

## 厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・リハビリテーション総合研究事業）

### 総合研究報告書

#### 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、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、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、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、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、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。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。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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L となるように添加して総体積 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 )で溶解した試薬をそれぞれのウェルに50 $\mu$ Lずつ加え、マイクロプレートリーダーで37 , 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。

分析能パラメータからは測定者(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。

$$\frac{(n-1)SD^2 / {}^2(n-1, 0.05)}{{}^2(n-1, 0.95)} \quad (n-1)SD^2$$

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 /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 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)-D-グルカン (以下 BG) による反応干渉を確認するため、5 $\mu$ g/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<sup>3)</sup>、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）に収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）に収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：

水溶性固形原料 - 乳糖  
不溶性固形原料 - タルク、ステアリン酸  
マグネシウム  
色素 - 黄色5号  
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25mm、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、3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 から の調査・検討を実施し、試験条件を確定した。

#### 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。

### 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。

### 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  $\mu\text{L}$  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。

### 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 $\mu\text{L}$  (キャリアー表面の消毒剤を回収する液量は 100 $\mu\text{L}$  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 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

#### 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| 0.980)に適合した(表 I-5-1)。

#### 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)。

#### 精度

##### -1. 併行精度

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)。

## -2. 室内再現精度

-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. 室間再現精度

-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)。

## 範囲

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

## 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)。

## 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<sup>9)</sup>。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、エステルア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。

#### 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。

#### 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。

#### 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

##### 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。

## 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

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

カプトガニ血球成分を利用することによる資源の枯渇、生態系への影響および環境保護の問題を解決するため、新しい学問および技術、すなわち組換え技術を用い、局方エンドトキシン測定用試薬の開発に取り組んだ。

まず組換え試薬の原料となる 3 つの酵素因子を組換えタンパク質として作製する際に、ウイルス法と安定発現細胞法という、2

つの異なる方法を検討した。培養時間の経過に伴い、生産した組換え酵素因子が、前者では分解を受け、後者では安定に存在することがわかった。分解を受けた因子の活性を確認すると、Et に依存しない活性化がみられ、組換え試薬としては使用できない性能であった(データ示さず)。安定発現細胞から得られた3つの酵素因子でカスケード反応を再構成すると、30分という短い測定時間で、天然カプトガニ由来のライセート試薬と同等に低Et濃度を測定できた。よって、安定発現細胞から得られたこれらの原料を用いて製品の形状である凍結乾燥製剤を作製し、組換え試薬がEt測定に必要なかつ十分な性能を有していることを検証した。

分析法バリデーションに記載される分析性能パラメータについて、日本薬局方、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、既存試薬の性能を基にした基準を考慮して設定された判定基準への適合性を検証した。直線性については、日本薬局方の基準である0.980よりはるかに大きい相関係数を示した。また、真度についても回収率は73~104%の範囲に入り、日本薬局方の基準である50~200%より理論値に近く、高い性能を示した。併行精度、室内再現精度および室間再現精度、また定量限界(反応時間法)については、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記載された要求基準に適合した。また、特異性も既存試薬と同等であったことから、組換え試薬は今回検討した条件においてEt測定に必要な基本性能を有していることを確認した。

組換え試薬とライセート試薬との同等性の検証について、2.(1)に示した試験条件で

注射剤の反応干渉と各種EtのUSPRSEに対する相対活性を指標に評価した。

反応干渉因子試験において組換え試薬は反応時間法と反応速度法でNIDが大きく異なるものが認められた。その一例として、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。しかし解析条件を変更することで、NIDは反応速度法のそれと同じく4倍となった。このように一部の注射剤は反応速度法と反応時間法でNIDが異なったが、それら注射剤に適した解析条件を設定することでNIDは両解析法で概ね同等となった。

各種EtのUSPRSEに対する相対活性は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、高い相関を示し、それらの回帰直線は1と有意差がない傾きを示した。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に対する相対活性から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I-7)。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-7)。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。

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、入手可能であった注射

剤全てを測定可能であった。また、各種 Et の USPRSE に対する相対活性は組換え試薬とライセート試薬で同等であったことから、組換え試薬はライセート試薬と同等の性能を有していることを確認した。

日本薬局方では「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。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。原料ロットを変えて、連続して製造した 3 ロットの組換え試薬は、分析法バリデーションによる評価において、各種基準に全て適合した。これは高品質な製品を恒常的に生産可能であることを示唆している。組換え試薬が日本薬局方に収載されるためには、製品の品質がロット毎に一定であることが必要である。今後、組換え試薬のロット間差をライセート試薬と比較することで明らかにしていく予定である。

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思う。

「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング」「滅菌及び滅菌指標体」はともに無菌医薬品製造技術の変化に合ったものに改正してゆく必要がある。今回の改定案においてはいくつかの新しい概念と技術の取り入れを達成しており、また使いやすくなりやすいものと考えられる。

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思う。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。

これら医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法の新規導入・改良作業および指針の作成はグローバル化している医薬品業界にとっては国際調和を伴った医薬品の安全性向上に必須の要件であり、より安全な無菌医薬品の供給を可能にするものであることから、国民の保健・医療・福祉の向上に大いに貢献するものである。

## E. 結 論

医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法の新規導入のため、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。

組換え因子を使い Et 定量反応の再構成に成功し、組換え試薬を作製した。組換え試薬は、分析法バリデーションに記載の全ての分析能パラメータにおいて判定基準に適合したことから、Et の測定に必要な基本性能を有していることが検証できた。また、組換え試薬は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、入手可能であった注射剤全ての測定が可能であった。さらに、組換え試薬の各種 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。これらのことから組換え試薬はライセート試薬と同等の性能を有しており、組換え技術を用いて作製した原料で調製し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、日本薬局方のエンドトキシン試験に使用可能であると言える。

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。

国内の無菌医薬品製造において必要な情報の再整理を、最新の情報を取り入れ、PIC/S との整合性もよく考慮して 2 編の参考情報の改定案を作成した。

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., Shima K., Igarashi M., Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1841-1845 (2012)
- 2) 室井正志、杉浦友香、廣野泰亮、棚元憲一：エンドトキシン試験法の代替法の開発に関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、**44**, 177-182 (2013)
- 3) 杉浦友香、廣野泰亮、室井正志、棚元憲一：分析法バリデーションによる光散乱エンドトキシン測定法の評価、日本防菌防黴学会誌、**41**, 187-196 (2013)
- 4) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yan-Yan Hu, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: A ten years (2000-2009) surveillance of resistant *Enterobacteriaceae* in Zhejiang Province, China. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **23**, 11609-11618 (2012)
- 5) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Kitaguchi, Masao Nasu.: Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and active *Pseudomonas* spp. in milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 746-750 (2012)
- 6) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yong-Lu Huang, Jia-Chang Cai, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: High prevalence of qnr and aac(6)-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ.*, **27**, 158-163 (2012)
- 7) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Sakotani, Tomoaki Ichijo, Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1187-1190 (2012)
- 8) Nobuyasu Yamaguchi, Tomoaki Ichijo, Akiko Sakotani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Scientific Reports*, **2**, 525-510 (2012)
- 9) Takashi Baba, Naoko Inoue, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu.: Rapid enumeration of active *Legionella pneumophila* in freshwater environments by the microcolony method combined

- with direct fluorescent antibody staining. *Microbes Environ.*, **27**, 324-326 (2012)
- 10) Kitajima T., Muroi M., Yamashita N., and Tanamoto K.: Toll-like receptors required for *Dermatophagoides farinae* to activate NF- $\kappa$ B. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 74-80 (2014)
- 11) Shah N., de Oca M.M., Jover-Cobos M., Tanamoto K., Muroi M., Sugiyama K., Davies N.A., Mookerjee R.P., Dhar D.K., Jalan R.: Role of Toll-like receptor-4 in mediating multi-organ dysfunction in acetaminophen induced acute liver failure in mice. *Liver Transpl.*, **19**, 751-761 (2013)
- 12) Ogura N., Muroi M., Sugiura Y. and Tanamoto K.: Lipid IVa incompletely activates MyD88-independent Toll-like receptor 4 signaling in mouse macrophage cell lines. *Pathogens and Disease*, **67**, 199-205 (2013)
- 13) Nobuyasu Yamaguchi, Takahiro Nishiguchi, Fuangfa Utrarachkij, Orasa Suthienkul, Masao Nasu.: 16S ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis of abundant bacteria in river, canal and potable water in Bangkok, Thailand. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 872-876 (2013)
- 14) Tomoaki Ichijo, Hatsuki Hieda, Rie Ishihara, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu.: Bacterial monitoring with adhesive sheet in the International Space Station-“Kibo”, the Japanese Experiment Module. *Microbes Environ.*, **28**: 264-268 (2013)
- 15) Nobuyasu Yamaguchi, Syuhei Matsukawa, Yoko Shintome, Tomoaki Ichijo, Masao Nasu.: Microchip-based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for on-site analysis of bacterial communities in freshwater. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 1305-1309 (2013)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) Muroi M. and Tanamoto K.: Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages. *Toxicol. Lett.*, in press
- 2 . 学会発表
- 1) 小倉紀彦、杉浦由香、室井正志、棚元憲一：Lipid A 類縁体による Toll-like receptor 4 の MyD88 依存的・非依存的経路の活性化比較、日本薬学会第 133 年会（2013, 3）
- 2) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：ゲルタルアルデヒドを用いた蛍光活性染色法による生菌数の迅速測定、第 24 回微生物シンポジウム（2012, 9）
- 3) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：蛍光活性染色による生菌数の迅速測定



- における蛍光増強法の検討、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2012, 12)
- 4) 佐野 彩香、山口 進康、川井 真好：蛍光染色を用いた細菌数測定法の多様な医薬品への応用、日本薬学会第 133 年会 (2013, 3)
  - 5) 杉浦 友香、高橋 晴也、室井 正志、棚元 憲一：IRAK-1 による TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 構造領域の検討、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
  - 6) 北島孝明、石黒希、室井正志、山下直美、棚元憲一：コナヒョウヒダニ抽出物による NF- $\kappa$ B の活性化に關与する Toll-like receptor の同定、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
  - 7) 佐野 彩香、藤尾 実穂、更家 信、山口 進康、川井 真好：蛍光染色による細菌数測定法の医薬品原料への適用、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2013, 10)
  - 8) 藤尾 実穂、佐野 彩香、更家 信、山口 進康、川井 真好：蛍光染色を用いた細菌数迅速測定法の固形医薬品原料への適用、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) M. Kawai, J. Yamagishi. Resistance mechanisms of Triclosan in Staphylococci. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
  - 12) 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)
  - 13) 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)
  - 14) 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)
  - 15) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラ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 日 - 28 日 (神戸)
  - 16) 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)

## H . 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 杉山圭一、棚元憲一、室井正志：新規ペプチド、これを用いたエンドトキシ

ン由来疾患治療剤およびこの治療剤の探索方法 平成 24 年 7 月 27 日 特許

測定試料に含まれるエンドトキシン

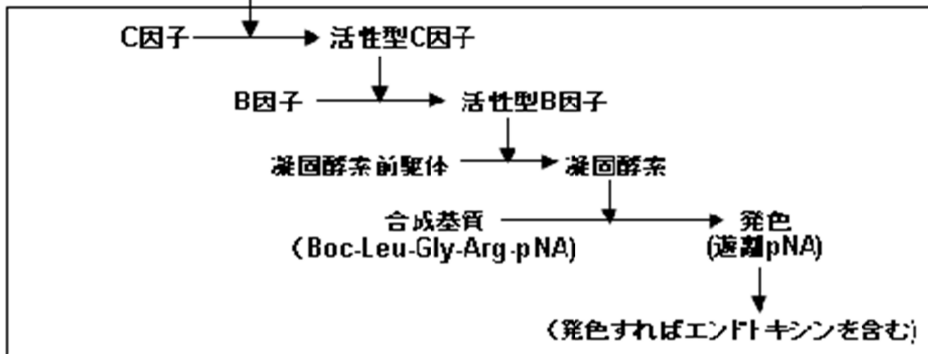


図 I-1 Et 測定において、ライセート試薬内で起こる反応を模式的に示す。測定試料に含まれる Et が C 因子を活性化し、活性化 C 因子は B 因子を、活性化 B 因子は凝固酵素前駆体を順次切断、活性化し、最終的には発色合成基質である Boc-Leu-Gly-Arg-pNA が切断され、遊離の pNA が発色する。

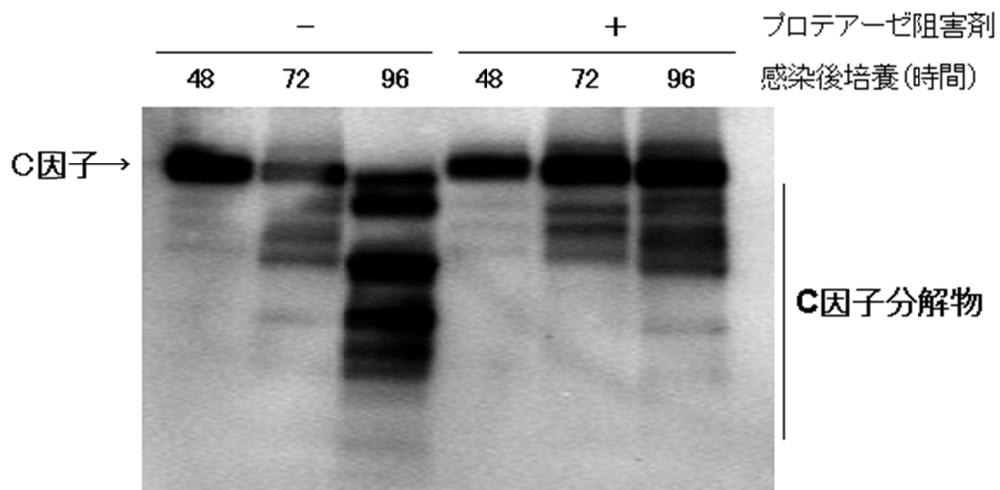


図 I-2 ウイルス法で作製した組換え C 因子を含む培養上清に対する、抗 C 因子特異的抗体によるウエスタンブロッティング。

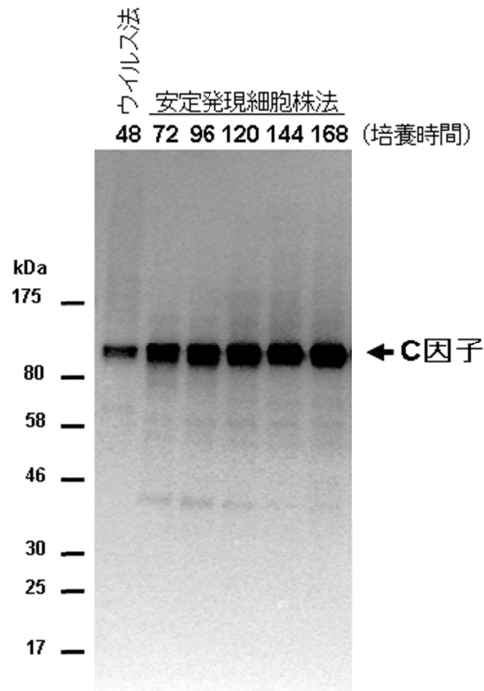


図 I-3 安定発現細胞法で作製した組換え C 因子を含む培養上清に対する、抗 C 因子特異的抗体によるウエスタンブロットング。

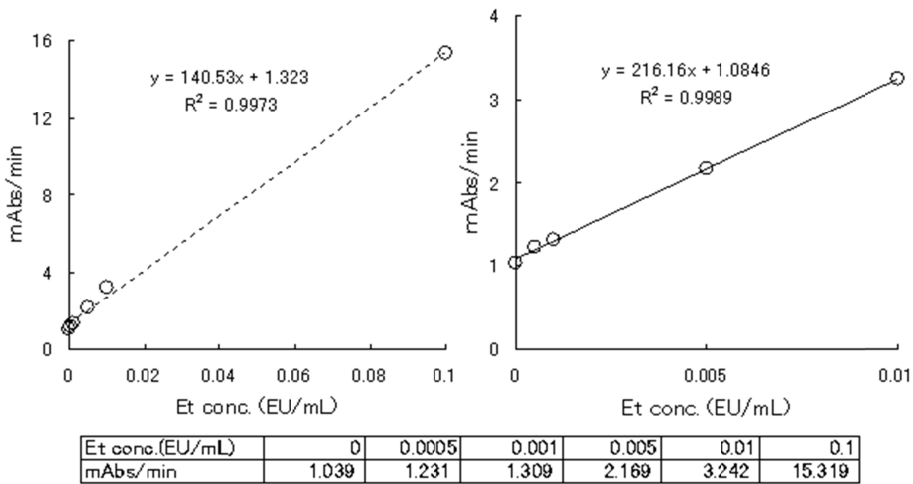


図 I-4 安定発現細胞法で作製した組換え試薬による Et に対する用量反応性。左：Et 濃度 0-0.1 EU/mL、右：Et 濃度 0-0.01 EU/mL の範囲での結果をそれぞれプロットした。吸光度変化率 (mAbs/min) は 2 回測定の前平均値であらわした。

表 I-1 組換え試薬のロットと原料ロット

組換え試薬 ロット	主原料ロット*		
	C 因子	B 因子	凝固酵素前駆体
#1	C1	B1	P1
#2	C2	B2	P2
#3	C3	B3	P3

3 種のプロテアーゼ前駆体の組換え酵素は全て異なる（独立した）ロットを用いた。

表 I-2 分析能パラメータと測定法、結果の解析法および判定基準

分析能パラメータ	評価方法		判定基準
直線性	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の回帰直線における各 Et 濃度と吸光度変化率を xy プロットし、相関係数を求める。	r  0.980 <sup>a)</sup>
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の回帰直線における各 Et 濃度と吸光度の閾値への到達時間 (Onset time) の対数値を xy プロットし、相関係数を求める。	
真度 (回収率)	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率を算出する	50 - 200 % <sup>a)</sup>
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率を算出する。	
精度			
-1 併行精度	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値を算出し、その CV を求める	CV 反応速度法 @ 0.00625 EU/mL 20% <sup>b)</sup> @ 0.0125 - 0.1 EU/mL 15% <sup>b)</sup> 反応時間法 @ 0.005 EU/mL 20% <sup>b)</sup> @ 0.05 - 50 EU/mL 15% <sup>b)</sup>
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値を算出し、その CV を求める	
-2 室内再現精度	併行精度検討で用いた各 Et 濃度における Et 測定値の平均値を算出し、それら合計 12 測定で得られた Et 測定値の CV の 90%信頼区間を求める。		CV 反応速度法 @ 0.00625 EU/mL 20% <sup>b)</sup> @ 0.0125 - 0.1 EU/mL 15% <sup>b)</sup> 反応時間法 @ 0.005 EU/mL 20% <sup>b)</sup> @ 0.05 - 50 EU/mL 15% <sup>b)</sup>
-3 室間再現精度 反応時間法 のみ	2 施設で得られた各 Et 濃度における Et 測定値の平均値を算出し、それら合計 18 測定で得られた Et 測定値を対数変換し、その CV の 90%信頼区間を求める。		CV @ 0.005 EU/mL 20% <sup>b)</sup> @ 0.05 - 50 EU/mL 15% <sup>b)</sup>

		2施設（因子1）および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う。	2つの施設で得られた測定値の分散に5%の水準で有意差が無いこと。				
	範囲	分析法の直線性、真度および精度が判定基準を満たす測定範囲を求める。	分析能パラメータ1,2および3-1の全てが判定基準を満たすこと b)。				
	定量限界 （下限） LOQ	<table border="1"> <tr> <td>反応速度法</td> <td>ブランク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する。合計9回の測定で得られた結果の95%信頼区間を求める。</td> </tr> <tr> <td>反応時間法</td> <td>定量限界（0.005 EU/mL）における真度および精度を評価する。</td> </tr> </table>	反応速度法	ブランク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する。合計9回の測定で得られた結果の95%信頼区間を求める。	反応時間法	定量限界（0.005 EU/mL）における真度および精度を評価する。	なし
反応速度法	ブランク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する。合計9回の測定で得られた結果の95%信頼区間を求める。						
反応時間法	定量限界（0.005 EU/mL）における真度および精度を評価する。						
	特異性 （BGとの反応性） 反応速度法のみ	BGを5 $\mu$ g/mLとなるように添加または添加しない0.0125 - 0.1 EU/mL（2倍希釈列）の直線の回帰式を比較する。	BG添加および無添加条件下で回帰分析を行い、5%危険率で切片が0を含みかつ傾きが1を含むこと c)。				

a) 日本薬局方エンドトキシン試験法予備試験

b) 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

c) 既存試薬の性能を参考に設定

表 I-3 試験に使用した試薬および測定条件

No.	名称	測定原理・ 解析法	測定時間 (分)	閾値	標準品濃度 (EU/mL)	測定波長	測定機
1	組換え試薬	比色法・ 反応速度法 <sup>1)</sup>	30	/	0.00625 – 0.1 (2 倍希釈)	2 波長 主波長: 405nm 参照波長: 492nm	ウェルリーダー (生化学工業)
2	ライセート試薬1						
3	組換え試薬	比色法・ 反応時間法 <sup>2)</sup>	30	0.015 Abs	0.005 – 50 (10 倍希釈)	1 波長 405nm	ELx808IU (Biotek)
			60 <sup>4)</sup>	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 <sup>3)</sup>	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) 一部の注射剤測定において 60 分測定を実施した。

表 I-4 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。



表 I-5-1 各分析能パラメータにおける結果および判定

分析能パラメータ	結果				判定
	反応速度法 (JPRSE)		反応時間法 (USPRSE)		
直線性 (相関係数; 絶対値)	0.00625 - 0.1 EU/mL 0.999 - 1.000		0.005 - 50 EU/mL 1.000		適合
真度 (回収率)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
	0.00625	72.7 - 99.4	0.005	94.7 - 103.6	
	0.0125	94.2 - 101.3	0.05	91.6 - 103.1	
	0.025	100.0 - 105.4	0.5	99.1 - 108.2	
	0.05	100.3 - 105.4	5	100.1 - 109.4	
	0.1	98.5 - 99.8	50	92.4 - 99.3	
精度					
-1 併行精度 (CV)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
	0.00625	3.1 - 11.0	0.005	5.9 - 15.7	
	0.0125	1.4 - 7.2	0.05	5.7 - 14.9	
	0.025	1.5 - 6.5	0.5	6.4 - 11.4	
	0.05	1.4 - 5.4	5	3.3 - 14.8	
	0.1	0.6 - 4.3	50	3.1 - 14.2	
-2 室内再現精度 (CV)	EU/mL	90%信頼区間 下限 - 上限(%)	EU/mL	90%信頼区間 下限 - 上限(%)	適合
	0.00625	7.3 - 15.2	0.005	0.3 - 0.7	
	0.0125	1.4 - 2.9	0.05	0.7 - 1.5	
	0.025	1.2 - 2.5	0.5	2.8 - 5.8	
	0.05	1.3 - 2.6	5	1.1 - 2.3	
	0.1	0.3 - 0.7	50	0.4 - 0.8	
3-3 室間再現精度 (CV)	実施せず。		EU/mL	90%信頼区間 下限 - 上限(%)	適合
			0.005	0.6 - 1.0	
			0.05	1.1 - 1.9	
			0.5	4.1 - 7.3	
			5	0.9 - 1.7	
	50	0.5 - 0.9			
範囲	0.00625 - 0.1 EU/mL		0.005 - 50 EU/mL		適合
定量限界 (下限)	95%信頼区間 下限 - 上限(%) 0.0008 - 0.0016 EU/mL		@ 0.005 EU/mL 真度: 95 - 104 % 併行精度: 6 - 16 %		反応 時間法 適合
特異性 (BG との反応性) 反応速度法のみ	回帰分析結果 (95%信頼区間) 切片: -0.133 - 0.126 傾き: 0.991 - 1.029		/		適合

表 I-5-2 各分析能パラメータにおける結果および判定 (反応速度法・Et 測定値と 95%信頼区間)

	定量値 (EU/mL)	SD (EU/mL)	95%信頼区間 下限 - 上限(%)
ブランク	0.00011	0.00009	-0.0001 - 0.0003
0.00125 EU/mL	0.00129	0.00005	0.00119 - 0.00138

表 I-6-1 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
1	アシクロビル注射液	25 mg/mL	0.5 EU/mg	2	8	4	8	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
2	アスコルピン酸注射液	100 mg/mL	0.15 EU/mg	4	2	4	8	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
3	注射用アズトレオナム	333 mg/mL	0.10 EU/mg(力価)	32	64	16	128	32	
				5333	6667	5333	6667	4267	
4	アトロピン硫酸塩注射液	0.5 mg/mL	75 EU/mg	1	1	1	4	1	
				6000	7500	6000	7500	4800	
5	アミカシン硫酸塩注射液	100 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	16	2	64	4	
				8000	10000	8000	10000	6400	
6	注射用アミカシン硫酸塩	50 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	16	1	64	2	
				4000	5000	4000	5000	3200	
7	アミノフィリン注射液	25 mg/mL	0.6 EU/mg	16	16	8	4	8	
				2400	3000	2400	3000	1920	
8	注射用アムホテリシン B	4.2 mg/mL	3.0 EU/mg(力価)	8	8*	4	32	64	
				2000	2500	2000	2500	1600	
9	L-アルギニン塩酸塩注射液	100 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	8	8	4	16	4	
				80	100	80	100	64	
10	アルプロスタジル注射液	0.005 mg/mL	10 EU/mL	8	256	16	1	256	
				1600	2000	1600	2000	1280	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-2 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
11	アルベカシン硫酸塩注射液	50 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	4	4*	2	32	2	
				4000	5000	4000	5000	3200	
12	アレンドロン酸ナトリウム注射液	2.5 mg/mL	119 EU/mg	2	2	2	16	8	
				47600	59500	47600	59500	38080	
13	注射用アンピシリンナトリウム	250 mg/mL	0.075 EU/mg(力価)	8	32*	8	16	32	
				3000	3750	3000	3750	2400	
14	イオタラム酸ナトリウム注射液	66.8 %	3.4 EU/mL	32	64	16	32	32	
				544	680	544	680	435	
15	イセパマイシン硫酸塩注射液	200 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	32	4	128	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
16	イソニアジド注射液	50 mg/mL	0.50 EU/mg	4	4	4	4	4	
				4000	5000	4000	5000	3200	
17	イダルピシン塩酸塩		8.9 EU/mg(力価)						入手不可
18	注射用イダルピシン塩酸塩	1 mg/mL	8.9 EU/mg(力価)	128	512	128	16	8	
				1424	1780	1424	1780	1139	
19	注射用イミペネム・シラスタチンナトリウム	25 mg/mL	0.25 EU/mg(力価)	8	16	1	4	16	
				1000	1250	1000	1250	800	
20	インジゴカルミン注射液	4 mg/mL	7.5 EU/mg	4	16	4	16	32	
				4800	6000	4800	6000	3840	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-3 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
21	ヒトインスリン (遺伝子組換え)	100 単位/mL	0.8 EU/インスリン単位	4	2	2	8	2	
				12800	16000	12800	16000	10240	
22	エドロホニウム塩化物注射液	1 mg/mL	15 EU/mg	8	8	4	8	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
23	エフェドリン塩酸塩注射液	40 mg/mL	7.5 EU/mg	8	40	4	8	8	
				48000	60000	48000	60000	38400	
24	メチルエルゴメトリンマレイン酸塩注射液	0.2 mg/mL	1500 EU/mg	1	2	1	32	1	
				48000	60000	48000	60000	38400	
25	塩化カルシウム注射液	55.5 mg/mL	0.30 EU/mg	32	32	32	32	16	
				2664	3330	2664	3330	2131	
26	10%塩化ナトリウム注射液	10 %	3.6 EU/mL	2	2	4	16	2	
				576	720	576	720	461	
27	オキシトシン注射液	1 単位/mL	10 EU/単位	2	16	2	8	2	
				1600	2000	1600	2000	1280	
28	注射用オザグレルナトリウム	10 mg/mL	3.7 EU/mg	1	1	2	2	4	
				5920	7400	5920	7400	4736	
29	果糖注射液	20 %	0.5 EU/mL	4	4	2	4	2	
				80	100	80	100	64	
30	キシリトール注射液	5 %	0.50 EU/mL	1	1	1	1	1	
				80	100	80	100	64	

表 I-6-4 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
31	輸血用クエン酸ナトリウム注射液	100 mg/mL	5.6 EU/mL	1	1	4	64	4	
				896	1120	896	1120	717	
32	クリンダマイシンリン酸エステル注射液	150 mg/mL	0.1 EU/mg(力価)	128	64	16	32	32	
				2400	3000	2400	3000	1920	
33	クロルフェニラミンマレイン酸塩注射液	2 mg/mL	8.8 EU/mg	2	4	2	8	4	
				2816	3520	2816	3520	2253	
34	シアノコバラミン注射液	1000 μg/mL	0.30 EU/μg	2	2	1	4	2	
				48000	60000	48000	60000	38400	
35	ジゴキシン注射液	0.25 mg/mL	200 EU/mg	16	32	16	8	32	
				8000	10000	8000	10000	6400	
36	ジモルホラミン注射液	15 mg/mL	5.0 EU/mg <sup>a)</sup>	16	64	16	16	8	
				12000	15000	12000	15000	9600	
37	注射用水	-----	0.25 EU/mL						入手不可
38	注射用水(容器入り)	-----	0.25 EU/mL	1	1	1	1	1	
				-----	-----	-----	-----	-----	
39	スキサメトニウム塩化物注射液	22 mg/mL	2.0 EU/mg	1	2	1	8	1	
				7040	8800	7040	8800	5632	
40	注射用スキサメトニウム塩化物	100 mg/mL	1.5 EU/mg	8	8	4	16	8	
				24000	30000	24000	30000	19200	

a) 0.15w/v%に希釈して試験をおこなう。

表 I-6-5 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
41	注射用ストレプトマイシン硫酸塩	333 mg/mL	0.10 EU/mg	32 5333	128 6667	8 5333	1024 6667	16 4267	
42	血清性腺刺激ホルモン		0.1 EU/単位						入手不可
43	注射用血清性腺刺激ホルモン	200 単位/mL	0.1 EU/単位	16 <sup>b)</sup> 3200	1 4000	16 <sup>b)</sup> 3200	1 4000	16 <sup>b)</sup> 2520	
44	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン	75 単位/mL	0.66 EU/卵胞刺激ホルモン単位 <sup>a)</sup>	16 <sup>b)</sup> 7920	2 9900	4 <sup>b)</sup> 7920	1 9900	4 <sup>b)</sup> 6336	
45	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン		0.03 EU/単位						入手不可
46	注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	200 mg/mL	0.03 EU/単位	1 960	1 1200	1 960	1 1200	1 768	
47	生理食塩水	----- -----	0.50 EU/mL	1 80	1 100	1 80	2 100	1 64	
48	セファゾリンナトリウム水和物		0.10 EU/mg(力価)						入手不可
49	注射用セファゾリンナトリウム	333 mg/mL	0.05 EU/mg(力価)	32 2667	64 3333	32 2667	16 3333	32 2133	
50	セフェピム塩酸塩水和物		0.04 EU/mg(力価)						入手不可

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) Et 試験用水 1mL 当たり 75 卵胞刺激ホルモン単位を溶かし、試験を行うとき

b) サンプルが Et 汚染されていたため、検量範囲内測定が可能となるまで希釈 (実際の NID より大きい): 後日、データを入替

表 I-6-6 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	医薬品注射剤の名称	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	
51	注射用セフェピム塩酸塩	50 mg/mL	0.06 EU/mg(力価)	8 480	16 600	4 480	32 600	8 384	
52	セフォゾプラン塩酸塩		0.05 EU/mg(力価)						入手不可
53	注射用セフォゾプラン塩酸塩	100 mg/mL	0.05 EU/mg(力価)	16 800	64 1000	8 800	128 1000	16 640	
54	注射用セフォチアム塩酸塩	83.3 mg/mL	0.125 EU/mg	16 1667	16 2083	8 1667	64 2083	32 1333	
55	注射用セフトジジム	200 mg/mL	0.067 EU/mg(力価)	32 2144	64 2680	8 2144	64 2680	16 1715	
56	セフピロム硫酸塩	50 mg/mL	0.10 EU/mg	16 800	32 1000	8 800	32 1000	8 640	
57	注射用セフメタゾールナトリウム	400 mg/mL	0.06 EU/mg	32 3840	32 4800	64 3840	64 4800	64 3072	
58	セルモロイキン (遺伝子組換え)	40 万単位/mL	100 EU/mL	1 16000	2* 20000	1 16000	64 20000	2 12800	
59	タゾバクタム <sup>a)</sup>	450 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	128 2880	128 3600	64 2880	64 3600	128 2304	
60	炭酸水素ナトリウム注射液	0.7 mg/mL	5.0 EU/mEq	4 560	4 700	4 560	8 700	8 448	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) 参考：注射用タゾバクタムナトリウム・ピペラシリンナトリウム

表 I-6-7 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
61	注射用チアミラルナトリウム	25 mg/mL	1.0 EU/mg	32	16	16	16	16	
				4000	5000	4000	5000	3200	
62	チアミン塩化物塩酸塩注射液	50 mg/mL	6.0 EU/mg	8	16*	4	128	32	
				48000	60000	48000	60000	38400	
63	注射用チオペンタールナトリウム	25 mg/mL	0.30 EU/mg	32	16	16	128	32	
				1200	1500	1200	1500	960	
64	チオ硫酸ナトリウム水和物	100 mg/mL	0.01 EU/mg	8	16	2	32	4	
				160	200	160	200	128	
65	テイコプラニン注射用	66.7 mg/mL	0.75 EU/mg(力価)	512	1024*	512	512	256	
				8000	10000	8000	10000	6400	
66	デキストラン 40	0.1 g/mL	2.5 EU/g	1	2	1	4	4	
				40	50	40	50	32	
67	デキストラン 40 注射液 <sup>a)</sup>	100 mg/mL	0.50 EU/mL	1	1	1	64	4	
				80	100	80	100	64	
68	デスラノシド注射液	0.2 mg/mL	500 EU/mg	4	8	4	2	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
69	テセロイキン(遺伝子組換え)		5 EU/たん白質 1mg						入手不可
70	注射用テセロイキン(遺伝子組換え)	35 万単位/mL	5 EU/35 万単位	2	2	2	8	2	
				28000	35000	28000	35000	22400	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) 低分子デキストラン加乳酸リンゲル液



表 I-6-8 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
71	デヒドロコール酸注射液	100 mg/mL	0.30 EU/mg	64	64	32	32	64	
				4800	6000	4800	6000	3840	
72	注射用ドキシルピシン塩酸塩	10 mg/mL	2.50 EU/mg(力価)	256	128*	32	32	64	
				4000	5000	4000	5000	3200	
73	ドパミン塩酸塩注射液	20 mg/mL	4.2 EU/mg	8	4	2	4	4	
				13440	16800	13440	16800	10752	
74	トブラマイシン注射液	60 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	32	32*	4	512	8	
				4800	6000	4800	6000	3840	
75	トラネキサム酸注射液	50 mg/mL	0.12 EU/mg	2	4	2	2	2	
				960	1200	960	1200	768	
76	ニカルジピン塩酸塩注射液	1 mg/mL	8.33 EU/mg	16	16	16	8	8	
				1333	1666	1333	1666	1066	
77	ニコチン酸注射液	50 mg/mL	3.0 EU/mg	8	8	8	16	16	
				24000	30000	24000	30000	19200	
78	ネオスチグミンメチル硫酸塩注射液	0.5 mg/mL	5 EU/mg	1	1	1	2	1	
				400	500	400	500	320	
79	ノルアドレナリン注射液	1 mg/mL	300 EU/mg	2	2	2	4	4	
				48000	60000	48000	60000	38400	
80	精製白糖	100 mg/mL	0.25 EU/mg	2	1	8 <sup>a)</sup>	1	1	
				4000	5000	4000	5000	3200	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) サンプルが Et 汚染されていたため、検量範囲内測定が可能となるまで希釈（実際の NID より大きい）

表 I-6-9 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
81	バソプレシン注射液	20 単位/mL	15 EU/バソプレシン	4	32	4	32	4	
				48000	60000	48000	60000	38400	
82	パニペナム	25 mg/mL	0.15 EU/mg(力価)	16	16	8	8	8	
				600	750	600	750	480	
83	パパベリン塩酸塩注射液	40 mg/mL	6.0 EU/mg	256	1024	64	128	64	
				38400	48000	38400	48000	30720	
84	注射用バンコマイシン塩酸塩	100 mg/mL	0.25 EU/mg	128	512	64	128	128	
				4000	5000	4000	5000	3200	
85	注射用ヒドララジン塩酸塩	20 mg/mL	5.0 EU/mg	16	16*	8	32	16	
				16000	20000	16000	20000	12800	
86	ピペラシリン水和物		0.07 EU/mg(力価)						入手不可
87	注射用ピペラシリンナトリウム	200 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	64	128	64	32	64	
				1280	1600	1280	1600	1024	
88	ピリドキシリン塩酸塩注射液	10 mg/mL	3.0 EU/mg	4	8	2	128	16	
				4800	6000	4800	6000	3840	
89	注射用ビンブラスチン硫酸塩	2 mg/mL	10 EU/mg	16	32	8	8	2	
				3200	4000	3200	4000	2560	
90	ファモチジン注射液	10 mg/mL	15 EU/mg	8	16*	8	16	16	
				24000	30000	24000	30000	19200	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-10 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
91	注射用ファモチジン	10 mg/mL	15 EU/mg	4	8	2	16	8	
				24000	30000	24000	30000	19200	
92	フェノールスルホンフタレイン注射液	6 mg/mL	7.5 EU/mg	16	128*	16	64	64	
				80	100	80	100	64	
93	ブドウ糖注射液	50 %	0.50 EU/mL	16	16	8	32	4	
				80	100	80	100	64	
94	注射用プレドニゾンコハク酸エステルナトリウム	10 mg/mL	2.4 EU/プレドニゾン 1mg 対応量	16	16	16	8	32	
				3840	4800	3840	4800	3072	
95	プロカイン塩酸塩注射液	20 mg/mL	0.02 EU/mg	8	32	4	16	8	
				64	80	64	80	51	
96	プロカインアミド塩酸塩注射液	100 mg/mL	0.30 EU/mg	32	64	16	32	32	
				4800	6000	4800	6000	3840	
97	フロセミド注射液	10 mg/mL	1.25 EU/mg	4	4	8	8	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
98	プロタミン硫酸塩注射液	10 mg/mL	6.0 EU/mg	256	1024	4	4096	8	
				9600	12000	9600	12000	7680	
99	注射用フロモキシセフナトリウム	250 mg/mL	0.025 EU/mg(力価)	32	64	16	32	32	
				1000	1250	1000	1250	800	
100	ペチジン塩酸塩注射液	50 mg/mL	6.0 EU/mg	16	32*	32	64	32	
				48000	60000	48000	60000	38400	

\* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-11 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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	
				400	500	400	500	320	
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 I-6-12 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	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

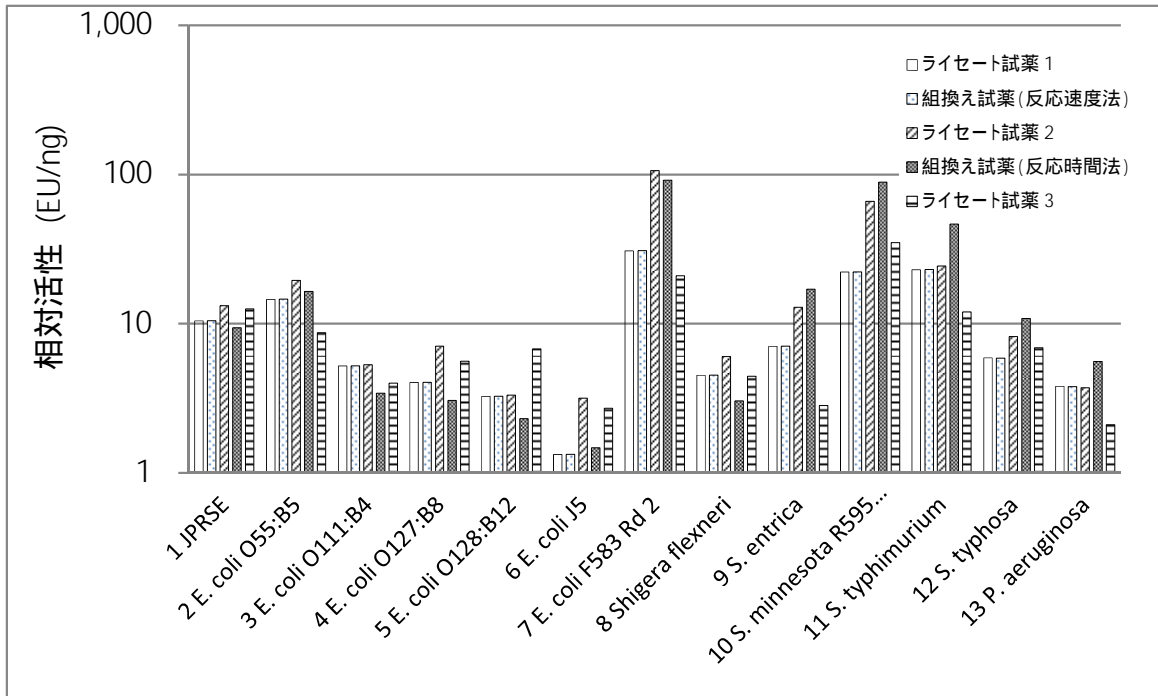


図 I-5 各種 Et の USPRSE に対する相対活性

表 I-7 組換え試薬とライセート試薬の各種 Et 相対活性の回帰分析結果

組合 わせ	x 軸	y 軸	傾き			y 切片			相関 係数
			傾き	95%信頼限界		y 切片	95%信頼限界		
				下限	上限		下限	上限	
A	L1	組換え試薬 反応 速度法	0.958	0.717	1.199	0.153	-0.046	0.353	0.935
B	L2		0.768	0.570	0.965	0.057	-0.168	0.283	0.932
C	L3		0.895	0.470	1.321	0.113	-0.272	0.498	0.813
D	L1	組換え試薬 反応 時間法	1.433	1.044	1.822	0.150	-0.395	0.248	0.926
E	L2		1.177	0.912	1.443	-0.297	-0.552	0.056	0.947
F	L3		1.259	0.537	1.981	0.384	-0.719	0.586	0.757
G	L1	L2	1.202	0.985	1.418	0.161	-0.019	0.339	0.965
H	L1	L3	0.852	0.604	1.100	0.206	0.000	0.411	0.916
I	L2	L3	0.626	0.355	0.897	0.180	-0.130	0.490	0.837

ライセート試薬を L と表記する。

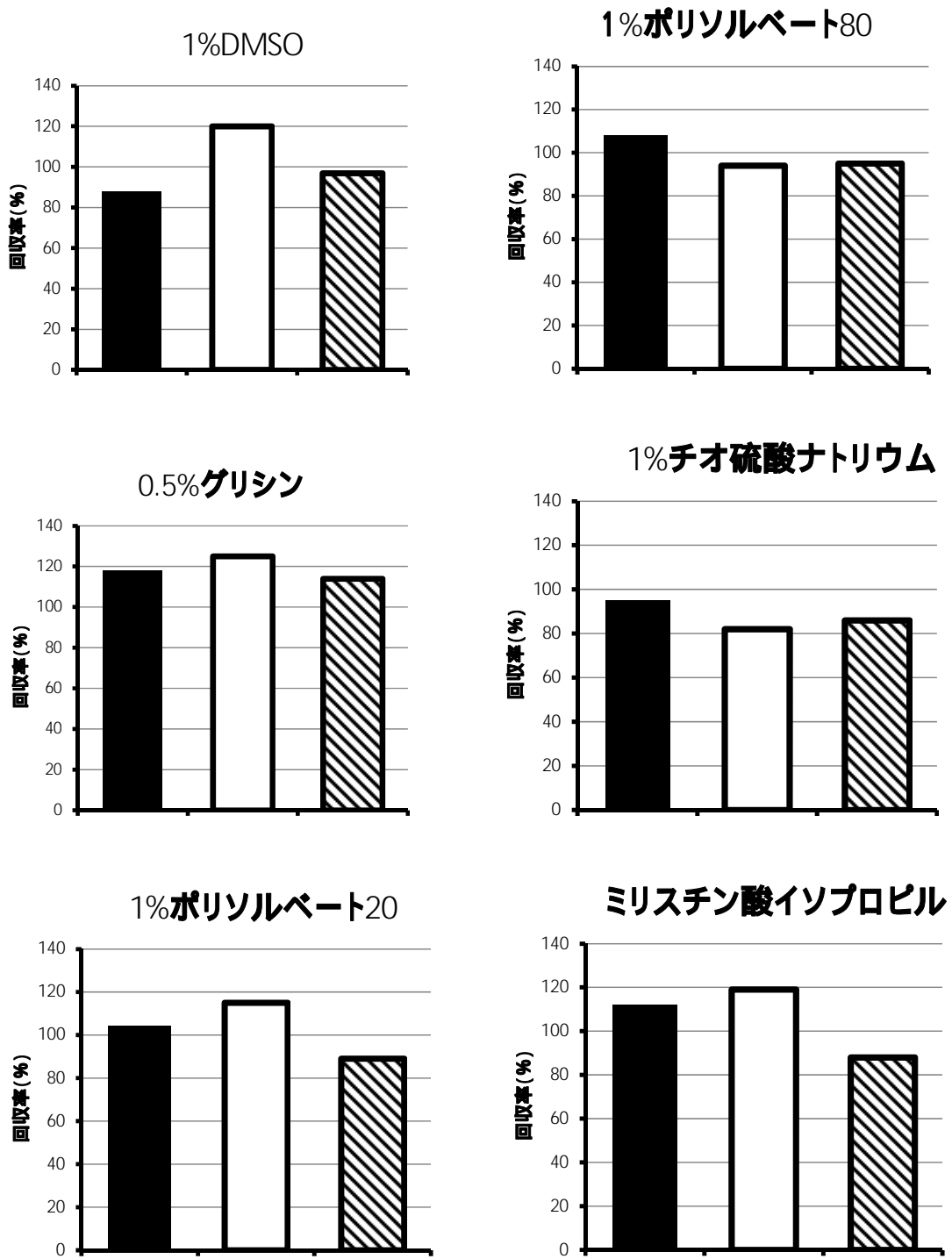


図 II-1 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 DAPI の染色性への影響

■ *S. aureus*    □ *B. subtilis*    ▨ *E. coli*

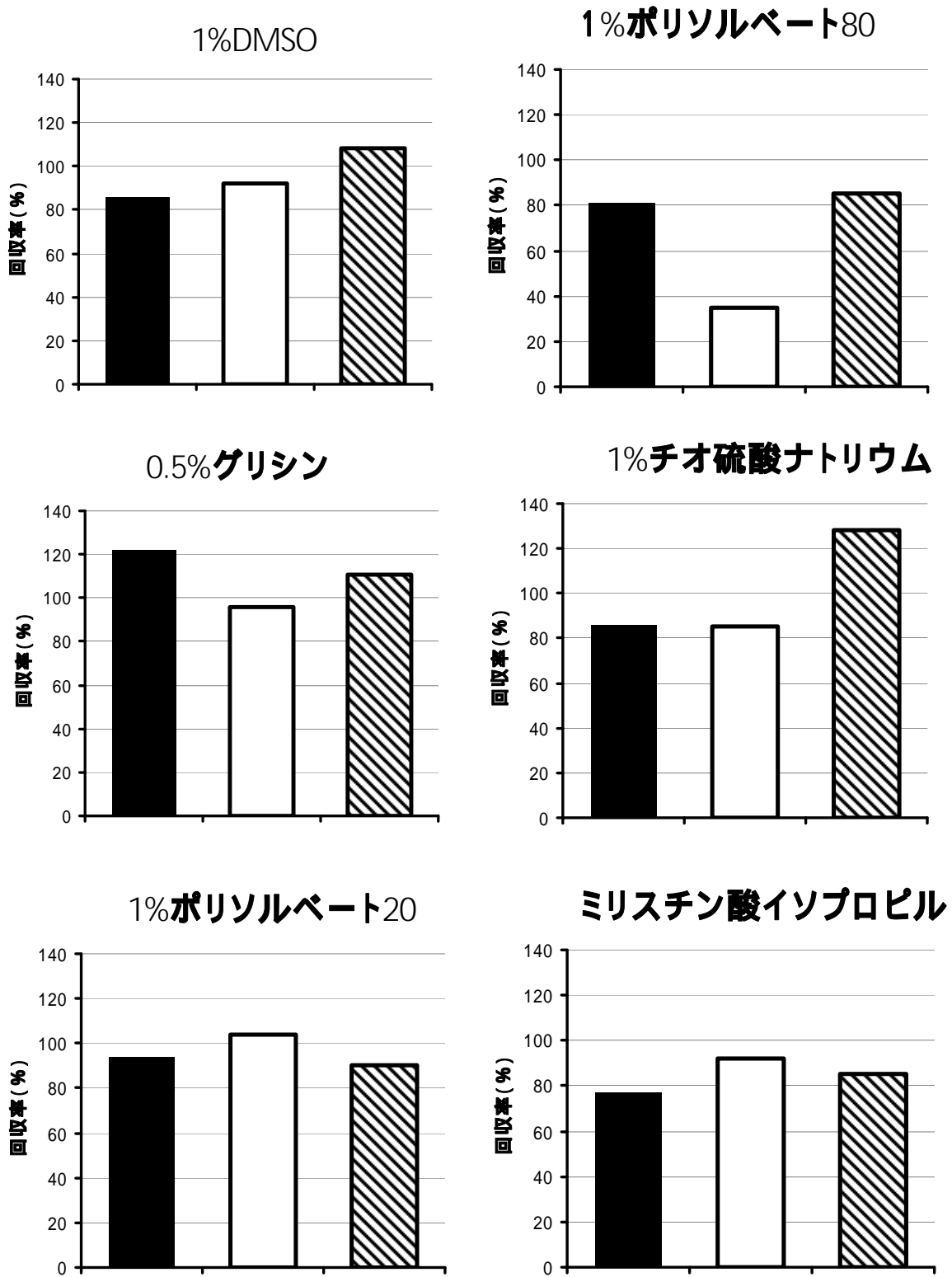


図 II-2 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 CFDA の染色性への影響

■ *S. aureus*    □ *B. subtilis*    ▨ *E. coli*



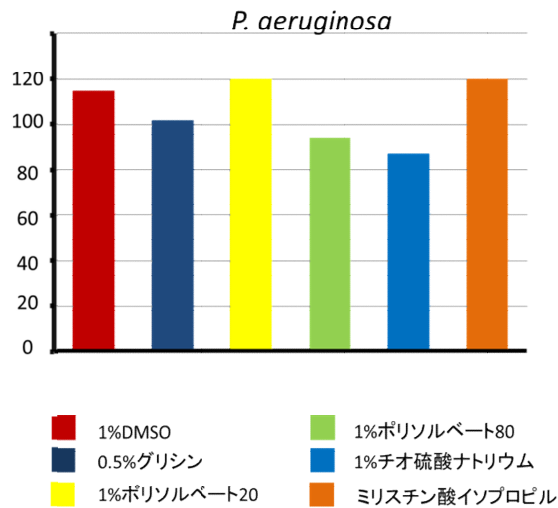


図 II-3 .各中和剤・溶解剤が DAPI 染色に与える影響

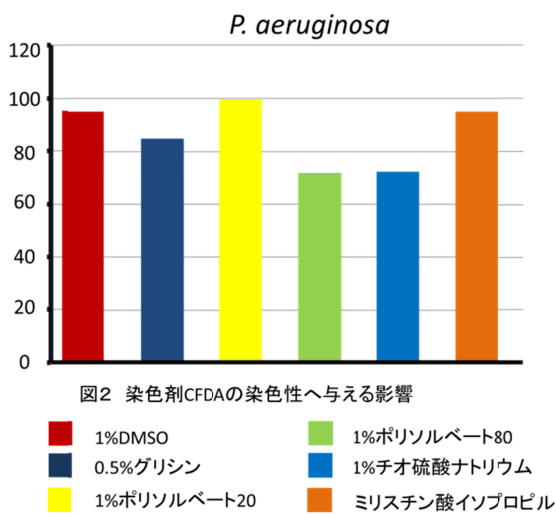


図 II-4 .各中和剤・溶解剤が CFDA 染色に与える影響

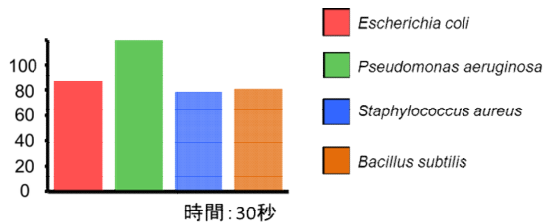


図 II-5 .CFDA 染色に n-オクタン 与える影響

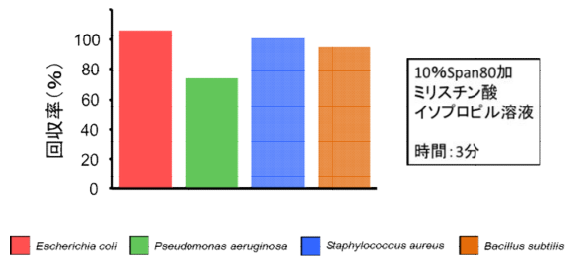


図 II-6 .CFDA 染色に n-オクタン 与える影響

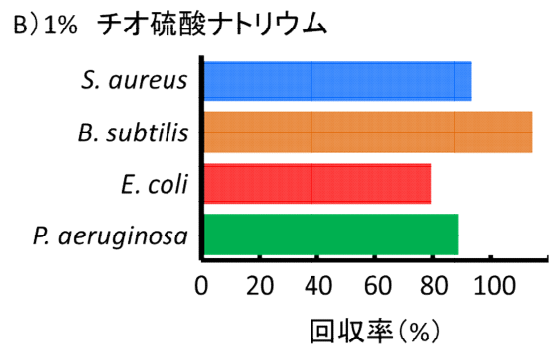
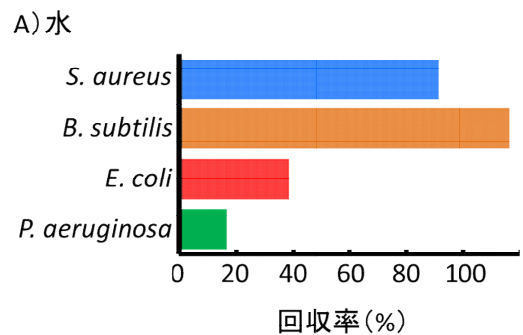


図 II-7 .色素中に添加した細菌の 蛍光染色法による検出

表 II-1 . マクロゴールに添加した細菌の回収率

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

表 II-2 . 白色ワセリンを溶解するための溶媒の検討

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	○

表 II-3 . 白色ワセリンに添加した細菌の回収率

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

表 II-4 . 吸水軟膏に添加した細菌の回収率

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

表 II-5 . 抗菌剤に添加した細菌の回収率

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.0X10 <sup>6</sup>	1.2X10 <sup>6</sup>	110
<i>B. subtilis</i>	5.3X10 <sup>5</sup>	6.0X10 <sup>5</sup>	112
<i>E. coli</i>	4.8X10 <sup>5</sup>	5.7X10 <sup>5</sup>	118
<i>P. aeruginosa</i>	9.1X10 <sup>5</sup>	5.4X10 <sup>4</sup>	76

抗菌薬:アンピシリン

表 II-6 . 非無菌製剤の賦形剤の生菌数の測定

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	$4.4 \times 10^3$	<2.5	<2.5
A3A29	$3.8 \times 10^3$	<2.5	<2.5

- 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	$3.4 \times 10^6$	375	<25
45071	$1.1 \times 10^4$	275	25

- 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	$7.3 \times 10^5$	<25	<25
2014G6090	$1.1 \times 10^4$	50	<25

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	$1.0 \times 10^4$	<500	<500

- 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	$3.4 \times 10^3$	0.67	<0.33
864930	$2.7 \times 10^4$	0.33	<0.33

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	$5.1 \times 10^5$	<2.5	<2.5
P4I65	$6.9 \times 10^5$	<2.5	<2.5
P4I66	$5.6 \times 10^5$	2.5	<2.5

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	$5.3 \times 10^5$	<2.5	<2.5
044924	$5.4 \times 10^7$	<2.5	<2.5

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%
クオルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%

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

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

表 III-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 <sup>1</sup>	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。

## 添付資料 I-1

### 無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法

参考情報 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法を次のように改める。

本法は、無菌医薬品製造区域の清浄度評価方法及び許容基準を示す。本法の主な目的は、①無菌医薬品製造区域がそれぞれ設計された清浄度、微生物制御を達成し、維持していることを確認すること、及び②無菌医薬品製造環境中の微粒子数、微生物数が適切に制御されていることを確認することである。

本法に示す評価方法及び許容基準を参考に、製造設備ごとにリスクアセスメントを実施し、リスクに応じた基準値を設定すること。また測定方法については、合理的な根拠に基づき代替法を用いることができる。

#### 1. 用語の定義

本法で用いる用語の定義は、次のとおりである。

- (i) 処置基準(アクションレベル)：モニタリング対象物の数(微生物の場合は必要に応じて種)に対して設定した基準をいい、この値に達した場合には直ちに調査を行い、その結果に基づいて是正措置をとる。
- (ii) 警報基準(アラートレベル)：モニタリング対象物の数(微生物の場合は必要に応じて種)に対して設定した基準で、予知される問題点を早期に警告する値をいう。
- (iii) 無菌操作法：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び職員を規制している管理された環境下で行われる無菌医薬品の充填やその他の作業を指す。
- (iv) 無菌操作区域：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び職員を規制している高度に管理された環境をいう。無菌操作区域は、更にグレードAとグレードBに分けられる。
- (v) 微生物：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称。ただし、本法では細菌及び真菌を指す。
- (vi) 作業シフト：同じ職員又はグループによってなされる一定の作業又は作業時間をいう。
- (vii) リスクアセスメント：ICH Q9の品質リスクマネジメントに従って危害を引き起こすハザードを特定し、分析し、評価する一連のプロセスをいう。本法において危害とは、製品又は製造区域を汚染させることを指す。ハザードとは、これらの危害を引き起こすヒト、環境、作業内容の要因をいう。リスクは危害の発生確率とそれが顕在化した場合の重大性の組み合わせで表現される。
- (viii) 校正(キャリブレーション)：標準器、標準試料などを用いて計測器の表示値と真の値との関係を求め適切に使用できる状態にすること。
- (ix) 非作業時：製造設備を据え付けて稼働させているが、これらを運用する職員がいない状態のことをいう。
- (x) 作業時：据え付けた設備が所定の稼働条件で機能し、規定された人数の職員が作業している状態のことをいう。

#### 2. 製造区域

製造区域とは、培養、抽出・精製、容器等の洗浄・乾燥、原料秤量、薬剤の調製、滅菌、充填、閉塞、包装表示等の作業を行う場所、及び更衣を行う場所等をいう。

無菌医薬品の製造区域は、取り扱う容器、原料及び中間製品

が微生物及び微粒子に汚染されることを防止するように維持・管理された区域である。

これらの製造区域で作業に従事する職員は、衛生管理、微生物学、製造技術、更衣手順などについて必要な教育訓練を受けること。

#### 2.1. 製造区域の分類

- (i) グレードA：製品への汚染リスクを高いレベルで防ぐ必要がある作業を行う局所的な区域である。無菌操作法で製造される医薬品の場合は、無菌の医薬品、容器、栓などが暴露される環境において、無菌性が保持できるように設計された区域をいう。この区域においては充填前の無菌作業(無菌接続、無菌原料の添加など)、無菌充填、容器閉塞などを行う。
- (ii) グレードB：製品への汚染リスクを比較的高いレベルで防ぐ必要がある作業を行う多目的な区域である。無菌操作法で製造される無菌医薬品の場合は、無菌を維持できるように収納された滅菌後の容器、原料及び中間製品の搬入、無菌操作区域に直接介入するヒト、器具、装置などが所在する区域である。一般的な無菌室では、グレードAの周辺環境となる。なお、アイソレーターなどのヒトの介在や暴露の程度が小さい場合など環境由来の微生物汚染リスクが低い場合においては、周辺環境はグレードBである必要はない。
- (iii) グレードC、D：製品への汚染リスクを比較的低いレベルで防ぐ区域である。滅菌前の容器、原料及び中間製品が、環境に暴露される製造作業を行う区域、無菌操作に使用する器具、装置などを洗浄する区域等をいう。なお、アイソレーターなどのヒトの介在や暴露の程度が小さい場合など環境由来の微生物汚染リスクが低い場合においては、周辺環境として使用できる。

#### 2.2. 製造区域ごとの環境管理基準値

医薬品製造環境の空中浮遊微粒子は、空調システムの稼働状況を把握する重要な指標の一つとなる。物理的には製品に混入して不溶性微粒子の原因の一つになり、また生物学的には微生物の担体となり得る。

そこで医薬品製造環境中では微生物数と同様に空中浮遊微粒子数についても一定の基準以下に制御されていることを保証しなければならない。そのために、風量、気流パターン、換気回数、ヒト・物の動線などを適切に設計することにより、空中浮遊微粒子を効果的に排出すること。

製造区域ごとに要求される空気の清浄度及び環境微生物の許容基準を表1及び表2に示す。

微粒子測定によるそれぞれのグレード分類をISO/DIS 14644-1 (2010)のクラス分類と比較するとグレードAの作業時の基準はISO 5、グレードBの作業時の基準はISO 7、グレードCの作業時の基準はISO 8にはほぼ等しい。

製造区域ごとの清浄度区分の定義に従い、製造区域の清浄度区分を検証する場合のサンプリングポイント数は、表3を参考にできる。対象区域の面積に応じて規定されたサンプリングポイント数を対象区域全体に均等に分布させ、作業活動の高さを考慮してサンプリングポイントを設定する。また、リスクに応じて測定ポイントを追加することも有用である。

ISO/DIS 14644-1 (2010)に掲載されているサンプリングポイント数を表3に示す。

グレードA設計時における確認では、微粒子測定1回当たり最小限1 m<sup>3</sup>のサンプリングを行う。

5.0 µm以上の空中浮遊微粒子測定、落下菌数測定は、必要

に応じて行う。

表1 空気の清浄度

グレード	許容空中浮遊微粒子数(個/m <sup>3</sup> )			
	非作業時 <sup>※1</sup>		作業時	
大きさ	0.5 μm 以上	5.0 μm 以上	0.5 μm 以上	5.0 μm 以上
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000	… <sup>※2</sup>	… <sup>※2</sup>

※1 非作業時の値は、作業終了後、一般に15～20分後に達成されるべき値である。

※2 この区域の許容微粒子数は、作業形態により異なる。

表2 環境微生物の許容基準(作業時)<sup>※1</sup>

グレード	空中微生物		表面付着微生物	
	浮遊菌 (CFU/m <sup>3</sup> )	落下菌 <sup>※2</sup> (CFU/プレート)	コンタクトプレート (CFU/24～30 cm <sup>2</sup> )	手袋 (CFU/5 指)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	…
D	200	100	50	…

※1 許容基準は平均値評価とする。

※2 プレート1枚あたりの測定時間は、最大4時間までとし、作業時間を通して測定を行う。

表3 クリーンルームの面積に対応した最少サンプリング数

クリーンルームの面積(m <sup>2</sup> ) <sup>※1</sup>	最少ポイント数
1	1
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13
72	14
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
500	26

※1 面積は、表示された数値未満又は等しい値である。

### 3. 環境モニタリングプログラム

無菌医薬品の製造においては、製造環境の悪化を事前に予知し、製品品質への悪影響を未然に防止しなければならない。そのため、環境モニタリングプログラムには、製造区域に要求されている清浄度が日常的に保持されていることを検証できるように、必要なすべての事項を含むこと。環境モニタリングプログラムに含まれる項目は、3.1～3.6項を参考に決定する。環境モニタリングプログラムは施設ごとに作成すること。環境モニ

タリングを実施する職員は、衛生管理、微生物学、測定原理、測定手順、更衣手順などについて十分な教育訓練を受けること。

#### 3.1. 適用範囲

モニタリング対象は、微生物と空中浮遊微粒子とする。微生物測定の対象は、細菌及び真菌とし、微粒子測定は0.5 μm以上の空中浮遊微粒子を対象とする。

#### 3.2. モニタリング頻度

無菌医薬品の製造区域では、空中浮遊微粒子及び微生物のモニタリングが必要であり、無菌医薬品が環境空気と直接接するグレードAにおいては、作業シフトごとに適切な頻度でモニタリングを行う。作業時のモニタリング参考頻度を表4に示す。ここで示した参考頻度は、従来型の一般的な無菌操作法を行う場合を想定しているが、個別の事例においては、リスクアセスメント結果に従い、適切なモニタリング頻度を定めるべきである。特にグレードA及びグレードBの空中微生物については、製品への汚染リスクを考慮して、その影響を評価できるモニタリング頻度を設定すること。例えば、製品の環境への暴露時間が長い場合、又はグレードAへ介入する作業回数が多い場合など、製品への汚染リスクが高いと想定される場合は、より高いモニタリング頻度を設定する必要がある。

これに対してアイソレーターやRABS (Restricted Access Barrier System)、フローフィルシールなどを用いた製造作業では、**ヒト**や環境中から製品への汚染リスクが低いため、モニタリング頻度も低減させることができる。

表4 モニタリングの参考頻度

グレード	空中浮遊微粒子		表面付着微生物 装置、壁など	
	空中微生物	装置、壁など	手袋、作業衣	手袋、作業衣
A	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後
B	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後
C, D	製品や容器が環境に暴露される区域			
	製品や容器が環境に暴露される区域	週1回	週2回	週2回
	その他の区域	週1回	週1回	週1回

※ 製品を暴露しない場合などリスクが低い場合は測定頻度を適宜減らすことができる。

#### 3.3. モニタリングポイント

モニタリング対象には、製造区域の空気、床、壁、設備表面、手袋、作業衣などがある。モニタリングポイントの選定にあたっては、重要作業箇所、汚染されやすい箇所、製造区域の清浄度を代表する箇所などを考慮する。

日常的な製造区域のモニタリングポイントは、製品が環境に暴露される近傍(例えば、30 cm以内)、**ヒト**の介入や往来が多い、又は低グレードエリアの影響を受けて汚染源となりやすい位置、気流解析の結果からワーストポイントと考えられる位置など、リスクアセスメントの結果や製造区域の清浄度区分の検証で得られた結果を参考に決定する。

#### 3.4. モニタリング方法

モニタリング対象物に応じた方法を選択する。また、サンプリング作業に伴う**ヒト**の介入や、サンプリングによる気流の乱れなどにより製品への汚染リスクを高める可能性があることに十分留意する。

モニタリングの測定対象物が空中に浮遊している微生物の場合は、能動的なサンプリング方法と受動的なサンプリング方法

がある。また、検出しようとする微生物の種類によって、使用する培地の種類や培養方法が異なる。詳細については5.微生物測定を参考にする。

### 3.5. 環境管理基準

各モニタリング対象物については警報基準値を設定することにより設備性能の低下を早期に見つけることが可能であり、管理しやすくなる。環境モニタリングにおいて重要なことは、モニタリング対象物が一定の基準を常時維持していることを評価することである。

環境モニタリングにより得られた数値は、平均値として評価を行うが、平均化により汚染リスクを過小評価しないようにする。グレードAで微生物を検出した場合は、製品への影響を評価する。重要な作業の後は作業員などの表面付着微生物についてモニタリングをしなければならない。

グレードA及びグレードBにおける5.0 µm以上の空中浮遊微粒子の測定は、環境の異常を早期に検出する上で有用である。

5.0 µm以上の空中浮遊微粒子が連続的、又は頻繁に検出されるようであれば、その数が少なくても、環境に影響を及ぼす異常が発生している可能性を考慮し、調査することが望ましい。

### 3.6. データの評価と基準を超えた場合の処置

環境モニタリングデータは、短期的な評価及び長期的な評価を行う。評価には、以下の項目を含める。

- (i) 一定期間を通じての微生物数、空中浮遊微粒子数の増減
- (ii) 検出された微生物の菌種の変動
- (iii) モニタリングポイントの増減
- (iv) 警報基準/処置基準の妥当性の確認
- (v) 職員ごとの検出頻度の確認
- (vi) 当該期間中の環境モニタリング結果に影響を及ぼす変更

環境モニタリングデータの傾向分析を行うことによって、製造環境の悪化を事前に把握し、環境悪化の原因を推定することができる。そのために場所、採取日時、製造品目、ロット、職員などといった環境に影響する情報も重要となる。

環境モニタリングデータに逸脱があった場合、逸脱があった時間の作業内容、製品との位置、逸脱の大きさなどを考慮し、製品の処置、衛生環境復旧の方法を決定する。

## 4. 微粒子測定

微粒子数の測定には、粒径別に計測できるパーティクルカウンター(微粒子計測器)を用いる。パーティクルカウンターは、空気を吸引するポンプとレーザー光の反射を粒子径に変換するセンサー及び変換部で構成される。サンプリングポイントと計測器が離れている場合には、サンプリングチューブを介して測定する。粒子分布を正確に測定するためには、原則としてサンプリングプローブの吸引口と気流の流れを平行とし、その気流と等速で吸引する。

測定には、校正済装置を用い、装置本体だけでなく、サンプリングチューブの長さ、直径及び曲がり部分の直径などを考慮する必要がある。測定装置の校正項目としては、流量、計数効率、偽計数、計数損失などがある。

微粒子モニタリング方式には、個々のモニタリングポイントごとに独立したパーティクルカウンターを設置して測定する方式と、複数のモニタリングポイントをマニホールドシステムにより1台のパーティクルカウンターに接続して測定する方式又はこれらの組合せ方式がある。いずれの測定方式でも、測定対象とする清浄度環境において決められた粒径範囲の粒子濃度を

適切に計測し、これらを表示又は記録できるものとする。なお、5.0 µm以上の微粒子計測においては、大サイズ微粒子が比較的速く落下するので、長いチューブ使用は避ける。また、微粒子モニタリングに当たっては、測定箇所起因する測定作業員の健康リスク(例えば高感作物質、病原菌や放射性医薬品など)を考慮する必要がある場合もある。

グレードA区域は、連続モニタリングが推奨される。サンプリング量は1 m<sup>3</sup>当たりに正確に換算できる量であること。

## 5. 微生物測定

環境モニタリングに用いられる微生物測定法には、浮遊菌数測定法、表面付着菌数測定法、落下菌数測定法などがある。浮遊菌又は表面付着菌の捕集や測定に関しては、種々のサンプリング装置及び方法がある。モニタリングの目的及び対象物によって、適切なサンプリング装置及び方法を選定する。

### 5.1. 培養による測定

#### 5.1.1. 浮遊菌数測定

一定量の空気を吸引する方法で、サンプリングした空気の容量あたりの菌数を測定する。サンプリング方法によって衝突型サンプリング装置及びろ過型サンプリング装置がある。

いずれの方法にも長所と短所があり、使用するにあたり空気をモニターする装置の能力(吸引量、微生物の捕集能力など)を確認しておくこと。また、グレードAで使用するにあたり、サンプリングが効率的であること、除染又は滅菌が容易であること、一方向気流を乱さないことを予め確認する。

浮遊菌数測定のサンプリング量は、モニタリング対象区域の清浄度やモニタリング頻度などの総合的な根拠考察により、適切なサンプリング量とする。グレードAでは、浮遊菌の1回のサンプリング量は1 m<sup>3</sup>とする。

(i) 衝突型サンプリング方法：衝突型サンプリングに用いる装置の選択及び使用に当たっては、捕集される空気の培地への衝突速度が捕集された微生物粒子に悪影響を及ぼさず、かつ微生物を捕集するのに十分な速度であること。また、空気の吸引量は、培地の物理的・化学的特性を大きく変えるものであってはならない。

一般的に使用される衝突型サンプリング浮遊菌数測定装置には、①スリットサンプラー、②アンダーセンサンプラー、③ピンホールサンプラー、④遠心型サンプラーがある。スリットサンプラーは、回転するカンテン培地に一定サイズのスリットを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、培地の回転速度及びスリットと培地表面との距離を調節して測定し、最大1時間まで時系列的に微生物の推移を把握することができる。アンダーセンサンプラーは、多孔板とカンテン培地を数段組み合わせ、培地に多孔板を通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、空気中の微生物の分布を測定するのに適している。ピンホールサンプラーは、スリットサンプラーのスリット部分がピンホールになった装置で、回転するカンテン培地に数個のピンホールを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する。遠心型サンプラーは、回転羽根を回転し、一定流量で吸引した空気を周囲に固定したカンテン培地のストリップに吹きつけて微生物を捕集する装置で、機器の持ち運びが容易で局所の測定に適している。

(ii) ろ過型サンプリング方法：ろ過型サンプリングに用いる装置は、吸引力及びフィルターサイズを適切に変えることにより、希望する空気量を捕集することができるが、フィルター

を無菌的にホルダーに取り付けたり、取り出すときに注意を要する。フィルターには、ゼラチンフィルターなどを用いたウェットタイプ及びメンブランフィルターを用いたドライタイプのものがある。ドライタイプのフィルターは、静電気の影響により微生物が付着した粒子をフィルター上に定量的に捕集できないことがある。

### 5.1.2. 表面付着菌数測定

付着微生物のサンプリング面積は採取する対象物の形状や状態により適宜選定する。

(i) コンタクトプレート法：平滑であり、十分な面積を有した適切な接触表面を有するコンタクトプレートを使用する。原則として機器や器具表面からの採取面積は24~30 cm<sup>2</sup>とする。

サンプリング箇所、コンタクトプレート全体を均等に数秒間接触させる。この際、回転させたり直線的に動かしてはならない。接触後、プレートにふたをし、できるだけ速やかに適切な培養条件で培養する。なお、コンタクトプレート使用後は、接触箇所が付着した培地成分を無菌的に拭き取る。

(ii) スワブ法：微生物を回収しやすく、異物が発生しにくい無菌材質のスワブを適切なリンス液に浸し、あらかじめ規定された表面積を方向を変えながら、ゆっくりと回転、又は平行線状に拭き取ることによってサンプリングを行う。サンプリング後、スワブを適切な一定量のリンス液に入れて攪拌後、微生物限度試験法(4.05)を参考にしながら適切な方法で微生物数を測定する。

(iii) 粘着集菌法：粘着剤を塗布したサンプリングシートを検査対象物に均等に貼付し、剥がす。この操作を同一箇所について、複数回繰り返す。粘着面に捕集した微生物は、適切な方法で測定する。なお、超音波処理などにより、粘着面から微生物を液中に回収することも可能である。

### 5.1.3. 落下菌数測定

測定場所でカンテン培地を入れた一定の大きさのペトリ皿(通例、直径9 cm)のふたをとり、一定時間放置後、表面に落下した微生物を培養し、集落数を計数する方法である。本法は、静置した培地の表面に落下しなかった微生物を検出できないこと、微生物凝集物の落下速度は気流の影響を受けることから、一定体積中の微生物の総数を定量的にモニタリングするには有効でない。本法は、得られる結果が定性又は半定量的であるが、製品又は装置が空中に浮遊する微生物によって汚染される可能性を、長時間モニタリングできる利点がある。

使用時の注意点として長時間の暴露条件で、培地が乾燥して菌の発育を阻害することがないことを確認する。落下菌数測定で得たデータは、これ以外の浮遊菌数測定の結果と組み合わせて考えることが有用である。

### 5.1.4. 培養

環境モニタリングでは、微生物を再現性よく検出する培養条件を採用する。使用する培地は、製造バッチごとに培地性能試験を実施する。また、培地には、モニタリング箇所で使用若しくは製造される消毒剤又は抗菌剤の効果を打ち消すか抑制するための不活化剤を加えてもよい。

培地とその培養条件は、目的とした微生物によって異なる。

表5にその一例を示す。表に示した培地はカンテン培地を例としたが、測定方法に応じて、液体培地を用いることもできる。

なお、培地や抽出液は適切な方法で滅菌されたものを使用する。

培養日数については、5日間以上と示したが、信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養5日間以前の計測値を採用してもよい。

また、嫌気性細菌を対象とする場合には、嫌気培養とする。

表5 培地の種類 例示

検出対象微生物	培地	温度と日数
好気性細菌、酵母及びかび	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	25~30℃ 5日間以上
	SCDLPカンテン培地	
	SCDLカンテン培地	
好気性細菌	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30~35℃ 5日間以上
	SCDLPカンテン培地	
	SCDLカンテン培地	
酵母及びかび	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	20~25℃ 5日間以上
	SCDLPカンテン培地	
	SCDLカンテン培地	
	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ポテト・デキストロースカンテン培地 グルコースペプトンカンテン培地	
嫌気性細菌	強化クロストリジアカンテン培地	30~35℃ 5日間以上 (嫌気培養を行う)
	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	
抽出液	生理食塩液	
	リン酸緩衝生理食塩液	
	リン酸緩衝液, pH 7.2	
	ペプトン食塩緩衝液, pH 7.0	
	ペプトン生理食塩液 ペプトン水	

#### (i) SCDLPカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイズ製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
レンチン	1.0 g
ポリソルベート80	7.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で7.1~7.5になるようにpHを調整する。  
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

#### (ii) SCDLカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイズ製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
レンチン	1.0 g
カンテン	15 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で7.1~7.5になるようにpHを調整する。  
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

#### (iii) グルコースペプトンカンテン培地

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
ブドウ糖	20.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
リン酸二水素カリウム	1.0 g



カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で5.6～5.8になるようにpHを調整する。  
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(iv) 強化クロストリジアカンテン培地

牛肉エキス	10.0 g
ペプトン	10.0 g
酵母エキス	3.0 g
溶性デンプン	1.0 g
ブドウ糖一水和物	5.0 g
システイン塩酸塩	0.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
酢酸ナトリウム	3.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で6.6～7.0になるようにpHを調整する。  
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(v) リン酸緩衝生理食塩液

リン酸二水素カリウム	0.0425 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	1000 mL

(vi) ペプトン生理食塩液

ペプトン	1.0 g
塩化ナトリウム	8.5 g
水	1000 mL

(vii) ペプトン水

ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	1000 mL

5.1.5. 同定

グレードA及びBから検出された菌は、種レベルまで同定するのが望ましい。遺伝子を調べる方法は、これまでの生化学や表現型の手法に比べて正確であり、精度も高い。これら同定結果は、無菌試験又はプロセスシミュレーションで汚染が生じた際の原因調査に利用できる。遺伝子解析を用いた同定の方法については、参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参照する。

5.2. 迅速法による微生物測定

迅速法においては多くの場合、従来の培養法と比較して短時間のうちに測定結果を得ることが可能である。

一般に以下の3つの観点から科学的に検証された装置を使用する。

- (i) 捕集法(ろ過, 衝突, 粘着, 空気吸引など)
- (ii) 検出シグナル(蛍光, 発光など)
- (iii) 検出装置

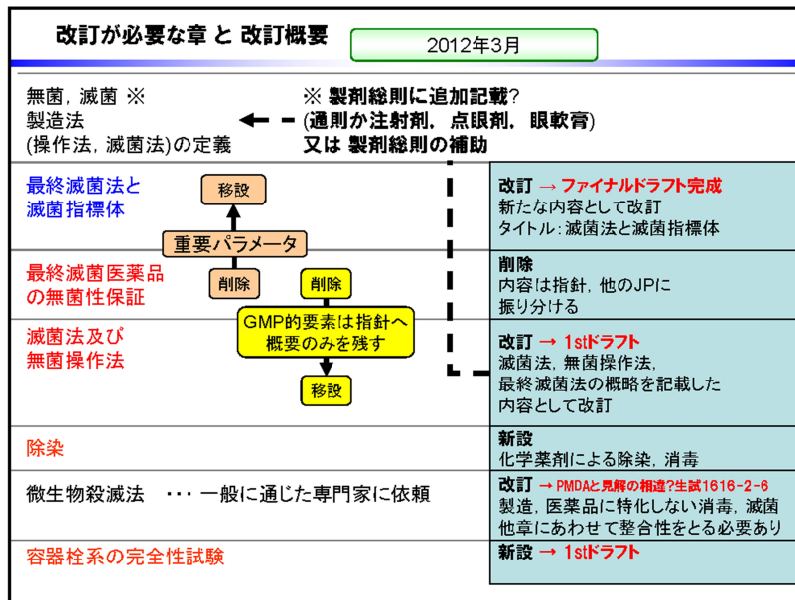
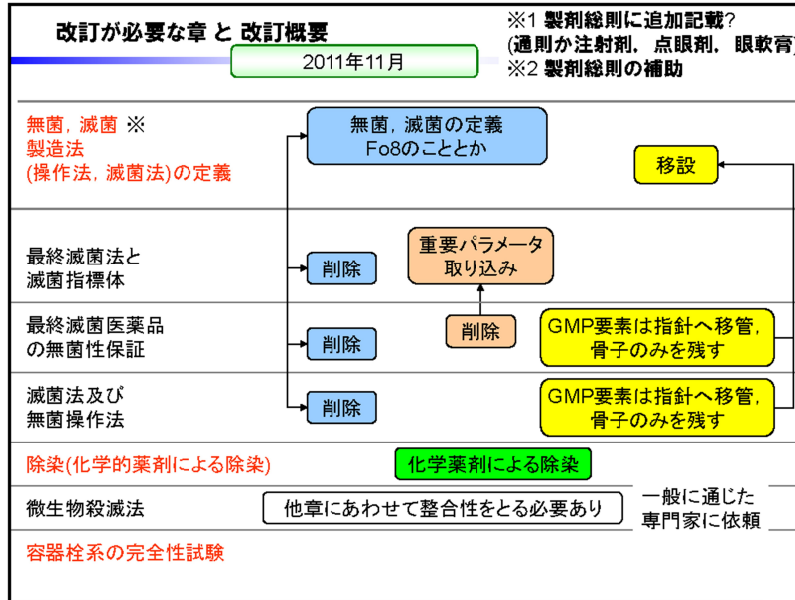
なお、迅速法においては従来の培養法よりも、多くの場合、得られる微生物の測定値は高くなることから、使用に際しては、機器の適格性評価、校正方法についても十分に検討すること。また、培養法とは測定原理が異なるため、許容基準に関しては科学的論拠を基にそれぞれ設定する必要がある。その際、結果として従来法と比較して、同等以上の微生物管理ができるよう

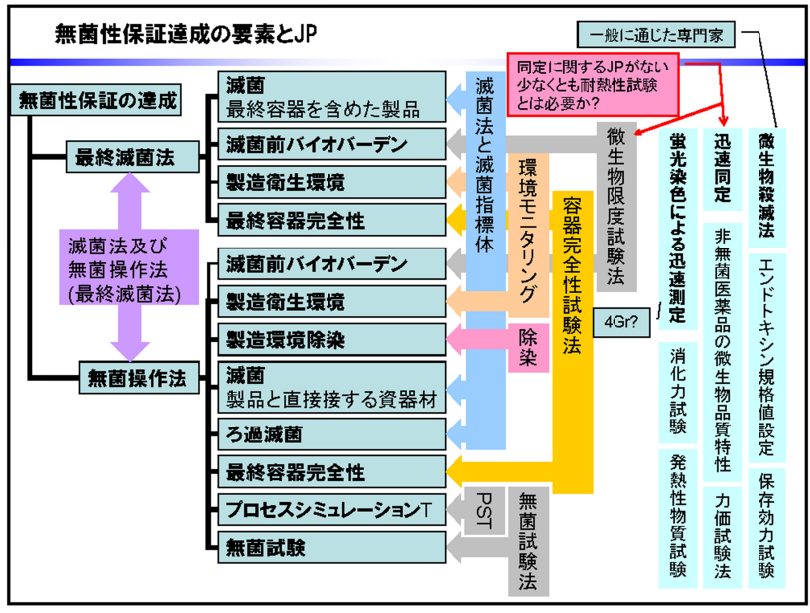
に設定すること。

6. 参考資料

- 1) PIC/S GUIDE TO GOOD MANUFACTURING PRACTICE FOR MEDICINAL PRODUCTS ANNEXES: Annex 1 · Manufacture of sterile medicinal products (September 2009)
- 2) ISO/DIS 14644-1 (2010): Cleanrooms and associated controlled environments · Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration

添付資料 I-2





添付資料 I-3

1 **次のように改める。**

2 **滅菌法及び滅菌指標体**

3 滅菌とは、物質中の全ての微生物を殺滅又は除去することを  
4 いう。本参考情報は、無菌製品の製造のほか滅菌が必要な場合  
5 に適用する。滅菌法を適用する場合には、各滅菌法の長所・短  
6 所を十分理解した上で、包装を含む被滅菌物(製品又は滅菌が必要  
7 必要な設備、器具、材料など)の適合性に依りて、適切な滅菌法を  
8 選択する。

9 滅菌においては、滅菌装置据付け(滅菌工程の設計・開発を含む)後、その工程が科学的根拠や妥当性をもって設計どおりに正  
10 しく稼働していることを評価する適格性評価に基づき設備の保  
11 守点検プログラムを設定すること。また、無菌医薬品の製造を  
12 行う製造所では、製造全般に関わる品質システムを確立すること。例えば、滅菌後の無菌性を含め品質に影響を及ぼし得る全  
13 での作業を明確にし、製品の微生物汚染を回避するために必要  
14 な手順書等を設定し、適切に運用すること。

15 滅菌条件を設定し、滅菌後の無菌性を保証するためには、被  
16 滅菌物の滅菌前のバイオバーデンを定期的又は一定滅菌単位ご  
17 とに測定すること。測定方法は、4.05微生物限度試験法等を参  
18 照する。

19 本参考情報には代表的な滅菌法を示すが、これら以外にも  
20  
21 ・ 滅菌の機構が十分に解明されている  
22  
23 ・ 滅菌工程の物理的な重要パラメーターが明確であり、それ  
24 らの制御と測定が可能である  
25  
26 ・ 滅菌操作を効果的かつ再現性よく実施できる  
27 といった要件を満たし、かつ被滅菌物に悪影響を及ぼさない場  
28 合は、他の滅菌法も用いることができる。

29 **1. 定義**

30 本法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。  
31  
32 ・ フィルターの完全性試験：フィルターの微生物捕捉性能デー  
33 タとの相関性が実証された非破壊試験をいう。  
34  
35 ・ バイオバーデン：被滅菌物に生存する微生物の群集をいう。  
36  
37 ・ D値：微生物の死滅率を表す値で、供試微生物の90%を死滅  
38 させ、生存率を1/10に低下させるのに要する時間(Decimal

35 Reduction Time)をいう。  
36  
37 ・  $F_{HT}$ 値：乾熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程度  
38 であり、20 のz値(D値を10倍変化させる温度変化の度数)  
39 を持つ微生物について、160 の温度に等価な時間(分)で表  
40 される値。  
41  
42 ・  $F_0$ 値：湿熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程度  
43 であり、10 のz値(D値を10倍変化させる温度変化の度数)  
44 を持つ微生物について、121.1 の温度に等価な時間(分)で  
45 表される値。  
46  
47 ・ 無菌性保証水準(SAL)：滅菌後に、生育可能な1個の微生物  
48 が製品中に存在する確率をいう。10<sup>-7</sup>で表される。  
49  
50 ・ 線量(吸収線量)：物質の単位質量当たり付与された吸収エ  
51 ネルギーの量。単位はグレイ(Gy)で表す。  
52  
53 ・ 重要パラメーター：滅菌工程に本質的に必要であり、計測可  
54 能なパラメーター。  
55  
56 ・ 載荷形態(ローディングパターン)：被滅菌物の滅菌装置又は  
57 照射容器内での数、方向、配置方法について規定した組み合  
58 わせ。  
59  
60 **2. 滅菌法**  
61  
62 **2.1. 加熱法**  
63  
64 加熱法は、熱によって微生物を殺滅する方法である。  
65  
66 **2.1.1. 湿熱滅菌法**  
67  
68 湿熱滅菌法には、一般的に広く用いられている飽和蒸気滅菌  
69 とその他の湿熱滅菌とがある。湿熱滅菌における管理項目、ユ  
70 ーティリティ及び制御装置を、参考として表1に示した。  
71  
72 飽和蒸気滅菌は、加圧飽和水蒸気中で微生物を殺滅する方  
73 法をいう。本法の重要パラメーターとしては、温度、圧力及び所  
74 定の温度における保持時間がある。したがって、通常の滅菌工  
75 程管理においては、温度、圧力及び保持時間を常時監視、測定  
76 すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含  
77 まれていること。  
78  
79 また、その他の湿熱滅菌には、密封容器中の被滅菌物を滅菌  
80 する場合に用いる蒸気加圧運転サイクル、水散布サイクル、水  
81 浸漬サイクルなどがある。これらの方法の重要パラメーターと  
82 しては、容器内の温度、所定の温度における保持時間がある。

表1 湿熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	飽和蒸気滅菌	その他の湿熱滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>熱履歴(通例<math>F_0</math>値で表記)</li> <li>温度(必要に応じてドレインなど)</li> <li>圧力(滅菌器内)</li> <li>所定の温度における保持時間</li> <li>被滅菌物の載荷形態</li> <li>蒸気品質(過熱度、乾燥度、非凝縮性ガス濃度、必要に応じて化学的純度)</li> <li>滅菌器の中に復圧などのため導入する空気の品質</li> <li>冷却のために用いる水の品質</li> <li>その他必要な事項</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>熱履歴(通例<math>F_0</math>値で表記)</li> <li>温度(必要に応じてドレインなど)</li> <li>必要に応じて圧力(滅菌器内)</li> <li>所定の温度における保持時間</li> <li>被滅菌物の載荷形態</li> <li>滅菌器の中に復圧などのため導入する空気の品質</li> <li>冷却のために用いる水の品質</li> <li>その他必要な事項</li> </ul>
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>蒸気</li> <li>滅菌器の中に復圧などのため導入する空気</li> <li>冷却のために用いる水</li> <li>温度制御装置</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>蒸気</li> <li>熱水</li> <li>滅菌器の中に復圧などのため導入する空気</li> <li>冷却のために用いる水</li> <li>温度制御装置</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>・圧力制御装置</li> <li>・時間制御装置</li> <li>・その他</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・圧力制御装置</li> <li>・時間制御装置</li> <li>・連続式滅菌装置の場合の搬送装置</li> <li>・その他</li> </ul>
--	--	--

70 2.1.2. 乾熱滅菌法

71 乾熱滅菌法は、加熱乾燥空気中で微生物を殺滅する方法である。

72 通例、バッチ式乾熱滅菌器又は連続式乾熱滅菌装置を用いる。

73 いずれの場合においても滅菌装置に流入する空気の清浄度に留

74 意する必要がある。乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ

75 ィ及び制御装置を、参考として表2に示した。本法はガラス製、

76 磁製、金属製など耐熱性の高い材質のものや鉱油、脂肪油、固

77 形の医薬品などで熱に安定なものが被滅菌物として適している。

78 本法の重要パラメーターとしては、温度及び所定の温度にお

79 ける保持時間(ベルト速度)がある。同じ加熱による滅菌でも、

80 湿熱滅菌法より高い温度又は長い保持時間が必要となる。通常

81 の滅菌工程管理においては、温度及び保持時間を常時監視、測

82 定すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として

83 含まれていること。

表2 乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	バッチ式乾熱滅菌	連続式乾熱滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>・熱履歴(通例<math>F_H</math>値で表記)</li> <li>・温度</li> <li>・所定の温度における保持時間</li> <li>・器内外の差圧</li> <li>・被滅菌物の載荷形態</li> <li>・空気(加熱用、冷却用)の品質</li> <li>・その他必要事項</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・熱履歴(通例<math>F_H</math>値で表記)</li> <li>・温度</li> <li>・ベルト速度(保持時間)</li> <li>・装置内外の差圧</li> <li>・載荷密度</li> <li>・空気(加熱用、冷却用)の品質</li> <li>・その他必要事項</li> </ul>
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>・空気(加熱用、冷却用)</li> <li>・温度制御装置</li> <li>・時間制御装置</li> <li>・器内の差圧計</li> <li>・HEPAフィルター</li> <li>・その他</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・空気(加熱用、冷却用)</li> <li>・温度制御装置</li> <li>・時間制御装置</li> <li>・装置内の差圧計</li> <li>・HEPAフィルター</li> <li>・冷却装置(必要な場合)</li> <li>・その他</li> </ul>

84 2.1.3. 高周波滅菌法

85 高周波(マイクロ波)を薬液などの被滅菌物に照射すると、吸

86 収された高周波により、被滅菌物の極性分子が配向性を変えよ

87 うと振動し、分子同士の摩擦によりエネルギーを発生する。こ

88 のとき生じる熱(マイクロ波加熱)によって微生物を殺滅する方

89 法を高周波滅菌法という。高周波は、通例、 $2450 \pm 50\text{MHz}$ の

90 ものをを用いる。

91 高周波滅菌装置は、マグネトロンを用いて高周波照射を行い

92 加熱する加熱照射部、赤外線ヒーターなどを用いて滅菌温度を

93 保持するための保持部、被滅菌物を冷却する冷却部から構成さ

94 れ、常圧下で被滅菌物を連続的に滅菌する装置である。高周波

95 滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置を、参考

96 として表3に示した。

97 本法は、密封容器等に充填された液状製品又は水分含量の多

98 い製品に適用される。

99 本法の重要パラメーターとしては、被滅菌物の温度、処理時

100 間がある。したがって、通常の滅菌工程管理においては、被滅

101 菌物の温度、処理時間を常時監視、測定すべきであり、そのた

102 めの測定装置は滅菌設備の仕様として含まれていること。

103 高周波による加熱は、熱効率及び応答性に優れ、高温短時間

104 滅菌を連続処理できることが特徴である。ただし、被滅菌物の

105 熱の伝わりやすさによって均一な加熱が難しい場合もある。さ

106 らに常圧環境下での加熱のため、内圧が高くなることから、使

107 用する容器の耐圧性及び均一性に注意する必要がある。

表3 高周波滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>・熱履歴(通例<math>F_0</math>値で表記)</li> <li>・温度</li> <li>・処理時間</li> <li>・ベルト速度</li> <li>・被滅菌物の形状</li> <li>・その他必要事項</li> </ul>
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>・高周波制御装置</li> <li>・外部加熱装置(必要な場合)</li> <li>・冷却装置(必要な場合)</li> <li>・温度監視装置</li> <li>・時間監視装置</li> <li>・その他</li> </ul>

108 2.2. ガス法

109 ガス法は、滅菌ガスが微生物と接触することによって、微生

110 物を殺滅する方法である。加熱法と比較して低い温度での滅菌

111 が可能で、一般に被滅菌物の熱損傷が少ない方法である。その

112 ため、熱抵抗性の低いプラスチック製容器などに適用される事

113 例が多い。

114 一般的なガスを用いた滅菌法では、汚れや水分が滅菌効果を

115 阻害するため、十分な洗浄、乾燥が重要となる。また、ガスが

116 被滅菌物に吸着される場合では、滅菌効果が減少する。

117 2.2.1. 酸化エチレン(E0)ガス滅菌法  
 118 EOガス滅菌は、微生物が持つタンパク質、核酸を変性させる  
 119 ことにより、微生物を殺滅する方法である。EOガスは、爆発性  
 120 があるため、通例、二酸化炭素などで10～30%に希釈して用  
 121 いる。EOガスは、反応性の強いアルキル化剤であるので、EO  
 122 ガスと反応する製品又はEOガスを吸収しやすい製品の滅菌に  
 123 は適用できない。  
 124 滅菌工程はプレコンディショニング、滅菌サイクル及びエア  
 125 レーションからなる。EOガスは、変異原性などの毒性があるの  
 126 で、被滅菌物については、エアレーションにより残留EOガスや  
 127 他の二次生成有毒ガス(エチレンクロロヒドリンなど)の濃度を  
 128 安全レベル以下に下げる必要がある。ガスは、法規制に適合す  
 129 る処理を施して排気する。EOガス滅菌における管理項目、ユー  
 130 ティリティ及び制御装置を、参考として表4に示した。  
 131 本法の重要パラメーターとしては、温度、湿度、ガス濃度(圧  
 132 力)及び時間がある。したがって、通常の滅菌工程管理において  
 133 は、温度、湿度、ガス濃度(圧力)、及び時間を常時監視、測定  
 134 すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含  
 135 まれていること。

表4 EOガス滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>滅菌ガス導入による圧力上昇、導入時間、最終圧力</li> <li>温度(滅菌器内及び被滅菌物)</li> <li>湿度</li> <li>EOガス濃度(滅菌器内ガス濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合は以下の場合も許容される)             <ul style="list-style-type: none"> <li>使用するガスの質量</li> <li>使用するガスの容積</li> <li>初期減圧度とガス投入圧からの換算式採用</li> </ul> </li> <li>作用時間(暴露時間)</li> <li>被滅菌物の載荷形態</li> <li>バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果</li> <li>プレコンディショニング条件(温度、湿度、時間、その他)</li> <li>エアレーション条件(温度、時間、その他)</li> <li>その他必要事項</li> </ul>
管理すべきユーティリティ及び制御装置	<ul style="list-style-type: none"> <li>EOガス</li> <li>注入する蒸気又は水</li> <li>滅菌終了後、置換する空気</li> <li>温度制御装置</li> <li>圧力制御装置</li> <li>湿度制御装置</li> <li>時間制御装置</li> <li>その他</li> </ul>

136 2.2.2. 過酸化水素滅菌法  
 137 過酸化水素による滅菌は、過酸化水素がもつ酸化力又は過酸  
 138 化水素をプラズマ状態にすることにより発生するラジカルによ  
 139 る酸化反応によって、微生物を殺滅する方法である。加熱法と  
 140 比較して低い温度での滅菌が可能であるが、セルロースを材料  
 141 として用いた使い捨ての作業衣、メンブランフィルターなど過  
 142 酸化水素を吸着するような被滅菌物では、滅菌効果が減少する  
 143 ため、このような被滅菌物の滅菌法としては適していない。過  
 144 酸化水素滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置  
 145 を、参考として表5に示した。  
 146 本法の重要パラメーターとしては、濃度、時間、温度がある。  
 147 プラズマ状態にして滅菌する場合は、高周波装置の管理も重要  
 148 である。被滅菌物の残存水分、滅菌環境中の湿度が滅菌効果に  
 149 影響するので、必要な場合は管理すること。

表5 過酸化水素滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	過酸化水素滅菌	過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌
管理項目	<ul style="list-style-type: none"> <li>濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合庫内均一性も許容される)</li> <li>時間</li> <li>温度</li> <li>湿度</li> <li>圧力</li> <li>過酸化水素の品質</li> <li>過酸化水素の消費量</li> <li>被滅菌物の残存水分</li> <li>被滅菌物の載荷形態</li> <li>バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合庫内均一性も許容される)</li> <li>時間</li> <li>温度</li> <li>湿度</li> <li>圧力</li> <li>過酸化水素の品質</li> <li>過酸化水素の消費量</li> <li>被滅菌物の残存水分</li> <li>被滅菌物の載荷形態</li> <li>バイオリジカルインジケータの設置点及び培養結果</li> </ul>

	・ケミカルインジケータの設置点及び結果	・ケミカルインジケータの設置点及び結果
管理すべき ユーティリティ 及び制御装置	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置 ・高周波発生装置

150 2.3. 放射線法 160 れぞれ水分子と反応してラジカルなどを生成し、微生物のDNA  
151 2.3.1. 放射線滅菌法 161 に損傷を与えることによって殺滅する間接作用がある。  
152 放射線滅菌法には、コバルト60を線源とした線が被滅菌物 162 両法とも室温で滅菌が可能であるため、熱に不安定な物質に  
153 に照射することで微生物を殺滅する線照射滅菌と、電子線加 163 適用でき、放射線が透過するためこん包状態での滅菌も可能で  
154 速器から放出される電子線を照射することで微生物を殺滅する 164 ある。線滅菌は、電子線に比べると透過力が高いため、主に  
155 電子線照射滅菌とがある。滅菌方法の選択にあたっては、被滅 165 金属、水、粉末などを含む高密度製品に適している。電子線滅  
156 菌物の品質劣化を含む適合性を事前に確認しておくこと。 166 菌は、線に比べて単位時間当たりの放射線の量(線量率)が高  
157 線照射滅菌では線が二次的に発生する電子で微生物を殺 167 いたため、処理時間が短くなる。放射線滅菌における管理項目、  
158 滅し、電子線照射滅菌では電子が直接微生物を殺滅する。この 168 ユーティリティ及び制御装置を、参考として表6に示した。  
159 ような電子による直接作用がある一方で、線及び電子線がそ

表6 放射線滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	線照射滅菌	電子線照射滅菌
管理項目	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・照射時間(コンベア速度又はサイクルタイム) ・その他必要な事項	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・電子ビーム特性(平均電子ビーム電流、電子エネルギー、走査幅) ・その他必要な事項
管理すべき ユーティリティ 及び制御装置	・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他	・電子ビーム測定装置 ・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他

169 2.4. ろ過法 180 などが影響を及ぼす重要パラメーターとして挙げられる。フィル  
170 ろ過法は、滅菌用フィルターによって液体又は気体中の微生 181 ルターの微生物除去では、滅菌の対象が液体の場合には、ろ過  
171 物を物理的に除去する方法である。したがって、熱、放射線に 182 を行う液体の物理化学的性質(粘度、pH、界面活性作用など)に  
172 対して不安定な被滅菌物にも適用できる。なお、ここに記載し 183 影響される。一般に、適切な条件下で培養された指標菌  
173 たるろ過による被滅菌物は、0.2µmメンブランフィルターで除去 184 *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NBRC 14213)又は  
174 できる微生物であり、細菌の中でもマイコプラズマやレプトス 185 これより小さな適切な菌を用いて、フィルターの有効ろ過単位  
175 ピラ、またウイルスは対象としない。ろ過法における管理項目、 186 面積(cm<sup>2</sup>)当たり10<sup>7</sup> CFU以上をチャレンジし、フィルターの二  
176 ユーティリティ及び制御装置を、参考として表7に示した。 187 次側に無菌のろ液が得られることにより、滅菌用フィルターの  
177 液体ろ過滅菌では、ろ過時間、ろ過量、ろ過流速、ろ過差圧、 188 微生物捕捉性能は検証される。  
178 温度などがフィルターの微生物除去に影響を及ぼす重要パラメ 189 なお、ろ過前の液体中のバイオペーデンは、ろ過滅菌性能に  
179 ーターとして挙げられる。気体ろ過滅菌では、ろ過差圧、温度 190 影響を及ぼすため、その管理について考慮する。

表7 ろ過法における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

	液体ろ過滅菌	気体ろ過滅菌
管理項目	・ろ過時間 ・ろ過量 ・ろ過流速 ・ろ過差圧 ・温度 ・フィルターの完全性 ・多回使用の場合は、使用期間及びフィルターの滅菌回数 ・その他必要な事項	・ろ過差圧 ・フィルターの完全性 ・使用期間 ・フィルターの滅菌回数 ・気体流れ方向(双方向に流す場合) ・必要場合は温度 ・その他必要な事項
管理すべき	・圧力計	・圧力計

ユーティリティ及び制御装置	・流量計 ・完全性試験装置 ・その他	・流量計 ・完全性試験装置 ・その他
---------------	--------------------------	--------------------------

191 3. 滅菌指標体(インジケータ) 198 「金属などの表面に接種するタイプ」, 「液体タイプ」及び「培  
192 3.1. バイオロジカルインジケータ(BI) 199 地とペーパーストリップがあらかじめ封入された培地一体タイ  
193 3.1.1. 概要 200 プ」などに分類される。また, 担体から分類すると, ろ紙, ガ  
194 BIとは, ある滅菌法に対して強い抵抗性を示す微生物の芽胞 201 ラス, ステンレス又はプラスチックなどを担体として, 指標菌  
195 を用いて作られた指標体であり, 当該滅菌法の滅菌条件の決定 202 の芽胞を接種して包装したものと, 製品又は類似品を担体とし  
196 及び滅菌工程の管理に使用される。 203 て指標菌の芽胞を接種したものがあ。代表的な指標菌の例を  
197 指標体は, その形状から, 「ペーパーストリップタイプ」, 204 表8に示した。

表8 代表的な滅菌法別指標菌一覧

滅菌法	菌種	株名	D値等(参考)
湿熱滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953, NBRC 13737	1.5分間以上(121 )
乾熱滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(160 )
EOガス滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(54 ) 12.5分間以上(30 ) ガス濃度 600 mg/L ± 30 mg/L, 相対湿度 60 %RH
過酸化水素滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980, ATCC 7935, NBRC 12550	

205 3.1.2. 市販BIの表示事項 235 に芽胞菌数などの測定を行い, BI製造者の公称菌数との間に大  
206 ISO11138-1に従って製造された市販BIの使用者は, BI製造 236 きな差がないことを確認すること。  
207 者より使用者に対して提供された次のような情報を確認するこ 237 3.1.4. 使用者による滅菌指標体作製時の注意  
208 と。 238 購入したBIを使用せず, 製造環境や被滅菌物から回収したバ  
209 ・製造トレーサビリティ(微生物, 単体, 包装材料など) 239 イオバーデンを利用して指標体を作成する場合は, 使用前に少  
210 ・菌種名 240 なくとも次のような事項を評価すること。  
211 ・公称菌数 241 ・菌種名  
212 ・抵抗性 242 ・菌数  
213 ・使用方法 243 ・抵抗性(当該滅菌温度又は滅菌ガス濃度におけるD値)  
214 ・保管条件(温度, 使用期間など) 244 ・保管条件(温度, 使用期間など)  
215 ・培養条件(温度, 期間, 培地など) 245 ・培養条件(温度, 期間, 培地など)  
216 ・廃棄方法 246 なお, 抵抗性についてはバイオバーデン中の最大の抵抗性菌  
217 BIの性能を決める項目としては, 「菌種」, 「抵抗性」, 「菌 247 であることを継続的に示すための評価プログラムを定めること。  
218 数」などがある。抵抗性は, 同じ菌種であっても担体又は包装 248 3.1.5. 市販BIの使用者による改変時の注意  
219 材料の材質若しくは形状によっても変動するため, 包装材料を 249 購入したBIを包装から取り出し, 薬液や資材などの被滅菌物  
220 含めた評価が必要である。 250 に接種して使用する場合は, 菌数や抵抗性が変動するため, 使  
221 3.1.3. 市販BI使用時の管理 251 用前にこれらの性能を評価すること。  
222 BIを使用する場合には, BI製造者が提示した保管条件, 滅菌 252 評価を行う場合は, ISO11138やUSP<55>を参照することが  
223 後から培養開始までの期間, 培養条件, 廃棄方法などに従い取 253 できる。抵抗性の評価には, 生物指標抵抗性評価装置(BIER)  
224 り扱うこと。特に, 保管条件はBIの性能に影響を及ぼすおそれ 254 又はオイルバスを用いたキャピラリー法がある。自社にて評価  
225 があるため, 取り出してから使用するまでの期間についても長 255 することが困難な場合は, 外部試験検査機関を利用することも  
226 時間放置しないなどの留意を必要がある。 256 できる。  
227 BIは, 被滅菌物全体を評価できるように設置する。また, 加 257 3.2. ケミカルインジケータ(CI)  
228 熱による滅菌におけるコールドスポットのような, それぞれの 258 CIとは, 熱, ガス, 又は放射線などの作用により化学的又は  
229 方法において 滅菌効果が低いと予測される場所にも設置する。 259 物理的に変化する指標体である。指標体の形状としては, それ  
230 回収する場合は, BIの包装材料や担体を破壊しないように留意 260 を塗布又は印刷した紙片などがある。滅菌方法に応じて変化する  
231 する。また, 包装材料を破壊してしまった場合は, 指標菌が放 261 原理は異なるため, 使用する滅菌方法に合ったCIを選ぶ必要  
232 出・拡散する可能性があるため, 微生物汚染防止の観点から, 262 がある。CIは, 使用用途に基づいて以下の6クラスに分類され  
233 手順をあらかじめ定めておくこと。 263 る。ここに示すクラスは性能の優劣に關するものではない。  
234 BIを購入して使用する場合, 使用者は, 必要に応じて受入時 264 なお, CIは滅菌工程の一つ又は複数の重要パラメーターの達



265 成を示す指標であるが、滅菌効果や無菌性の保証に用いる指標  
 266 ではないため、BIの代わりとして用いることはできない。  
 267 クラス1：プロセス・インジケータ  
 268 被滅菌物が滅菌工程を経たかどうかを区別することを目  
 269 的とする。重要パラメータの1つ又はそれ以上に反応する。  
 270 クラス2：特定試験用インジケータ  
 271 ISO11140シリーズで規定される、真空型高压蒸気滅菌装  
 272 置の排気能力及び蒸気浸透の試験で使用される。  
 273 Bowie-Dickタイプが該当する。  
 274 クラス3：単一変数インジケータ  
 275 重要パラメータの1つのみに反応する。指定されたパラ  
 276 メータの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを示す。  
 277 クラス4：複数変数インジケータ  
 278 重要パラメータの2つ又はそれ以上に反応する。指定さ  
 279 れたパラメータの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを  
 280 示す。  
 281 クラス5：インテグレーション・インジケータ  
 282 全ての重要パラメータに反応する。ISO11138シリーズ  
 283 に規定されているBIの性能要求と同等又はそれ以上の規定  
 284 値をもつ。  
 285 クラス6：エミュレーション・インジケータ  
 286 規定された滅菌サイクルの全ての重要パラメータに反  
 287 応する。規定値は、指定した滅菌工程の重要パラメータで  
 288 ある。  
 289 3.3. 線量計  
 290 3.3.1. 線量計の種類  
 291 放射線照射プロセスにおける線量計とは、放射線を吸収する  
 292 ことによる変化から吸収線量を読み取る計器又はシステムであ  
 293 り、「再現性」と「放射線の測定が可能な応答性」を持つこと  
 294 が要求される。線量計の多くは、使用する照射施設における照  
 295 射前後及び照射中の温度並びに線量率などの環境条件(工程パ  
 296 ラメータ)によって影響を受ける場合があるため注意を要す  
 297 る。線量計の選定や使用については、放射線照射プロセスに対  
 298 する線量計システムの選定及び校正指針(ISO/ASTM 51261)が  
 299 規定されている。放射線の吸収線量を測定する線量計を表9に  
 300 示した。なお、線用線量計は、通例、エネルギー3MeV未満  
 301 の電子線を用いる滅菌の工程管理には適さない。

表9 線量計の種類

放射線種類	線量計
線	着色ポリメチルメタクリレート線量計
	透明ポリメチルメタクリレート線量計
	セリックスラス線量計
	アラニン線量計
線, 電子線	セルロースアセテート線量計
	ラジオクロミックフィルム線量計

302 3.3.2. 線量計使用方法  
 303 線量計は、放射線の照射条件を決定するために実施する線量  
 304 分布測定時に、また、通常の放射線滅菌における被滅菌物の吸  
 305 収線量を評価するために使用する。前者では、あらかじめ被滅  
 306 菌物内部に線量計を配置し、放射線照射後に回収して、測定シ  
 307 ステムで計測することにより、各部位の吸収線量を明確にする。  
 308 このとき、放射線の透過性や線量のばらつきからこん包形態の

309 妥当性を確認すると共に、最小及び最大線量と工程パラメータ  
 310 との関係を決める必要があるため、線量計を垂直方向、水  
 311 平方向の広い範囲に配置する。後者では、線量計を必ずしも被  
 312 滅菌物内部の最小や最大線量部位に設置する必要はない。線量  
 313 計の設置/回収が容易な管理点を選定し、管理点での吸収線量  
 314 を基に被滅菌物の吸収線量を保証する。そのために線量分布測  
 315 定において、この管理点と被滅菌物内の最大/最小線量部位と  
 316 の量的な関係を明確にすると共に、管理点における合格線量範  
 317 囲も算出しておくこと。

318 なお、線量計は、新しく購入して使用する前に校正を行うほ  
 319 か、線量計のバッチ切り替え時、及び1年を超えないごとに1回、  
 320 校正する。

#### 321 4. 滅菌条件設計法

##### 322 4.1. ハーフサイクル法

323 ハーフサイクル法は、被滅菌物上に存在するバイオバーデ  
 324 ン数や検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、BIに含  
 325 まれる $10^6$  CFUの指標菌の全てが死滅する処理時間の2倍の滅  
 326 菌時間を採用する方法である。本法は、主にEOなどガス滅菌法  
 327 の滅菌条件の設定に使用される。

##### 328 4.2. オーバークイル法

329 オーバークイル法は、被滅菌物上のバイオバーデン数や検出菌  
 330 の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、 $10^6$ 以下のSALが  
 331 得られる条件で滅菌を行う方法である。

332 蒸気滅菌の場合は12Dの滅菌条件をいう。ただし、 $F_0$  12以上  
 333 での滅菌条件もオーバークイル法と称している。

##### 334 4.3. バイオバーデン/BI併用法

335 バイオバーデン/BI併用法は、広範なバイオバーデン調査結  
 336 果から最大バイオバーデン数を決定し、目標とするSALを基に、  
 337 最大バイオバーデン数以上の試験菌数を有する適当な市販BI  
 338 を用いて滅菌時間(又は滅菌線量)を算出する方法である。

339 本法を用いる場合は、被滅菌物のバイオバーデン数を日常的  
 340 に調査し、検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定も定期的  
 341 に実施する必要がある。

342 バイオバーデン調査において、BIの指標菌より抵抗性の強い  
 343 菌が検出された場合には、それを用いて指標菌とする。また、  
 344 必要に応じて滅菌条件の見直しを行う。

$$345 \text{ 滅菌時間(又は滅菌線量)} = D \times \log(N_0 / N)$$

346  $D$  : BIのD値

347  $N$  : 目的とする無菌性保証水準(SAL)

348  $N_0$  : 被滅菌物の最大バイオバーデン数

##### 349 4.4. 絶対バイオバーデン法

350 絶対バイオバーデン法は、被滅菌物や製造環境から検出され  
 351 た菌について、当該滅菌法に対する抵抗性調査を行い、湿熱滅  
 352 菌法の場合には、その中から最も抵抗性の強い菌を選び、その  
 353 D値を用い、被滅菌物のバイオバーデン数を基に滅菌条件を設  
 354 定する方法である。

355 バイオバーデン数は、広範なバイオバーデン調査によって決  
 356 定する。本法を用いる場合は、日常のバイオバーデン管理にお  
 357 いて、菌数計測及び検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定を  
 358 日常的に行う必要がある。

359 放射線滅菌法の場合は、ISO11137-2の方法により実施する。

#### 360 5. 参考資料

361 ・ISO 11138-1(2006):Sterilization of health care

362	products-Biological indicators-Part1:General	369	• ISO 11140 -1(2005): Sterilization of health care
363	requirements	370	products-Chemical indicators- Part1:General
364	• ISO11137-2(2006):Sterilization of health care	371	requirements
365	products-Radiation- Part2: Establishing the sterilization	372	• USP <55> BIOLOGICAL INDICATORS -RESISTANCE
366	dose	373	PERFORMANCE TESTS
367	• ISO / ASTM 51261(2002): Guide for selection and	374	
368	calibration of dosimetry systems for radiation processing	375	
376			

試験菌の接種と回収方法  
- 試験菌の乾燥による影響確認 -

## 1. 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。

## 2. 検討手順

以下の手順で実施した。

- 1) *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。
- 2) 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。

- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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。
- 8) 培養条件は 30～35℃ 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。

### 3. 結果

接種菌数と乾燥後の回収菌数の結果を表 III-1 に示す。

表 III-1 乾燥によるキャリアー上の菌数変動

試験菌	材質	試験者	接種菌数 (CFU/キャリアー)	回収菌数 (CFU/キャリアー)	対数減少量
<i>S. aureus</i>	ステンレス	A	$7.2 \times 10^4$	$4.0 \times 10^3$	1.3
<i>P. aeruginosa</i>			$2.2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^2$	2.1
<i>E. coli</i>			$3.3 \times 10^4$	$8.5 \times 10^2$	1.6
<i>C. albicans</i>			$3.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^2$	2.5
<i>B. subtilis</i>			$9.5 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	0.7
<i>A. brasiliensis</i>			$4.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	0.6

*S. aureus* , *P. aeruginosa* , *E. coli* 及び *C. albicans* の 4 菌種は *B. subtilis* 及び *A. brasiliensis* に比較すると菌数の減少量が多く、乾燥の影響を受けているものと推測された。

消毒効果を評価するためには、キャリアー上の初期菌数は  $10^5$ CFU 程度が望ましい。そのため、乾燥による菌数減少量を考慮した試験菌液を調製し、同様の調査を実施した。この時、塩化ビニル、硬質ウレタンゴム、エポキシ樹脂コートのカリヤーを用いた材質間の変動、試験者を 2-3 名採用し、試験者間の変動を含め、再調査を実施した。その結果を表 III-2 に示したが、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、その減少量をキャリアー材質間や試験者間で一定にすることは困難であることが判明した。

その要因としては、「乾燥した」という官能的な判断に個人差があること、キャリアー上の菌液は一様に乾燥するのではなく部分的に生じ、その時点で既に試験菌は影響を受けていること等が推定される。

以上のことから、テスト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は、消毒効果では無い部分で菌数減少を生じさせ、消毒剤の効果を過剰に評価する可能性が想定された。

そのため、共同実験においては、試験菌液接種量を  $50 \mu\text{L}$  として、キャリアー上の水分量を必要最低限にすると共に、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。

表 III-2 乾燥による菌数変動

試験菌	材質	試験者	接種菌数 (CFU/キャリアー)	回収菌数 (CFU/キャリアー)	対数減少量
<i>S. aureus</i>	塩化ビニル	A	$2.2 \times 10^6$	$6.7 \times 10^4$	1.5
		B	$2.2 \times 10^6$	$4.4 \times 10^4$	1.7
		C	$2.2 \times 10^6$	$1.5 \times 10^5$	1.1
	硬質 ウレタンゴム	A	$2.2 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$	1.0
		B	$2.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^5$	1.0
		C	$2.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$	0.9
	エポキシ 樹脂コート	A	$2.2 \times 10^6$	$4.3 \times 10^3$	2.7
		B	$2.2 \times 10^6$	$1.9 \times 10^5$	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	塩化ビニル	A	$1.1 \times 10^6$	$6.4 \times 10^3$
B			$1.1 \times 10^6$	$8.6 \times 10^3$	2.1
C			$1.1 \times 10^6$	$4.9 \times 10^3$	2.3
硬質 ウレタンゴム		A	$1.1 \times 10^6$	$2.1 \times 10^4$	1.7
		B	$1.1 \times 10^6$	$4.0 \times 10^4$	1.4
		C	$1.1 \times 10^6$	$6.6 \times 10^4$	1.2
エポキシ 樹脂コート		A	$1.1 \times 10^6$	$3.5 \times 10^2$	3.5
		B	$1.1 \times 10^6$	$9.8 \times 10^3$	2.0
<i>E. coli</i>		塩化ビニル	A	$1.9 \times 10^6$	$1.6 \times 10^5$
	B		$1.9 \times 10^6$	$1.1 \times 10^5$	1.3
	C		$1.9 \times 10^6$	$8.2 \times 10^4$	1.4
	硬質 ウレタンゴム	A	$1.9 \times 10^6$	$1.9 \times 10^4$	2.0
		B	$1.9 \times 10^6$	$1.2 \times 10^4$	2.2
		C	$1.9 \times 10^6$	$4.9 \times 10^4$	1.6
	エポキシ樹脂 コート	A	$1.9 \times 10^6$	$4.0 \times 10^3$	2.7
		B	$1.9 \times 10^6$	$1.5 \times 10^4$	2.1
	<i>C. albicans</i>	塩化ビニル	A	$9.0 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$
B			$9.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	1.8
C			$9.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$	1.7
硬質ウレタン ゴム		A	$9.0 \times 10^5$	$3.1 \times 10^4$	1.5
		B	$9.0 \times 10^5$	$3.8 \times 10^4$	1.4
		C	$9.0 \times 10^5$	$8.3 \times 10^4$	1.1
エポキシ樹脂 コート		A	$9.0 \times 10^5$	$9.0 \times 10^2$	3.0
		B	$9.0 \times 10^5$	$5.7 \times 10^4$	1.2

消毒剤の中和方法  
- 回収液の検討 -

## 4. 概要

検証対象濃度の各消毒剤を対象に、微生物の回収が可能となる液組成を検討した。その結果、表 1 に示す組成が全ての消毒剤に対して、微生物の回収が可能であることを確認した。

表 III-1 回収液組成

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 <sup>1</sup>	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。

## 5. 回収液の調製手順

以下の方法で調製した。

- (1) 大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウム 5 水和物、L-ヒスチジン、リン酸二水素カリウム及び水を混和し、121°C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。
- (2) よく振り混ぜ、室温にまで冷却する。
- (3) ろ過による無菌化を行ったカタラーゼを加え、全量 1000 mL とする。
- (4) 滅菌済の適当な分注器を用い、滅菌済の試験管等に回収液を 10 mL ずつ分注する。
- (5) 室温、暗所で保管し、1 週間以内に使用する。

## 6. 検討手順

以下の手順で実施した。

- (1) 検証対象濃度の各消毒剤を調製し、その 100  $\mu$ L を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に各試験菌  $10^3 \sim 10^4$  CFU を含んだ液 100  $\mu$ L を個別に接種した。
- (3) (2)の液を 90 分程度放置し、作用させた。
- (4) (3) の液 100  $\mu$ L ずつを 2 枚の SCD カンテン平板に接種し、カンテン表面塗抹法により、菌数を計測した。平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「回収された試験菌数」とした。
- (5) 同時に、消毒剤の代わりに滅菌水を添加した回収液に対して同様の操作を行い、SCD カンテン平板培地 2 枚で計測された菌数の平均値を「イニシャル値」とした。
- (6) (4) 及び (5) の培養条件は 30 ~ 35°C で最長 5 日間とした。

(7) 以下の式を使用して試験菌の回収率を算出した。

【計算式】

$$\text{回収率 (\%)} = (\text{回収された試験菌数} / \text{イニシャル値}) \times 100$$

(8) 試験菌の回収率が 50～200%であれば、回収液として適切と判断した。

## 7. 結果

消毒剤ごとの試験菌に対する回収率の結果を表 III-2 に示す。

全ての消毒剤及び試験菌を良好に回収することが出来たことから、表 III-1 の組成は回収液として適切であると判断した。

表 III-2 回収液の微生物回収率

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>S. aureus</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>E. coil</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	91	89	82	81	85	111	89	97	100
過酢酸	0.21%	80	95	78	80	103	96	104	109	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	82	107	74	98	100	108	87	105	91
イソプロパノール	50%	80	104	92	80	114	100	96	109	95
エタノール	70%	98	88	86	114	112	109	99	145	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	84	102	81	106	95	109	102	125	103
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	63	94	92	90	96	82	107	104	94
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	91	104	77	100	96	114	86	144	93

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>B. subtilis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
過酸化水素	3.0%	105	103	92	79	107	97	108	80	78
過酢酸	0.21%	82	115	83	105	73	78	90	104	82
次亜塩素酸ナトリウム	0.020%	99	112	88	96	100	105	110	86	96
イソプロパノール	50%	108	99	98	93	73	85	111	114	92
エタノール	70%	95	110	87	95	87	85	107	94	102
ベンザルコニウム塩化物	0.05%	79	97	54	99	107	103	100	82	88
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05%	94	94	86	100	93	97	104	84	71
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05%	93	115	82	93	80	123	106	88	116

## 評価方法確立のプロトコル

### 8. 目的

日本薬局方 参考情報収載の「微生物殺滅法」を改正し、「消毒法及び除染法」と名称変更した上で、GMP で要求される消毒剤の有効性を評価する手法と評価基準を提示する予定である。医薬品製造環境の構造設備は種々の材質から構成されているが、消毒剤の効果は材質によって異なる可能性がある。そこで、医薬品製造環境の構造設備における代表的な表面の構成材質に対して、標準的な消毒剤の有効性評価法を提示するための基礎実験を行う。

本実験では、各試験条件に対して適切な繰り返し数を設定することにより、評価法の室内再現性を確認すると共に、統一したプロトコルを基に、複数の試験室で消毒剤の有効性評価を実施し、得られた結果を比較することで、評価法の室間再現性についても考察する。

### 9. 実験材料

#### 2.1 消毒剤

表 III-1 に示す消毒剤を使用する。

滅菌した日本薬局方 精製水の規格を満たす水を用い、検証濃度の消毒剤を調製する。

表 III-1 消毒剤の種類と濃度

消毒剤	使用濃度 <sup>1</sup>	検証濃度 <sup>2</sup>
過酸化水素	3%	3%
過酢酸	0.2 ~ 0.3%	0.2%
次亜塩素酸ナトリウム	0.02 ~ 0.05%	0.02%
イソプロパノール	50 ~ 70%	50%
エタノール	70%	70%
ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%	0.05%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%	0.05%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%	0.05%

<sup>1</sup> : 消毒剤メーカーが治具や構造設備等へ適用する際に推奨しており、医薬品製造環境で汎用されている濃度である。

<sup>2</sup> : 本検証においては、汎用される使用濃度の下限値をワーストケースとして採用する。

#### 2.2 対象材質

表 III-2 及び図 1 に示す材質のキャリアー (サイズ 5 cm × 5 cm) を準備し、試験に供する。こ



のキャリアーを除塵した上で過酸化水素水に一晩以上浸漬して、清浄な状態にする。

表 III-2 清浄区域及び無菌操作区域で使用される構造設備の材質

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

図1 各材質の外観



### 2.3 試験菌

消毒剤の効果を評価するための試験菌は，各分類群の代表菌種を選定する．これらの試験菌を日本薬局方 <4.05> 微生物限度試験法に記載されている条件で培養及び希釈して使用する．ただし，*Bacillus subtilis* については日本薬局方 <4.02> 抗生物質の微生物学的力価試験法を参考に芽胞懸濁液を調製する．調製済の市販品の使用も可である．なお，試験菌液の調製には pH7.2 のリン酸緩衝液を用いる．詳細は表 III-3 に示す．

表 III-3 試験菌と培養条件

試験菌		培養条件		
		培地	温度	時間
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633 等	芽胞懸濁液		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 等	サブロー	20 ~ 25 °C	2 ~ 3 days
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 等	PD 斜面	20 ~ 25 °C	5 ~ 7 days

## 2.4 回収液

消毒剤の効果を中和しながら試験菌を回収するために用いる回収液の組成を表 III-4 に示す。

表 III-4 回収液の組成

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	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

：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。

### 【調製方法】

- (1) 大豆レシチン，ポリソルベート 80，チオ硫酸ナトリウム 5 水和物，L-ヒスチジン，リン酸二水素カリウム及び水を混和し，加温溶解した後，121°C で 15 ~ 20 分間高圧蒸気滅菌する。
- (2) よく振り混ぜ，室温にまで冷却する。
- (3) ろ過による無菌化を行ったカタラーゼを加え，全量 1000 mL とする。
- (4) 滅菌済の適当な分注器を用い，滅菌済の試験管等に回収液を 10 mL ずつ分注する。
- (5) 室温下，暗所で保管し，1 週間以内に使用する。

## 10. 実施項目

### 3.1 消毒剤の有効性評価法の検証

日本薬局方 参考情報 「消毒法及び除染法」に収載予定の消毒剤の有効性評価法について，そ

の妥当性を検証する。なお、参考情報には2種類の評価法を収載する予定であるが、ここでは実製造現場での使用状態に近い評価が可能な「硬質表面キャリア法」を対象とする。参考情報収載案については、別添資料を参照のこと。

### 3.2 分担

本評価法確立の共同実験には14社の試験室が参画する。各試験室は消毒剤ごとに分担する。各試験室では日にちを変えて3回繰り返すことにより、評価法の室内再現性を、また同じ条件の実験を2つ以上の試験室で繰り返し、得られた結果を比較することにより、評価法の室間再現性をそれぞれ確認及び考察する。

#### 【参画企業】(五十音順)

アステラスファーマテック株式会社	サノフィ株式会社	参天製薬株式会社
塩野義製薬株式会社	第一三共株式会社	大日本住友製薬株式会社
武田薬品工業株式会社	中外製薬株式会社	東和薬品株式会社
バイエル薬品株式会社	ファーマパック株式会社	メルク株式会社
持田製薬工業株式会社	ロート製薬株式会社	

## 11. 実施方法

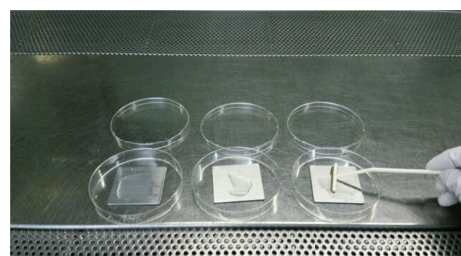
消毒剤2種、ステンレス製のキャリアーを対象とした時の試験手順を以下に示す。ここで示した操作を6菌種に対して実施する。

(参考情報：同時に複数の操作を実施する場合は、キャリアーを統一する方が、菌種を統一する場合よりも、菌液の乾燥時間や回収操作がほぼ同等となり、煩雑性と結果のバラつきが抑制される)

- 9)  $10^{6-7}$  CFU/mL の *E. coli* を含んだ菌液 50  $\mu$ L を、滅菌済シャーレ等に配置した 5 cm  $\times$  5 cm のキャリアーの表面に接種する。これを3枚準備する。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(接種菌液量を 50  $\mu$ L とすることで、キャリアー表面上の水分を最少とし、実製造現場の状況を可能な限りシミュレートする)。

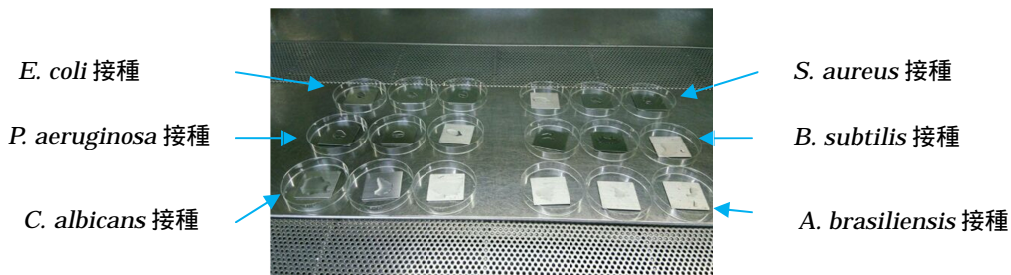


菌液接種



菌液の均一化

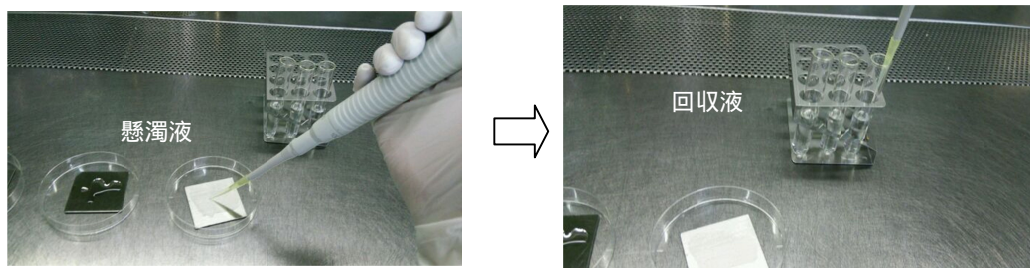
- 10) 1)と同様の操作を *S. aureus* , *P. aeruginosa* , *B. subtilis* , *C. albicans* , *A. brasiliensis* についても実施し, 計 18 枚の試験菌を接種したキャリアーを作成する .



- 11) *E. coli* 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. 他の1枚については消毒剤を, 残りの1枚には消毒剤をそれぞれ 1 mL 滴下し, コンラージ棒を用いて, キャリアー表面全体に行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる .



- 12) 3)と同様の操作を他の 5 菌種を接種したキャリアーについて実施する. 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 (消毒剤) 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約 1 分ごとに均一化操作を行う.
- 13) 5 分後にキャリアー表面の *E. coli* を懸濁した滅菌水 100  $\mu$ L をとり, 回収液 10 mL に移し, よくかき混ぜる. 同様に, キャリアー表面の *E. coli* を懸濁した消毒剤 及び消毒剤 100  $\mu$ L をとり, 回収液 10 mL に移し, よくかき混ぜる. 他の 5 菌種を懸濁した滅菌水, 消毒剤 及び消毒剤 についても同様の操作を実施する .



- 14) 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 .
- 15) 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 .
- 16) 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計測しても差支えない。なお、コロニー計測は30～300 CFUの範囲内のプレートを対象に行う。該当するプレートが無い場合又は2種類の希釈段階から30～300 CFUの範囲内にあるコロニーを認めた場合は、希釈段階の少ない液で得られた計測値を採用する。

- 17) 消毒剤で懸濁し、シャーレ2枚で計測された菌数の平均値を「消毒後の菌数」、滅菌水で懸濁し、シャーレ2枚で計測された菌数の平均値を「初期菌数」とする。

**【菌数の算出】**

$$\text{菌数} = a \times b \times c \times d$$

a : シャーレ2枚の平均値【CFU】

b : 段階希釈倍数 (1倍 or 10倍 or 100倍)

c : 10 (回収液の量)【mL】

d : 10 (消毒剤中の菌数に換算する係数。1 mL中の100μLに対する菌数を計測)

- 18) 「消毒後の菌数」と「初期菌数」をそれぞれ対数換算し、以下の式を使用して試験菌の対数減少量を算出する (小数点2桁目を四捨五入し、少数点1桁で表記する)。

**【計算式】**

$$\text{対数減少量} = \text{Log (消毒後の菌数)} - \text{Log (初期菌数)}$$

- 19) 他7種の材質のキャリアーについて、上記1)～10)の操作実施する。  
20) 上記1)～11)の操作について日にちを変えて、それぞれ3回繰り返す。  
21) 使用した各キャリアーは、3%過酸化水素水に一晩以上浸漬して清浄な状態にする。

## 12. 付則

参考資料消毒法及び除染法 (参考情報 改定案の抜粋)

## 参考資料

### 消毒法及び除染法 (参考情報 改定案の抜粋)

#### 2.2 評価法

清浄区域及び無菌操作区域等に消毒法を適用する場合は、消毒剤の濃度、作用時間、消毒対象となる表面の材質、その消毒剤で減少させたい微生物の種類等を考慮し、その条件の有効性を確認する。以下に評価法の例を示す。評価において、対象微生物に対して有効と判断された条件を採用する。なお、科学的に正しいことが立証できれば、例示した評価法以外の方法を採用しても差し支えない。

##### 2.2.1 試験菌懸濁法

実際に使用する希釈液 (精製水、水道水、他) を用いて、実際に使用する濃度の消毒剤を調製する。調製した消毒剤に  $10^5 \sim 10^6$  CFU の試験菌を接種する。常温で規定時間 (通例、5 ~ 15 分間) 作用させた後、消毒剤を希釈、又は除去 (ろ過) する。希釈液又はろ過後の洗浄液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和する。接種した試験菌数及び消毒後の試験菌数の計測は、<4.05> 微生物限度試験法 3.4.製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす条件で実施する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、細菌及び真菌では 3Log 以上、芽胞では 2Log 以上の減少を認めた場合、各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表 III-2 を参照し、必要な菌種を選定する。これらの試験菌は日本薬局方 <4.05> 微生物限度試験法に記載されている条件で培養及び希釈して評価に使用する。ただし、*Bacillus subtilis* については日本薬局方 <4.02> 抗生物質の微生物学的力価試験法を参考に芽胞懸濁液を調製して評価に使用する。なお、表 III-2 に示す菌種と同等であれば、他の菌種を使用することができる。

##### 2.2.2 硬質表面キャリアー法

約 5 cm × 5 cm の各種表面材質のキャリアーを適切な精度が得られる数量準備する。 $10^5 \sim 10^6$  CFU の試験菌をキャリアーの広範囲に接種し、乾燥させた後、実使用濃度の消毒剤を滴下する。常温で規定時間 (通例、5 ~ 15 分間) 作用させた後、希釈しながら、キャリアー上の試験菌を回収する。回収液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和する。回収方法は JIS T11737-1:2013 を参考にストマック法、振とう法等を採用する。接種した試験菌数及び回収した試験菌数は、4.05 微生物限度試験法 3.4.製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす試験条件で計測する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、2.2.1 試験菌懸濁法に規定された減少量を十分に上回る効果を認めた条件を各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表 III-2 を参照し、必要な菌種を選定するほか、環境モニタリングで検出頻度の高い代表菌 1 ~ 2 株を追加することが望ましい。なお、表 III-2 に示す菌種と同等であれば、他の菌種を使用することができる。試験菌の培養及び希釈等については 2.2.1 試験菌懸濁法の規定を参考にし、また、清浄区域又は無菌操作区域で使用される各種表面の材質の例を表 III-3 に示すが、評価においては実使用状況を考慮の上、適宜追加する。

表III-2 試験菌

分類	試験菌
一般細菌	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, NBRC 3972 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NBRC 13276 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NBRC 13275
芽胞形成菌	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NBRC 3134
真菌	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NBRC 1594 <i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, NBRC 9455

表III-3 消毒対象となる材質例

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
化粧珪酸カルシウム	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

添付資料 II-4-1 3% 過酸化水素：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量 (LRV)																							
		SUS			強化ガラス			ポリカーボネート			化粧ケイ酸カルシウム			エポキシ樹脂			塩化ビニル			ウレタンゴム			ニトリルゴム		
		A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社	A社	B社	K社
<i>E. coli</i>	1	-5.1	-5.7		-5.3	-5.7		-5.2	-5.8		-5.2	-5.7		-5.4	-5.8		-5.3	-5.6		-5.6	-5.8		-5.7	-5.7	
	2	-4.9	-6.4		-5.2	-6.5		-5.3	-6.4		-5.3	-6.4		-5.2	-6.4		-5.0	-6.5		-5.3	-6.5		-5.4	-6.4	
	3	-5.3	-5.4		-5.4	-5.1		-3.5	-5.2		-3.1	-4.9		-5.7	-4.9		-5.5	-5.1		-3.5	-5.2		-5.0	-4.5	
	Ave.	-5.1	-5.8		-5.3	-5.8		-4.7	-5.8		-4.5	-5.7		-5.4	-5.7		-5.3	-5.7		-4.8	-5.8		-5.4	-5.5	
<i>S. aureus</i>	1	-4.8	-5.7		-4.8	-5.7		-5.3	-5.7		-5.3	-5.7		-5.0	-5.7		-4.9	-5.7		-5.4	-5.8		-5.3	-5.7	
	2	-4.8	-6.4		-5.1	-6.4		-3.5	-6.5		-3.5	-2.9		-5.0	-6.4		-4.9	-6.4		-5.2	-5.3		-5.3	-6.4	
	3	-3.6	-5.4		-5.3	-5.3		-5.2	-5.4		-5.2	-5.7		-5.3	-5.5		-5.3	-5.4		-3.5	-5.4		-5.2	-5.4	
	Ave.	-4.4	-5.8		-5.1	-5.8		-4.7	-5.9		-4.7	-4.8		-5.1	-5.9		-5.0	-5.8		-4.7	-5.5		-5.3	-5.8	
<i>P. aeruginosa</i>	1	-5.3	-5.8		-5.1	-5.7		-5.0	-5.7		-4.9	-5.7		-5.6	-5.8		-5.2	-5.7		-5.0	-5.8		-5.0	-5.7	
	2	-5.0	-4.8		-5.0	-4.5		-2.8	-3.9		-5.1	-3.7		-4.8	-5.0		-4.8	-5.1		-4.8	-6.4		-4.8	-4.5	
	3	-5.1	-4.8		-5.0	-4.6		-5.4	-5.0		-3.6	-5.0		-5.1	-6.1		-4.9	-5.0		-3.6	-4.9		-3.6	-4.9	
	Ave.	-5.1	-5.1		-5.0	-4.9		-4.4	-4.9		-4.5	-4.8		-5.2	-5.6		-5.0	-5.3		-4.5	-5.7		-4.5	-5.0	
<i>B. subtilis</i>	1	-0.1	-0.1		0.1	-0.2		0.0	0.6		0.0	-0.1		-0.3	0.1		-0.2	0.1		-0.1	0.0		0.0	-0.1	
	2	0.0	0.0		-0.1	0.0		-0.1	0.0		0.0	0.0		-0.1	0.0		0.0	0.0		0.1	0.0		0.1	0.0	
	3	0.1	-0.1		0.0	0.0		0.0	-0.3		-0.1	0.0		0.0	-0.1		0.1	-0.2		0.0	0.0		0.1	-0.1	
	Ave.	0.0	-0.1		0.0	-0.1		0.0	0.1		0.0	0.0		-0.1	0.0		0.0	0.0		0.0	0.0		0.1	-0.1	
<i>C. albicans</i>	1	-1.4	-0.5		-1.4	-5.0		-1.1	-1.4		-1.1	-0.2		-2.5	-0.3		-2.2	-0.3		-1.9	-0.1		-1.7	-1.0	
	2	-1.2	-0.1		-1.3	-0.1		-1.3	-0.1		-0.2	-0.2		-1.8	0.0		-1.6	0.0		-0.4	-0.3		-1.8	-0.2	
	3	-2.7	-0.5		-1.6	-0.3		-1.0	-0.1		-1.0	-0.3		-2.3	-0.1		-2.8	-0.1		-1.8	-0.3		-1.3	-0.1	
	Ave.	-1.8	-0.4		-1.4	-1.8		-1.1	-0.5		-0.8	-0.2		-2.2	-0.1		-2.2	-0.1		-1.4	-0.2		-1.6	-0.4	
<i>A. brasiliensis</i>	1	-2.9	-1.5	-1.3	-2.8	-1.2	-1.2	-2.7	-6.0	-1.6	-2.1	-1.2	-1.2	-1.2	-1.2	-1.0	-2.9	-6.0	-1.1	-3.0	-1.2	-1.3	-3.2	-1.6	-2.0
	2	-4.9	-1.9	-1.9	-5.0	-1.5	-2.0	-3.1	-1.8	-2.0	-4.7	-1.4	-1.9	-5.0	-1.2	-1.4	-4.9	-1.4	-2.2	-4.9	-1.4	-1.5	-2.6	-1.8	-2.2
	3	-2.8	-1.5	-2.4	-3.0	-1.4	-2.2	-3.3	-1.3	-2.2	-3.0	-1.3	-2.4	-2.7	-0.5	-2.1	-2.9	-1.3	-2.2	-3.0	-1.3	-2.2	-3.0	-1.4	-2.4
	Ave.	-3.5	-1.6	-1.9	-3.6	-1.4	-1.8	-3.0	-3.0	-1.9	-3.3	-1.3	-1.8	-3.0	-1.0	-1.5	-3.6	-2.9	-1.8	-3.6	-1.3	-1.7	-2.9	-1.6	-2.2



添付資料 II-4-1 3% 過酸化水素：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)																							
		SUS						強化ガラス						ポリカーボネート						化粧ケイ酸カルシウム					
		A社		B社		K社		A社		B社		K社		A社		B社		K社		A社		B社		K社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	130000	0	520000	0			192000	0	520000	0			145000	0	630000	0			146500	0	560000	0		
	2	89000	0	1850000	0			172000	0	2880000	0			182000	0	2550000	0			183500	0	2725000	0		
	3	198000	0	137500	0			239000	0	118000	0			152000	50	144000	0			114500	100	73000	0		
<i>S. aureus</i>	1	70500	0	540000	0			67000	0	520000	0			180000	0	515000	0			180000	0	465000	0		
	2	70000	0	255000	0			133000	0	2630000	0			159500	50	3000000	0			175500	3500	2960000	4000		
	3	214500	50	230500	0			187500	0	190000	0			156500	0	269000	0			144500	0	520000	0		
<i>P. aeruginosa</i>	1	203000	0	685000	0			139000	0	525000	0			92500	0	485000	0			88000	0	490000	0		
	2	98000	0	58500	0			91000	0	29000	0			85500	150	8150	0			113500	0	5450	0		
	3	128000	0	58500	0			94500	0	36500	0			253000	0	102500	0			100500	50	91500	0		
<i>B. subtilis</i>	1	51500	45500	71000	60500			52000	60000	72000	50000			110000	104500	59000	218000			95000	98500	73000	56500		
	2	106000	92000	91000	83500			105000	88000	81500	88000			114500	91500	91800	96000			111000	118500	95500	93000		
	3	103000	119000	69000	51500			123000	115000	53500	59500			104500	107000	80500	42500			113000	100500	87000	78000		
<i>C. albicans</i>	1	74500	3250	131000	42500			44000	1600	97500	0			100500	8350	91000	3800			59000	4800	126500	76500		
	2	79000	4800	93000	71000			90000	5850	115500	92000			124000	7200	154000	114500			53500	34500	116500	75500		
	3	258500	500	45000	14350			52500	1250	29100	15450			127000	11500	62000	51000			92500	8650	55500	25000		
<i>A. brasiliensis</i>	1	800	0	94000	3150	56000	2550	600	0	84000	5700	72000	4600	55500	100	1065000	0	86500	2100	68000	50	108000	6300	73000	4900
	2	81000	0	81000	950	52000	700	94500	0	65500	2250	49500	450	67000	50	878000	1400	83000	850	46500	0	105000	4400	45500	550
	3	58500	100	80500	2350	58000	250	51500	50	76500	3350	70500	450	103000	50	95500	4650	95000	550	54500	50	90500	4650	81000	300

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)																							
		エポキシ樹脂						塩化ビニル						ウレタンゴム						ニトリルゴム					
		A社		B社		K社		A社		B社		K社		A社		B社		K社		A社		B社		K社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	237500	0	615000	0			201000	0	380000	0			369500	0	585000	0			485000	0	515000	0		
	2	146500	0	2580000	0			109000	0	2880000	0			182500	0	2830000	0			277500	0	2745000	0		
	3	500000	0	81000	0			328500	0	127500	0			165500	50	151000	0			106000	0	33000	0		
<i>S. aureus</i>	1	106000	0	510000	0			88500	0	525000	0			228500	0	590000	0			203000	0	460000	0		
	2	106000	0	2405000	0			74000	0	2620000	0			169500	0	180000	0			183000	0	2705000	0		
	3	197500	0	289000	0			202000	0	259500	0			166500	50	232000	0			170500	0	261000	0		
<i>P. aeruginosa</i>	1	400000	0	665000	0			159000	0	505000	0			107000	0	600000	0			110000	0	480000	0		
	2	63500	0	101000	0			70000	0	120500	0			68000	0	2520000	0			57000	0	34000	0		
	3	131000	0	1185000	0			83500	0	112000	0			222500	50	78000	0			184000	50	75500	0		
<i>B. subtilis</i>	1	89500	43000	47000	60000			43500	25000	43500	56500			110500	86500	62000	60500			104500	97000	69500	61000		
	2	98000	80000	82500	76500			88500	84500	103000	98500			99500	117000	105000	96500			92500	108500	99500	89000		
	3	106000	112500	81500	59000			97000	113000	77500	52500			121500	119000	76500	74500			102000	120500	87000	65500		
<i>C. albicans</i>	1	51000	150	115000	59000			57000	400	139500	64500			99500	1350	128500	93000			142000	2550	168500	15650		
	2	93000	1650	100500	112500			97500	2500	121000	117000			128000	47000	113000	60000			155000	2700	96500	63000		
	3	87500	450	47000	40500			101000	150	53500	39000			136500	2100	67000	34500			120500	5900	49000	42000		
<i>A. brasiliensis</i>	1	750	50	123500	8200	61000	6550	850	0	1025000	0	74500	6300	93000	100	99500	6750	109000	5650	79000	50	109500	3050	93500	900
	2	95500	0	102000	6700	51000	1850	79500	0	101000	4050	61500	400	82000	0	110000	4700	71500	2100	75000	200	79000	1300	77500	450
	3	73000	150	98000	29500	41500	300	74500	100	88000	4400	77500	500	52500	50	113000	6600	101500	700	48000	50	89500	3500	102000	450

添付資料 II-4-2 0.2% 過酢酸：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量 (LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		C社	D社	C社	D社	C社	D社	C社	D社	C社	D社	C社	D社	C社	D社	C社	D社
<i>E. coli</i>	1	-6.4	-5.1	-6.5	-5.1	-6.7	-5.2	-6.4	-5.2	-6.4	-5.2	-6.5	-5.2	-6.5	-5.2	-6.5	-5.2
	2	-6.2	-5.3	-6.3	-5.2	-6.4	-5.3	-6.3	-5.2	-6.3	-5.2	-6.4	-5.3	-6.3	-5.3	-6.4	-5.3
	3	-5.4	-4.8	-5.3	-5.0	-5.3	-5.2	-5.4	-5.2	-5.7	-5.1	-5.3	-5.2	-5.3	-5.1	-5.4	-5.0
	Ave.	-6.0	-5.1	-6.0	-5.1	-6.1	-5.2	-6.0	-5.2	-6.1	-5.2	-6.1	-5.2	-6.0	-5.2	-6.1	-5.2
<i>S. aureus</i>	1	-7.0	-5.1	-7.0	-5.4	-7.2	-5.5	-7.0	-5.2	-6.5	-5.1	-7.0	-5.4	-6.3	-5.5	-6.7	-5.4
	2	-6.7	-5.4	-6.7	-5.4	-6.8	-5.4	-6.2	-5.4	-6.4	-5.4	-6.6	-5.4	-6.5	-5.5	-6.5	-5.5
	3	-5.8	-5.5	-5.6	-5.5	-5.7	-5.4	-5.7	-4.9	-5.8	-5.0	-5.8	-5.3	-5.7	-5.3	-5.7	-5.3
	Ave.	-6.5	-5.3	-6.4	-5.4	-6.6	-5.4	-6.3	-5.2	-6.2	-5.2	-6.5	-5.4	-6.2	-5.4	-6.3	-5.4
<i>P. aeruginosa</i>	1	-6.4	-4.7	-6.6	-5.0	-6.3	-5.2	-6.8	-5.1	-6.3	-4.8	-6.6	-5.2	-5.9	-5.2	-6.3	-5.8
	2	-5.4	-5.0	-5.6	-5.3	-5.6	-5.2	-5.8	-5.2	-5.1	-5.3	-5.3	-5.2	-5.4	-5.2	-5.3	-5.3
	3	-5.0	-4.6	-5.0	-5.1	-5.7	-5.0	-5.3	-5.0	-5.4	-4.8	-5.4	-5.1	-4.9	-5.2	-5.3	-5.2
	Ave.	-5.6	-4.8	-5.7	-5.1	-5.9	-5.1	-6.0	-5.1	-5.6	-5.0	-5.8	-5.2	-5.4	-5.2	-5.6	-5.4
<i>B. subtilis</i>	1	-4.9	-5.5	-4.9	-5.6	-5.1	-5.6	-4.7	-5.6	-5.2	-5.6	-5.1	-5.6	-5.0	-5.6	-5.1	-5.6
	2	-5.2	-5.6	-5.0	-5.6	-5.1	-5.6	-4.9	-5.6	-5.0	-5.6	-5.3	-5.7	-5.1	-5.6	-5.2	-5.6
	3	-5.3	-5.5	-5.1	-5.5	-5.3	-5.2	-5.2	-5.2	-5.1	-5.5	-5.1	-5.3	-5.1	-5.5	-5.1	-5.6
	Ave.	-5.1	-5.5	-5.0	-5.6	-5.2	-5.5	-4.9	-5.5	-5.1	-5.6	-5.2	-5.5	-5.1	-5.6	-5.1	-5.6
<i>C. albicans</i>	1	-5.0	-4.5	-4.6	-4.8	-5.8	-4.5	-4.1	-4.7	-5.4	-4.4	-5.7	-4.6	-5.1	-5.0	-5.3	-5.0
	2	-3.2	-4.6	-3.5	-4.7	-4.7	-4.7	-3.7	-4.8	-4.2	-4.1	-4.4	-4.5	-4.5	-4.9	-4.6	-5.0
	3	-4.3	-4.4	-4.0	-4.3	-5.4	-4.3	-3.8	-4.1	-5.3	-4.1	-4.4	-4.3	-4.6	-4.8	-4.4	-4.6
	Ave.	-4.2	-4.5	-4.0	-4.6	-5.3	-4.5	-3.9	-4.5	-5.0	-4.2	-4.8	-4.5	-4.7	-4.9	-4.8	-4.9
<i>A. brasiliensis</i>	1	-3.5	-4.7	-3.7	-4.6	-4.6	-4.9	-3.9	-4.7	-4.0	-4.5	-4.5	-4.6	-4.6	-4.8	-4.6	-4.9
	2	-3.8	-4.4	-3.8	-4.5	-4.0	-4.7	-3.9	-4.8	-4.0	-4.5	-4.6	-4.6	-4.6	-4.7	-4.6	-4.9
	3	-3.9	-4.8	-3.9	-4.5	-4.0	-4.5	-3.8	-4.4	-3.9	-4.8	-4.2	-4.9	-4.0	-4.3	-3.9	-4.7
	Ave.	-3.7	-4.6	-3.8	-4.5	-4.2	-4.7	-3.9	-4.6	-4.0	-4.6	-4.4	-4.7	-4.4	-4.6	-4.4	-4.8

添付資料 II-4-2 0.2% 過酢酸：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		C社		D社		C社		D社		C社		D社		C社		D社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	2560000	0	122500	0	2880000	0	133500	0	5260000	0	162500	0	2255000	0	145500	0
	2	165000	0	182500	0	195500	0	172500	0	2300000	0	187500	0	221000	0	166000	0
	3	251000	0	70000	0	194000	0	95500	0	187500	0	161000	0	281000	0	158000	0
<i>S. aureus</i>	1	9040000	0	118500	0	10730000	0	233500	0	15830000	0	308000	0	1020000	0	164500	0
	2	4800000	0	240500	0	4990000	0	270000	0	5950000	0	264000	0	1475000	0	239000	0
	3	595000	0	300500	0	375000	0	300000	0	520000	0	240000	0	475000	0	81500	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	2430000	0	46000	0	3660000	0	92500	0	2150000	0	171000	0	6360000	0	131000	0
	2	229000	0	92000	0	313000	0	179500	0	380000	0	148500	0	590000	0	173500	0
	3	101000	0	35500	0	100500	0	132000	0	495000	0	105500	0	189000	0	97500	0
<i>B. subtilis</i>	1	84000	0	340000	0	79000	0	430000	0	129500	0	365000	0	45000	0	400000	0
	2	159000	0	360000	0	110500	0	420000	0	138000	0	360000	0	83500	0	370000	0
	3	179000	0	320000	0	143000	0	290000	0	184000	0	147500	0	148000	0	163000	0
<i>C. albicans</i>	1	108000	0	29000	0	35500	0	69500	0	585000	0	32500	0	12500	0	52500	0
	2	1600	0	39000	0	2950	0	52500	0	54000	0	55000	0	5300	0	68000	0
	3	22400	0	23500	0	9050	0	18500	0	237500	0	18000	0	6450	0	11500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	2950	0	47000	0	5050	0	41000	0	39000	0	73500	0	8900	0	55500	0
	2	6100	0	25000	0	6650	0	30000	0	11250	0	51500	0	7650	0	64000	0
	3	9050	0	65500	0	8150	0	33500	0	10850	0	28500	0	6550	0	26500	0

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		C社		D社		C社		D社		C社		D社		C社		D社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	2770000	0	153000	0	2980000	0	173500	0	3435000	0	168000	0	3050000	0	162500	0
	2	201000	0	164500	0	283000	0	183500	0	193000	0	191000	0	239000	0	205000	0
	3	495000	0	117000	0	214000	0	146000	0	214000	0	138500	0	250000	0	105500	0
<i>S. aureus</i>	1	3030000	0	130000	0	10720000	0	232000	0	1790000	0	345000	0	5020000	0	276500	0
	2	2700000	0	235500	0	3850000	0	233500	0	3200000	0	289000	0	3425000	0	301000	0
	3	620000	0	107000	0	610000	0	199000	0	550000	0	203500	0	525000	0	204000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	2180000	0	60000	0	4300000	0	173500	0	790000	0	170000	0	2075000	0	610000	0
	2	119500	0	179000	0	200500	0	171000	0	233000	0	147500	0	177500	0	188500	0
	3	244500	0	66000	0	244000	0	131000	0	86500	0	153000	0	176500	0	171000	0
<i>B. subtilis</i>	1	146500	0	380000	0	137000	0	370000	0	110000	0	445000	0	120000	0	385000	0
	2	105000	0	430000	0	176000	0	460000	0	119000	0	420000	0	159000	0	390000	0
	3	178000	0	343500	0	115000	0	209500	0	118500	0	290000	0	136000	0	390000	0
<i>C. albicans</i>	1	226000	0	25000	0	480000	0	42500	0	137500	0	99000	0	186000	0	97500	0
	2	14700	0	12500	0	28000	0	31000	0	29950	0	86000	0	42500	0	97000	0
	3	193500	0	13000	0	27500	0	19500	0	41000	0	67500	0	27800	0	35500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	10200	0	31000	0	31500	0	42500	0	40000	0	67500	0	38500	0	82000	0
	2	10100	0	33000	0	44000	0	39500	0	40500	0	47000	0	39500	0	71000	0
	3	8800	0	64500	0	15850	0	74500	0	11350	0	20500	0	8450	0	51000	0

添付資料 II-4-3 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量 (LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		E社	F社	E社	F社	E社	F社	E社	F社	E社	F社	E社	F社	E社	F社	E社	F社
<i>E. coli</i>	1	-5.5	-5.6	-5.6	-5.5	-5.4	-5.8	-5.3	-5.8	-5.4	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-6.0	-5.6	-5.9
	2	-5.5	-5.7	-5.5	-6.1	-5.5	-5.5	-5.5	-5.9	-5.4	-5.6	-5.5	-6.0	-5.5	-5.9	-5.5	-6.0
	3	-5.5	-5.5	-5.5	-5.7	-5.5	-5.6	-5.5	-5.8	-5.4	-5.6	-5.5	-5.7	-5.5	-5.6	-5.5	-5.6
	Ave.	-5.5	-5.6	-5.5	-5.8	-5.5	-5.6	-5.4	-5.8	-5.4	-5.6	-5.5	-5.8	-5.5	-5.8	-5.5	-5.8
<i>S. aureus</i>	1	-5.5	-5.5	-5.5	-5.6	-5.4	-5.6	-5.3	-5.4	-5.3	-5.6	-5.4	-5.6	-5.4	-5.6	-5.6	-5.5
	2	-5.5	-5.6	-5.5	-5.5	-5.6	-5.5	-5.4	-5.5	-5.4	-5.5	-5.4	-5.7	-5.4	-5.5	-5.4	-5.6
	3	-5.5	-5.2	-5.6	-5.4	-5.5	-5.6	-5.5	-5.4	-5.5	-5.6	-5.5	-5.4	-5.5	-5.6	-5.4	-5.6
	Ave.	-5.5	-5.4	-5.5	-5.5	-5.5	-5.6	-5.4	-5.4	-5.4	-5.6	-5.4	-5.6	-5.4	-5.6	-5.5	-5.6
<i>P. aeruginosa</i>	1	-5.2	-5.4	-5.2	-5.4	-5.2	-5.3	-5.2	-5.4	-5.4	-5.4	-5.5	-5.4	-5.5	-5.4	-5.6	-5.4
	2	-5.1	-5.4	-5.1	-5.5	-5.2	-5.3	-5.1	-5.4	-5.2	-5.3	-5.2	-5.3	-5.1	-5.4	-5.2	-5.4
	3	-5.2	-5.4	-5.3	-5.3	-5.3	-5.1	-5.3	-5.4	-5.3	-5.1	-5.3	-5.3	-5.1	-5.4	-5.2	-5.4
	Ave.	-5.2	-5.4	-5.2	-5.4	-5.2	-5.2	-5.2	-5.4	-5.3	-5.3	-5.3	-5.3	-5.2	-5.4	-5.3	-5.4
<i>B. subtilis</i>	1	0.0	-0.3	-0.3	0.3	0.0	-0.1	0.0	-0.5	0.2	0.0	-0.1	0.0	0.0	-0.1	-0.1	0.0
	2	-0.1	0.0	-0.1	0.2	-0.1	0.0	0.1	-0.2	-0.1	0.4	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1	0.0	-0.1
	3	0.1	0.2	-0.1	0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.1	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1
	Ave.	0.0	0.0	-0.2	0.2	-0.1	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.1	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.0	-0.1
<i>C. albicans</i>	1	-5.4	-5.4	-5.4	-4.0	-5.6	-5.6	-5.6	-5.3	-5.5	-5.7	-5.5	-5.6	-5.6	-5.7	-5.6	-5.6
	2	-5.5	-5.5	-5.3	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.6	-5.5	-5.7	-5.5	-5.6	-5.6	-5.5	-3.8	-5.7
	3	-5.5	-5.6	-5.4	-5.3	-5.6	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.7	-5.6	-5.6	-5.5	-5.6	-5.5	-5.6
	Ave.	-5.5	-5.5	-5.4	-5.0	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.5	-5.7	-5.5	-5.6	-5.6	-5.6	-5.0	-5.6
<i>A. brasiliensis</i>	1	-5.6	-3.1	-5.6	-5.5	-5.7	-5.7	-5.6	-5.7	-5.5	-5.7	-4.9	-5.5	-3.9	-2.2	-4.0	-5.8
	2	-5.5	-5.8	-5.5	-5.5	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.6	-5.6	-5.5	-5.6	-3.9	-2.3	-3.4	-5.7
	3	-5.6	-5.5	-5.5	-5.0	-5.6	-5.5	-5.6	-5.4	-5.5	-5.6	-5.5	-5.6	-3.8	-3.7	-5.6	-5.6
	Ave.	-5.6	-4.8	-5.5	-5.3	-5.6	-5.6	-5.6	-5.5	-5.5	-5.6	-5.3	-5.6	-3.9	-2.7	-4.3	-5.7

添付資料 II-4-3 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		E社		F社		E社		F社		E社		F社		E社		F社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	305000	0	400000	0	380000	0	335000	0	249500	0	580000	0	188000	0	370000	0
	2	305000	0	555000	0	340000	0	1170000	0	345000	0	350000	0	310000	0	785000	0
	3	320000	0	345000	0	310000	0	460000	0	340000	0	440000	0	305000	0	650000	0
<i>S. aureus</i>	1	335000	0	340000	0	310000	0	420000	0	248500	0	227000	0	198000	0	430000	0
	2	340000	0	370000	0	330000	0	320000	0	355000	0	310000	0	234000	0	280000	0
	3	310000	0	166500	0	415000	0	275500	0	301000	0	430000	0	330000	0	265000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	167000	0	252000	0	156500	0	238000	0	165000	0	92000	0	145000	0	227500	0
	2	138500	0	232000	0	126500	0	345000	0	148000	0	210000	0	123000	0	237000	0
	3	154500	0	250000	0	178000	0	219500	0	215500	0	124500	0	209500	0	120000	0
<i>B. subtilis</i>	1	845000	810000	1190000	640000	995000	530000	430000	945000	1160000	1100000	935000	320000	660000	680000	1080000	1130000
	2	1120000	870000	1200000	1215000	930000	825000	910000	1290000	1145000	955000	1105000	1130000	955000	1245000	740000	430000
	3	685000	835000	540000	915000	655000	560000	675000	995000	1145000	895000	1225000	1340000	1205000	1065000	760000	1035000
<i>C. albicans</i>	1	254000	0	280000	0	240500	0	460000	50	395000	0	214500	0	360000	0	370000	0
	2	325000	0	320000	0	185500	0	360000	0	415000	0	355000	0	293000	0	410000	0
	3	335000	0	365000	0	264500	0	191000	0	365000	0	445000	0	365000	0	370000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	375000	0	270000	0	375000	0	305000	0	470000	0	515000	0	355000	0	310000	0
	2	345000	0	570000	0	305000	0	335000	0	420000	0	380000	0	380000	0	330000	0
	3	410000	0	300000	0	305000	0	110000	0	400000	0	335000	0	395000	0	230000	0

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		E社		F社		E社		F社		E社		F社		E社		F社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	254000	0	1470000	0	360000	0	660000	0	286500	0	1115000	0	425000	0	750000	0
	2	272500	0	415000	0	335000	0	895000	0	310000	0	725000	0	320000	0	965000	0
	3	238500	0	425000	0	300500	0	480000	0	305000	0	355000	0	315000	0	445000	0
<i>S. aureus</i>	1	193000	0	380000	0	230500	0	390000	0	249500	0	365000	0	355000	0	350000	0
	2	225000	0	295000	0	256000	0	450000	0	227000	0	350000	0	243500	0	375000	0
	3	297000	0	430000	0	298500	0	280000	0	335000	0	415000	0	269000	0	390000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	226000	0	237000	0	330000	0	218000	0	345000	0	242000	0	370000	0	238000	0
	2	168000	0	196000	0	142000	0	68500	0	118500	0	255500	0	156000	0	281000	0
	3	206500	0	138500	0	190000	0	189000	0	129000	0	233500	0	142500	0	250500	0
<i>B. subtilis</i>	1	685000	1025000	1185000	1155000	1425000	1175000	1145000	860000	960000	985000	1550000	1290000	1300000	975000	1495000	1360000
	2	1120000	930000	570000	1345000	930000	760000	1305000	1130000	1205000	705000	1490000	1285000	1025000	915000	1445000	1175000
	3	915000	855000	1165000	805000	1110000	1025000	1075000	1140000	660000	710000	1140000	1110000	875000	800000	1120000	960000
<i>C. albicans</i>	1	350000	0	555000	0	350000	0	425000	0	375000	0	470000	0	420000	0	375000	0
	2	335000	0	485000	0	335000	0	380000	0	385000	0	340000	0	315000	50	475000	0
	3	307500	0	450000	0	410000	0	445000	0	315000	0	420000	0	305000	0	430000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	345000	0	465000	0	72000	0	455000	0	425000	50	640000	3750	450000	50	585000	0
	2	445000	0	420000	0	335000	0	435000	0	395000	50	455000	2400	485000	200	490000	0
	3	300000	0	410000	0	320000	0	415000	0	305000	50	450000	100	420000	0	425000	0

添付資料 II-4-4 50% イソプロパノール：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量 (LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		G社	H社	G社	H社	G社	H社	G社	H社	G社	H社	G社	H社	G社	H社	G社	H社
<i>E. coli</i>	1	-5.4	-5.0	-6.0	-5.2	-6.3	-5.1	-6.0	-4.7	-6.3	-5.3	-6.2	-5.1	-6.6	-5.2	-6.6	-5.1
	2	-5.2	-5.1	-5.1	-4.9	-5.6	-5.1	-5.5	-5.0	-5.0	-5.1	-5.2	-5.0	-5.3	-5.0	-5.5	-5.0
	3	-5.5	-5.1	-5.6	-5.0	-6.2	-5.1	-5.9	-5.1	-6.3	-4.9	-6.2	-4.9	-5.8	-4.9	-5.8	-5.0
	Ave.	-5.4	-5.1	-5.6	-5.0	-6.0	-5.1	-5.8	-4.9	-5.9	-5.1	-5.9	-5.0	-5.9	-5.0	-6.0	-5.0
<i>S. aureus</i>	1	-5.4	-5.3	-5.7	-5.3	-5.4	-5.3	-5.4	-5.2	-5.4	-5.3	-5.4	-5.3	-5.4	-5.4	-5.4	-5.3
	2	-5.4	-5.2	-5.4	-4.8	-5.6	-5.2	-5.3	-5.2	-5.6	-5.2	-5.5	-5.2	-5.6	-5.2	-5.7	-5.2
	3	-5.5	-5.0	-5.4	-5.1	-5.4	-5.2	-5.2	-5.1	-5.3	-5.2	-5.2	-5.2	-5.3	-5.2	-5.3	-5.2
	Ave.	-5.4	-5.2	-5.5	-5.1	-5.5	-5.2	-5.3	-5.2	-5.4	-5.2	-5.4	-5.2	-5.4	-5.3	-5.5	-5.2
<i>P. aeruginosa</i>	1	-4.6	-5.4	-5.2	-2.1	-5.6	-5.1	-5.7	-5.3	-5.6	-5.1	-6.1	-5.2	-6.1	-5.2	-6.3	-5.3
	2	-4.3	-5.4	-4.3	-5.3	-4.2	-5.3	-4.2	-5.2	-4.2	-5.3	-4.1	-5.2	-4.1	-5.3	-4.0	-5.3
	3	-5.1	-5.2	-5.1	-5.2	-5.2	-5.2	-5.0	-4.9	-5.3	-5.3	-5.3	-4.8	-5.5	-5.2	-5.3	-5.2
	Ave.	-4.7	-5.3	-4.9	-4.2	-5.0	-5.2	-5.0	-5.1	-5.0	-5.2	-5.2	-5.1	-5.2	-5.2	-5.2	-5.3
<i>B. subtilis</i>	1	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	0.3	-0.2	-0.1
	2	0.1	0.0	-0.1	0.2	0.2	0.1	0.4	-0.1	0.0	0.1	0.1	-0.1	0.1	0.1	-0.1	0.1
	3	-0.2	0.2	-0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.1	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	0.0
	Ave.	0.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	-0.1	0.0
<i>C. albicans</i>	1	-4.3	-5.0	-4.3	-5.1	-5.7	-5.1	-5.2	-5.2	-5.0	-5.0	-5.3	-5.0	-5.5	-5.1	-5.4	-5.0
	2	-4.1	-5.0	-4.6	-5.1	-5.2	-5.1	-4.5	-4.7	-5.2	-5.0	-4.9	-5.1	-5.4	-5.2	-5.5	-5.2
	3	-5.5	-5.2	-4.6	-5.0	-5.5	-5.2	-5.0	-5.1	-4.6	-5.1	-4.5	-5.1	-5.0	-5.2	-4.8	-5.2
	Ave.	-4.6	-5.1	-4.5	-5.1	-5.5	-5.1	-4.9	-5.0	-4.9	-5.0	-4.9	-5.1	-5.3	-5.2	-5.2	-5.1
<i>A. brasiliensis</i>	1	0.4	-0.1	0.1	-0.2	-0.3	-0.2	0.1	0.2	-0.2	0.4	-0.7	0.0	-0.4	-0.2	-0.4	-0.3
	2	0.4	0.2	-0.2	0.2	-0.3	0.0	0.1	0.6	-0.4	0.0	0.1	-0.1	-0.5	-0.1	-0.5	0.0
	3	0.0	0.3	-0.1	0.2	-0.2	0.0	0.0	0.2	-0.2	-0.2	0.3	0.0	-0.9	-0.1	-0.7	-0.1
	Ave.	0.3	0.1	-0.1	0.1	-0.3	-0.1	0.1	0.3	-0.3	0.1	-0.1	0.0	-0.6	-0.1	-0.5	-0.1

添付資料 II-4-4 50% イソプロパノール：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		G社		H社		G社		H社		G社		H社		G社		H社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	231500	0	100000	0	900000	0	160000	0	2025000	0	133000	0	905000	0	52500	0
	2	165000	0	122000	0	139500	0	83500	0	355000	0	117500	0	300000	0	108500	0
	3	285000	0	116500	0	405000	0	109500	0	1625000	0	134500	0	750000	0	114000	0
<i>S. aureus</i>	1	248500	0	190500	0	485000	0	202000	0	279000	0	182500	0	231500	0	159500	0
	2	241000	0	177000	0	256000	0	67500	0	360000	0	164500	0	183000	0	172000	0
	3	345000	0	95000	0	280500	0	138500	0	269000	0	165000	0	157000	0	116500	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	38500	0	257000	0	148500	0	217000	1600	425000	0	129500	0	495000	0	178500	0
	2	22000	0	241000	0	20550	0	203000	0	14900	0	200500	0	15750	0	157000	0
	3	123500	0	175000	0	116000	0	151500	0	166000	0	145500	0	106500	0	89000	0
<i>B. subtilis</i>	1	196500	234000	149500	149500	310000	240000	184000	175500	315000	190000	169000	194500	183000	144000	211500	234500
	2	204500	246500	298000	295000	205500	155500	243000	347500	173000	264000	280500	332000	60500	137000	364000	284000
	3	120500	82000	235500	337500	106000	92500	232500	302500	179000	245500	262000	299000	161500	213000	206000	357000
<i>C. albicans</i>	1	19900	0	108500	0	22350	0	132500	0	485000	0	130500	0	153000	0	144000	0
	2	11500	0	101000	0	42000	0	118000	0	1425000	0	122000	0	28500	0	48500	0
	3	345000	0	150000	0	40500	0	95500	0	340000	0	146000	0	95000	0	113000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	2750	6450	73500	62000	30500	38500	51500	34000	65500	38000	89500	56000	11900	14350	24500	41000
	2	11000	30500	43500	68500	35500	24000	50000	84500	56000	29000	79500	84000	15000	19000	16500	62000
	3	20000	21000	31500	67500	24000	21000	40500	67500	62500	400000	70000	71500	23000	22500	44000	74500

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		G社		H社		G社		H社		G社		H社		G社		H社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	2095000	0	201500	0	169500	0	115500	0	3630000	0	169000	0	4075000	0	124000	0
	2	98500	0	119000	0	158500	0	103500	0	194500	0	102000	0	315000	0	100500	0
	3	1890000	0	80000	0	1465000	0	88500	0	670000	0	81000	0	610000	0	100500	0
<i>S. aureus</i>	1	244000	0	186000	0	233500	0	179000	0	271500	0	230000	0	262000	0	184000	0
	2	410000	0	162500	0	320000	0	175500	0	425000	0	171500	0	475000	0	163000	0
	3	189500	0	149000	0	142500	0	156500	0	222500	0	157500	0	215500	0	166500	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	385000	0	139000	0	1165000	0	145500	0	1395000	0	156000	0	1830000	0	218500	0
	2	14200	0	193000	0	11350	0	172500	0	12100	0	207000	0	10250	0	191500	0
	3	186000	0	180000	0	180500	0	60000	0	310000	0	162500	0	184500	0	145000	0
<i>B. subtilis</i>	1	385000	305000	166000	247500	370000	340000	161000	148000	355000	355000	102000	192500	335000	216500	215000	186500
	2	162000	169000	243000	326000	157500	186000	277000	212500	193000	240000	286500	322000	250000	192500	278500	383500
	3	149500	131500	255500	322000	191000	174000	292000	34000	111500	219000	289000	324000	126500	175000	273000	301500
<i>C. albicans</i>	1	97000	0	101000	0	221500	0	111500	0	305000	0	119500	0	228000	0	112000	0
	2	171000	0	90000	0	87500	0	132000	0	258000	0	157500	0	300000	0	167500	0
	3	40500	0	133000	0	29500	0	118500	0	104500	0	155000	0	61000	0	150500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	58000	35500	29500	76500	54500	9950	57500	54000	65500	24500	57500	40000	77000	30000	70000	36000
	2	28000	11500	51000	47500	13500	17000	37000	28000	50500	14500	63000	46500	105000	31500	76000	71500
	3	53500	35500	56500	36500	33500	69000	41000	38000	230000	29000	70000	50500	180000	37000	78500	65500

添付資料 II-4-5 70% エタノール：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量 (LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		I社	J社	I社	J社	I社	J社	I社	J社	I社	J社	I社	J社	I社	J社	I社	J社
<i>E. coli</i>	1	-5.1	-5.8	-5.2	-5.9	-5.2	-6.1	-5.1	-5.9	-5.1	-5.7	-5.1	-6.0	-5.1	-6.0	-5.1	-6.1
	2	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9	-5.0	-6.1	-5.1	-5.9	-5.0	-6.1	-5.1	-5.9	-5.1	-6.0	-5.1	-6.1
	3	-5.1	-5.7	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9	-5.1	-5.9	-5.1	-6.2	-5.0	-5.9	-5.1	-5.8	-5.0	-5.9
	Ave.	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9	-5.1	-6.0	-5.1	-5.9	-5.1	-6.0	-5.1	-5.9	-5.1	-5.9	-5.1	-6.0
<i>S. aureus</i>	1	-4.7	-5.3	-5.1	-5.3	-5.2	-5.7	-5.1	-5.5	-5.1	-5.5	-5.1	-5.8	-5.2	-5.8	-5.2	-5.8
	2	-5.1	-5.6	-5.1	-5.6	-5.2	-5.7	-4.9	-5.6	-5.1	-5.9	-5.2	-5.7	-4.9	-5.8	-5.1	-5.8
	3	-5.2	-5.5	-5.2	-5.6	-5.2	-5.8	-5.2	-5.8	-5.1	-6.1	-5.2	-5.8	-5.2	-5.9	-5.2	-5.8
	Ave.	-5.0	-5.5	-5.1	-5.5	-5.2	-5.7	-5.1	-5.6	-5.1	-5.8	-5.2	-5.8	-5.1	-5.8	-5.2	-5.8
<i>P. aeruginosa</i>	1	-4.7	-5.2	-5.0	-5.4	-5.0	-5.1	-4.8	-5.0	-4.8	-5.2	-5.0	-5.3	-5.1	-4.7	-5.0	-5.3
	2	-5.0	-5.1	-5.0	-5.1	-5.0	-4.9	-4.7	-5.1	-4.9	-4.9	-5.1	-5.0	-4.7	-5.0	-5.1	-5.1
	3	-5.0	-5.1	-5.2	-5.1	-5.1	-5.1	-5.2	-4.9	-5.2	-5.2	-4.6	-5.1	-5.2	-5.0	-5.1	-5.1
	Ave.	-4.9	-5.1	-5.1	-5.2	-5.0	-5.0	-4.9	-5.0	-5.0	-5.1	-4.9	-5.1	-5.0	-4.9	-5.1	-5.2
<i>B. subtilis</i>	1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.1
	2	0.1	-0.1	0.0	0.1	0.1	-0.1	0.2	0.0	0.0	-0.1	0.2	-0.1	0.2	0.0	0.1	0.1
	3	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.2	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.1	-0.2	0.0	0.1
	Ave.	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.1
<i>C. albicans</i>	1	-4.7	-5.0	-4.7	-4.9	-4.9	-5.0	-4.8	-5.1	-5.0	-5.0	-4.9	-5.0	-4.6	-5.1	-5.1	-5.1
	2	-4.8	-4.9	-4.8	-4.9	-5.0	-5.1	-4.8	-4.9	-4.3	-4.9	-5.0	-5.0	-4.8	-5.1	-5.1	-5.1
	3	-4.6	-4.7	-4.8	-4.7	-5.0	-5.0	-4.8	-4.8	-5.0	-4.9	-5.0	-4.7	-4.9	-5.1	-5.1	-5.0
	Ave.	-4.7	-4.9	-4.8	-4.8	-5.0	-5.0	-4.8	-4.9	-4.8	-4.9	-5.0	-4.9	-4.8	-5.1	-5.1	-5.1
<i>A. brasiliensis</i>	1	-5.0	-4.2	-4.2	-4.2	-4.8	-4.1	-4.1	-4.1	-4.9	-4.1	-4.8	-4.0	-4.8	-4.0	-4.8	-4.2
	2	-3.9	-4.2	-4.8	-4.0	-4.9	-4.1	-3.9	-4.1	-4.0	-4.0	-5.0	-4.0	-4.6	-4.1	-4.9	-4.1
	3	-5.0	-4.2	-4.1	-4.2	-5.0	-4.2	-4.8	-4.0	-4.7	-4.0	-4.8	-4.0	-5.0	-4.1	-4.8	-4.1
	Ave.	-4.6	-4.2	-4.4	-4.1	-4.9	-4.1	-4.3	-4.1	-4.5	-4.0	-4.9	-4.0	-4.8	-4.1	-4.8	-4.1



添付資料 II-4-5 70% エタノール：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		I社		J社		I社		J社		I社		J社		I社		J社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	135500	0	625000	0	164500	0	835000	0	156500	0	910000	0	120500	0	885000	0
	2	120500	0	625000	0	121000	0	730000	0	99500	0	129000	0	115000	0	760000	0
	3	126000	0	530000	0	139000	0	635000	0	137500	0	775000	0	122000	0	835000	0
<i>S. aureus</i>	1	49500	0	197500	0	127000	0	211500	0	151500	0	585000	0	134500	0	330000	0
	2	115500	0	385000	0	130000	0	365000	0	164000	0	525000	0	83500	0	360000	0
	3	142500	0	315000	0	174500	0	395000	0	148500	0	665000	0	146000	0	580000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	46500	0	152500	0	93500	0	233500	0	106000	0	205000	0	65000	0	94000	0
	2	110000	0	127000	0	96000	0	122000	0	112000	0	78000	0	55500	0	139500	0
	3	112000	0	128500	0	147500	0	131000	0	139500	0	126000	0	159000	0	83000	0
<i>B. subtilis</i>	1	79000	116000	113500	134500	193500	161500	112000	135000	160500	234000	181000	190000	128500	156000	110500	149000
	2	171000	204500	115000	101500	109000	113000	167500	147000	127000	153000	143000	122000	88000	136500	173000	160500
	3	102500	135500	112500	118500	122500	128000	112500	94000	115000	129500	140500	96500	113500	123000	106500	106000
<i>C. albicans</i>	1	55000	0	99000	0	53500	0	80000	0	79500	0	97000	0	56500	0	112500	0
	2	60000	0	79500	0	70500	0	88000	0	105500	0	122000	0	63000	0	73000	0
	3	41000	0	49500	0	66000	0	51000	0	101000	0	92500	0	68000	0	67500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	105000	0	17150	0	14300	0	16350	0	62000	0	13050	0	11850	0	14050	0
	2	7450	0	17100	0	67000	0	10600	0	71000	0	13050	0	7150	0	13250	0
	3	93000	0	14150	0	12250	0	16550	0	101500	0	14800	0	59000	0	9600	0
Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		I社		J社		I社		J社		I社		J社		I社		J社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	129000	0	550000	0	132500	0	1180000	0	119000	0	1040000	0	138500	0	1190000	0
	2	92500	0	1190000	0	131000	0	865000	0	110000	0	1110000	0	127000	0	1305000	0
	3	124500	0	1515000	0	106000	0	825000	0	139500	0	620000	0	89500	0	860000	0
<i>S. aureus</i>	1	140500	0	345000	0	130500	0	555000	0	1425000	0	665000	0	167500	0	685000	0
	2	117500	0	735000	0	161500	0	510000	0	126500	0	590000	0	120000	0	640000	0
	3	139500	0	1180000	0	143000	0	590000	0	164000	0	790000	0	152000	0	635000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	62000	0	172500	0	106500	0	124000	0	121500	0	51000	0	111000	0	184500	0
	2	78000	0	73500	0	123000	0	106500	0	95500	0	103500	0	135000	0	115500	0
	3	150500	0	148500	0	37500	0	116000	0	143000	0	93000	0	129500	0	130000	0
<i>B. subtilis</i>	1	107500	113500	135000	165500	123500	146000	155500	197000	125500	107500	145000	161000	141000	127000	143500	189000
	2	103000	112000	167500	119000	155000	239500	161000	125500	119500	151500	148500	160500	117500	133000	142500	180000
	3	123000	133000	121000	90500	123500	144000	129000	116500	107000	131000	127500	84500	130000	130500	150000	183500
<i>C. albicans</i>	1	102500	0	102500	0	83500	0	104500	0	43000	0	128000	0	123000	0	125000	0
	2	21300	0	82500	0	97500	0	96000	0	36000	0	117500	0	129000	0	122000	0
	3	93500	0	84500	0	91000	0	51500	0	72000	0	118000	0	115000	0	111000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	77500	0	12250	0	63000	0	10350	0	67000	0	10800	0	70500	0	17750	0
	2	9300	0	9400	0	105000	0	9800	0	41500	0	12000	0	74000	0	13560	0
	3	50000	0	9750	0	62500	0	9400	0	95500	0	13450	0	65500	0	12700	0

添付資料 II-4-6 0.05% ベンザルコニウム塩化物：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量(LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		K社	J社	K社	J社	K社	J社	K社	J社	K社	J社	K社	J社	K社	J社	K社	J社
<i>E. coli</i>	1	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9	-5.2	-6.0	-5.2	-5.9	-5.4	-5.7	-5.2	-6.1	-5.3	-6.0	-5.2	-6.1
	2	-5.2	-5.8	-5.3	-5.9	-5.3	-6.1	-5.3	-5.9	-5.2	-6.1	-5.4	-5.9	-5.4	-6.0	-5.4	-6.1
	3	-5.0	-5.7	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9	-5.1	-5.9	-5.1	-6.2	-5.1	-5.9	-5.1	-5.8	-5.1	-5.9
	Ave.	-5.1	-5.8	-5.2	-5.9	-5.2	-6.0	-5.2	-5.9	-5.2	-6.0	-5.2	-6.0	-5.3	-5.9	-5.2	-6.0
<i>S. aureus</i>	1	-5.5	-5.3	-5.6	-5.3	-5.4	-5.8	-5.7	-5.5	-5.5	-5.5	-5.6	-5.7	-5.6	-5.8	-5.6	-5.8
	2	-5.4	-5.6	-5.4	-5.6	-5.4	-5.7	-5.5	-5.6	-5.3	-5.9	-5.3	-5.7	-5.4	-5.8	-5.5	-5.8
	3	-5.2	-5.5	-5.4	-5.6	-5.5	-5.8	-5.4	-5.8	-5.2	-6.1	-5.4	-5.8	-5.4	-5.9	-5.4	-5.8
	Ave.	-5.4	-5.5	-5.5	-5.5	-5.4	-5.8	-5.5	-5.6	-5.3	-5.8	-5.4	-5.7	-5.5	-5.8	-5.5	-5.8
<i>P. aeruginosa</i>	1	-5.3	-5.2	-5.3	-5.4	-5.3	-5.3	-5.3	-5.0	-5.3	-5.2	-5.1	-5.1	-5.3	-4.7	-5.5	-5.3
	2	-5.0	-5.1	-5.0	-5.1	-5.0	-4.9	-5.1	-5.1	-5.1	-4.9	-5.2	-5.0	-5.1	-5.0	-5.0	-5.1
	3	-5.1	-5.1	-5.4	-5.1	-5.2	-5.1	-5.3	-4.9	-5.1	-5.2	-5.4	-5.1	-5.3	-5.0	-5.3	-5.1
	Ave.	-5.1	-5.1	-5.2	-5.2	-5.2	-5.1	-5.2	-5.0	-5.2	-5.1	-5.2	-5.1	-5.2	-4.9	-5.3	-5.2
<i>B. subtilis</i>	1	-0.1	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1
	2	-0.1	-0.3	-0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	-0.2	0.0	-0.2	-0.2	-0.1	-0.1	-0.2	0.0	0.1
	3	0.3	-0.1	0.3	0.0	-0.1	-0.2	-0.2	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.2	-0.1	0.0	0.0
	Ave.	0.0	-0.2	0.1	0.0	0.0	-0.1	0.0	-0.2	0.0	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	-0.1	0.0	0.1
<i>C. albicans</i>	1	-5.0	-5.0	-5.2	-4.9	-5.2	-5.0	-5.1	-5.1	-5.1	-5.0	-5.2	-5.0	-5.1	-5.1	-5.2	-5.1
	2	-5.0	-4.9	-5.1	-4.9	-5.1	-5.1	-5.0	-4.9	-5.0	-4.9	-5.0	-5.0	-5.2	-5.1	-5.1	-5.1
	3	-5.3	-4.7	-5.3	-4.7	-5.0	-5.0	-5.2	-4.8	-5.3	-4.9	-5.0	-4.7	-5.0	-5.1	-5.2	-5.0
	Ave.	-5.1	-4.9	-5.2	-4.8	-5.1	-5.0	-5.1	-4.9	-5.1	-4.9	-5.1	-4.9	-5.1	-5.1	-5.2	-5.1
<i>A. brasiliensis</i>	1	-1.4	-0.3	-1.5	-0.2	-1.1	-0.3	-1.4	-0.3	-1.0	-0.4	-1.1	-0.4	-1.2	-0.3	-0.9	-0.4
	2	-0.3	-0.5	-0.3	-0.4	-0.4	-0.5	-0.3	-0.5	-0.6	-0.4	-0.6	-0.6	-0.3	-0.4	-0.2	-0.5
	3	-0.3	-0.4	-0.3	-0.3	-0.2	-0.6	-0.4	-0.6	-0.3	-0.6	-0.9	-0.6	-0.4	-0.6	-0.2	-0.4
	Ave.	-0.7	-0.4	-0.7	-0.3	-0.6	-0.5	-0.7	-0.5	-0.6	-0.5	-0.9	-0.5	-0.6	-0.4	-0.4	-0.4

添付資料 II-4-6 0.05% ベンザルコニウム塩化物：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		K社		J社		K社		J社		K社		J社		K社		J社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	134000	0	625000	0	138500	0	835000	0	152000	0	910000	0	155500	0	885000	0
	2	153000	0	625000	0	218000	0	730000	0	202500	0	1290000	0	208000	0	760000	0
	3	110000	0	530000	0	128000	0	635000	0	139000	0	775000	0	134000	0	835000	0
<i>S. aureus</i>	1	290000	0	197500	0	355000	0	211500	0	264500	0	585000	0	480000	0	330000	0
	2	241000	0	385000	0	247500	0	365000	0	259500	0	525000	0	300000	0	360000	0
	3	177000	0	315000	0	229000	0	395000	0	289000	0	665000	0	2325000	0	580000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	184000	0	152500	0	190500	0	233500	0	190000	0	205000	0	186500	0	94000	0
	2	106500	0	127000	0	104500	0	122000	0	104500	0	78000	0	124000	0	139500	0
	3	120500	0	128500	0	242000	0	131000	0	154500	0	126000	0	202000	0	83000	0
<i>B. subtilis</i>	1	86500	75500	113500	94000	167500	149500	112000	121000	70000	114500	181000	174500	142000	129500	149000	87500
	2	106000	90500	115000	64500	163000	133500	147000	14000	86000	79000	143000	111000	126500	150500	173000	113500
	3	84000	180000	112500	83000	265000	505000	112500	116000	111000	97000	140500	83500	285000	200500	106500	81500
<i>C. albicans</i>	1	101500	0	99000	0	158000	0	80000	0	145000	0	97000	0	127000	0	112500	0
	2	100500	0	79500	0	126500	0	88000	0	132000	0	122000	0	111500	0	73000	0
	3	190000	0	49500	0	190000	0	51000	0	103500	0	92500	0	155000	0	67500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	4600	200	12900	6650	3050	100	13300	8100	3800	300	14950	7000	3900	150	14350	7400
	2	12000	6000	16950	79500	10500	4700	15050	5700	15000	6550	17250	5200	21000	9500	15300	5100
	3	15500	7500	15800	6600	10500	4700	13250	6350	22500	14000	141000	3950	23000	10000	15450	3750

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		K社		J社		K社		J社		K社		J社		K社		J社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	229000	0	550000	0	177000	0	1180000	0	194000	0	1040000	0	149000	0	1190000	0
	2	177500	0	1190000	0	235500	0	865000	0	239000	0	1110000	0	235000	0	1305000	0
	3	114500	0	1515000	0	141000	0	825000	0	124500	0	620000	0	132000	0	860000	0
<i>S. aureus</i>	1	309500	0	345000	0	355000	0	555000	0	425000	0	665000	0	385000	0	685000	0
	2	206000	0	735000	0	218000	0	510000	0	262500	0	590000	0	291500	0	640000	0
	3	176500	0	1180000	0	271500	0	590000	0	271500	0	790000	0	235000	0	635000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	196000	0	172500	0	116000	0	124000	0	223000	0	51000	0	335000	0	184500	0
	2	136500	0	73500	0	169500	0	106500	0	121000	0	103500	0	110000	0	115500	0
	3	127000	0	148500	0	226500	0	116000	0	213000	0	93000	0	196000	0	130000	0
<i>B. subtilis</i>	1	151000	128500	135000	128500	137000	115500	155500	148000	129000	175500	145000	134000	172000	195000	143500	178500
	2	127500	142500	1675000	117000	173000	120000	161000	137500	125000	101500	148500	101500	128500	140000	142500	173500
	3	202500	212500	121000	104000	168000	174000	129000	99000	178000	285000	127500	113000	206000	210000	150000	145000
<i>C. albicans</i>	1	119500	0	102500	0	174500	0	104500	0	118000	0	128000	0	143000	0	125000	0
	2	106000	0	82500	0	103500	0	96000	0	172500	0	117500	0	127500	0	122000	0
	3	185000	0	84500	0	105500	0	51500	0	103000	0	118000	0	155000	0	111000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	3200	300	13250	5500	3500	250	13950	5300	4250	250	14250	7100	3450	450	12400	5050
	2	21000	5000	14400	6350	9000	2500	16450	3950	26000	14500	10450	4400	20000	13500	14750	4700
	3	20000	9000	15850	4300	16000	2100	15400	3600	27500	11000	16300	4350	26500	17500	17100	6300

添付資料 II-4-7 0.05% アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量(LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		K社	L社	K社	L社	K社	L社	K社	L社	K社	L社	K社	L社	K社	L社	K社	L社
<i>E. coli</i>	1	-5.1	-4.6	-5.1	-4.6	-5.2	-4.6	-5.2	-4.6	-5.4	-4.6	-5.2	-4.5	-5.3	-4.7	-5.2	-4.7
	2	-5.2	-4.6	-5.3	-4.4	-5.3	-4.6	-5.3	-4.4	-5.2	-4.6	-5.4	-4.6	-5.4	-4.7	-5.4	-4.6
	3	-5.0	-3.0	-5.1	-4.6	-5.1	-4.7	-5.1	-4.5	-5.1	-4.5	-5.1	-4.6	-5.1	-4.6	-5.1	-4.6
	Ave.	-5.1	-4.1	-5.2	-4.5	-5.2	-4.6	-5.2	-4.5	-5.2	-4.6	-5.2	-4.6	-5.3	-4.7	-5.2	-4.6
<i>S. aureus</i>	1	-5.5	-4.7	-5.6	-5.0	-5.4	-4.7	-5.7	-4.6	-5.5	-4.6	-5.6	-4.7	-5.6	-4.7	-5.6	-4.7
	2	-5.4	-4.6	-5.4	-4.7	-5.4	-4.6	-5.5	-4.7	-5.3	-4.6	-5.3	-4.6	-5.4	-4.6	-5.5	-4.4
	3	-5.2	-4.6	-5.4	-4.5	-5.5	-4.7	-5.4	-4.5	-5.2	-4.6	-5.4	-4.5	-5.4	-4.6	-5.4	-4.5
	Ave.	-5.4	-4.6	-5.5	-4.7	-5.4	-4.7	-5.5	-4.6	-5.3	-4.6	-5.4	-4.6	-5.5	-4.6	-5.5	-4.5
<i>P. aeruginosa</i>	1	-5.3	-2.9	-5.3	-4.6	-5.3	-4.4	-5.3	-2.8	-5.3	-2.8	-5.1	-4.4	-5.3	-4.3	-5.5	-4.4
	2	-5.0	-4.4	-5.0	-4.4	-5.0	-4.5	-5.1	-4.4	-5.1	-4.4	-5.2	-4.4	-5.1	-2.9	-5.0	-4.4
	3	-5.1	-2.8	-5.4	-4.6	-5.2	-4.4	-5.3	-4.3	-5.1	-4.3	-5.4	-4.2	-5.3	-4.1	-5.3	-4.3
	Ave.	-5.1	-3.4	-5.2	-4.5	-5.2	-4.4	-5.2	-3.8	-5.2	-3.8	-5.2	-4.3	-5.2	-3.8	-5.3	-4.4
<i>B. subtilis</i>	1	0.0	0.0	0.0	0.1	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	-0.1
	2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.1	-0.2	-0.1	-0.2	-0.1	0.0	-0.3	0.0	0.1	0.0
	3	0.3	0.0	-0.2	0.0	0.4	0.3	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.2	0.0	0.0	-0.1
	Ave.	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. albicans</i>	1	-5.0	-4.7	-5.2	-4.8	-5.2	-4.7	-5.1	-4.6	-5.1	-4.7	-5.2	-4.7	-5.1	-4.9	-3.5	-4.9
	2	-5.0	-4.7	-5.1	-4.5	-5.1	-4.5	-5.0	-4.7	-5.0	-4.9	-5.0	-4.7	-5.2	-4.5	-5.1	-4.8
	3	-5.3	-4.6	-5.3	-4.8	-5.0	-4.7	-5.2	-4.6	-5.3	-4.7	-5.0	-4.6	-5.0	-4.7	-5.2	-4.8
	Ave.	-5.1	-4.7	-5.2	-4.7	-5.1	-4.6	-5.1	-4.6	-5.1	-4.8	-5.1	-4.7	-5.1	-4.7	-4.6	-4.8
<i>A. brasiliensis</i>	1	-1.1	-3.1	-1.1	-4.6	-1.0	-3.1	-1.1	-2.6	-1.0	-2.5	-1.5	-4.7	-1.1	-4.8	-0.7	-3.1
	2	-0.5	-4.3	-0.4	-4.4	-0.5	-4.4	-1.1	-4.3	-0.7	-2.2	-0.5	-2.4	-0.5	-4.2	-0.2	-4.9
	3	-0.3	-4.1	-0.4	-4.8	-0.4	-4.6	-0.4	-1.8	-0.9	-2.3	-0.6	-2.7	-0.7	-3.0	-0.2	-2.5
	Ave.	-0.6	-3.8	-0.6	-4.6	-0.6	-4.0	-0.9	-2.9	-0.9	-2.3	-0.9	-3.3	-0.8	-4.0	-0.4	-3.5

添付資料 II-4-7 0.05% アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		K社		I社		K社		I社		K社		I社		K社		I社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	134000	0	44500	0	138500	0	36500	0	152000	0	35500	0	155500	0	43500	0
	2	153000	0	42500	0	218000	0	23050	0	202500	0	36500	0	208000	0	24500	0
	3	110000	0	45500	50	128000	0	39500	0	139000	0	47000	0	134000	0	30500	0
<i>S. aureus</i>	1	290000	0	47500	0	355000	0	107000	0	264500	0	49000	0	480000	0	35500	0
	2	241000	0	39000	0	247500	0	49500	0	259500	0	36500	0	300000	0	46500	0
	3	177000	0	44000	0	229000	0	32500	0	289000	0	54500	0	232500	0	33500	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	184000	0	38500	50	190500	0	36500	0	190000	0	23000	0	186500	0	30000	50
	2	106500	0	24100	0	104500	0	24400	0	104500	0	30500	0	124000	0	26000	0
	3	120500	0	30500	50	242000	0	43500	0	154500	0	25150	0	202000	0	20500	0
<i>B. subtilis</i>	1	86500	86500	1680000	1620000	167500	157500	1660000	1910000	70000	42500	1565000	1630000	142000	155500	1640000	1600000
	2	106000	102000	1865000	1990000	163000	172000	1940000	1785000	86000	67500	1835000	1885000	126500	151000	1715000	1105000
	3	84000	165000	1590000	1555000	265000	169500	1620000	1565000	111000	290000	2000000	3565000	285000	165500	1460000	1380000
<i>C. albicans</i>	1	101500	0	50000	0	158000	0	66500	0	145000	0	53000	0	127000	0	42500	0
	2	100500	0	50500	0	126500	0	33000	0	132000	0	29500	0	111500	0	50500	0
	3	190000	0	36500	0	190000	0	66500	0	103500	0	48500	0	155000	0	39500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	4600	350	62000	50	3050	250	37500	0	3800	400	70500	50	3900	300	59000	150
	2	12000	3500	17900	0	10500	3900	26800	0	15000	5150	25950	0	21000	1850	21600	0
	3	15500	8500	13850	0	10500	3900	58000	0	22500	8000	42000	0	23000	8500	14600	250

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		K社		I社		K社		I社		K社		I社		K社		I社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	229000	0	40000	0	177000	0	33500	0	194000	0	55000	0	149000	0	56000	0
	2	177500	0	37500	0	235500	0	44500	0	239000	0	45000	0	235000	0	38500	0
	3	114500	0	34000	0	141000	0	41000	0	124500	0	38000	0	132000	0	42000	0
<i>S. aureus</i>	1	309500	0	36500	0	355000	0	46500	0	425000	0	51000	0	385000	0	53000	0
	2	206000	0	41500	0	218000	0	41500	0	262500	0	39000	0	291500	0	27050	0
	3	176500	0	41500	0	271500	0	31000	0	271500	0	35500	0	235000	0	31000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	196000	0	30000	50	116000	0	27000	0	223000	0	21300	0	335000	0	25400	0
	2	136500	0	25500	0	169500	0	27200	0	121000	0	36000	50	110000	0	263350	0
	3	127000	0	18800	0	226500	0	17650	0	213000	0	13050	0	196000	0	21200	0
<i>B. subtilis</i>	1	151000	139500	1540000	1715000	137000	128000	1605000	1280000	129000	125500	1465000	1360000	172000	184500	1830000	1465000
	2	127500	112500	1965000	1370000	173000	128500	1810000	1680000	125000	61000	1950000	1945000	128500	166000	1850000	1685000
	3	202500	183500	1615000	1595000	168000	206000	1975000	1675000	178000	270000	1700000	1630000	206000	195000	2030000	1650000
<i>C. albicans</i>	1	119500	0	46000	0	174500	0	46000	0	118000	0	81000	0	143000	50	71000	0
	2	106000	0	73500	0	103500	0	48000	0	172500	0	34500	0	127500	0	59500	0
	3	185000	0	48500	0	105500	0	42500	0	103000	0	52000	0	155000	0	58500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	3200	350	14200	50	3500	100	46500	0	4250	350	58000	0	3450	750	58500	50
	2	21000	4250	23950	150	9000	3150	22600	100	26000	9000	14400	0	20000	13000	82500	0
	3	20000	2400	43500	200	16000	4250	47500	100	27500	5000	49000	50	26500	18000	64000	200

<i>A. brasiliensis</i>	K社				K社				K社				K社			
	新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品	
	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
	75000	9600	65500	100	63500	8850	56500	50	80000	30000	85500	250	63000	45000	47500	500

<i>A. brasiliensis</i>	K社				K社				K社				K社			
	新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品		新鮮培養菌		市販品	
	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
	72500	16500	33500	150	56000	7100	26500	0	90000	34500	90500	200	76500	40000	67000	2000

添付資料 II-4-8 0.05% クロルヘキシジングルコン酸塩：対数減少量

Test Strains	Test times	対数減少量(LRV)															
		SUS		強化ガラス		ポリカーボネート		化粧ケイ酸カルシウム		エポキシ樹脂		塩化ビニル		ウレタンゴム		ニトリルゴム	
		M社	N社	M社	N社	M社	N社	M社	N社	M社	N社	M社	N社	M社	N社	M社	N社
<i>E. coli</i>	1	-5.2	-5.1	-5.6	-5.0	-5.7	-5.1	-5.8	-4.9	-5.8	-5.0	-5.7	-5.0	-5.7	-5.0	-5.7	-5.0
	2	-5.2	-5.6	-5.2	-5.7	-5.1	-5.7	-5.2	-5.7	-5.1	-5.6	-5.3	-5.8	-5.3	-5.7	-5.2	-5.7
	3	-5.6	-5.3	-5.6	-4.7	-5.8	-5.2	-5.6	-5.4	-5.7	-5.1	-5.6	-5.2	-5.5	-5.1	-5.7	-5.3
	Ave.	-5.3	-5.3	-5.5	-5.1	-5.5	-5.3	-5.5	-5.3	-5.5	-5.2	-5.5	-5.3	-5.5	-5.3	-5.5	-5.3
<i>S. aureus</i>	1	-5.0	-4.9	-5.1	-5.0	-5.4	-4.9	-5.4	-2.1	-5.6	-1.7	-5.5	-1.1	-5.4	-1.4	-5.4	-1.3
	2	-4.3	-5.0	-5.1	-5.0	-5.3	-5.1	-5.3	-5.0	-5.3	-5.0	-5.0	-4.9	-5.3	-5.0	-5.4	-5.0
	3	-5.1	-5.4	-5.0	-5.6	-5.4	-2.6	-5.4	-5.4	-5.4	-3.3	-5.4	-2.4	-5.4	-5.4	-5.5	-5.4
	Ave.	-4.8	-5.1	-5.1	-5.2	-5.4	-4.2	-5.4	-4.2	-5.4	-3.3	-5.3	-2.8	-5.4	-3.9	-5.4	-3.9
<i>P. aeruginosa</i>	1	-4.5	-5.8	-4.5	-5.8	-5.1	-5.8	-4.9	-5.7	-4.9	-5.7	-5.1	-5.7	-5.0	-5.7	-5.1	-5.7
	2	-5.6	-6.2	-5.5	-6.2	-5.7	-6.2	-5.6	-6.2	-5.7	-6.2	-5.7	-6.2	-5.7	-6.1	-5.8	-6.4
	3	-5.2	-5.1	-5.1	-4.9	-5.2	-4.9	-5.2	-4.9	-5.1	-5.0	-5.3	-4.9	-5.3	-4.7	-5.3	-4.8
	Ave.	-5.1	-5.7	-5.0	-5.6	-5.3	-5.6	-5.2	-5.6	-5.2	-5.6	-5.4	-5.6	-5.3	-5.5	-5.4	-5.6
<i>B. subtilis</i>	1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.2	-0.4	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	-0.1
	2	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.2	-0.1	0.0
	3	-0.1	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	-0.2	-0.5	0.0	-0.1	-0.2	0.1	-0.1	0.0	-0.1	0.1
	Ave.	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	-0.1	-0.4	0.0	0.0	-0.1	0.0	-0.1	-0.1	0.0	0.0
<i>C. albicans</i>	1	-5.3	-4.2	-4.5	-4.3	-5.7	-4.3	-6.0	-4.2	-5.9	-4.2	-6.4	-4.3	-5.3	-4.2	-5.9	-4.3
	2	-5.3	-4.4	-5.4	-4.5	-5.6	-4.4	-5.4	-4.4	-5.3	-4.4	-5.6	-4.4	-5.5	-4.4	-5.6	-4.5
	3	-5.3	-4.8	-5.4	-5.1	-5.5	-5.1	-5.6	-5.2	-5.7	-5.1	-5.6	-5.2	-5.0	-5.2	-5.7	-5.2
	Ave.	-5.3	-4.5	-5.1	-4.6	-5.6	-4.6	-5.7	-4.6	-5.6	-4.6	-5.9	-4.6	-5.3	-4.6	-5.7	-4.7
<i>A. brasiliensis</i>	1	-2.9	-2.7	-5.0	-2.3	-3.3	-1.8	-2.7	-1.9	-3.3	-2.4	-3.3	-2.2	-2.3	-2.7	-3.7	-3.0
	2	-2.9	-2.1	-2.4	-2.2	-2.3	-2.3	-2.5	-2.2	-2.5	-1.7	-2.7	-2.3	-2.6	-2.4	-2.6	-2.3
	3	-1.8	-2.4	-2.2	-2.2	-2.0	-2.5	-2.5	-2.5	-1.9	-2.3	-1.7	-2.5	-2.1	-2.9	-1.8	-2.1
	Ave.	-2.5	-2.4	-3.2	-2.2	-2.5	-2.2	-2.6	-2.2	-2.6	-2.1	-2.6	-2.3	-2.3	-2.7	-2.7	-2.5

添付資料 II-4-8 0.05% クロルヘキシジングルコン酸塩：初期菌数・生残菌数

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		SUS				強化ガラス				ポリカーボネート				化粧ケイ酸カルシウム			
		M社		N社		M社		N社		M社		N社		M社		N社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	172000	0	118500	0	415000	0	96000	0	535000	0	139500	0	570000	0	87000	0
	2	176000	0	375000	0	170000	0	480000	0	128000	0	510000	0	157000	0	450000	0
	3	127000	0	178500	0	106000	0	54000	0	241500	0	146500	0	269500	0	267000	0
<i>S. aureus</i>	1	103000	0	84000	0	125000	0	89500	0	252000	0	73500	0	122000	0	85000	650
	2	209000	0	106000	0	136000	0	106500	0	192000	0	116500	0	152000	0	105000	0
	3	127000	0	258000	0	105000	0	440000	0	241500	0	247000	650	269500	0	241000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	32500	0	575000	0	33500	0	590000	0	125000	0	595000	0	85000	0	555000	0
	2	440000	0	1470000	0	350000	0	1740000	0	535000	0	1700000	0	355000	0	1475000	0
	3	148500	0	121500	0	128500	0	83500	0	166500	0	85000	0	170000	0	75000	0
<i>B. subtilis</i>	1	1230000	1180000	9150	7550	1130000	1285000	8650	7250	1275000	1250000	8650	7650	1475000	1095000	8050	3550
	2	7000	69000	83500	108000	69500	51000	865000	92000	77000	73000	79500	83500	72000	76500	114500	80000
	3	62000	48000	10650	10850	73000	50000	10300	10350	72000	74000	13150	14050	76500	53000	14800	5050
<i>C. albicans</i>	1	21800	0	17200	0	34000	0	19450	0	555000	0	18500	0	1050000	0	17200	0
	2	219500	0	23800	0	228000	0	29850	0	410000	0	27050	0	242000	0	25300	0
	3	182500	0	64500	0	224000	0	126500	0	315000	0	127500	0	365000	0	147500	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	147000	200	28000	50	95000	0	41500	200	545000	300	33500	500	147500	300	29000	400
	2	700000	850	38000	300	325000	1300	36500	250	365000	2050	40500	200	575000	1950	39000	250
	3	206500	3050	36500	150	177000	1100	35000	200	172000	1700	47500	150	325000	1000	30000	100

Test Strains	Test times	菌数 (CFU)															
		エポキシ樹脂				塩化ビニル				ウレタンゴム				ニトリルゴム			
		M社		N社		M社		N社		M社		N社		M社		N社	
		初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数	初期菌数	生残菌数
<i>E. coli</i>	1	610000	0	102000	0	555000	0	96500	0	455000	0	107000	0	460000	0	99000	0
	2	113000	0	415000	0	204000	0	565000	0	212500	0	505000	0	158000	0	465000	0
	3	249500	0	130500	0	247500	0	160500	0	268000	0	116500	0	350000	0	195500	0
<i>S. aureus</i>	1	385000	0	88000	1650	340000	0	83000	6400	273000	0	96500	4050	266500	0	87000	4400
	2	179000	0	94500	0	102500	0	83000	0	222000	0	112000	0	255000	0	107500	0
	3	249500	0	223500	100	247500	0	234500	850	268000	0	138500	0	350000	0	250000	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	81000	0	550000	0	129500	0	515000	0	100000	0	475000	0	133000	0	545000	0
	2	470000	0	1620000	0	505000	0	1555000	0	555000	0	1275000	0	570000	0	2580000	0
	3	140000	0	105500	0	197500	0	78500	0	223500	0	50000	0	178000	0	59000	0
<i>B. subtilis</i>	1	1485000	1160000	7050	6900	1585000	1215000	6750	7550	1460000	1325000	8750	8200	1370000	1495000	6850	9400
	2	73500	81000	88500	90500	75000	71500	88500	95000	88000	68000	75000	117000	82500	69500	84000	87000
	3	58500	68500	14500	12000	91500	62500	11250	15100	71000	69500	10650	10400	86000	64500	11650	14600
<i>C. albicans</i>	1	840000	0	15700	0	2245000	0	20950	0	222000	0	16300	0	730000	0	19400	0
	2	208500	0	26400	0	385000	0	23350	0	295000	0	27850	0	435000	0	29200	0
	3	455000	0	134500	0	365000	0	144500	0	103000	0	168500	0	455000	0	150000	0
<i>A. brasiliensis</i>	1	600000	300	26500	100	108000	50	34500	200	137500	650	46500	100	530000	100	47500	50
	2	600000	1900	36000	650	645000	1150	31000	150	600000	1350	47500	200	605000	1650	47500	250
	3	132500	1550	47000	250	64500	1250	52000	150	153000	1100	41500	50	278500	4600	44500	350