

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

**医薬品の微生物学的品質確保のための
高度試験法導入に関する研究**

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚元 憲一

平成26(2014)年 4月

目 次

I . 総括研究報告	
医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究	1
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 1	
添付資料 2	
II . 分担研究報告	
1 . 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発	21
棚元 憲一	
(資料) 添付資料 1	
2 . 微生物の迅速検出法の確立	26
山口 進康	
3 . 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究	32
片山 博仁	
(資料) 添付資料 1	
添付資料 2	
添付資料 3	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	42

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・計測・制御サイエンス総合研究事業）

総括研究報告書

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を行った。

本年度は組換えエンドトキシン比色試薬の製剤化検討を行い、試薬組成を決定した。次に3ロットの凍結乾燥製剤を製造し、これらの性能を分析法バリデーションに従い、それぞれの分析能パラメータについて評価した。直線性および真度は局方エンドトキシン試験法予備試験の要求基準に適合し、精度および定量限界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に記載された要求基準に適合した。また、特異性はカプトガニ血球ライゼートを利用する既存試薬で問題となる(13)-D-グルカンとの反応性が認められないことを確認した。また、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）に用いる溶解剤や中和剤が難染色性の *Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）の蛍光染色に与える影響を検討し、検討した溶解剤や中和剤が、蛍光活性染色による緑膿菌の検出に影響を与えないことを明らかにした。また、蛍光活性染色法は抗菌性物質や、色素の含まれる非無菌製剤中に混入した細菌の検出にも応用できることを明らかにした。無菌医薬品の製造と管理の技術に関する研究では、無菌医薬品の品質を確保するための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」が実用可能であることを確認することを目的に、実施する基礎実験で使用する回収液の組成を検討した。さまざまな硬質キャリアーに対する種々の回収液を検討し、汎用消毒剤を添加しても十分に試験菌を回収できる回収液の組成を決定することができた。

研究分担者

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はなく、 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のデータを得る。

「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

まずは 3 種のプロテアーゼ前駆体の組換え蛋白質、発色合成基質および副原料の配合比率を検討し、次に各溶質の崩壊温度などの凍結乾燥に影響を与える条件を考慮し至適化されたプログラムで主原料がそれぞれ異なる 3 ロットの試薬 (#1 ~ #3) を製造した (表 1)。これらを用いて、分析法バリデーションに従い、各種分析能パラメータの評価を行った (表 2)。各分析能パラメータは米国薬局方標準エンドトキシン (USPRSE: H0K354) を用い、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 12 回の独立した試験を行った。分析能パラメータ 1~5 は 0.005 - 50 EU/mL の 2 倍希釈列の RSE 溶液を調製し、反応時間法で解析した。分析能パラメータ 6 は 0.0125 - 0.1 EU/mL の 2 倍希釈列の RSE 溶液を調製し、測定日および測定機は 1 条件で試験し、反応速度法で解析した。また、当該分析能パラメータは BG による反応干渉を確認するため、5 µg/mL の BG を含む RSE の 2 倍希釈列も調製した。これらの RSE または BG+RSE を 50 µL ずつ 96 穴マイクロプレートに分注し、つぎに緩衝液 (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 µL 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 (表 3)。反応時間法においては各 RSE 濃度とそれらの一定の吸光度 (閾値: 0.015Abs) に到達した時間を対数変換後、直線回帰し、検量線とした。またその直線性 (相関係数 r) を求めた。次にそれぞれの RSE 濃度に

おける Et 測定値を算出し、それらの理論値に対する実測値の割合、すなわち Et 回収率を真度として求めた。また、8 重測定を行った Et 測定値のばらつきを併行精度として求めた。また 3 条件を変えた 12 回繰り返し測定から得られた平均値のばらつきを室内再現精度として求めた。

反応速度法については最小二乗法で求めた 1 分間あたりの吸光度変化率を専用ソフトで算出した。また BG 添加および無添加の RSE から得られた検量線の回帰分析を行い、特異性を求めた。

2) 蛍光染色用指標菌株

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 に加えて、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 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。

3) 蛍光染色用試料

i) 溶解剤および中和剤が *Pseudomonas aeruginosa* の染色性へ与える影響の評価
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や中和剤を用い、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
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、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。

ii) 非無菌製剤原料に対する蛍光染色法の適用

非無菌製剤原料を以下の通り分類し、代表的な原料を試料として検討した： 抗菌性物質 - アンピシリン、色素 - 黄色 5 号、カプセル、軟膏基剤 - ワセリン

これらの非無菌製剤原料に前述の指標菌株を既知量添加し、CFDA-DAPI 二重染色法により染色した。蛍光顕微鏡下で求めた細菌数測定結果から、回収率を算出した。

4) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター（黒色、直径 25 mm、孔径 0.2 μm）上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の青色励起光下で CFDA により染色された細菌数、紫外線励起光下で DAPI により染色された細菌数を測定した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、または細菌数が 0 となった視野数が 5 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試料を再調製した。

5) 消毒剤の有効性評価

基礎実験では、複数の試験室で添付資料 1 に示す共通のプロトコル（案）を用いて

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、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。硬質表面キャリアー法では、各種表面材質のキャリアーに既知数の試験菌と消毒剤を接種した後、生残菌数を計測し、菌数減少量の定量を行うことで消毒剤の有効性を評価するが、この方法で生残菌数を計測する際は、消毒剤の微生物に対する作用を中和しながら試験菌を回収する必要がある。本研究では、基礎実験を実施する前段階として、消毒剤中の生残菌数を回収する際に用いる回収液組成を検討した。

医薬品製造施設で汎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 4 に示す。

表 4. 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 ¹
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%
イソプロピルアルコール	50 ~ 70%
エタノール	70%
ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%

1 : 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、医薬品製造施設で汎用されている濃度である。基礎実験においては、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し、供試する予定である。

これらの消毒剤及び基礎実験で採用する濃度を対象に、中和剤を含む回収液の組成を検討した。中和剤としては日本薬局方微生物限度試験法の「阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法」の表に記載されている大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムの他、L-ヒスチジンや過酸化水素等の分解に汎用されるカタラーゼ等を用い、それらの配分を変動させながら回収液の組成を検討した。

回収液としての組成候補液を数種類調製し、そこに消毒剤 0.1 mL を接種したものを試料溶液として、日本薬局方 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有用性を評価した。具体的な操作方法は次の通りである。なお、「消毒剤 0.1mL」は、基礎実験で生残菌数を計測する際の消毒剤の容量である。

- (1) 表 4 の各消毒剤の下限濃度品を調製し、その 0.1 mL を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に各試験菌 $10^3 \sim 10^4$ CFU を含んだ菌液 0.1 mL を接種した。
- (3) (2)の液を 90 分程度放置し、作用させた。
- (4) (3) の液 0.1 mL 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 で 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】

回収率 (%) =

回収された試験菌数 / イニシャル値 × 100

(8) 上記(1)~(7)の操作を回収液の候補組成液毎に実施した。

(9) 試験菌の回収率が 50 ~ 200%であれば、回収液として適切な組成であると判断した。

C . 研究結果

1) 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の評価

1. 直線性

検量線の相関係数は 12 回の測定すべてにおいて、その絶対値が 1.000 となり、局方予備試験記載の判定基準 ($|r| \geq 0.980$) に適合した (表 5)。

2. 真度

検量線の各濃度において 8 重測定を行った真度 (Et 回収率) の平均値を求めた。12 回測定を行った真度は 0.005-50 EU/mL において 92-109%となり、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 5)。

3. 精度

3-1. 併行精度

検量線の各濃度において 8 重測定を行って求めた Et 濃度の相対標準偏差 (CV) を求めた。条件を変えて 12 回試験を行った CV は 0.005 EU/mL において 6-16%、0.05-50 EU/mL において、11-15% 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、すなわち定量下限の 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 5)。

3-2. 室内再現精度

検量線の各濃度における測定値の 8 重測定の平均値を求め、3 条件を変えて 12 回試験を行った際の検量範囲の各濃度における相対標準偏差の 90%信頼区間(CV) を下式により求めたところ、2 - 5% となり、良好な室内再現精度を示した (表 5)。

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

3-3. 室間再現精度

3 年目 (2014 年度) に実施予定。

4. 範囲

0.005-50 EU/mL の検量範囲において分析能パラメータ 1, 2, 3-1 の判定基準を全て満たすこと、すなわち直線性、真度および精度が容認できる程度であることを確認できた (表 5)。

5. 定量限界

定量下限、すなわち 0.005EU/mL における真度は理論値の ± 20%以内および併行精度は 20%以下となり、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定量限界の要求基準に適合することを確認した (表 5)。

6. 特異性

分析対象物であるエンドトキシン (USPRSE) 単独ならびに既存試薬で交差反応を起こす BG を USPRSE に添加して測定した。BG 添加および無添加条件間の回帰分析の結果、3 ロットの切片の 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 5)。

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

i) 溶解剤および中和剤が *Pseudomonas aeruginosa* の染色性へ与える影響の評価

まず、*P. aeruginosa* (緑膿菌) を対象とし、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。

調製した試料溶液 (1%ジメチルスルホキシド、 0.5%グリシン、 1%ポリソルベート 20、 1%ポリソルベート 80、 1%チオ硫酸ナトリウム、 ミリスチン酸イソプロピル原液) と菌体を 30 分間反応させた後に、CFDA-DAPI 二重染色を行い、ろ過滅菌水での測定値を 100 とした場合の検出率を求めた。

その結果、図 1 および図 2 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。

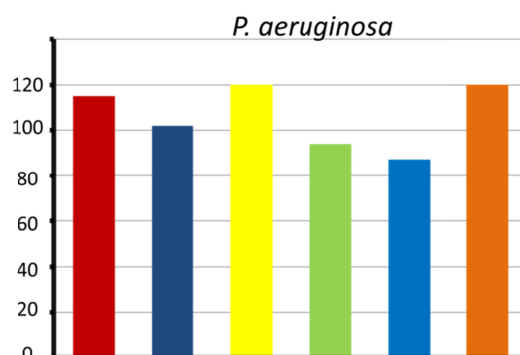
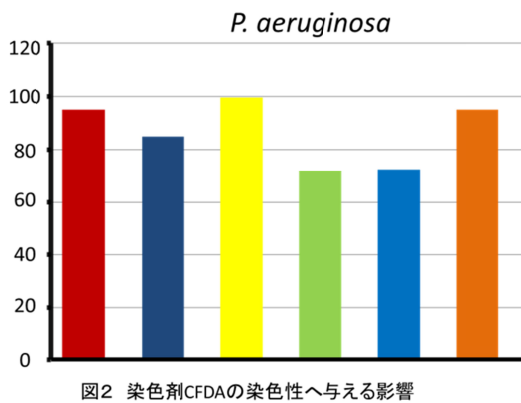


図1 染色剤DAPIの染色性へ与える影響

- 1% DMSO
- 0.5% グリシン
- 1% ポリソルベート 20
- 1% ポリソルベート 80
- 1% チオ硫酸ナトリウム
- ミリスチン酸イソプロピル



ii) 非菌製剤原料に対する蛍光染色法の適用

これまでに、乳糖などの可溶性固形原料、タルクなどの不溶性固形原料に混入した細菌は、適切な前処理を行うことにより、検出・計数可能であることを報告した。今年度は、抗菌性物質、色素、カプセルおよび軟膏基剤について検討した。

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。本研究では、アンピシリンを選び、混入した細菌の計数方法について検討した。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(表6)。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。

表6 抗菌剤に添加した細菌の回収

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

抗菌薬:アンピシリン

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3A)。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 3B 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分かった。今後、アゾ系以外の色素についても検討する予定である。

カプセルおよび軟膏基剤のワセリンについては良好な結果が得られなかったため、引き続き検討を行う。さらに、芽胞形成菌や真菌の検出にも蛍光染色法が適用できるよう、検討を進める予定である。

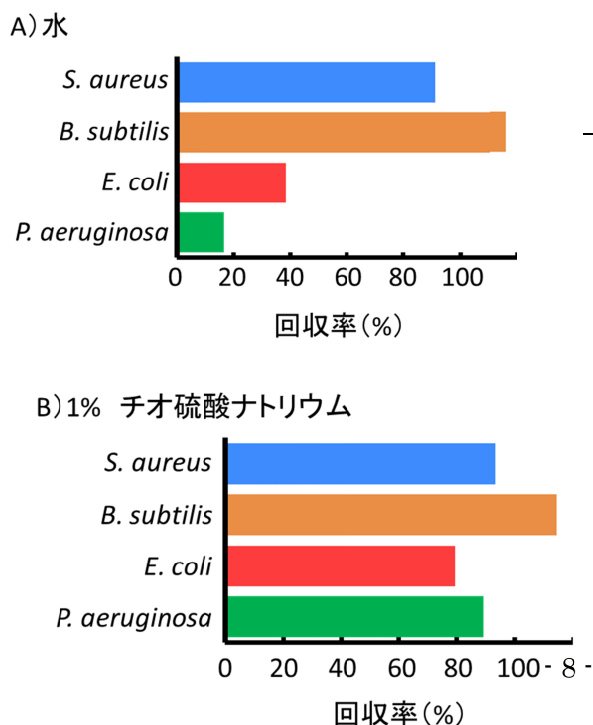


図 3 . 蛍光活性染色法による色素中に添加した細菌の検出

3) 消毒剤の有効性評価

各成分の配分を調整しながら評価を実施した結果、表 7 に示す組成の回収液が、表 4 に示した汎用消毒剤すべてを添加しても接種した試験菌を 50 ~ 200% の範囲で回収し、中和に有効であることが示された。この結果を基に、基礎実験で使用する回収率の組成を決定した。回収率の詳細データは添付資料 2 に示す。

表 7 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 ²	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

² : カタラーゼは熱により分解するため、ろ過滅菌による無菌化を行った上で使用した。

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、高濃度で添加しても試験菌の回収は困難であったが、カタラーゼを使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、回収液調製時には過滅菌の操作が必要となることに留意する必要がある。

D. 考 察

組換え Et 測定比色試薬が 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するため、分析法バリデーションに従った評価を行い、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確認した。直線性については、局方の基準である 0.980 より良好な相関係数を示した。また、真度についても回収率は 90 ~ 110% の範囲に入り、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。併行精度および定量限界については、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。範囲および定量限界も既存試薬と同じであったことから、組換え測定 Et 比色試薬は既存試薬と同等以上の性能を有することが確認された。今後、局方に収載されるためには、本測定法が恒常的に実施可能であること、すなわち製品の品質がロット毎に一定でありかつ安定的に製造が可能であることが必須である。本検討では原料ロットが全て異なる 3 つの凍結乾燥製剤で検討し、全てのロットで、判定基準に適合したことから、本技術を用いた試薬の安定生産についても、一定の担保が得られた。

今後は既存試薬との比較として、由来菌種および化学的な構造の異なる各種 Et への反応性を検討するとともに、第十六

改正日本薬局方に収載されている注射薬について反応干渉因子試験を行う予定である。

緑膿菌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があることが知られている。そこで、今年度は緑膿菌を対象とし、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。今後、同様の検討を様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

消毒剤の有効性を評価するための硬質表面キャリアー法で用いられる中和剤は通常、対象となる物質毎に適したものを選定していくことが多いが、今回決定した中和剤を含む回収液は、基礎実験で検

証対象としている汎用消毒剤のいずれに対しても中和効果を示している点で、利用しやすいものであると考える。

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導入に関する研究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

組換え Et 測定比色試薬の性能を分析法バリデーションに従い評価と行った。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、当該試薬が既存のライゼート試薬と同等の Et 測定に必要かつ十分な性能を有していることが確認できた。

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）に用いる各溶解剤や中和剤が難染色性の *P. aeruginosa*（緑膿菌）の蛍光染色に与える影響を検討し、検討した溶解剤や中和剤は、蛍光活性染色による緑膿菌の検出に影響を与えないことが明らかとなった。また、蛍光活性染色法は抗菌性物質や、色素の含まれる非無菌製剤中に混入した細菌の検出にも応用できることを明らかにした。

日本薬局方 参考情報「微生物殺滅法」の改訂案に消毒剤の有効性を評価する方法として掲載される予定の「硬質表面キャリアー法」が実用可能であることを確認するために実施する基礎実験で使用する回収液の組成を検討し、決定することができた。次年度以降に実施する基礎実験の準備を進

捗させることができた。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Kitajima T., Muroi M., Yamashita N., and Tanamoto K.: Toll-like receptors required for *Dermatophagoides farinae* to activate NF- κ B. Biol. Pharm. Bull., **37**, 74-80 (2014)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)

- 6) 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)

2. 学会発表

- 1) 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）
- 2) 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- κ B の活性化に関する Toll-like receptor の同定、日本薬学会第 134 年会（2014, 3）
- 3) 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）
- 4) 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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 「新規組換えファクターC、その製造法、およびエンドトキシンの測定法」
2013/12/10 PCT 出願
出願番号：PCT/JP2013/083082

表 1 試薬 3 ロットを製造した際の原料のロット

試薬ロット	主原料ロット*		
	Factor C	Factor B	Pro-clotting enzyme
#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 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
1 直線性	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) をプロットし、相関係数を求める。	r 0.980 ^{a)}
2 真度 (回収率)	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率 (8 重測定 of 平均値) を算出する。	50 - 200 % ^{a)}
3 精度		
3-1 併行精度	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値 (8 重測定) を算出し、その相対標準偏差 (CV) を求める。	CV @ 0.005 EU/mL 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL 15% ^{b)}
3-2 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 (8 重測定) の平均値を算出し、それら 12 測定で得られた Et 測定値の相対標準偏差の 90%信頼区間 (CV) を求める。	CV @ 0.005 EU/mL 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL 15% ^{b)}
3-3 室間再現精度	未実施 (3 年目に実施予定)	
4 範囲	分析法の直線性、真度および精度が容認できる程度である測定範囲を求める。	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)} 。
5 定量限界 (下限) LOQ	定量下限 (0.005 EU/mL) における真度および精度を評価する。	分析能パラメータ 2 および 3-1 における 0.005 EU/mL の真度が理論値の ±20% 以内、精度が 20% 以下であること。
6 特異性 (BG との反応性)	BG を 5µg/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) 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 3 測定および解析条件

測定条件	測定機	測定波長	測定 (解析) 時間
反応時間法 15 秒間隔	ELx808IU (Biotek)	1 波長 405nm	30 分
反応速度法 15 秒間隔	ウェルリーダー (生化学工業)	2 波長 主波長: 405nm 参照波長: 492nm	30 分 (2 ~ 30 分)

表 5 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
1	直線性 (相関係数: 絶対値)	0.005 - 50 EU/mL 1.000		適合
2	真度 (回収率)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
		0.005	94.7 - 103.6	
		0.05	91.6 - 103.1	
		0.5	99.1 - 108.2	
		5	100.1 - 109.4	
50	92.4 - 99.3			
3	3-1 併行精度 (CV)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
		0.005	5.9 - 15.7	
		0.05	5.7 - 14.9	
		0.5	6.4 - 11.4	
		5	3.3 - 14.8	
	50	3.1 - 14.2		
	3-2 室内再現精度 (CV)	EU/mL	90%信頼区間 下限 - 上限(%)	適合
		0.005	1.8 - 3.8	
		0.05	2.1 - 4.4	
		0.5	1.9 - 3.9	
5		1.8 - 3.8		
50	1.5 - 3.0			
4	範囲	0.005 - 50 EU/mL		適合
5	定量限界 (下限) LOQ	@ 0.005 EU/mL 真度: 95 - 104 % 精度: 6 - 16 %		適合
6	特異性 (BG との反応性)	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

消毒剤の有効性評価方法確立の Protocol(案)

1. 実験材料

1.1 消毒剤

表 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 1 消毒剤の種類と濃度

消毒剤	使用濃度 ¹	検証濃度 ²
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%
イソプロピルアルコール	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%

¹ : 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。

² : 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。

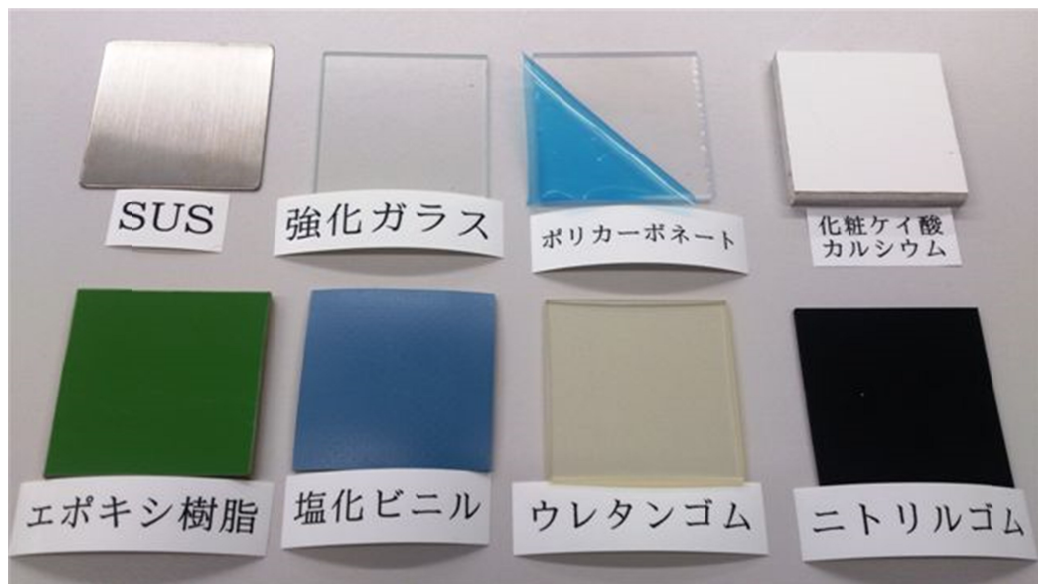
1.2 対象材質

表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。

表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



1.3 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。市販品使用も可である。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 3 に示す。

表 3 試験菌と培養条件

試験菌		培養条件			最大許容濃度 (CFU/mL)
		培地	温度	時間	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633 等		芽胞懸濁液		10 ^{6~7}
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 等	サブロー	20 ~ 25 °C	2 ~ 3 days	10 ^{6~7}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 等	PD 斜面	20 ~ 25 °C	5 ~ 7 days	10 ^{6~7}

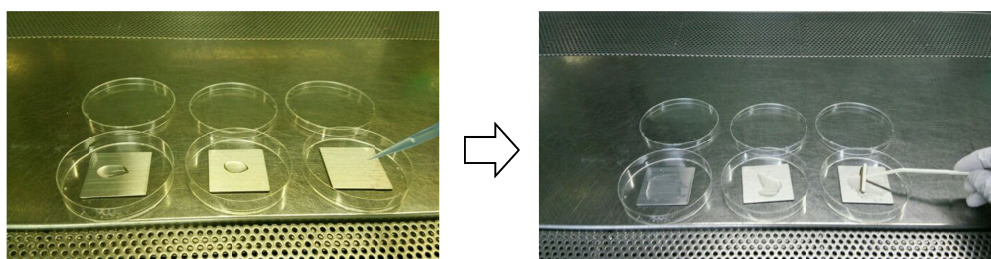
1.4 回収液

消毒剤の微生物に対する作用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は別途検討する。

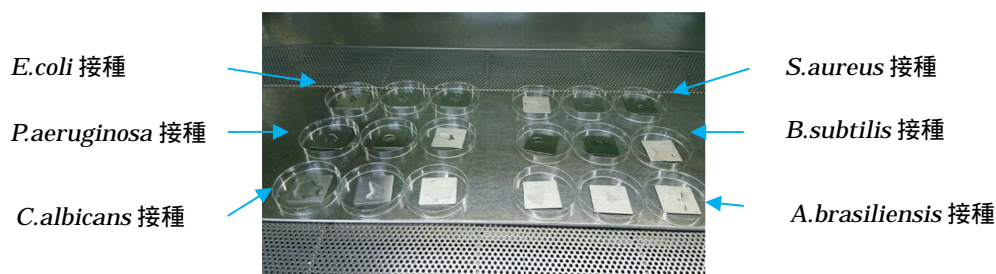
2. 実施方法

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。

- 1) $10^6 \sim 7$ CFU/mL の *E.coli* を含んだ菌液 50 μ 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 μ 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）。



- 2) 1)と同様の操作を *S.aureus*、*Paeruginosa*、*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。



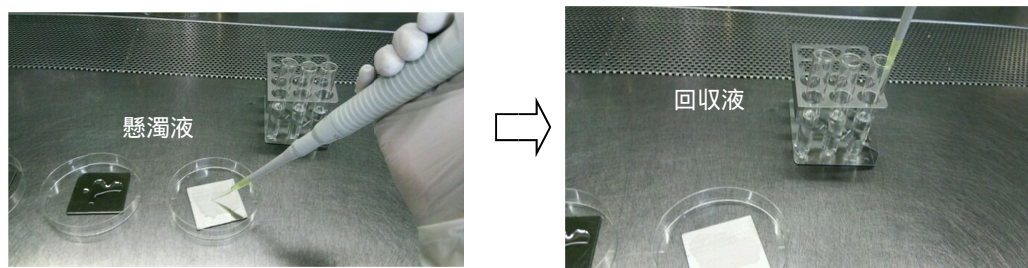
- 3) *E.coli* を接種したキャリアー 1 枚に、常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。他の 1 枚については消毒剤 1 種目を、残りの 1 枚には消毒剤 2 種目をそれぞれ 1 mL 滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。



- 4) 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 分毎に均一化操作を行う。

- 5) 5 分後にキャリアー表面の *E.coli* を懸濁した滅菌水 100 μ 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 1 種目及び消毒剤 2 種目 100 μ 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 1 種目及び消毒剤 2 種目についても同様の操作を実施する。



- 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°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。
- 9) 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。菌数の算出は次式による。

【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 100 μ L に対する菌数を計測)

- 10) 「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】

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

- 11) 他 7 種の材質のキャリアーについて、上記 1) ~ 10) の操作を実施する。
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。

回収液組成の検討結果

1. 概要

検証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 1 回収液組成 (1000mL 中)

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ ¹	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

1: 熱により分解するため、ろ過滅菌による無菌化を行う。

2. 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) ろ過滅菌し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。

3. 検討手順

以下の手順で実施した。

- (1) 検証濃度の各消毒剤を調製し、その 0.1 mL を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に *Escherichia coli* ATCC 8739、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Candida albican* ATCC 10231 及び *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 の $10^3 \sim 10^4$ CFU を含んだ液 0.1 mL 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 0.1 mL 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℃ で 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。

4. 結果

消毒剤毎の試験菌に対する回収率の結果を表 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。

表 2 回収液の微生物回収率

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>S.aureus</i>			<i>P.earuginosa</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

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・ユトリサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の評価

分担研究者	棚元憲一	武蔵野大学薬学部教授
協力研究者	室井正志	武蔵野大学薬学部
	小倉紀彦	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G
	小田俊男	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G
	明田川純	生化学工業株式会社 LAL 営業 G
	水村 光	生化学工業株式会社 LAL 研究開発 G

研究要旨：昨年度、我々は3種のプロテアーゼ前駆体の組換え酵素と発色合成基質からカスケード反応を再構成し、天然カプトガニに依らない組換えエンドトキシン（Et）測定用比色試薬を開発した。今年度は、まず組換え Et 比色試薬の製剤化検討を行い、試薬組成を決定した。次に3ロットの凍結乾燥製剤を製造し、これらの性能を分析法バリデーションに従い、それぞれの分析能パラメータについて評価した。直線性および真度は局方 Et 試験法予備試験の要求基準に適合し、精度および定量限界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に記載された要求基準に適合した。また、特異性はカプトガニ血球ライセートを利用する既存試薬で問題となる(1-3)-β-D-グルカン（BG）との反応性が認められないことを確認した。

A．研究目的

「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」によると医薬品の承認申請に用いられる試験方法については分析法バリデーションを実施し、分析法が試験の目的に適する方法であることが求められている。今回は製品の最終形態である凍結乾燥製剤を3ロット用い、当該分析法が Et 測定に必要なかつ十分な性能を有していること、さらに製品の品質がロット毎に一定でありかつ安定的に製造が可能であることを分析法バリデーションに従って評価することを目的とした。具体的には各分析能パラメータについて局方予備試験、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確認した。

B．研究方法

まずは3種のプロテアーゼ前駆体の組換え蛋白質、発色合成基質および副原料の配合比率を検討し、次に各溶質の崩壊温度などの凍結乾燥に影響を与える条件を考慮し至適化されたプログラムで主原料がそれぞれ異なる3ロットの試薬（#1～#3）を製造した（表1）。これらを用いて、分析法バリデーションに従い、各種分析能

パラメータの評価を行った(表2)。各分析能パラメータは米国薬局方標準エンドトキシン(USPRSE: H0K354)を用い、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12回の独立した試験を行った。分析能パラメータ1~5は0.005 - 50 EU/mLの2倍希釈列のRSE溶液を調製し、反応時間法で解析した。分析能パラメータ6は0.0125 - 0.1 EU/mLの2倍希釈列のRSE溶液を調製し、測定日および測定機は1条件で試験し、反応速度法で解析した。また、当該分析能パラメータはBGによる反応干渉を確認するため、5µg/mLのBGを含むRSEの2倍希釈列も調製した。これらのRSEまたはBG+RSEを50µLずつ96穴マイクロプレートに分注し、つぎに緩衝液(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50µL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(表3)。反応時間法においては各RSE濃度とそれらの一定の吸光度(閾値: 0.015Abs)に到達した時間を対数変換後、直線回帰し、検量線とした。またその直線性(相関係数r)を求めた。次にそれぞれのRSE濃度におけるEt測定値を算出し、それらの理論値に対する実測値の割合、すなわちEt回収率を真度として求めた。また、8重測定を行ったEt測定値のばらつきを併行精度として求めた。また3条件を変えた12回繰り返し測定から得られた平均値のばらつきを室内再現精度として求めた。

反応速度法については最小二乗法で求めた1分間あたりの吸光度変化率を専用ソフトで算出した。またBG添加および無添加のRSEから得られた検量線の回帰分析を行い、特異性を求めた。

C. 研究結果

1. 直線性

検量線の相関係数は12回の測定すべてにおいて、その絶対値が1.000となり、局方予備試験記載の判定基準(|r| = 0.980)に適合した(表4)。

2. 真度

検量線の各濃度において8重測定を行った真度(Et回収率)の平均値を求めた。12回測定を行った真度は0.005 - 50 EU/mLにおいて92 - 109%となり、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4)。

3. 精度

3-1. 併行精度

検量線の各濃度において8重測定を行って求めたEt濃度の相対標準偏差(CV)を求めた。条件を変えて12回試験を行ったCVは0.005EU/mLにおいて6 - 16%、0.05 - 50 EU/mLにおいて、11 - 15%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、すなわち定量下限の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4)。

3-2. 室内再現精度

検量線の各濃度における測定値の8重測定の平均値を求め、3条件を変えて12回試験を行った際の検量範囲の各濃度における相対標準偏差の90%信頼区間(CV)を下式により求めたところ、2 - 5%となり、良好な室内再現精度を示した(表4)。

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

3-3. 室間再現精度

3年目(2014年度)に実施予定。

4. 範囲

0.005 - 50 EU/mLの検量範囲において分析能パラメータ1, 2, 3-1の判定基準を全て満たす

こと、すなわち直線性、真度および精度が容認できる程度であることを確認できた(表4)。

5. 定量限界

定量下限、すなわち0.005EU/mLにおける真度は理論値の±20%以内および併行精度は20%以下となり、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定量限界の要求基準に適合することを確認した(表4)。

6. 特異性

分析対象物であるエンドトキシン(USPRSE)単独ならびに既存試薬で交差反応を起こすBGをUSPRSEに添加して測定した。BG添加および無添加条件間の回帰分析の結果、3ロットの切片の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4)。

D. 考察

組換えEt測定比色試薬が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するため、分析法バリデーションに従った評価を行い、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確認した。直線性については、局方の基準である0.980より良好な相関係数を示した。また、真度についても回収率は90~110%の範囲に入り、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。併行精度および定量限界については、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。範囲および定量限界も既存試薬と同じであったことから、組換え測定Et比色試薬は既存試薬と同等以上の性能を有することが確認された。今後、局方に収載されるためには、本測定法が恒常的に実施可能であること、すなわち製品の品質がロット毎に一定でありかつ安定的に製造が可能であることが必須である。本検討では原料ロットが全て異なる3つの凍結乾燥製剤で検討し、全てのロットで、判定基準に適合したことから、本技術を用いた試薬の安定生産についても、一定の担保が得られた。

今後は既存試薬との比較として、由来菌種および化学的な構造の異なる各種Etへの反応性を検討するとともに、第十六改正日本薬局方に収載されている注射薬について反応干渉因子試験を行う予定である。

E. 結論

本年度は組換えEt測定比色試薬の性能を分析法バリデーションに従い評価と行った。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、当該試薬が既存のライセート試薬と同等のEt測定に必要なかつ十分な性能を有していることが確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表 無し
2. 学会発表 無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「新規組換えファクターC、その製造法、およびエンドトキシンの測定法」
2013/12/10 PCT 出願：
出願番号 PCT/JP2013/083082

添付資料 1

表 1 試薬 3 ロットを製造した際の原料のロット

試薬ロット	主原料ロット*		
	Factor C	Factor B	Pro-clotting enzyme
#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 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
1 直線性	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) をプロットし、相関係数を求める。	$ r \geq 0.980^a)$
2 真度 (回収率)	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率 (8 重測定) の平均値を算出する。	50 - 200 % ^{a)}
3 精度		
3-1 併行精度	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値 (8 重測定) を算出し、その相対標準偏差 (CV) を求める。	CV @ 0.005 EU/mL 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL 15% ^{b)}
3-2 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 (8 重測定) の平均値を算出し、それら 12 測定で得られた Et 測定値の相対標準偏差の 90%信頼区間 (CV) を求める。	CV @ 0.005 EU/mL 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL 15% ^{b)}
3-3 室間再現精度	未実施 (3 年目に実施予定)	
4 範囲	分析法の直線性、真度および精度が容認できる程度である測定範囲を求める。	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)} 。
5 定量限界 (下限) LOQ	定量下限 (0.005 EU/mL) における真度および精度を評価する。	分析能パラメータ 2 および 3-1 における 0.005 EU/mL の真度が理論値の $\pm 20\%$ 以内、精度が 20% 以下であること。
6 特異性 (BG との反応性)	BG を 5 μ 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) 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 3 測定および解析条件

測定条件	測定機	測定波長	測定 (解析) 時間
反応時間法 15 秒間隔	ELx808IU (Biotek)	1 波長 405nm	30 分
反応速度法 15 秒間隔	ウェルリーダー (生化学工業)	2 波長 主波長: 405nm 参照波長: 492nm	30 分 (2 ~ 30 分)

表 4 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
1 直線性 (相関係数; 絶対値)	0.005 - 50 EU/mL 1.000		適合
2 真度 (回収率)	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
	0.005	94.7 - 103.6	
	0.05	91.6 - 103.1	
	0.5	99.1 - 108.2	
	5	100.1 - 109.4	
3 精度	EU/mL	最小 - 最大 (%)	適合
	0.005	5.9 - 15.7	
	0.05	5.7 - 14.9	
	0.5	6.4 - 11.4	
	5	3.3 - 14.8	
3-2 室内再現精度 (CV)	EU/mL	90%信頼区間 下限 - 上限(%)	適合
	0.005	1.8 - 3.8	
	0.05	2.1 - 4.4	
	0.5	1.9 - 3.9	
	5	1.8 - 3.8	
50	1.5 - 3.0		
4 範囲	0.005 - 50 EU/mL		適合
5 定量限界 (下限) LOQ	@ 0.005 EU/mL 真度: 95 - 104 % 精度: 6 - 16 %		適合
6 特異性 (BG との反応性)	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

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・ユビタリサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

- 微生物の迅速検出法の確立 -

分担研究者 山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生・微生物学）

協力研究者 川井真好 姫路獨協大学薬学部（衛生・微生物学）

研究要旨：第十六改正日本薬局方に参考情報として収載された蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を、医薬品の微生物学的品質保証に活用するためには、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などに対するプロトコルの確立が重要となる。そこで、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、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）に用いる溶解剤や中和剤が、難染色性の指標菌 *Pseudomonas aeruginosa* の蛍光染色に与える影響を検討した。さらに、非無菌製剤原料について蛍光染色を用いた細菌数測定法を適用するための検討を行った。

A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきた。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている^{1,2)}。医薬品製造用水や生薬等においても培養困難な細菌の存在が報告されてきており³⁻⁶⁾、このような細菌の計数においては、個々の細菌を蛍光試薬で染色し、直接観察する方法が有効である^{7,8)}。

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

測定する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が比較的容易であり、かつ短時間で結果を得ることができる点が挙げられる。蛍光活性染色法の染色時間は数分から約 30 分である。またコロニー形成の初期段階で蛍光染色し、測定するマイクロコロニー法であっても、24 時間以内に測定結果を得ることができる。したがって、細菌の検出に数日を要する培養法と比較して、短時間のうちに結果を得ることができる。

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

非無菌医薬品の微生物管理として、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などの細菌数測定および製造環境モニタリングが重要であ

る。医薬品原料や医薬品添加物等に対しては、適切な前処理を行うことにより、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法による生菌数測定が可能となる。

前年度は、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)に用いる溶解剤や中和剤が蛍光染色に与える影響を、指標菌である *Escherichia coli* NBRC 3972、*Bacillus subtilis* NBRC 3134 および *Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276 を用いて検討した。今年度は前年度の成果をふまえ、蛍光染色による検出が困難であるとされている指標菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 を用いて検討を続けた。さらに、抗菌性物質や色素、軟膏基剤などの非無菌製剤原料を対象として、蛍光染色を用いた細菌数測定法を適用するための検討を行った。

B . 研究方法

1) 指標菌株

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 に加えて、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 を用いた。各菌株を SCD 液体培地に植菌し、30 で一晩培養した。菌液をマイクロチューブにとり、遠心分離により菌体を回収した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適切な菌量になるようろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。

2) 試料

i) 溶解剤および中和剤が *Pseudomonas aeruginosa* の染色性へ与える影響の評価

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

下の溶解剤や中和剤を用い、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

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、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。

ii) 非無菌製剤原料に対する蛍光染色法の適用

非無菌製剤原料を以下の通り分類し、代表的な原料を試料として検討した：抗菌性物質 - アンピシリン、色素 - 黄色 5 号、カプセル、軟膏基剤 - ワセリン

これらの非無菌製剤原料に前述の指標菌株を既知量添加し、CFDA-DAPI 二重染色法により染色した。蛍光顕微鏡下で求めた細菌数測定結果から、回収率を算出した。

3) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター(黒色、直径 25 mm、孔径 0.2 μm)上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の青色励起光下で CFDA により染色された細菌数、紫外線励起光下で DAPI により染色された細菌数を測定した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、また

は細菌数が 0 となった視野数が 5 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試料を再調製した。

C . 研究結果および考察

i) 溶解剤および中和剤が *Pseudomonas aeruginosa* の染色性へ与える影響の評価

P. aeruginosa (緑膿菌) 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、日和見感染症の起原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、今年度は緑膿菌を対象とし、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。

調製した試料溶液 (1%ジメチルスルホキシド、 0.5%グリシン、 1%ポリソルベート 20、 1%ポリソルベート 80、 1%チオ硫酸ナトリウム、 ミリスチン酸イソプロピル原液) と菌体を 30 分間反応させた後に、CFDA-DAPI 二重染色を行い、ろ過滅菌

水での測定値を 100 とした場合の検出率を求めた。

その結果、図 1 および図 2 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。

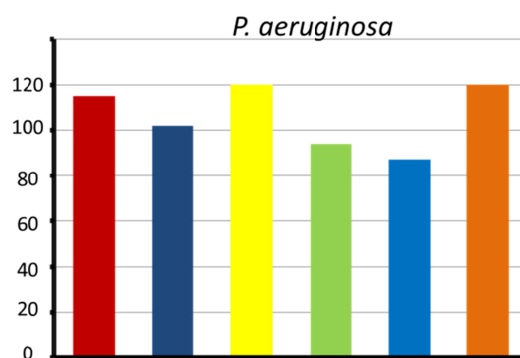


図1 染色剤DAPIの染色性へ与える影響

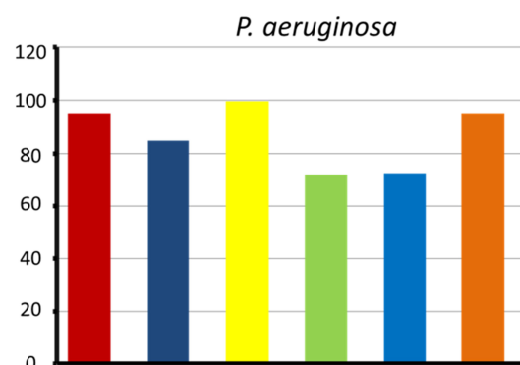


図2 染色剤CFDAの染色性へ与える影響



ii) 非無菌製剤原料に対する蛍光染色法の適用

これまでに、乳糖などの可溶性固形原料、タルクなどの不溶性固形原料に混入した細菌は、適切な前処理を行うことにより、検出・計数可能であることを報告した。今年度は、抗菌性物質、色素、カプセルおよび軟膏基剤について検討した。

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。本研究では、アンピシリンを選び、混入した細菌の計数方法について検討した。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(表 6)。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。

表 1 抗菌剤に添加した細菌の回収

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

抗菌薬: アンピシリン

次に、着色性をもつ製剤原料である色素について検討を行った。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 3 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 3 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分かった。今後、アゾ系以外の色素についても検討する予定である。

カプセルおよび軟膏基剤のワセリンについては良好な結果が得られなかったため、引き続き検討を行う。さらに、芽胞形成菌や真菌の検出にも蛍光染色法が適用できるよう、検討を進める予定である。

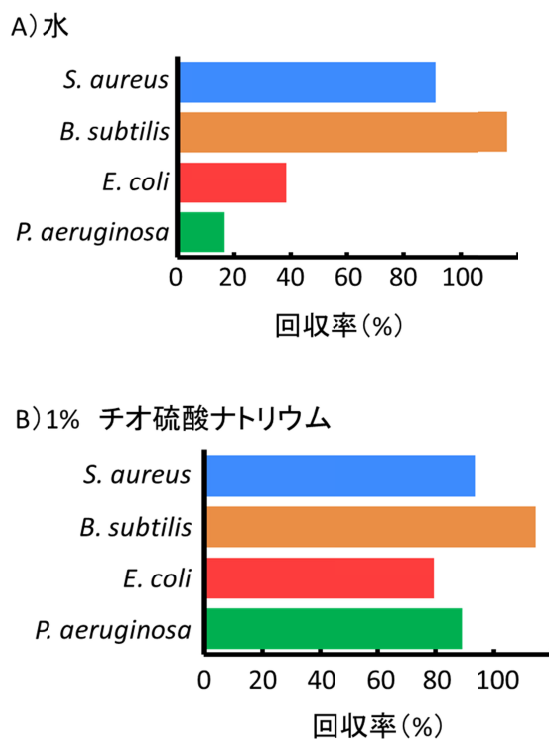


図 3 . 蛍光活性染色法による色素中に添加した細菌の検出

D . 結 論

今回の研究では、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）に用いる溶解剤や中和剤として、ジメチル

スルホキシド、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を選び、各溶解剤や中和剤が難染色性の *Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌）の蛍光染色に与える影響を検討した。その結果、検討した溶解剤や中和剤は、蛍光活性染色による緑膿菌の検出に影響を与えないことが明らかとなった。

また、蛍光活性染色法は抗菌性物質や、色素の含まれる非無菌製剤中に混入した細菌の検出にも応用できることを明らかにした。

本研究の成果をもとに、今後、同様の検討を様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

E . 参 考 文 献

- 1 . 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出 . 衛生化学、**43**: 145-154 (1997)
- 2 . Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
- 3 . Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing

- process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 496-504 (1999)
- 4 . Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 699-704 (2002)
 - 5 . Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
 - 6 . Nakajima, K., K. Nonaka, K. Yamamoto, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 128-132 (2005)
 - 7 . 山口進康、那須正夫：蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出．*日本細菌学雑誌*、**61**: 251-260 (2006)
 - 8 . 佐々木次雄、棚元憲一、川村邦夫編：新 GMP 微生物試験法．*じほう* (2008)
 - 9 . Miyanaga K., S. Takano, Y. Morono, K. Hori, H. Unno and Y. Tanji. Optimization of distinction between viable and dead cells by fluorescent staining method and its application to bacterial consortia. *Biochem. Eng. J.*, **37**: 56-61 (2007)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・ユトリサイエンス総合研究事業）

分担研究報告書

無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

研究分担者：	片山博仁	バイエル薬品株式会社
研究協力者：	佐々木次雄	武蔵野大学
	原田敏和	参天製薬株式会社
	内藤貴博	塩野義製薬株式会社
	古賀裕香里	日本PDA製薬学会
	伊藤千鶴子	日本PDA製薬学会
	白木澤治	ファルマ・ソリューションズ株式会社

研究要旨：無菌医薬品の品質を確保するためには消毒剤の有効性を的確に評価する必要がある。本研究では、消毒剤の有効性の評価法として「硬質表面キャリアー法」が実用可能であることを確認することを目的に、実施する基礎実験で使用する回収液の組成を検討した。さまざまな硬質キャリアーに対する種々の回収液を検討し、汎用消毒剤を添加しても十分に試験菌を回収できる回収液の組成を決定することができ、次年度以降に実施する基礎実験の準備を進捗させることができた。

A. 研究目的

日本薬局方 参考情報「微生物殺滅法」の改訂作業を進めている。改訂案では、GMPで要求される医薬品製造施設等を対象とした消毒の要件と消毒剤の有効性を評価する方法を収載する予定である。そこで本年度は消毒剤の有効性評価法の確立を行った。

これまで国内には、消毒剤の微生物に対する有効性を評価するための標準的な方法がなく、評価を行う際にはUSP、EN、AOAC等の海外の公定書に掲載されている方法を参考にしてきた。今回、消毒剤の評価法を参考情報に収載するに際してもこれら公定書も参考にしながら検討し、「硬質表面キャリアー法」を提案する。本法は、種々の材質で

構成されている医薬品製造施設等の状況を小スケールで再現しながら消毒剤の有効性を評価する方法である。この「硬質表面キャリアー法」が実用的な評価法であることを調査するための基礎実験を国内製薬会社数社の共同により計画中である。

基礎実験では、複数の試験室で添付資料 1 に示す共通のプロトコル（案）を用いて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、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予定である。硬質表面キャリアー法では、各種表面材質のキャリアーに既知数の試験菌と

消毒剤を接種した後、生残菌数を計測し、菌数減少量の定量を行うことで消毒剤の有効性を評価するが、この方法を採用して生残菌数を計測する際は、消毒剤の微生物に対する作用を中和しながら試験菌を回収する必要がある。本研究では、基礎実験を実施する前段階として、消毒剤中の生残菌数を回収する際に用いる回収液の組成を検討した。

B. 研究方法

本研究では、まず医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度を調査した。調査は日本 PDA 製薬学会 無菌製品 GMP 委員会参加企業に対して聞き取り調査を行い、そこで得られた情報を基に汎用性の高い消毒剤の有効成分と使用されている濃度を集約した。集約結果を表 1 に示す。

表 1. 医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度

消毒剤	使用濃度 ¹
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%
イソプロピルアルコール	50～70%
エタノール	70%
ベンザルコニウム塩化物	0.05～0.2%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05～0.5%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05～0.5%

1：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、医薬品製造施設で汎用されている濃度である。基礎実験においては、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し、供試する予定である。

これらの消毒剤及び基礎実験で採用する濃度を対象に、中和剤を含む回収液の組成を検討した。中和剤としては日本薬局方 微生物限度試験法の「阻害物質に対する一般的な中和剤中和法」の表に記載されている大豆レシチン、ポリソルベート 80、チオ硫酸ナトリウムの他、L-ヒスチジンや過酸化水素等の分解に汎用されるカタラーゼ等を用い、それらの配分を変動させながら回収液の組成を検討した。

回収液としての組成候補液を数種類調製し、そこに消毒剤 0.1mL を接種したものを試料溶液として、日本薬局方 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有用性を評価した。具体的な操作方法は次の通りである。なお、「消毒剤 0.1mL」は、基礎実験で生残菌数を計測する際の消毒剤の容量である。

- (1) 表 1 の各消毒剤の下限濃度品を調製し、その 0.1 mL を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に各試験菌 $10^3 \sim 10^4$ CFU を含んだ菌液 0.1 mL を接種した。
- (3) (2) の液を 90 分程度放置し、作用させた。
- (4) (3) の液 0.1 mL 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℃ で

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】

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

(8) 上記(1)～(7)の操作を回収液の候補組成液毎に実施した。

(9) 試験菌の回収率が50～200%であれば、回収液として適切な組成であると判断した。

C. 研究結果

各成分の配分を調整しながら評価を実施した結果、表2に示す組成の回収液が、表1に示した汎用消毒剤すべてを添加しても接種した試験菌を50～200%の範囲で回収し、中和に有効であることが示された。この結果を基に、基礎実験で使用する回収率の組成を決定した。回収率の詳細データは添付資料2に示す。

表2 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 ²	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

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

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、高濃度で添加しても試験菌の回収は困難であったが、カタラーゼを使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滅菌の操作が必要となることに留意する必要がある。

D. 考察

中和剤は通常、対象となる物質毎に適したものを選定していくことが多いが、今回決定した中和剤を含む回収液は、基礎実験で検証対象としている汎用消毒剤のいずれに対しても中和効果を示している点で、利用しやすいものであると考える。

E. 結論

日本薬局方 参考情報「微生物殺滅法」の改訂案に消毒剤の有効性を評価する方法として掲載される予定の「硬質表面キャリアー法」が実用可能であることを確認するために実施する基礎実験で使用する回収液の組成を検討し、決定することができた。次年度以降に実施する基礎実験の準備を進捗させることができた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

消毒剤の有効性評価方法確立の Protokol(案)

5. 実験材料

1.1 消毒剤

表 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 1 消毒剤の種類と濃度

消毒剤	使用濃度 ¹	検証濃度 ²
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%
イソプロピルアルコール	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%

¹ : 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。

² : 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。

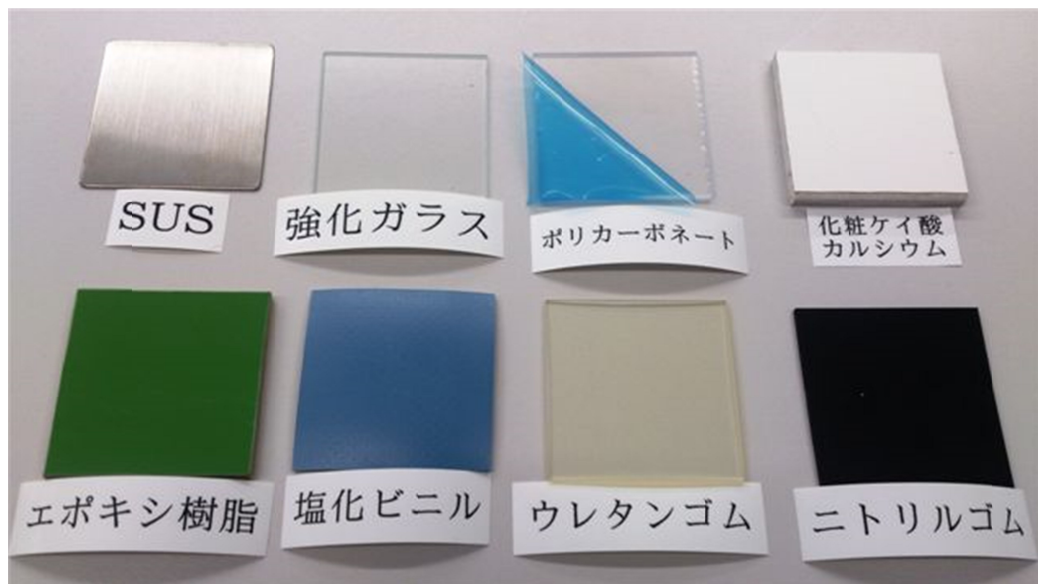
1.2 対象材質

表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。

表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



1.3 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。市販品使用も可である。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 3 に示す。

表 3 試験菌と培養条件

試験菌		培養条件			最大許容濃度 (CFU/mL)
		培地	温度	時間	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 等	SCD	30 ~ 35 °C	18 ~ 24 h	10 ^{6~7}
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633 等		芽胞懸濁液		10 ^{6~7}
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 等	サブロー	20 ~ 25 °C	2 ~ 3 days	10 ^{6~7}
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 等	PD 斜面	20 ~ 25 °C	5 ~ 7 days	10 ^{6~7}

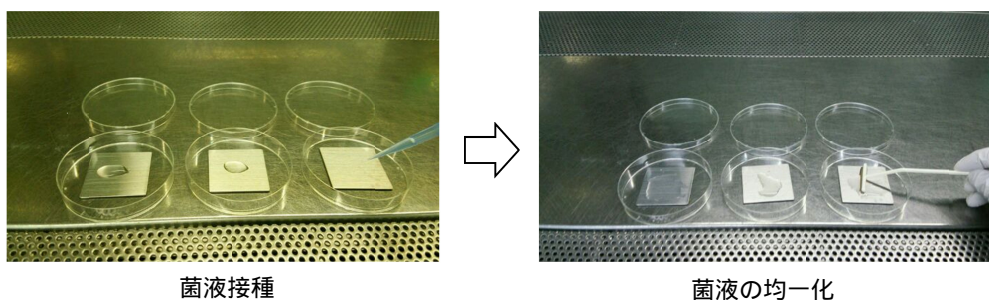
1.4 回収液

消毒剤の微生物に対する作用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は別途検討する。

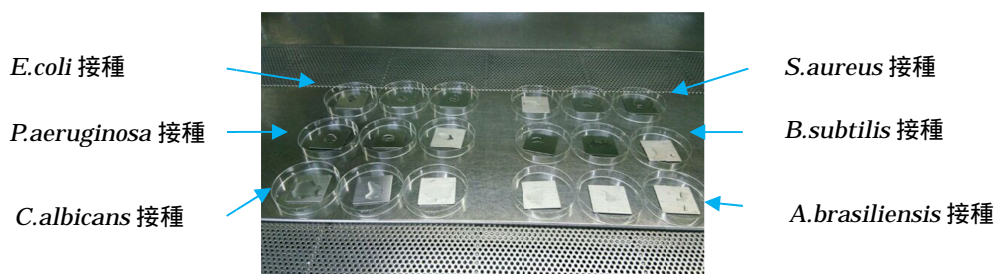
6. 実施方法

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。

- 1) $10^{6\sim7}$ CFU/mL の *E.coli* を含んだ菌液 50 μ 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 μ 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）。



- 2) 1)と同様の操作を *S.aureus*、*Paeruginosa*、*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。



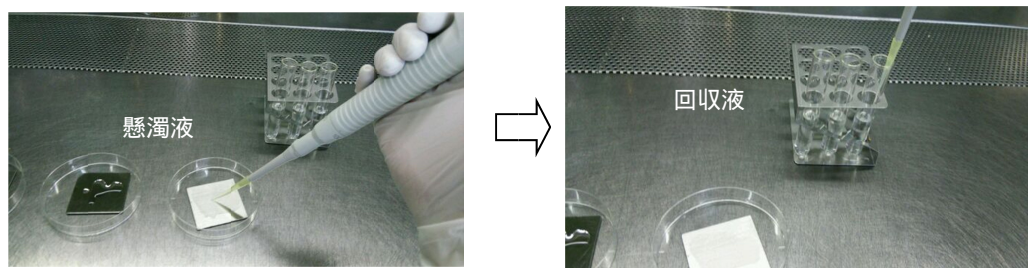
- 3) *E.coli* を接種したキャリアー 1 枚に、常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。他の 1 枚については消毒剤 1 種目を、残りの 1 枚には消毒剤 2 種目をそれぞれ 1 mL 滴下し、コンラージ棒を用いて、キャリアー表面全体に行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。



- 4) 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 分毎に均一化操作を行う。

- 5) 5 分後にキャリアー表面の *E.coli* 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。同様に、キャリアー表面の *E.coli* を懸濁した消毒剤 1 種目及び消毒剤 2 種目 100 μL 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 1 種目及び消毒剤 2 種目についても同様の操作を実施する。



- 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°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。
- 9) 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。菌数の算出は次式による。

【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 100 μL に対する菌数を計測)

- 10) 「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】

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

- 11) 他 7 種の材質のキャリアーについて、上記 1) ~ 10) の操作を実施する。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。

回収液組成の検討結果

7. 概要

検証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 1 回収液組成 (1000mL 中)

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ ¹	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

1：熱により分解するため、ろ過滅菌による無菌化を行う。

8. 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) ろ過滅菌し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。

9. 検討手順

以下の手順で実施した。

- (1) 検証濃度の各消毒剤を調製し、その 0.1 mL を回収液 10 mL に添加した。
- (2) (1) に *Escherichia coli* ATCC 8739、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Candida albican* ATCC 10231 及び *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 の $10^3 \sim 10^4$ CFU を含んだ液 0.1 mL 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 0.1 mL 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 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。

10. 結果

消毒剤毎の試験菌に対する回収率の結果を表 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。

表 2 回収液の微生物回収率

消毒剤		回収率 (%)								
		<i>S.aureus</i>			<i>P.earuginosa</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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山口進康、 那須正夫	微生物迅速検出法	佐々木次雄、 棚元憲一、 川村邦夫	新 GMP 微生物試験法 第2版	じほう	日本	2013	489-506

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitajima T., Muroi M., Yamashita N., and Tanamoto K.	Toll-like receptors required for <i>Dermatophagoides farinae</i> to activate NF- κ B	Biol. Pharm. Bull.	37	74-80	2014
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
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
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
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
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