

厚生労働科学研究費補助金

**医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
(医薬品等規制調和・評価研究事業)**

**医薬品の微生物学的品質確保のための
高度試験法導入に関する研究**

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 棚元 憲一

平成27(2015)年 4月

目 次

I . 総括研究報告

医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法導入に関する研究	1
棚元 憲一	
(資料)	
添付資料 I-1.....	18
添付資料 III-1.....	33
添付資料 III-2.....	26
添付資料 III-3.....	38
参考資料.....	44

II . 分担研究報告

1 . 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の評価	63
棚元 憲一	
(資料)	
添付資料 1.....	68
2 . 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究.....	83
山口 進康	
3 . 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究	91
片山 博仁	
(資料)	
添付資料 1	99
添付資料 2	102
添付資料 3	104
参考資料	110
添付資料 4	112

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	128
----------------------------	-----

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、の3研究を行った。本年度は組換えエンドトキシン比色試薬を分析法バリデーションに従い、既存エンドトキシン測定試薬との間での同等性を評価し、組換え試薬が薬局方エンドトキシン試験法に適用可能であることを確認した。また、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、代表的な非無菌製剤原料（水溶性基剤、油脂製基剤、乳剤性基剤）への細菌数迅速測定法の適用を検討した。また、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の生菌数を蛍光活性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。さらに、製薬関連企業15社における共同実験により、「硬質表面キャリアー法」が消毒剤の有効性を的確に評価する方法として実用可能な方法であることが確認し、日本薬局方参考情報「微生物殺滅法」の改訂案を作成した。

研究分担者

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

善もしくは新規試験法の導入を図らなければならない。そのような観点から本研究では、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。

A．研究目的

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

エンドトキシン試験法の必須資源であるカプトガニの資源確保が危惧されることから、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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 の他、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* NBRC 13276、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、さらに嫌気性菌として *Clostridium sporogenes* NBRC14293 を用いた。各菌株を SCD 液体培地に植菌し、30 で一晩培養した。菌液をマイクロチューブにとり、遠心分離により菌体を回収した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適切な菌量になるようにろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。

各非無菌製剤原料中の細菌を検出するための前処理条件の検討にあたり、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および無菌試験）に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
グリシン
チオ硫酸ナトリウム
ミリスチン酸イソプロピル
ポリソルベート 80
ポリソルベート 20
n-オクタン
Span80

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

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

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

CFDA-DAPI 二重染色は第 16 改正日本薬局方・参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」に従い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター（黒色、直径 25 mm、孔径 0.2 μm）上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の青色励起光下で CFDA により染色された細菌数（生菌数）、紫外線励起光下で DAPI により染色された細菌数（全菌数）を測定した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、または細菌数が 0 となった視野数が 5 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試料を再調製した。

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

3) 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

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

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

プロトコルの作成に際しては、事前に以下の 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。

表 III-1. 医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度

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

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

評価対象とする構造設備の材質

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

表 III-2 構造設備の材質

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

試験菌の接種と回収方法

硬質表面キャリアー法では、各種表面材質のキャリアー上に既知数の試験菌と

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

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

次の操作に移行することとした。詳細は添付資料 III-1 に示す。

表 III-3. 試験菌

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

消毒剤の中和方法

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

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

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

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

表 III-4 回収液の組成 (1000 mL 中)

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

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

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

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

C . 研究結果

1) 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン試験法の開発

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

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

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

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

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

2) 細菌数迅速測定法のバリデーション法

に関する研究

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

表 II-1 マクロゴールに添加した細菌の回収

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

表 II-2 白色ワセリンの溶解性

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

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

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

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

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

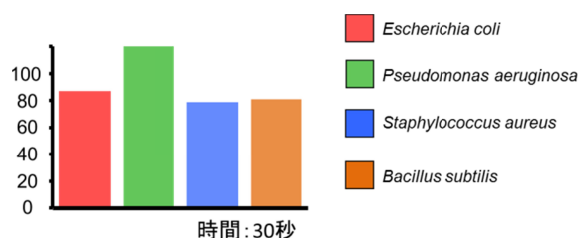


図 II-1 n-オクタンの CFDA 染色へ与える影響

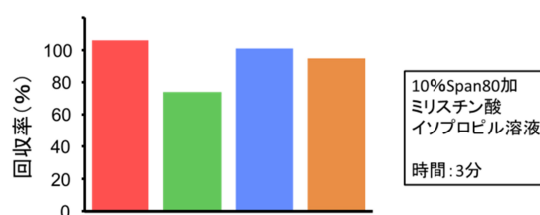


図 II-2 ソルビタンモノオレエート (Span80) が CFDA 染色へ与える影響

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

iii) 乳剤性基剤 (吸水軟膏)

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

表 II-3 白色ワセリンに添加した細菌の回収

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

表 II-4 吸水軟膏に添加した細菌の回収

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

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

3) 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究

共通プロトコルに基づく実験結果

a. 全般

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

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

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

b. 消毒剤ごとの結果

1) 3% 過酸化水素

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

表 II-5 賦形剤に存在する生菌

水溶性固形原料(乳糖)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性細菌	真菌
9L10A	4.4×10 ³	<2.5	<2.5
A3A29	3.8×10 ³	<2.5	<2.5
- 1 不溶性固形原料(タルク)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
8H07A	3.4 × 10 ⁶	375	<25
45071	1.1 × 10 ⁴	275	25
- 2 不溶性固形原料(ステアリン酸マグネシウム)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
1B6009	7.3 × 10 ⁵	<25	<25
2014G6090	1.1 × 10 ⁴	50	<25
色素(黄色5号)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
X73FFI	1.0 × 10 ⁴	<500	<500
- 1 軟膏基剤(マクロゴール)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
864805	3.4×10 ³	0.67	<0.33
864930	2.7×10 ⁴	0.33	<0.33
2 軟膏基剤(白色ワセリン)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
P1D12	5.1×10 ⁵	<2.5	<2.5
P4I65	6.9×10 ⁵	<2.5	<2.5
P4I66	5.6×10 ⁵	2.5	<2.5
3 軟膏基剤(吸水軟膏)			
Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
044711	5.3×10 ⁵	<2.5	<2.5
044924	5.4×10 ⁷	<2.5	<2.5

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

2) 0.2% 過酢酸

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

3) 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム

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

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

4) 50% イソプロパノール

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

5) 70% エタノール

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

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

6) 0.05% ベンザルコニウム塩化物

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

7) 0.05% アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩

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

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

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

8) 0.05% クロルヘキシジングルコン酸塩

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

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

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

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

実験実施時に得られた操作上の注意点等

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

a. テストキャリアーの清浄化方法

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

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

b. キャリアーからの消毒剤の漏れ

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

c. 試験菌の回収操作法

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

D. 考 察

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

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

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

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

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

本研究で得られた蛍光活性染色による各種非無菌製剤原料中の生菌数測定法を、今後、様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

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

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

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

E . 結 論

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

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

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

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

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

- 8) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラージェ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)

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料 I-1

表 I-1 試験に使用した試薬

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

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

表 I-2 試験に使用した Et

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

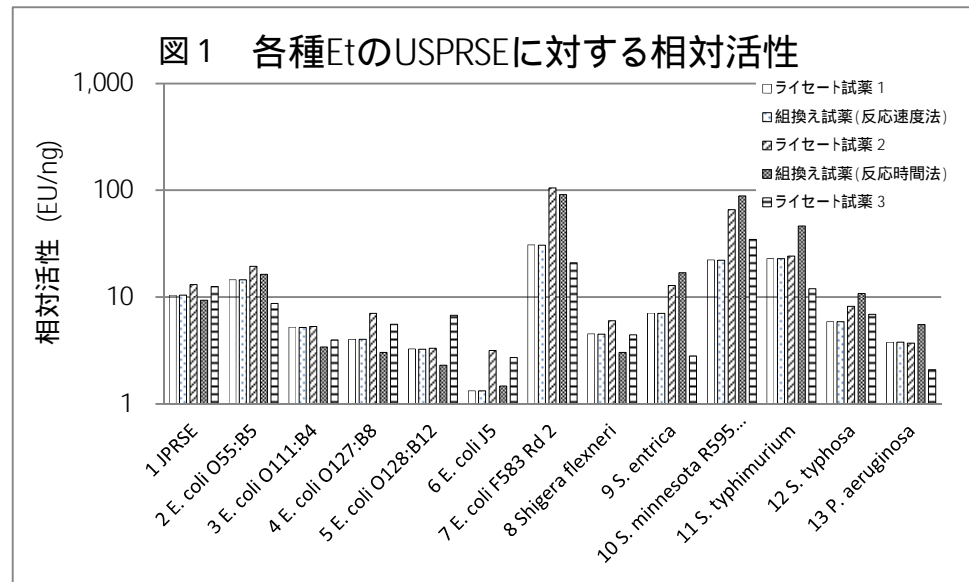


表 I-4-1 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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-4-2 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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	イダルビシン塩酸塩		8.9 EU/mg(力価)						入手不可
18	注射用イダルビシン塩酸塩	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-4-3 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応 速度法	反応 時間法	1	2	3	
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-4-4 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 ^{a)}	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	
				40	50	40	50	32	
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-4-5 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 ^{b)} 3200	1 4000	16 ^{b)} 3200	1 4000	16 ^{b)} 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 ^{a)}	16 ^{b)} 7920	2 9900	4 ^{b)} 7920	1 9900	4 ^{b)} 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-4-6 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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	注射用セフタジジム	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 ^{a)}	450 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	128	128	64	64	128	
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) 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-4-7 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 a)	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-4-8 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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	注射用ドキシソルピシン塩酸塩	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 ^{a)}	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-4-9 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応 速度法	反応 時間法	1	2	3	
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-4-10 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応 速度法	反応 時間法	1	2	3	
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-4-11 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

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

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-4-12 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

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

109 品目を測定 (うち、ID59, 67 の 2 品目は代替品)

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

表 I-5 室間再現精度の結果

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

表 I-6 上記 Et 測定値を対数変換し、その絶対値で解析

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

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

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	7.2×10^4	4.0×10^3	1.3
<i>P. aeruginosa</i>			2.2×10^4	1.5×10^2	2.1
<i>E. coli</i>			3.3×10^4	8.5×10^2	1.6
<i>C. albicans</i>			3.0×10^4	1.0×10^2	2.5
<i>B. subtilis</i>			9.5×10^4	2.1×10^4	0.7
<i>A. brasiliensis</i>			4.5×10^4	1.2×10^4	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キャリア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樣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	2.2×10^6	6.7×10^4	1.5
		B	2.2×10^6	4.4×10^4	1.7
		C	2.2×10^6	1.5×10^5	1.1
	硬質 ウレタンゴム	A	2.2×10^6	2.2×10^5	1.0
		B	2.2×10^6	2.0×10^5	1.0
		C	2.2×10^6	2.4×10^5	0.9
	エポキシ 樹脂コート	A	2.2×10^6	4.3×10^3	2.7
		B	2.2×10^6	1.9×10^5	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	塩化ビニル	A	1.1×10^6	6.4×10^3
B			1.1×10^6	8.6×10^3	2.1
C			1.1×10^6	4.9×10^3	2.3
硬質 ウレタンゴム		A	1.1×10^6	2.1×10^4	1.7
		B	1.1×10^6	4.0×10^4	1.4
		C	1.1×10^6	6.6×10^4	1.2
エポキシ 樹脂コート		A	1.1×10^6	3.5×10^2	3.5
		B	1.1×10^6	9.8×10^3	2.0
<i>E. coli</i>		塩化ビニル	A	1.9×10^6	1.6×10^5
	B		1.9×10^6	1.1×10^5	1.3
	C		1.9×10^6	8.2×10^4	1.4
	硬質 ウレタンゴム	A	1.9×10^6	1.9×10^4	2.0
		B	1.9×10^6	1.2×10^4	2.2
		C	1.9×10^6	4.9×10^4	1.6
	エポキシ樹脂 コート	A	1.9×10^6	4.0×10^3	2.7
		B	1.9×10^6	1.5×10^4	2.1
	<i>C. albicans</i>	塩化ビニル	A	9.0×10^5	1.6×10^4
B			9.0×10^5	1.5×10^4	1.8
C			9.0×10^5	2.0×10^4	1.7
硬質ウレタン ゴム		A	9.0×10^5	3.1×10^4	1.5
		B	9.0×10^5	3.8×10^4	1.4
		C	9.0×10^5	8.3×10^4	1.1
エポキシ樹脂 コート		A	9.0×10^5	9.0×10^2	3.0
		B	9.0×10^5	5.7×10^4	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 ¹	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

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

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 μL 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 μL 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 μL 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 Protokol

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 Protokol 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 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%

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。

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

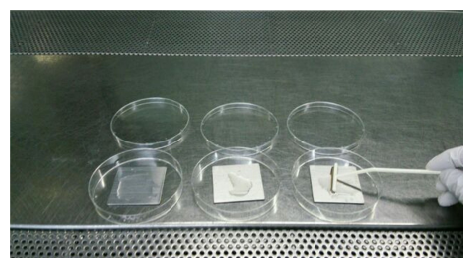
消毒剤2種、ステンレス製のキャリアを対象とした時の試験手順を以下に示す。ここで示した操作を6菌種に対して実施する。

(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 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)。

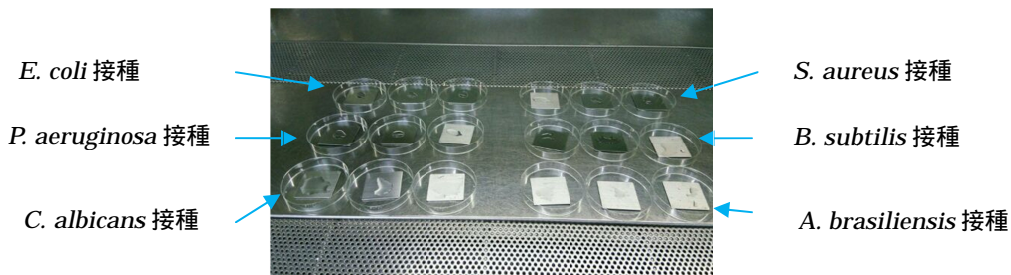


菌液接種



菌液の均一化

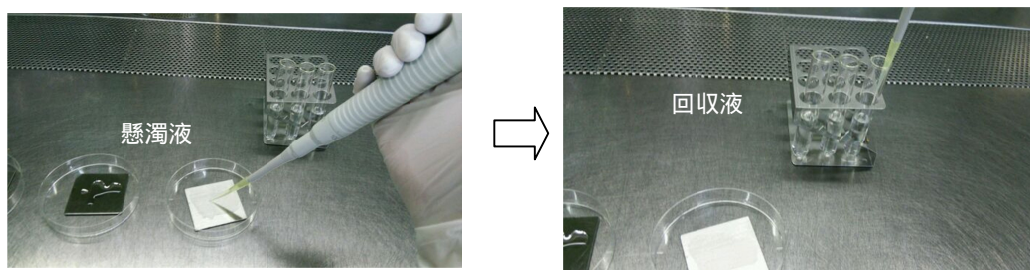
- 10) 1)と同様の操作を *S. aureus* , *P. aeruginosa* , *B. subtilis* , *C. albicans* , *A. brasiliensis* についても実施し, 計 18 枚の試験菌を接種したキャリアーを作成する .



- 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 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 及び消毒剤 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 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100 μ L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 III-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 III-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	2555000	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			253000	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			130500	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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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 III-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	-0.1
<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 III-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		L社		K社		L社		K社		L社		K社		L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		L社		K社		L社		K社		L社		K社		L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

A. brasiliensis	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

A. brasiliensis	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 III-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 III-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

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
	水村 光	生化学工業株式会社
	小田俊男	生化学工業株式会社
	明田川純	生化学工業株式会社
	小倉紀彦	生化学工業株式会社

研究要旨：これまで、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比色試薬（以下、組換え試薬）を開発した。当該試薬性能を分析法バリデーションに従い、それぞれの分解能パラメータについて評価したところ、薬局方予備試験および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に適合した。最終年度である本年は、まず組換え試薬と既存エンドトキシン測定試薬（以下ライセート試薬）との間でエンドトキシン試験結果の同等性を評価するため、由来菌の異なる各種エンドトキシンを組換え試薬とライセート試薬で測定した。両試薬の米国薬局方エンドトキシン標準品（USPRSE）に対する各種エンドトキシンの相対活性は良好な相関を示した。また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ている医薬品中のエンドトキシンが最大有効希釈倍数以下で測定できたことより、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が確認できた。

A. 研究目的

エンドトキシン (Et) はリポ多糖 (LPS) とも呼ばれ、グラム陰性菌の細胞外膜を構成し、その化学的な構造は菌の種類により異なる。また、構造の違いはヒトにおける生理活性およびライセート試薬を用いた測定における比活性に影響を与えることが知られている。片岡らは、メーカーの異なるライセート試薬を使い、日本薬局方エンドトキシン標準品 (JPRSE) に対する由来菌の異なる各種 Et の相対活性を求め、試薬間でその値に一定の差があることを示した。

また、試薬原料を含め試薬性能に影響しうる製造法の変更があった場合、標準品に対する各種 Et の反応性を高精度に比較、評価することが必要と報告している¹⁾。よって、本年は第一に組換え試薬と日本でよく使用される3種のライセート試薬において、米国薬局方エンドトキシン標準品 (*E. coli* O113:H10 由来、USPRSE) に対する13種の Et (表2) の相対活性をそれぞれ求め、これを指標に組換え試薬とライセート試薬の同等性を検証した。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製造工程で製造されており²⁾、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 規格値が記載された医薬品は、厳しく Et を管理することが求められている。医薬品中の Et をライセート試薬で測定する際、医薬品主成分またはその添加物により反応干渉が認められることがある。薬局方では「試料溶液に反応干渉が認められるとき、最大有効希釈倍数 (MVD) を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う」とされている。よって、第二に組換え試薬がエンドトキシン試験法に適用可能であることを検証するため、第十六改正日本薬局方の医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品につき、反応干渉因子試験を行い、これらが MVD 以下で測定が可能であることを検証した。

B. 研究方法

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

1. 組換え試薬およびライセート試薬の各種 Et に対する反応性

13種の Et (表2) につき USPRSE に対する相対活性 (EU/ng) を求めた。Et は注射用水で溶解し、溶解できなかったものについては 0.1% トリエチルアミン (TEA) で溶解した。これら

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

2. 医薬品の反応干渉因子試験

本検討は 1 ロットの組換え試薬および表 1 に記載の 3 種のライセート試薬を 1 ロットずつ用いた。注射用水を除く入手可能であった代替品を含む 109 品目 (表 4-1~4-6) について日本薬局方のエンドトキシン試験法記載の反応干渉因子試験を実施した。粉末または凍結乾燥品の医薬品は注射用水または医薬品に添付された溶液で溶解した (原液濃度を表 4-1~4-6 に示す)。医薬品は必要に応じて注射用水で 2 倍もしくは 10 倍ずつ希釈した。医薬品の原液または希釈液には各試薬の検量線の midpoint 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 1)。それぞれの試薬の操作法に従い、これらの医薬品、JPRSE を添加した医薬品および JPRSE を測定した。Et 添加試料の Et 濃度 (測定値) から Et 回収率を計算し、反応干渉

因子が試料溶液中に存在しない、すなわち Et 回収率が 50%から 200%の範囲となる最小の希釈倍数である Non Interfering Dilution (NID) を求めた。

3. 室間再現精度の評価 (2 年目未実施分)

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

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

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

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

C. 研究結果

1. 組換え試薬およびライセート試薬の各種 Et に対する反応性

組換え試薬とライセート試薬それぞれの各種 Et の USPRSE に対する相対活性を x_y プロットした回帰式から得られた傾きは 0.768 から 1.433、相関係数は 0.757 から 0.947 となり、ラ

イセート試薬により異なった (表 3)。測定原理とデータ解析法が同じである表 3 の組合せ A (組換え試薬とライセート試薬 1) および組合せ 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、組合せ A および E の 2 試薬での、各種 Et の USPRSE に対する相対活性は同じであると言える (表 3)。TEA で溶解した Et のうち、糖鎖の短い R 型の Et である *E. coli* F583 Rd 2、*S. minnesota* R595 Re の相対活性は他の Et と比較して試薬間のばらつきが比較的大きかった (図 1)。一方で S 型の Et のうち、JPRSE、*Escherichia coli* O111:B4 ならびに *E. coli* O55:B5 の USPRSE に対する相対活性は組換え試薬を含めた全ての試薬の結果がよく一致した (図 1)。なおデータは載せていないが組換え試薬では、各 Et の EU/ng 値の試薬 3 ロット間の CV 値は、*Pseudomonas aeruginosa* (12.7%) を除き、いずれも 10% 未満であった。

2. 医薬品の反応干渉因子試験

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

組換え試薬で測定した 109 種の医薬品の NID は全て MVD を超えず、医薬品中の Et が測定可能であった (表 4-1~4-6)。しかし、同じ組換え試薬でも時間法と速度法で NID が大き

く異なるものが認められた。反応時間法におけるアルベカシン硫酸塩注射液の NID は閾値を 0.015Abs とした 30 分測定では 10,000 倍であり、MVD である 5,000 倍を超えた。しかし、測定時間を 60 分に延長し、閾値を 0.150Abs に変更した結果、NID は反応速度法と同じ 4 倍となった(表 4-1, 4-4)。

3. 室間再現精度の評価 (2 年目未実施分)

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

D. 考 察

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

薬局方では「ライセート試薬は各ロットにつ

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

E. 結 論

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。また、第十六改正日本薬局方の医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品は組換え試薬で全て測定が可能であった。よって組換え技術を用いて作製された原料から調製された組換え試薬は、カプトガニ由来の原料から調製されたライセート試薬と同様、薬局方のエンドトキシン試験に使用可能である。

F. 参 考 文 献

1. 片岡紀代ほか、医薬品研究. 36 (3) 129-135 (2005)
2. WHO/BS/2012.2193 and working document QAS/12.501

G. 研 究 発 表

1. 論文発表
 - 1) Muroi M, Tanamoto K.: Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages. Toxicol. Lett., 235, 199-205 (2015)
2. 学会発表

- 1) 室井 正志、棚元 憲一：Ziram は亜鉛および酸化作用依存的にマクロファージにおける pro-caspase-1 と NLRP3 蛋白を分解する、日本薬学会第 135 年会（2015, 3）

H. 知的財産権の出願・登録状況

無し

添付資料 1

表 1 試験に使用した試薬

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

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

表 2 試験に使用した Et

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

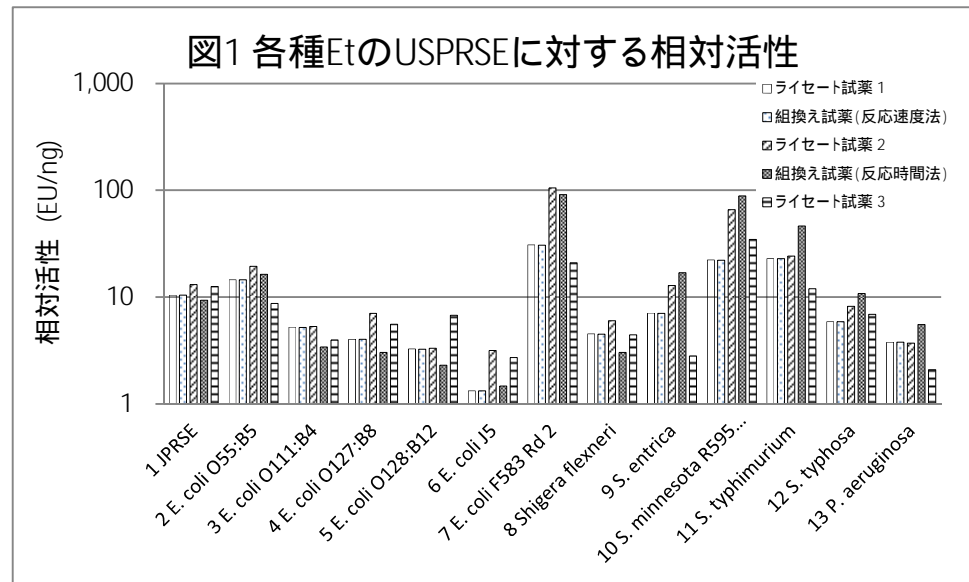


表 4-1 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 4-2 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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	イダルビシン塩酸塩		8.9 EU/mg(力価)						入手不可
18	注射用イダルビシン塩酸塩	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 4-3 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応 速度法	反応 時間法	1	2	3	
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 4-4 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 ^{a)}	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	
				40	50	40	50	32	
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 4-5 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 ^{b)} 3200	1 4000	16 ^{b)} 3200	1 4000	16 ^{b)} 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 ^{a)}	16 ^{b)} 7920	2 9900	4 ^{b)} 7920	1 9900	4 ^{b)} 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 4-6 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
51	注射用セフェピム塩酸塩	50 mg/mL	0.06 EU/mg(力価)	8	16	4	32	8	
				480	600	480	600	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	64	8	128	16	
				800	1000	800	1000	640	
54	注射用セフォチアム塩酸塩	83.3 mg/mL	0.125 EU/mg	16	16	8	64	32	
				1667	2083	1667	2083	1333	
55	注射用セフトジジム	200 mg/mL	0.067 EU/mg(力価)	32	64	8	64	16	
				2144	2680	2144	2680	1715	
56	セフピロム硫酸塩	50 mg/mL	0.10 EU/mg	16	32	8	32	8	
				800	1000	800	1000	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	32	64	64	64	
				3840	4800	3840	4800	3072	
58	セルモロイキン（遺伝子組換え）	40 万単位/mL	100 EU/mL	1	2*	1	64	2	
				16000	20000	16000	20000	12800	
59	タゾバクタム ^{a)}	450 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	128	128	64	64	128	
60	炭酸水素ナトリウム注射液	0.7 mg/mL	5.0 EU/mEq	4	4	4	8	8	
				560	700	560	700	448	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) 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 4-7 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 ^{a)}	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 4-8 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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	注射用ドキシソルピシン塩酸塩	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 ^{a)}	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 4-9 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
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 4-10 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

ID	医薬品の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応 速度法	反応 時間法	1	2	3	
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 4-11 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

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

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 4-12 医薬品各条に Et 規格値が記載される医薬品の NID

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

109 品目を測定 (うち、ID59, 67 の 2 品目は代替品)

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

表 5 室間再現精度の結果

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

表 6 上記 Et 測定値を対数変換し、その絶対値で解析

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

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

細菌数迅速測定法のバリデーション法に関する研究

分担研究者 山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生・微生物学）

協力研究者 川井真好 姫路獨協大学薬学部（衛生・微生物学）

研究要旨：第十六改正日本薬局方に参考情報として収載された蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を、医薬品の微生物学的品質保証に活用するためには、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などに対するプロトコルの確立が重要となる。そこで、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、代表的な非無菌製剤原料（水溶性基剤、油脂製基剤、乳剤性基剤）への細菌数迅速測定法の適用を検討した。また、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の生菌数を蛍光活性染色法により測定し、従来の培養法により得られた生菌数と比較することにより、蛍光活性染色法の有用性を確認した。

A. 研究目的

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

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

測定する方法である。

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

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

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

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

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

B . 研究方法

1) 指標菌株

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 の他、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* NBRC 13276、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、さらに嫌気性菌として *Clostridium sporogenes* NBRC14293 を用いた。各菌株を SCD 液体培地に植菌し、30 で一晚培養した。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) 溶解剤および中和剤

各非無菌製剤原料中の細菌を検出するための前処理条件の検討にあたり、日本薬局方微生物関連試験（微生物限度試験および

無菌試験）に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

グリシン

チオ硫酸ナトリウム

ミリスチン酸イソプロピル

ポリソルベート 80

ポリソルベート 20

n-オクタン

Span80

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

3) 非無菌製剤原料

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

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

4) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色は第 16 改正日本薬局方・参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」に従い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各

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

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

C. 研究結果および考察

1) 油状基剤への蛍光染色法の適用

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

i) 水溶性基剤（マクロゴール）

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

ii) 油脂性基剤（白色ワセリン）

白色ワセリンは石油を精製して製造され

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

表1 マクロゴールに添加した細菌の回収

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

表2 白色ワセリンの溶解性

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

指標菌株を添加した白色ワセリンをミリスチン酸イソプロピルに溶解させ、疎水性ポリカーボネートフィルター上に菌体を捕集し、蛍光染色剤で染色を行ったところ、目視では判別不可能な微量な白色ワセリンの残存物がフィルター上に見られ、CFDA 染色試料の顕微鏡観察が困難であった。一方、n-オクタンは白色ワセリンを十分に溶解した。ただし、n-オクタンを指標菌株と

接触させると全菌数には変化がないが、CFDA 染色により求められるエステラーゼ活性を有する細菌数が検出限界以下となり、n-オクタンは CFDA 染色に影響を与えることが明らかとなった。そこでさらに検討を進めたところ、図 1 に示した通り 30 秒間の接触では細菌の生理活性に影響を与えないことが分かった。このため、菌体に影響の少ないミリスチン酸イソプロピルに白色ワセリンを 45 付近で加温しながら溶解し、さらに完全に白色ワセリンを溶解させるためにろ過直前に n-オクタンを加えた。これにより、溶け残りの白色ワセリンが蛍光染色の観察を妨げるのを防いだ。

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

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

蛍光染色法による細菌数測定が可能となった。

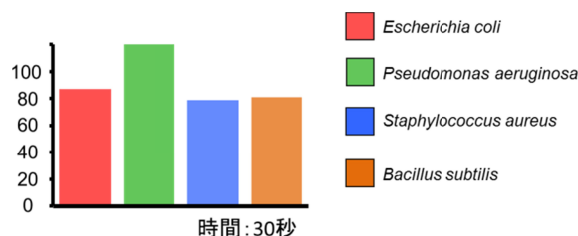


図1 n-オクタンのCFDA染色へ与える影響

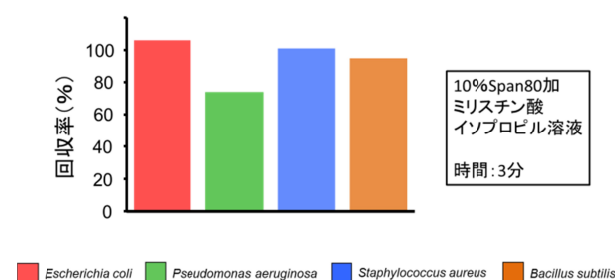


図2 ソルビタンモノオレエート(Span80)がCFDA染色に与える影響

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

iii) 乳剤性基剤 (吸水軟膏)

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

表3 白色ワセリンに添加した細菌の回収

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

表4 吸水軟膏に添加した細菌の回収

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

2) 非無菌製剤の賦形剤中の生菌数の測定

検討した前処理法を用いて、蛍光活性染色法により生菌数を計測した。また、従来の培養による方法についても実施し、結果を比較した(表5)。本結果から、蛍光活性染色法により得られる生菌数は、従来の培養法によって得られた生菌数よりも $10^3 \sim 10^7$ 倍多くなった。蛍光活性染色法(CFDA-DAPI二重染色法)では生菌の指標を酵素活性(エステラーゼ活性)としているのに対し、従来の培養法では増殖能力を生理活性の指標としているため明確な対比は難しいと考えられる。しかしながら、蛍光活性染色による細菌数の測定法は、迅速かつ高精度に生菌数が測定でき、特に色素などの抗菌性のある物質や軟膏基剤などの嫌気状態になる物質においても特別な操作を必要とせず、高精度に生菌数が測定できるため有効な方法である。蛍光染色法を用

いるにあたり、実測値データを積み重ねることにより、非無菌製剤の生菌数の基準となる菌数値を見出すことができると考える。

D. 結論

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

本研究で得られた蛍光活性染色による各種非無菌製剤原料中の生菌数測定法を、今後、様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

表5 賦形剤に存在する生菌
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	4.4x10 ³	<2.5	<2.5
A3A29	3.8x10 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 × 10 ⁶	375	<25
45071	1.1 × 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 × 10 ⁵	<25	<25
2014G6090	1.1 × 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 × 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	3.4x10 ³	0.67	<0.33
864930	2.7x10 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	5.1x10 ⁵	<2.5	<2.5
P4I65	6.9x10 ⁵	<2.5	<2.5
P4I66	5.6x10 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	5.3x10 ⁵	<2.5	<2.5
044924	5.4x10 ⁷	<2.5	<2.5

E. 参考論文

- 1 . 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出．*衛生化学*、**43**: 145-154 (1997)
- 2 . Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
- 3 . Kawai, M., N. Yamaguchi and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.*, **86**: 496-504 (1999)
- 4 . Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 699-704 (2002)
- 5 . Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
- 6 . Nakajima, K., K. Nonaka, K. Yamamoto, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial

contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 128-132 (2005)

- 7 . 山口進康：環境微生物検出のイノベーション．*化学療法の領域*、**26**: 2434-2444 (2010)
- 8 . 佐々木次雄、棚元憲一、川村邦夫編：新 GMP 微生物試験法 第 2 版．*じほう* (2013)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu. Distribution and respiratory activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers in Japan. *PLOS ONE*, 9: e110554 (2014)
- 2) N. Yamaguchi, J. Park, M. Kodama, T. Ichijo, T. Baba, M. Nasu. Change in the airborne bacterial community in outdoor environments following Asian dust events. *Microbes Environ.*, 29: 82-88 (2014)

2. 学会発表

- 1) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. On-site and real-time monitoring for bacterial cells in freshwater with microfluidic system. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
- 2) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu. Abundance and physiological activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers.

- American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
- 3) M. Kawai, J. Yamagishi. Resistance mechanisms of Triclosan in Staphylococci. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 4) 川井真好, 更家信, 山岸純一. ブドウ球菌属のトリクロサン抵抗性メカニズム. 第 62 回日本化学療法学会総会 2014 年 6 月 18 日 - 20 日 (福岡)
 - 5) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. Real-time and on-site monitoring of bacterial cells in aquatic environments by portable microfluidic system. 15th International Symposium on Microbial Ecology, August 24-29, 2014 (Seoul, Korea)
 - 6) 更家信, 山口進康, 川井真好. 蛍光染色による油状基剤からの生菌の迅速検出. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 (京都)
 - 7) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラージェ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)

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

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

A . 研究目的

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

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

これまで国内には、消毒剤の微生物に対する有効性を評価するための標準的な

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

B . 研究方法

共同実験は共通のプロトコルを作成して条件を一定にし、消毒剤ごとに各社で分担して評価を実施した。室内再現性を評価するために、各社で同一条件の実験を複数回行った。また、室間再現性を評価するために、同じ消毒剤の評価を 2 つ以上の試験室で実施し、得られた結果を比較することとした。更に、消毒剤の有効性評価法を実用的な内容とするために、共同実験の実施時に得られた操作上の注意点を抽出し、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 1 に示す。消毒剤の使用濃度については、消毒剤メーカーが器具や構造設備等へ適用する際に添付文書で推奨しており、医薬品製造施設で汎用されている濃度でもある。共同実験においては、汎用される使用濃度の下限をワーストケースとして採用し、供試することとした。

表 1. 医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度

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

評価対象とする構造設備の材質

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

表 2 構造設備の材質

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

試験菌の接種と回収方法

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

ステンレス製キャリアーに表 3 に示し

た試験菌液を接種し、乾燥させた後、滅菌水を用いてキャリアー上の生残菌を回収し、計測した。その結果、細菌 3 種及び酵母の著しい菌数減少を認めた。この情報を基にキャリアーへ接種する菌数の増量、材質による回収率の変動、試験者間の操作誤差等について追加調査を行ったが、効果的な対策を見つけることは困難であった。この条件で実験を実施すると、乾燥だけで消毒効果の判定基準に近い菌数減少が発生することがあり、またその減少量を一定にすることは困難であること、再現性良く消毒剤の効果を評価するために必要な菌数が得られない可能性が高いことから、共同実験においては、試験菌液接種量を 50 μ L とし、キャリアー上の水分量を必要最低限とすると共に、試験菌を固定させるための放置時間を最短とし、接種菌が乾燥する前に次の操作に移行することとした。詳細は添付資料 1 に示す。

表 3. 試験菌

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

消毒剤の中和方法

硬質表面キャリアー法では、キャリアー上の生残菌に対する消毒剤の作用を中和しながら試験菌を回収する必要がある。そのため、共同実験で採用する消毒剤及

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

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

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

回収液の組成を検討する過程で、最も中和が困難な消毒剤は過酢酸であった。過酢酸の場合、日本薬局方 微生物限度試験法の「阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法」の表に記載されている中和剤のみでは、それらを高濃度で添加しても試験菌の回収は困難であったが、カタラーゼ及びチオ硫酸ナトリウムを併用することで改善することが可能となった。

カタラーゼは熱により分解するため、回収液調製時にはろ過操作が必要となることに留意する必要がある。なお、共同実験においては、統一した中和方法を採用することとしたが、消毒剤によっては希釈のみで中和が可能であったり、使用する成分が少なくても中和が可能であったりと最適な中和方法は異なることが想定される。

表 4 回収液の組成 (1000mL 中)

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

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

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

C . 研究結果

共通プロトコルに基づく実験結果

a. 全般

共同実験により得られた結果を添付資料 4-1 ~ 4-8 に集約した。各社の試験室で実施された結果に基づく室内再現性、同条件の試験を異なる試験室で実施した

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

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

b. 消毒剤ごとの結果

1) 3% 過酸化水素

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

加実験を実施したところ、菌数減少量の安定した結果が得られた。操作方法が結果に影響することは本件に限定されたことでは無いが、回収操作の方法が再現性に影響を及ぼす要因となり得ることが判明した。詳細は添付資料 4-1 を参照されたい。

2) 0.2% 過酢酸

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

3) 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められなかった。*A. brasiliensis* とウレタンゴムの組み合わせが他の組み合わせと比較して消毒効果が低い傾向にあった（菌数減少は認められるが、その減少程度が少ない）が室内・室間再現性共に良好であった。

4) 50% イソプロパノール

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

5) 70% エタノール

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

作用機序が類似しているイソプロパノールと同等の結果が得られるものと予測していたが、エタノールでは *A. brasiliensis* に対する菌数減少が認めら

れており、これは消毒剤濃度に起因したものであると推測される。

6) 0.05% ベンザルコニウム塩化物

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

7) 0.05% アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩

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

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

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

8) 0.05% クロルヘキシジングルコン酸塩

今回採用した条件では *B. subtilis* に対する菌数減少は認められず、*A.*

brasiliensis に対する消毒効果が低い傾向にあった。

室内・室間再現性共に概ね良好であったが *S. aureus* について室内再現性の悪い結果が部分的に得られた。試験菌の準備方法はM社が調製済の市販されている菌、N社が自家調製した菌を供試しており、今回室内再現性の悪い結果は、自家調製した菌を使用して得られた結果である。試験菌液中の菌の分散性の影響、もしくは消毒条件が効果を変動させる境界上であった可能性が推察されたが明確な原因は不明である。

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

実験実施時に得られた操作上の注意点等

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

a. テストキャリアーの清浄化方法

硬質表面キャリアー法を採用する際、各材質のキャリアーを用いる必要があり、本研究では5cm×5cmのキャリアーを使用した。このキャリアーを使用する際に

は、事前に表面上の汚染菌を除去した上で、試験菌を接種する手順となる。キャリアー表面上の汚染菌の除去には、蒸気滅菌等の方法も想定されたが、材質によっては耐熱性を有せず、劣化が生じるため、今回は消毒剤に浸漬する方法を採用し、キャリアーを清浄化させた。浸漬に使用する消毒剤は、有効成分をキャリアー表面上に残留させないことを考慮し、3%過酸化水素を選定した。過酸化水素に一昼夜浸漬させたことにより、キャリアー表面の汚染菌は除去できたが、繰り返し浸漬を行ったことで塩化ビニル製のキャリアーの反り、ケイ酸カルシウム製キャリアーのベース部の膨張等の変形が発生し、試験における操作性を低下させた。試験遂行上、キャリアー上の汚染菌除去は必要であるが、その手段にはいくつかの方法が考えられる。今回採用したような浸漬を行うのも方法の一つではあるが、変形等が発生すると操作性が低下することもあり、例えば浸漬時間を短くする、消毒剤を使用して繰り返し拭き取る等、材質に応じた清浄化方法を採用する必要がある。

b. キャリアーからの消毒剤の漏れ

硬質表面キャリアー法を採用する際、キャリアー上に消毒剤を添加するが、消毒剤の表面張力によって、キャリアーからこぼれてしまうケースが認められた。キャリアーのサイズ 5 cm × 5 cm に対して、本共同実験で採用した消毒剤添加量は 1 mL である。「1 mL」はキャリアー全体に消毒剤を行き渡らすのに十分な量であり、またエタノール等の揮発性の高い

消毒剤を一定時間作用させてもキャリアー上に残存する量として採用したが、消毒剤を添加した後にキャリアーの操作を行うと、キャリアーからこぼれる事象が発生した。消毒剤の添加量は事前に最適化が必要で、作用時間を通じて残存している量、試験菌懸濁液の回収が可能な量といった条件を基に設定することになる。また、試験に使用する安全キャビネットの風量や消毒剤の添加量が少量過ぎるとキャリアー表面全体に行き渡らなくなる等を考慮し、事前に各材質のキャリアーを用いた模擬操作を実施して最適化することが望まれる。

c. 試験菌の回収操作法

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

しては、コンタクトプレートキャリアーに接触させ、広範囲の試験菌を回収する方法、キャリアーを回収液に浸漬し、その回収液をメンブランフィルター法でろ過する方法が提示された。

D. 考察

硬質表面キャリアー法による消毒剤の有効性評価は、実際に行われる消毒の状態を可能な限りシミュレートした方法で、材質、微生物、消毒剤の三者の相互作用を確認する際に有用であり、医薬品製造施設等で日常的に実施する消毒プログラムを策定するための基礎データを取得する際に有効な方法である。本共同実験で得られた結果は、消毒剤濃度は低濃度、作用時間も短時間で試験菌が生残しやすいと想定される試験条件を採用したものであり、採用する消毒剤濃度や作用時間が異なれば、試験菌に対する効果も異なった結果が得られるのは容易に想像することができる。各企業において、消毒プログラムの策定を目的として硬質表面キャリアー法を実施する場合は、本書の情報を参考にすることで効率的な実施が可能になるものであると考える。また、得られた結果を基に製造施設等の衛生管理の一環として、消毒プログラムを SOP にて標準化することになるため、消毒剤濃度や作用時間は実際の使用条件をよく考慮して、評価を行う必要がある。

アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩に対する消毒効果の項で述べたように、試験菌の準備方法が試験結果に影響する可能性があることも判明したが、常に一定の状態の菌を準備することが、微生物

試験においては難しく「菌の状態は変わるもの」という認識を持って評価することも必要である。また硬質表面キャリアー法で得られた結果は、消毒プログラムを策定するためのものであり、実際の製造室の状態を完全に保証するものではない。環境には対数増殖期や定常期の微生物、また多種のストレスにより損傷している微生物等、多種が存在していることが予測される。これらは日常的に実施している環境モニタリングで検出されるが、そこで検出された菌の特徴等も考慮しながら消毒剤を最適な条件で使用し、その継続的な有効性は環境モニタリングの結果等との組み合わせで評価することが有用である。

E. 結論

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

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

試験菌の接種と回収方法
- 試験菌の乾燥による影響確認 -

13. 概要

消毒剤の有効性を評価する方法として「硬質表面キャリアー法」を採用する場合、医薬品製造施設を構成している材質のテスト用キャリアーに試験菌液を接種した後、菌液を乾燥させる手順が採用されることがある。しかし、微生物全般に言える特徴として、「乾燥」によって、微生物の発育が抑制されることや比較的容易に死滅する微生物の存在が知られており、その影響が高いと消毒剤接種前に菌数が減少し、効果の確認に必要な初期菌数が得られなくなる等、正確な消毒剤の効果を判断することが困難となる。そのため、乾燥による微生物の影響を調査した。

14. 検討手順

以下の手順で実施した。

- 22) *E. coli* , *S. aureus* , *P. aeruginosa* , *B. subtilis* , *C. albicans* , *A. brasiliensis* の菌液を 5 cm × 5 cm のキャリアーの表面に接種し、菌塊が出来ないようにコンラージ棒を用い、菌液をキャリアー表面上で均一にする。
- 23) 1) が乾燥するまで安全キャビネット内で放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と菌液の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に菌液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて菌液を均一にする。また、乾燥による菌への影響を防止するため、乾燥後は次の操作に素早く移行する。
備考：キャリアー上の菌液の乾燥は、キャリアー材質の影響や安全キャビネットの風量等によって変動し、20～40分程度の時間を要した。
- 24) 各試験菌液を接種したキャリアー1枚に常温の滅菌水 1 mL (表面全体に均一に行き渡る量として設定) を滴下し、コンラージ棒を用いてキャリアー表面全体に滅菌水を行き渡らせるとともに試験菌を懸濁させる。
- 25) この状態で5分間放置する。なお、キャリアー材質の撥水性と滅菌水の表面張力の影響で、キャリアー表面の一部に液が集まることから放置時間中は数回、コンラージ棒を用いて液を均一にする。
- 26) 5分後にキャリアー表面の各菌液を懸濁した滅菌水 100 μL をとり、回収液 10 mL に移し、よくかき混ぜる。
- 27) 各回収液を pH7.2 のリン酸緩衝液で段階希釈し、100倍までの希釈液を調製する。
- 28) 各段階希釈液 1 mL ずつを滅菌済シャーレ 2 枚に添加し、SCD カンテン培地約 20 mL を用い、混釈法により菌数を計測する。
- 29) 培養条件は 30～35°C で 5 日間とする。コロニーの形成状態により、正確な菌数を計測できなくなる恐れがある場合は 5 日間よりも短い培養日数でコロニーを計測しても差支えない。

15. 結果

接種菌数と乾燥後の回収菌数の結果を表1に示す。

表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	7.2×10^4	4.0×10^3	1.3
<i>P. aeruginosa</i>			2.2×10^4	1.5×10^2	2.1
<i>E. coli</i>			3.3×10^4	8.5×10^2	1.6
<i>C. albicans</i>			3.0×10^4	1.0×10^2	2.5
<i>B. subtilis</i>			9.5×10^4	2.1×10^4	0.7
<i>A. brasiliensis</i>			4.5×10^4	1.2×10^4	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キャリア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 -)	回収菌数 (CFU/キャリア -)	対数減少量
<i>S. aureus</i>	塩化ビニル	A	2.2×10^6	6.7×10^4	1.5
		B	2.2×10^6	4.4×10^4	1.7
		C	2.2×10^6	1.5×10^5	1.1
	硬質 ウレタンゴム	A	2.2×10^6	2.2×10^5	1.0
		B	2.2×10^6	2.0×10^5	1.0
		C	2.2×10^6	2.4×10^5	0.9
	エポキシ 樹脂コート	A	2.2×10^6	4.3×10^3	2.7
		B	2.2×10^6	1.9×10^5	1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	塩化ビニル	A	1.1×10^6	6.4×10^3
B			1.1×10^6	8.6×10^3	2.1
C			1.1×10^6	4.9×10^3	2.3
硬質 ウレタンゴム		A	1.1×10^6	2.1×10^4	1.7
		B	1.1×10^6	4.0×10^4	1.4
		C	1.1×10^6	6.6×10^4	1.2
エポキシ 樹脂コート		A	1.1×10^6	3.5×10^2	3.5
		B	1.1×10^6	9.8×10^3	2.0
<i>E. coli</i>		塩化ビニル	A	1.9×10^6	1.6×10^5
	B		1.9×10^6	1.1×10^5	1.3
	C		1.9×10^6	8.2×10^4	1.4
	硬質 ウレタンゴム	A	1.9×10^6	1.9×10^4	2.0
		B	1.9×10^6	1.2×10^4	2.2
		C	1.9×10^6	4.9×10^4	1.6
	エポキシ樹脂 コート	A	1.9×10^6	4.0×10^3	2.7
		B	1.9×10^6	1.5×10^4	2.1
	<i>C. albicans</i>	塩化ビニル	A	9.0×10^5	1.6×10^4
B			9.0×10^5	1.5×10^4	1.8
C			9.0×10^5	2.0×10^4	1.7
硬質ウレタン ゴム		A	9.0×10^5	3.1×10^4	1.5
		B	9.0×10^5	3.8×10^4	1.4
		C	9.0×10^5	8.3×10^4	1.1
エポキシ樹脂 コート		A	9.0×10^5	9.0×10^2	3.0
		B	9.0×10^5	5.7×10^4	1.2

消毒剤の中和方法
- 回収液の検討 -

16. 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 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 ¹	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

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

17. 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。

18. 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 μ 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 μ 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 μ 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。

19. 結果

消毒剤ごと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ことから、表 1 の組成は回収液として適切であると判断した。

表 2 回収液の微生物回収率

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

20. 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 Protokol 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。

21. 実験材料

2.1 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%
クオー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。

2.2 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。このキ

キャリア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3に示す。

表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4に示す。

表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。

22. 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	

23. 実施方法

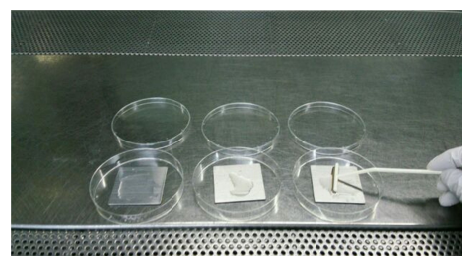
消毒剤2種、ステンレス製のキャリアーを対象とした時の試験手順を以下に示す。ここで示した操作を6菌種に対して実施する。

(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)

- 30) 10^{6-7} 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)。



菌液接種



菌液の均一化

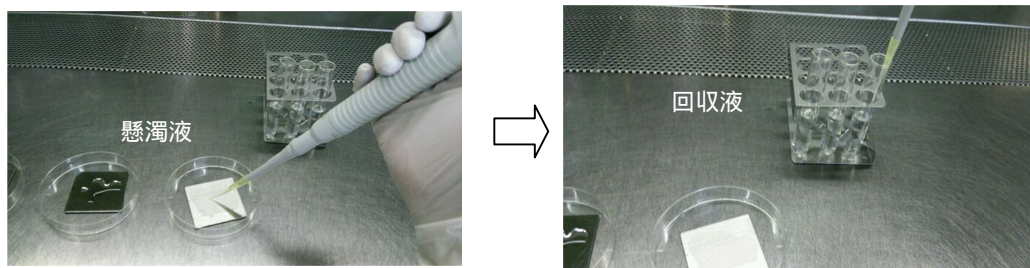
- 31) 1)と同様の操作を *S. aureus* , *P. aeruginosa* , *B. subtilis* , *C. albicans* , *A. brasiliensis* についても実施し, 計 18 枚の試験菌を接種したキャリアーを作成する .



- 32) *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 .



- 33) 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 .
- 34) 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 及び消毒剤 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 及び消毒剤 についても同様の操作を実施する .



- 35) 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 .
- 36) 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 .
- 37) 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。

- 38) 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100 μ Lに対する菌数を計測)

- 39) 「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】

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

- 40) 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。
41) 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。
42) 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。

24. 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)

2.3 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 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 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 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 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する、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 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 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 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			145000	0	560000	0		
	2	89000	0	185000	0			172000	0	288000	0			182000	0	255000	0			183000	0	272500	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	263000	0			159500	50	300000	0			175500	3500	296000	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			115500	0	5450	0		
	3	128000	0	58500	0			94500	0	36500	0			253000	0	102500	0			192500	50	91500	0		
<i>B. subtilis</i>	1	51500	45500	71000	60500			52000	60000	72000	50000			110000	104500	59000	218000			59000	98500	73000	56500		
	2	108000	92000	91000	83500			105000	88000	81500	88000			114500	91500	91000	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	5050	115500	92000			134000	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	87000	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	258000	0			108000	0	288000	0			182500	0	283000	0			277500	0	274500	0		
	3	508000	0	81000	0			528500	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	240500	0			74000	0	262000	0			169500	0	180000	0			183000	0	270500	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			88000	0	252000	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			925000	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			130500	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	75000	150	98000	29500	41500	300	74500	100	88000	4400	77500	500	52500	50	113000	6000	101500	700	48000	50	89500	3500	102000	450

添付資料 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 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	10200000	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 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 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 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 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 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 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 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 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	13000	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 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 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		L社		K社		L社		K社		L社		K社		L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		L社		K社		L社		K社		L社		K社		L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 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 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	82000	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

別紙 4

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	病原生物の多様性・系統分類・検出方法	川端善一郎, 吉田丈人, 古賀庸憲, 鏡味麻衣子	感染症の生態学	共立出版	日本	印刷中	印刷中

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
Muroi M. and Tanamoto K.	Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages	Toxicol. Lett.	235	199-205	2015
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
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