

医薬分野における微生物試験技術の動向と今後の展開

大分事業所 増山 博幸 / 永野 善男 / 古市 ゆかり

1 はじめに

世界の最上位グループに位置する日本の製薬産業は、競争の中での更なる発展を図るため、経営資源の新薬開発への集中、原体・中間体の製造のコストダウン、製造の一括アウトソーシングでの設備費削減及び開発期間の大幅削減とコストダウンなどの対応に全力で注力している。こうした中で、特にコストダウン手段として国際的な製薬産業の競争原理も創薬研究をも含む広い機能において、アウトソーシングを積極的に活用することが最重要視されるようになってきている。

我々は、これまで薬物動態、製剤、安定性試験等において幅広く受託実績を蓄積してきた。今回はその中の新医薬品等の信頼性基準及び治験薬GMPに対応した体制で日本薬局方（The Japanese Pharmacopoeia；JP）を始めとして、ヨーロッパ薬局方（The European Pharmacopoeia；EP）及び米国薬局方（The United States Pharmacopoeia；USP）などの各公定法に従った微生物試験の受託を行っており、各微生物試験業務の概要と今後の展開について紹介する。

2 試験概要

（1）無菌試験

無菌試験の目的は、無菌性が十分に検証されている工程で製造された医薬品の無菌性を保証するための一手段である。よって、無菌試験の結果のみで製品の無菌性は保証されない。

無菌試験とは、規定された検体又は試料の量について、規定された方法に従って試験したとき、当該検体又は試料に由来すると判断される微生物が検出されるかどうかを調べることである。



写真1 無菌試験（無菌操作）

無菌試験に供される検体や試料の量は限られており、労力に比べて検出力が優れたものではない。よって、たとえ規定された無菌試験に適合しても、培地、検体量、試験方法を変えれば検出できるかも知れない微生物の存在まで否定するものではない。

無菌試験方法は、メンブランフィルター法又は直接法のいずれかで試験を実施することとされている¹⁾。ま

た、無菌試験は無菌操作に習熟した作業者がそれに当たり、使用するすべてのものは滅菌したものを用いなければならない。さらに、試験環境は後述するグレードAに管理する必要がある。

（2）エンドトキシン試験

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁構成成分で、血中に入ると極めて微量で強い発熱活性を示す耐熱性の毒素である。本試験法の目的は、注射剤中に発熱惹起量のエンドトキシンが含まれていないことを確認することにより、注射剤の安全性を確保することにある。

エンドトキシン試験法は、カプトガニ（*Limulus polyphemus* 又は *Tachypleus tridentatus*）の血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出又は定量する方法である。本法には、エンドトキ



写真2 エンドトキシン試験（比色法）

シンの作用によるライセート試液のゲル形成を指標とするゲル化法及び光学的变化を指標とする光学測定法がある。光学測定法には、ライセート試液のゲル化過程における濁度変化を指標とする比濁法、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある¹⁾。

(3) 微生物限度試験

微生物限度試験法は非無菌製剤(最終製剤)や製剤原料、製剤成分、添加剤における微生物の具体的な検出、計測、同定法を示したものであり、生菌数試験と特定微生物試験に大別される。

無菌製剤中の微生物の混入は、敗



写真3 微生物限度試験(特定微生物試験)

表1 3局の微生物限度試験における生菌数試験法の比較

公定書	項目	方法	希釈	培地	培養条件	結果の表示	バリデーション 使用菌種
JP14	細菌数	メンブラン フィルター法	1枚のフィルター当たり10~100個の集落が出現する希釈	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト寒天	30~35 5日間	記載なし	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, NCIB 8545, IFO 3972など <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NCIB 8054, IFO 3134, JCM 2499など <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIB 8625, IFO 13276など
		寒天平板 混釈法	1平板当たり300個以下の 集落が得られる希釈				
		寒天平板 表面塗抹法	1平板当たり300個以下の 集落が得られる希釈				
		液体培地段階 希釈法(MPN法)	3段階各3本 1mLずつ分注	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト液体 9~10mL 12本	30~35 24~72時間	MNP/g or mL	
	真菌数	メンブラン フィルター法	1枚のフィルター当たり10~100個の集落が出現する希釈	サブロー・ブドウ糖寒天 or ポテト・ デキストロース寒天 or グルコース・ペプトン 寒天 (抗生物質添加)	20~25 5日間	記載なし	<i>Candida albicans</i> ATCC 2091, ATCC 10231, IFO 1594, JCM 2085など
		寒天平板 混釈法	1平板当たり100個以下の 集落が得られる希釈				
寒天平板 表面塗抹法		1平板当たり100個以下の 集落が得られる希釈					
USP26	好気性 菌数	平板法	30~300個の集落が 得られる希釈 1mLずつ2枚分注	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト寒天	30~35 48~72時間	10倍試料液 で集落数0の 場合は< 10/g or mL	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella</i>
		液体培地段階 希釈法(MPN法)	3段階各3本 1mLずつ分注	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト液体 9mL 14本	30~35 24~48時間	MNP/g or mL	
	真菌数	平板法	好気性菌数の平板法と同様	サブロー・ブドウ糖 寒天 or ポテト・ デキストロース寒天	20~25 5~7日間	好気性菌数 の平板法と 同様	記載なし
EP4	好気性 菌数	メンブラン フィルター法	10倍希釈液10ml(試料1g または、1ml相当量)または、 それ以下(菌数が高いとき)	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト寒天	30~35 5日間	記載なし	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538など (NCIMB 9518, CIP4.83) <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739など (NCIMB 8545, CIP53.126) <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633など (NCIMB 8054, CIP52.62)
		寒天平板 混釈法	試料10倍段階希釈 各1ml, 2枚以上				
		寒天平板 表面塗抹法	試料10倍段階希釈 各0.1ml以上, 2枚以上				
		液体培地段階 希釈法(MPN法)	3段階以上の試料10倍 希釈液 1ml, 各3本	ソイビーン・カゼイン・ ダイジェスト液体 9~10ml 9本		MNP/g or ml	
	真菌数	メンブラン フィルター法	10倍希釈液10ml(試料1g または、1ml相当量)または、 それ以下(菌数が高いとき)	サブロー・ブドウ糖 寒天(抗生物質添加)	20~25 5日間	記載なし	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231など (NCPF 3179, IP48.72) <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 (IMI 149007, IP1431.83)
		寒天平板 混釈法	試料10倍段階希釈 各1ml, 2枚以上				
寒天平板 表面塗抹法		試料10倍段階希釈 各0.1ml以上, 2枚以上					

血症やエンドトキシンショックの原因となるだけに、絶対にあってはならないことであるが、必ずしも無菌が要求されていない非無菌製剤といえども、多量の微生物が存在することは、医薬品を劣化させたり、感染防御機能の劣った病人には重症の感染症を引き起こす可能性がある。

微生物限度試験は、医薬品に存在する増殖能力を有する特定の微生物の定性、定量試験であり、生菌数試験（細菌及び真菌）及び特定微生物試験（大腸菌、サルモネラ、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌）が含まれる。

試験を遂行するに当たって、外部からの微生物汚染が起こらないように、細心の注意を払う必要がある。また、被検試料が抗菌作用を有する場合又は抗菌作用を持つ物質が混在する場合は、希釈、ろ過、中和又は不活化などの手段によりその影響を除去しなければならない¹⁾。

生菌数試験についてJP、EP²⁾及びUSP³⁾3局の比較を表1に示す。

(4) 保存効力試験

保存効力試験法は、多回投与容器中に充てんされた製剤自体又は製剤

に添加された保存剤の効力を微生物学的に評価する方法である。製剤に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力を評価する。

本試験は、一般に製剤の処方設計段階や定期的な保存効力の検証などに適用され、ロットの出荷判定試験としては行われぬが、最終容器につめられた製剤中の保存剤の効果は、製剤の有効期限にわたって検証する必要がある^{1,4)}。

3 試験環境

無菌試験は、「無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」に定めるグレードAに管理された無菌施設又は無菌装置内(例えば、層流キャビネット、アイソレーター)で行わなければならない。グレードAの「無菌施設」とは、通常の作業時における空気清浄度がクラス100に管理されたクリーンルーム又はクリーンゾーンを指し、その周辺環境はグレードB(通常の作業時における空気清浄度がクラス10,000)に管理されていない¹⁾。

表2に米国食品医薬品局(Food and Drug Administration; FDA)

推奨案の環境管理基準値(無菌医薬品製造のための空気清浄度)を示す⁵⁾。

また、エンドトキシン試験、微生物限度試験及び保存効力試験なども基本的にはクリーンな環境で試験するとともに無菌操作が要求される。

現在我々は各試験実施において要求されるクリーン度を維持確認するための空気調和設備管理や清掃消毒ならびに各種の環境モニター(浮遊微粒子、浮遊菌、付着菌、落下菌)を実施している。

4 機器管理

滅菌器及び培養器のバリデーシヨンの概要

バリデーシヨンは、「文書化」された「期待される結果」が得られることを「文書化」された方法に従って「検証」し、その結果を「文書」として記録することであり、バリデーシヨンの範囲は、機器・ソフトウェア・システム・分析方法・データである。また、バリデーシヨンは一度限りの作業ではなく、システムを使い続ける間ずっと必要になる。なお、バリデーシヨン(定期点検)において校正に使用する基準計測器はトレーサビリティの確保が必要であり、トレーサビリティとはJIS Z8103に「標準器または計測器がより高位の標準によって次々と校正され国家標準(国際標準)につながる経路が確立されていること」と定義されている。

我々は滅菌器として、高圧蒸気滅菌器及び乾熱滅菌器を使用しており、各機器の校正点検手順書に基づき定

表2 環境基準値^{a)}

クラス	0.5 μm微粒子/ft ³	0.5 μm微粒子/m ³	微生物限度値 ^{b)}	
			CFU/ft ³	CFU/m ³
100	100	3,500	< 1	< 3 ^{c)}
1,000	1,000	35,000	2	7
10,000	10,000	350,000	5	18
100,000	100,000	3,500,000	25	88

a: すべてのクラスにおいて作業中の微粒子数(上限値)を示す。

b: 十分な根拠がある場合、代替する微生物標準値が設定されるかもしれない。

c: クラス100からのサンプルは、通常微生物の混入があってはならない。

CFU: colony forming unit

期点検を実施している。即ち、各機器に被滅菌物の最大量を負荷し、実際に被滅菌物が規定された温度や時間などの滅菌条件をクリアする条件を基準計測器を用いて記録計測し、実際の滅菌条件を設定している。また、微生物的評価基準としてBI (Biological Indicator: 試験菌を 10^6 cfu添加) から菌の発育を認めないこととしている。なお、各滅菌器は、毎回運転のたびに滅菌条件をモニターして滅菌状態の確認を行っている。

また、培養器類についても同様に被培養物が培養温度範囲であることを基準計測器を用いて記録し、確認して管理温度範囲を設定している。連続運転する培養器の日常の管理方法は、培養温度を連続モニターすることにより管理温度範囲内にあることを確認し、試験精度の維持管理に努めている。

その他の試験機材についても同様の基準で使用時の精度管理を実施している。

5 試験実施基準

我々は、「申請資料の信頼性基準及び治験薬GMPに基づく新医薬品等の試験検査実施基準」を定め、これに基づき試験を実施している。なお、申請資料の信頼性の基準は、薬事法施行規則第18条の4の3に定められており、「正確性」、「完全性・網羅性」及び「保存」について記載されている。また、GMP (Good Manufacturing Practice) の3原則として、人為的な誤りを最小限にすること

(教育記録)、医薬品に対する汚染および品質変化を防止すること(設備の専用化と閉鎖式設備)及び高度な品質を保証するシステムの設計(バリデーション、トレーサビリティ)があり、特に、すべての試験従事者(例えば、統括責任者から試験担当者まで)の教育訓練の重要性がより一層求められていることを認識し、システム(教育訓練体系)のブラッシュアップに努めている。

6 今後の試験動向

(1) 非無菌原薬や製剤の微生物限度試験

非無菌医薬品の微生物学的品質特性は第十四改正日本薬局方(JP14)参考情報へ新規導入された。本項は医薬品製造者に非無菌医薬品の品質、安全性、有効性を確保するために最終製剤、医薬品原料、直接の容器・包装の微生物汚染を可能な限り低く抑えるための指針を示したものであり、非無菌医薬品及び医薬品原料中に存在する増殖能力を有する微生物(細菌及び真菌)の限度値の目安を基準として示したものである。微生物限度試験法の一環として現在国際調和が進行中である。

本項には、微生物限度試験の判定基準となる、1) 非無菌医薬品の微生物限度値、2) その許容範囲、さらには、3) 排除すべき特定微生物が含まれるが、1) の限度値は医薬品原料に関しては好気性細菌と真菌数のみが限度値として示されている。

一方、生薬及び生薬を配合した製

剤に関しても、生薬の微生物限度試験法で選定された特定微生物ごとにカテゴリ-1(熱湯で処理して用いる生薬及びその製剤)及びカテゴリ-2(その他の生薬及び製剤)についての微生物限度基準値が示された。しかし、これに関してはまったく国際調和がなされていない。

本項がJP14へ新規導入されたことから、この分野における微生物限度試験は必要性が高まっていくことが予想され、我々は市場の要求に応えるべく準備を進めている^{1,6)}。

(2) 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

無菌試験や無菌製造工程で検出される汚染微生物を同定すること、さらに医薬品製造区域や医薬品原料等から検出される微生物の種類についての知見は、微生物学的に安全な医薬品を製造する上で重要である。JPへの導入が図られている遺伝子解析による微生物の迅速同定法は系統発生的に微生物を分類する手法で、微生物に固有の遺伝子領域、すなわち細菌に対しては、16S rRNAの高度可変領域の一部、真菌に対しては18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域(ITS1)の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合することによって微生物を迅速に同定又は推測しようというものである。すでに一部の専門誌に収載され⁷⁻⁹⁾、JP14第二追補にも収載予定である。

この分野においては迅速かつ正確な情報提供が求められ、顧客の要望

表3 微生物関連試験法の国際調和

一般試験法	調和段階	担当薬局方
エンドトキシン試験法	Signed off (完全調和)	JP
無菌試験法	Signed off (部分調和)	EP
微生物限度試験法 ・生菌数試験法 ・特定微生物試験法 ・非無菌医薬品の微生物学的品質特性	Stage3 (第二次案作成) Stage3 (第二次案作成) Stage3 (第二次案作成)	EP EP ICH / USP

に十分応えられる解析体制を構築している。

(3) 国際調和の動向

(特に、無菌試験、微生物限度試験及び保存効力試験)

薬局方の改正には国際調和は欠かせない要因となっている。現在、薬局方の国際調和はICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Use) の場だけでなく PDG (Pharmaceutical Discussion Group) でも精力的に行われている。試験法の具体的な案の作成などはPDGが中心に行われている。現在進行中の国際調和試験法の調和状況を表3に示す。現在調和作業中の試験法としては無菌試験と微生物限度試験法がある。無菌試験に関しては現在最終段階を迎えているが、完全調和に至っていない幾つかの問題点があり、調整中である (JP14 第二追補で改正の予定)。

微生物限度試験法の生菌数試験法における問題点としては試験の適用除外がある。例えば抗生物質等におけるように生菌数試験が行われぬものや、細菌、カビを主成分とするも

のは生菌数試験を行えないとの考えである。

保存効力試験試験法についてUSP及びEPは一般試験法に収載しており、USPは出荷判定試験としても使用しているのに対して、JPは参考情報に収載し、製剤の開発段階での評価試験法として位置づけている。このような保存効力試験法の位置づけの違いが調和の大きな障壁となり、現在は調和対象項目からはずされている。しかし、USP及びEPはこれまでに議論・合意された成果を反映した形ですでに保存効力試験法を改正している⁶⁾。

これら国際調和の動向については最新の情報を迅速に入手し試験法への確に反映させ、柔軟に対応する取組みを行っている。今後の国際調和の動向を注視していきたい。

7 おわりに

今後、さらに速く薬局方微生物試験の国際調和作業は進み、試験検査スキルの向上や医薬品等へ微生物学的に厳密な品質確保が求められることが予想される。

我々としては、このような国内外の動向に的確に対応しながら、今後の試験動向で記載した内容及び新規

に薬局方などに収載される試験法についても迅速に対応して医薬品業界のさらなる発展のために、試験体制及び信頼性の向上に努めていきたい。

文 献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会編；“第十四改正 日本薬局方 解説書”，廣川書店 (2001)
- 2) “EUROPEAN PHARMACOPEIA 4th Edition” (2002)
- 3) “THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 26 / THE NATIONAL FORMULARY 21” (2003)
- 4) 日本薬局方解説書編集委員会編；“第十四改正 日本薬局方 第一追補解説書”，廣川書店 (2003)
- 5) FDA；“Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing Draft”，p.2 ~ 7 (2002.9.27)
- 6) 土戸哲明編；“防菌防黴”，日本防菌防黴学会，Vol.31, No.1, p.19 ~ 25 (2003)
- 7) 新谷英晴，黒須志のぶ；“医薬品研究”，日本公定書協会，33 (12) p.763 ~ 769 (2002)
- 8) 土戸哲明編；“防菌防黴”，日本防菌防黴学会，Vol.31, No.1, p.37 ~ 44 (2003)
- 9) “Japanese Pharmacopoeial Forum”，日本公定書協会，12 (2) p.82 (2003)



増山 博幸
(ますやま ひろゆき)
大分事業所



永野 善男
(ながの よしお)
大分事業所



古市 ゆかり
(ふるいち ゆかり)
大分事業所