

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 医薬品等規制調和・評価研究事業  
(英語) Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices

研究開発課題名： (日本語) 医薬品の微生物学的品質確保のための試験法高度化に関する研究  
(英語) Studies on the improvement of microbial test methods for ensuring the quality of pharmaceuticals

研究開発担当者 (日本語) 武蔵野大学薬学部教授 棚元憲一  
所属 役職 氏名： (英語) Musashino University Faculty of Pharmacy Professor Ken-ichi Tanamoto

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

遺伝子組換え蛋白質を用いたエンドトキシン試験法の高度化に関する研究では、本年度は組換え 3 因子で構成された組換え試薬である PyroSmart®（生化学工業、日本）と組換え C 因子のみで構成された組換え試薬である PyroGene™（Lonza、米国）および EndoZyme®（Hyglos、ドイツ）の製品間で比較研究を実施した。文献では PyroSmart®は哺乳類細胞で作製した組換え C 因子を含むが、PyroGene™ は昆虫細胞で作製した組換え C 因子を含むとされている。実際に我々は PyroSmart®に含まれる組換え C 因子が、PyroGene™ および EndoZyme®に含まれる組換え C 因子よりも、サイズが大きいことを明らかにした。宿主細胞の異なる各種組換え C 因子のレクチンへの反応性の違いから、この組換え C 因子のサイズの差は糖鎖修飾の違いに起因すると思われる。次に、これら日米欧の組換え試薬間の性能を注射剤に対する反応干渉の程度を指標に比較評価した。本評価は 28 品目の注射剤を用い、日本薬局方のエンドトキシン試験法に記載の反応干渉因子試験に従った。PyroSmart®は検討に用いた全ての注射剤を最大有効希釈倍数(MVD)以下で測定可能であったが、PyroGene™ と EndoZyme®はヘパリンカルシウム製剤を MVD 以下で測定できなかった。こうした一部の注射剤への反応性の差は、組換え試薬を構成する因子の数または組換え C 因子の作製方法の違いなどが原因であると推察している。

「微生物迅速法」のバリデーション法に関する研究に関し、(1) 新手法の実施にあたっての留意事項を検討した。具体的には、試料の前処理方法、蛍光染色の染色手順などに関する留意点を検討し、整理した。(2) 直接検出法および間接検出法について、医薬品製造企業における応用事例を蓄積した。また、製造環境における表面付着微生物および空中浮遊微生物を新手法により解析し、新手法の応用の可能性を評価した。さらに、新手法の消毒薬の品質評価への適応について検討した。(3) 「微生物迅速法」のバリデーションにおけるリスク（標準試料の調製における誤差の発生など）を抽出するとともに、バリデーションの際の留意事項を明確にした。

消毒剤および除染剤の評価方法確立に関する研究に関しては、消毒剤ローテーションの実用性の評価方法を協議するため、第十七改正日本薬局方 参考情報 “無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法” に記載されている「グレード C」で管理された調剤室（または同等の目的で使用される作業室）の 1 年間の浮遊菌及び付着菌のモニタリングデータをトライアルデータとして収集し、それらの検出状況を調査した。トライアルデータでは調剤室の使用条件が、環境の微生物学的清浄度に影響しており、消毒条件と比較してもより大きく影響していると推定された。そのため、無菌医薬品を製造する施設ごとに、「作業負荷度」（その施設で行われている作業内容や管理方法を定性的に分別した値）と「汚染度」（実際に施設で検出された微生物の最大値や検出率）を調査し、消毒剤ローテーション方法の違いに着目した比較及び考察を行い、微生物学的清浄度維持の効果を評価することとした。

（英文）

In research on improvement of “endotoxin test” using recombinant proteins, we performed a comparative study among PyroSmart® (Seikagaku Corporation, Japan) which is the recombinant reagent composed of three recombinant factors, and PyroGene™ (Lonza, the USA) and EndoZyme® (Hyglos, Germany) which are the recombinant reagents composed of just recombinant factor C. PyroSmart® contains recombinant factor C derived from mammalian cells while PyroGene™ and EndoZyme® comprise recombinant factor C almost certainly derived from insect cells from literatures. Firstly we showed that the recombinant factor C in PyroSmart® was larger in size than ones in PyroGene™ and

EndoZyme®. The reactivity of recombinant factor Cs derived from mammalian and insect cells to lectin suggests that the difference in size among recombinant factor Cs should be resulted from variation of glycosylation patterns. Secondly we performed the enhancement/inhibition test on 28 injectable drugs with PyroSmart®, PyroGene™ and EndoZyme®. PyroSmart® was able to measure endotoxin in all drugs at dilutions less than the Maximum Valid Dilutions (MVD), whereas PyroGene™ and EndoZyme® were not able to measure endotoxin in a heparin calcium injection at any dilutions less than the MVD. These results suggest that the inconsistency might be caused by the difference in number of factor used in recombinant reagents and/or in glycosylation of recombinant factor Cs.

In “Research on validation of rapid microbiological methods”, following results were conducted:(1) Important factors to apply rapid microbiological methods (RMMs) in pharmaceutical products were investigated, such as pre-treatment conditions of pharmaceutical products and procedure of fluorescent staining of microbial cells in pharmaceutical products.(2) Applications of RMMs in pharmaceutical products were collected, and practicability of RMMs for environmental evaluation of pharmaceutical plants was examined by analyzing in-air and on-surface microbial communities in a pharmaceutical plant. In addition, application of RMMs in quality assessment of disinfectants was investigated. (3) Risks and important points in validation of RMMs were investigated.

For the purpose of discussing how to evaluate the practical effect of rotation of different type of disinfectant, the cleanliness of dispensing rooms (or workrooms equivalent to dispensing rooms) was investigated for one year by monitoring the data of airborne and surface microorganisms in the rooms controlled by "Grade C" listed in the JAPANESE PHARMACOPOEIA 17th edition, General Information, “Microbiological Environmental Monitoring Methods of Processing Areas for Sterile Pharmaceutical Products” .

According to the trial data, it was estimated that the operating conditions of the dispensing room have much influence on the cleanliness in term of environmental microorganisms and they gave much more environmental impacts by comparing with the disinfection conditions. Therefore, the correlation investigate between "operating conditions level" qualitatively categorized by operations as well as control methods of facilities and "pollution level" including the maximum value and detection rate of microorganisms actually detected in the each facility for manufacturing sterile drug products. The evaluation execute by comparing and considering on the confirmation of effectiveness of the different rotation condition of disinfectant and the microbiological cleanliness maintaining in each facility.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表.

1. 消毒薬グルコン酸クロルヘキシジンが *Bacillus* 属に与える影響，ポスター，寺尾涼、迫谷有希子、川井真好，第 66 回日本薬学会近畿支部大会，2016/10/15，国内.
2. 宇宙居住モデル環境としての医薬品製造施設における衛生微生物学的検討，口頭，川井真好，高橋佑治，松田昭，水野真人，野口美也子，片山博仁，那須正夫，一條知昭，第 10 回大気バイオエアロゾルシンポジウム，2017/2/20，国内.
3. 医薬品製造施設における高精度微生物モニタリング，口頭，高橋佑治，川井真好，那須正夫，一條知昭，日本薬学会 137 年会，2017/3/27，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
特になし

(4) 特許出願  
なし