

Title	医薬品製造用水の品質確保に関する分子微生物生態学的研究
Author(s)	川井, 真好
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46066">https://hdl.handle.net/11094/46066</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	川 井 真 好
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 19101 号
学位授与年月日	平成 17 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	医薬品製造用水の品質確保に関する分子微生物生態学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 那須 正夫 (副査) 教授 田中 慶一 教授 西原 力 教授 宮本 和久

### 論 文 内 容 の 要 旨

医薬品に細菌が混入した場合、①ヒトに対して感染症を引き起こす、②細菌の菌体成分がエンドトキシンとして発熱やショック死を招く、③細菌の持つ酵素が製品の成分を分解して品質の劣化を招く、などの健康被害を引き起こし、十分な効果を得られない危険性がある。このため、医薬品の微生物学的な品質の確保は、その有効性および安全性を得るために必須である。医薬品製造用水は、医薬品原料、製造用具あるいは製造容器の洗浄、試薬・試液の調製など様々な用途に利用されている。このため、医薬品の品質を保証するためには、医薬品製造用水の微生物汚染を防止することが重要である。

医薬品の製造には、化学的および微生物学的品質の異なる水が用いられている。これらの微生物学的品質は、日本薬局方の規制に基づいて保証されている。その評価方法は、微生物を栄養培地上で一定時間培養することにより、形成したコロニーを肉眼で観察する培養法である。現行の微生物学的評価には、培養により 1 週間以上の時間を要する。加えて、環境微生物学分野では、培養操作に依存しない微生物検出技術が進歩し、自然環境中に通常の方法では培養困難な細菌が多く存在していることが明らかとなった。このため、培養困難な細菌を考慮した迅速な微生物の評価が求められている。本研究では、医薬品製造用水中に存在する細菌の現存量および細菌種を、通常の方法で求めるとともに、培養操作に頼らない方法を用いて解析し、新しい微生物管理方法を検討した。

医薬品製造用水のうちイオン交換水は、非常に微生物汚染を受けやすいため、厳密な微生物管理が必要である。イオン交換水について、Soybean Casein Digest 液体 (SCDB) 培地、SCD 寒天 (SCDA) 培地および R2A 培地上で培養される細菌数および細菌種を比較した。両 SCD 培地は、通常の方法に汎用されている培地であり、R2A 培地は貧栄養環境下に存在する細菌の検出に広く用いられている培地である。R2A 培地上では、SCDB および SCDA 培地上でコロニーを形成した細菌に加えて、プロテオバクテリアの  $\alpha$  サブクラスに属する細菌が多数コロニーを形成することがわかった。このことから、R2A 培地に代表される有機物の少ない培地を利用することにより、医薬品製造用水をより正確に細菌学的に評価することができた。

しかしながら、培養法による細菌の評価は、検出に時間がかかる、あるいは、培養条件により検出できる細菌種の制約を受けるなどの問題点が挙げられた。このため、イオン交換水中に存在する生理活性を有する細菌の現存量を、培養に頼らない蛍光染色技術により測定した。その結果、イオン交換水中には、現行の培養法では検出されないにもかかわらず、増殖能、呼吸活性、およびエステラーゼ活性を有する細菌が多数存在していることがわかった。また、これらの手法の利用により、24 時間以内に、正確な細菌数測定が可能となり、微生物汚染による製造工程の異常に迅速に対応できるようになった。

次に、イオン交換水中に存在する細菌群集構造を解析した。その結果、イオン交換水中に存在する細菌の多様性は非常に低く、その優占種の細菌は通常の培養法では検出できないことが明らかになった。また、優占種の細菌は、プロテオバクテリアの $\alpha$ サブクラスに属する細菌であり、エステラーゼ活性を有していた。以上のような、今まで存在が明らかにされていなかった優占種の細菌が医薬品に混入すると、感染症、発熱、および品質の劣化など、我々に様々な形で影響を与える危険性がある。したがって、このような培養困難な細菌も、十分に注意して管理すべきであることを明らかにした。

これまで検討してきた蛍光染色技術および分子微生物学的手法を、医薬品製造用水の微生物管理へ適用した。常水（水道水）から、軟水化処理、活性炭処理、逆浸透膜処理、およびイオン交換処理を経て精製水が製造される。さらに、高純度の水は、膜処理、および蒸留などの操作が加わる。これらの水を解析し、精製水およびその製造過程の水における、培養困難であるが生理活性を有する細菌の存在を明らかにした。特に、活性炭処理水およびその貯留水に、多数の細菌が存在していた。このことから、製造用水製造システム内で活性炭処理およびその貯留過程は、微生物が増殖する危険性を持つ重要な過程であることがわかった。次に、製造用水製造システム内の細菌の群集構造を解析したところ、活性炭処理水とその貯留水の群集構造は著しく変化した。活性炭処理水中では、*Methylobacterium* 属などが、その貯留水中では *Mycobacterium* 属が優占種となった。また、培養の難しい菌が多い *Acidobacterium* 属や *Cytophage* 属と近縁種の細菌も多く検出された。以上の結果から、製造用水システムのバイオバーデンが正確に把握でき、ターゲットとなる細菌を絞り込むことができた。

以上のように、蛍光染色技術や分子生物学的手法を用いることにより、培養による現行の微生物管理では、捉えることができなかった生理活性を有する細菌が製造用水中に多数存在することを明らかにした。また、それらの細菌の群集構造を解析し、管理指標とすべき数種の細菌種を特定することができた。これらのデータを蓄積することにより、医薬品製造用水に混入する危険性の高い培養困難な細菌を含めた細菌種ライブラリーの構築が可能となった。本研究において、*Mycobacterium* 属をリアルタイム PCR で定量した。その結果から、*Mycobacterium* 属が常水に由来し、システム内で増殖していることを明らかにした。このように、菌種ライブラリーを充実させ、リアルタイム PCR、マイクロアレイなど分子生物学的手法を組み合わせて利用することにより、特定の微生物の迅速な検出、同定、および定量が可能となる。また、迅速かつ正確なバイオバーデンの把握、および汚染微生物の混入経路の推定は、細菌の制御に非常に有益である。これらの手法をもとに、ターゲットを絞った効率的な医薬品製造用水の微生物管理を実現することにより、医薬品の品質確保、さらに医薬品製造における生産性の向上が期待できる。

## 論文審査の結果の要旨

医薬品の微生物的な安全性を保証するためには、医薬品製造用水の厳格な微生物管理が重要であり、日本薬局方では、培養法による微生物計数やエンドトキシン量の測定が定められている。しかしながら、水環境中にはこれらの方法のみではとらえることができない微生物が存在することから、通常の培養法では検出できない微生物をも対象とする迅速かつ高精度な手法の確立が切望されている。

本研究は、分子微生物生態学的手法を用いて医薬品製造水中の細菌の定量、生理活性評価、および群集構造解析を行ったものである。その結果、医薬品製造に用いられる精製水中の細菌量を培養法で求める際には、貧栄養条件下で生息する細菌の培養に適した R2A 培地を用いることが有効であることを示した。さらにマイクロコロニー法および蛍光染色法を用いることで、より多くの細菌を捉えることができ、従来の培養法では、精製水中の細菌量を過少評価していることを明らかにした。また、医薬品製造用水製造システムの各処理過程における細菌の現存量および群集構造を明らかにした。そのなかで一年間を通じて、活性炭処理水の貯留タンク内に非結核性 *Mycobacterium* 属細菌が存在すること明らかにした。さらにリアルタイム PCR のプロトコールを作成することで、本属菌の迅速定量を可能とするとともに、製造システム内における挙動を明らかにした。

本論文は、医薬品製造用水中の細菌の動態に関する先駆的な研究であり、得られた成果は医薬品製造用水の安全性確保のための新たなモニタリング技術の実用化に大きく貢献することから、博士（薬学）の学位に値するものと判断する。