

### 31. 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験

新	備考
<p><b>31. 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験</b></p> <p>天然物の品質確保の第一歩は、基原の正しい原材料を使用することである。したがって、生薬の基原は、適否の判定基準であることが、生薬総則の第4項に明示されている。生薬の基原を鑑別する方法には、形態学的方法や、官能試験、化学的方法があり、それぞれ各条に適切な方法が明示されている。形態学的方法や、官能試験、化学的方法は、生薬の表現形質に基づく種の鑑別方法である。他方、近年分子生物学的な技術の進歩と植物の遺伝子情報の蓄積に伴い、それぞれの生薬の遺伝型を確認することで、種を鑑別する手法が確立されつつある。このような方法は、形態学的方法などによる植物の表現型に基づく鑑別法とは異なり、環境による影響を受けない。また、鑑別のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られやすい等の利点がある。</p> <p>生物の進化は、遺伝子の突然変異により担われており、近縁種間における遺伝子の塩基配列の違いは、種の系統関係を反映している。この理論に基づき、近年微生物の鑑別では、核ゲノム上のリボゾーム RNA (rRNA) をコードする遺伝子領域 (rDNA) の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法が採用されている。同様に遺伝子型を用いた高等植物の鑑別にも、この rDNA の塩基配列が最もよく用いられている。特に rDNA 領域の ITS (intergenic transcribed spacer) 領域では、コード遺伝子領域と比較して塩基置換が起こりやすいため、近縁種を区別しやすいことになる。また、核ゲノム上の遺伝子は、両親に由来するため、種間雑種を確認出来る利点がある。高等植物には、更にミトコンドリアゲノム上の遺伝子と葉緑体ゲノム上の遺伝子がある。これらのゲノム上の遺伝子も鑑別のため良く用いられるが、通常単性遺伝であるため、種間雑種の確認はできない。</p> <p>ここに示した方法は、近年、論文報告 [Y. Guo, et al., J. Nat. Med. 60, 149-156 (2006)] された rDNA の ITS 領域の遺伝子配列に基づくソウジュツとビャクジュツの鑑定法を基礎として開発された、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験法で、バリデーションのための共同試験が終了したものである。各条では、ソウジュツの基原植物は、<i>Atractylodes lancea</i> De Candolle 又は、<i>A. chinensis</i> Koidzumi (Compositae)、ビャクジュツの基原植物は、<i>A. japonica</i> Koidzumi ex Kitamura 又は <i>A. ovata</i> De Candolle (Compositae) と規定されている。また、基原の適否は、基本的にソウジュツでは鏡検を含む生薬の性状で、ビャクジュツでは鏡検を含む生薬の性状と、確認試験の呈色反応で規定されている。論文では、これらの4種の植物について、前述した ITS 領域の塩基配列を比較することで、明確に区別できること、更に種特異的なプライマー対を用いた遺伝子の増幅 (PCR) を行い増幅バンドの有無を確認することにより、塩基配列の解析を行わずに種の鑑別が簡便に行えることを示している。</p> <p>共同試験では、試験の簡便さを最大限考慮し、塩基配列の解析を行わず、種特異的</p>	

なプライマー対を利用し、PCR 増幅バンドを観察する方法について検討した。このような、種特異的なプライマー対を利用した PCR に基づく試験法は、非常に感度の高い分析法である。したがって、粉末生薬の確認試験として用いる場合、分析する生薬のほとんどが不適なものでわずかに適合植物由来の生薬の粉末が存在していても、増幅バンドが観察されることになる。よって、確認試験法として利用するには、他生薬由来の粉末の混入に注意しながら切断生薬、全形生薬の単一個体に対して利用することになる。他方、純度試験として用いる場合、どのような形態の生薬であったとしても、対象遺伝子に多型が存在せず正しく遺伝子増幅が行われる限り、純度試験で対象とする不適な植物の増幅バンドが確認されれば、生薬の形態にかかわらず、対象とする不適な生薬が混入していることが明らかとなる。

なお、ここで示した方法は、参考情報であり、現段階で本法を用いて得られた結果がそのまま各条の生薬の適否を左右するものでない。また、論文で示されたシーケンスを行うことで、基原種についてより正確な判定が行えることは言うまでもない。

#### DNA 増幅装置

生薬より抽出精製して得られた DNA の増幅に用いる。機器により、温度調節方法等が微妙に異なるため、指定された条件で PCR を行っても、PCR 増幅バンドの強度等が異なることがある。したがって、PCR の増幅バンドの有無のみで、結果を判定する場合、事前にあらかじめ基原種が判明している試料を用い、得られた DNA を用いて PCR を行う時、適切な増幅バンドのみが得られることを確認し、得られない場合には、PCR の温度条件を微調整することが必要となる。

#### 操作法

以下、操作法の一例を示す。

##### 1. 鋳型 DNA の調製

生薬は、新鮮な植物体とは異なり乾燥物で、採取されてからある程度の時間を経たものである。したがって、DNA が断片化を起こしている場合が多く、また植物中には様々な PCR の反応阻害物が存在している可能性があり、鋳型 DNA の抽出精製は、最も注意を要する過程である。ジュツ類生薬の場合、生薬の周皮に阻害物が存在している場合が多いため、周皮を清潔なメス等ではぎ落として除いた試料を粉砕して使用する。

試料からの DNA の抽出精製法には様々な方法があるが、有害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれば、市販の DNA 抽出キットを用いることが推奨される。その場合、最終的に得られる DNA 量（濃度）に注意して、最初の試料量と DNA を溶出させる液量を調整する必要がある。組換え DNA 技術応用食品の検査方法に関する通知（平成 13 年 3 月，食発第 110 号，一部改正，平成 18 年 6 月，食安発第 0629002 号 2.2.1.2）で使用されているシリカゲル膜タイプのキットを用い、同法に準拠して抽出精製を行う場合、試料採取量は 200 mg とし、AP1 緩衝液 1 mL，RNase A を 2 $\mu$ L，AP2 緩衝液 325 $\mu$ L を用いるのが適当である。また、第一カラムに負荷する上清は、清澄であることが最も重

要で、無理に 1 mL を負荷する必要はない。また、最終的に DNA を溶出させる液量は、50 $\mu$ L が適当であり、通常 1 回目の溶出液を DNA 試料原液として用いる。

## 2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA の定量

原液中の DNA の純度は、分光光度計を用い OD260 nm/OD280 nm の比で確認することが出来る。同比が 1.5 になれば、DNA が十分に精製されていることを示す。DNA 量は、1 OD260 nm=50 $\mu$ g/mL で換算する。上記の測定は、適当に希釈した DNA 試料原液を用いて行い、得られた結果を基に、以後 PCR の反応に必要な濃度に水で希釈し、DNA 試料液として、マイクロ試料管に分注し、必要な場合は-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保存する。分注した DNA 試料液は、融解後直ちに使用し、残った溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは、そのまま DNA 試料液として用いる。

## 3. PCR

上記の通知で例示された定性 PCR 法（食安発第 0629002 号 2.1.3.1.1.）で用いる市販の酵素を用いた場合、酵素に添付されたマグネシウム入り PCR 緩衝液 2.5 $\mu$ L、酵素に添付された dNTP (0.2mmol/L)、5'及び 3'プライマー (0.4 $\mu$ mol/L) 及び Taq DNA ポリメラーゼ (1.25units) を含む液に、10 ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液 5 $\mu$ L (DNA として 50ng) を氷中で加え、全量が 25 $\mu$ L で反応を行うのが適当である。なお、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験を実施する場合、プライマー対は、前述の論文 [J. Nat. Med. 60,149-156 (2006)] で示された C, D (C は、*A. lancea* で陽性、D は、*A. chinensis* で陽性) を使用するが、プライマー対 A, B を組み合わせて使用すると、それぞれの検体の基原種を確認することが出来る。また、DNA が正しく抽出されていることを確認するため、以下の陽性対照プライマー対を加えた反応液を調製するとともに、陰性対照として、調製した DNA 試料液を加えないもの、それぞれのプライマー対を加えないものも調製し、同時に PCR を行う必要がある。

Pf: 5' - CATTGTCGAAGC CTG CAC AGC A - 3'

Pr: 5' - CGA TGC GTG AGC CGA GATATCC - 3'

PCR 反応は、以下の条件で行う。95 $^{\circ}$ Cに 10 分間保ち反応を開始させた後、95 $^{\circ}$ C0.5 分間、68 $^{\circ}$ C (プライマー対 C を用いる場合のみ 69 $^{\circ}$ C) 0.75 分間を 1 サイクルとして、30 サイクルの PCR 増幅、次に終了反応として 72 $^{\circ}$ Cで 7 分間保った後、4 $^{\circ}$ Cで保存し、得られた反応液を PCR 増幅反応液とする。

## 4. ゲル電気泳動

反応終了後、PCR 増幅反応液 5 $\mu$ L を、適当量のゲルローディング緩衝液と混合し、2%アガロースゲルのウェルに添加し、1 倍 TAE 緩衝液（参考情報、遺伝子解析による微生物の迅速同定法参照）を用いて電気泳動を行う。この際、適当な DNA 分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝液に含まれる

ブロモフェノールブルー色素がゲルの 1/2 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する。

#### 5. PCR 産物の検出と判定

泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線 (312 nm) を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA 分子量標準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験の場合、まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で 305 bp のバンドが確認され、プライマー対を加えないもの、DNA 試料液を加えないものでバンドが確認されないことを確かめる。次に、C プライマー対を加えたもので 226 bp のバンド、あるいは D プライマー対を加えたもので 200 bp のバンドが確認された場合、試料はソウジュツと判定され (刻み生薬の場合は、ソウジュツの混入が認められ)、不合格となる。陽性対照プライマー対を加えたもので 305 bp のバンドが確認され、プライマー対を加えないもの、DNA 試料液を加えないものでバンドが確認されず、C プライマー対で 226bp のバンド、D プライマー対で 200bp のバンドが確認されない場合、試料はソウジュツではない (刻み生薬の場合は、ソウジュツの混入がない) と判定され、純度試験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバンドが確認されない場合は、DNA の抽出が失敗したものと考えられるので、DNA の抽出からやりなおすことが求められる。また、プライマー対を加えないもの、DNA 試料液を加えないものでバンドが確認された場合は、PCR 操作に間違いがあったものとして、3. の PCR から実験をやりなおすことになる。

## 参考情報 改正事項

参考情報 13. 製薬用水の品質管理の条3. 4. 1 培地及び培養条件の項を次のように改める。

### 13. 製薬用水の品質管理

#### 3.4.1 培地及び培養条件

水中には、栄養源の乏しい環境にも適応している多数の従属栄養型の中温性細菌が存在する。従属栄養型の細菌は、製薬用水システムにおいてバイオフィルムの形成による水質劣化をもたらすことが多いため、貧栄養菌の増殖に優れた R2A カンテン培地を用いて水質をモニターすることが有用である。一方、日常の微生物モニタリングにおいては、標準カンテン培地を用いて 30 ～ 35℃で比較的短時間で増殖可能な一般細菌を計測し、製薬用水システムの微生物学的品質変動を傾向的に把握する方法も広く用いられている。

表2に生菌数の評価に用いる計測方法、最少試料量、培地、培養条件の一例を示す。

表2に示された培地を以下に掲げる。

##### 標準カンテン培地

カゼイン製ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.5 g
ブドウ糖	1.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH 6.9～7.1。

##### R2A カンテン培地

ペプトン（カゼイン製及び肉製）	0.5 g
カザミノ酸	0.5 g
酵母エキス	0.5 g
ピルビン酸ナトリウム	0.3 g
ブドウ糖	0.5 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.05 g
溶性デンプン	0.5 g
リン酸水素二カリウム	0.3 g
カンテン	15 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH 7.1～7.3。

培地成分には、日本薬局方に規定するもののほか、以下の試薬を用いる。

カザミノ酸 カゼインを酸により加水分解し、微生物試験用に製造したもの。

乾燥減量〈2.41〉 8%以下（0.5 g, 105℃, 恒量）。

強熱残分〈2.44〉 55%以下（0.5 g）。

窒素含量〈1.08〉 7%以上（105℃, 恒量, 乾燥後）。

ピルビン酸ナトリウム CH<sub>3</sub>COCOONa 本品は、白色からわずかに薄い黄色の結晶性の粉末である。水に溶けやすく、エタノール（99.5）及びアセトンに溶けにくい。

確認試験

(1)本品を赤外吸収スペクトル測定法〈2.25〉の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、波数  $1710\text{ cm}^{-1}$ ,  $1630\text{ cm}^{-1}$ ,  $1410\text{ cm}^{-1}$ ,  $1360\text{ cm}^{-1}$ ,  $1190\text{ cm}^{-1}$ ,  $1020\text{ cm}^{-1}$ ,  $980\text{ cm}^{-1}$ ,  $830\text{ cm}^{-1}$ ,  $750\text{ cm}^{-1}$ ,  $630\text{ cm}^{-1}$ , 及び  $430\text{ cm}^{-1}$  付近に吸収を認める。

(2)本品の水溶液 (1 → 20) はナトリウム塩の定性反応 (1) 〈1.09〉を呈する。

含量 97.0%以上. 定量法 本品 0.4 g を精密に量り、水 200 mL に溶かす。その 20 mL を共通すり合わせヨウ素フラスコに入れ、 $10^{\circ}\text{C}$ 以下に冷却する。0.05 mol/L ヨウ素試液 40 mL と 4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 20 mL を加え、2 時間暗所に放置後、薄めた硫酸(2 → 12)を 15 mL 添加し、0.1 ml/L チオ硫酸ナトリウム溶液で適定〈2.50〉する (指示薬: デンプン試液)。同様の方法で空試験を行い、補正する。

0.05 mol/L ヨウ素試液 1 mL = 1.854 mg  $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$

参考情報 14. 第十五改正日本薬局方における国際調和の条に次を加える.

## 14. 第十五改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2005年5月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第一追補)	備考
<b>Sodium Starch Glycolate</b>	<b>デンプングリコール酸ナトリウム</b>	
Definition	基原、ナトリウムの含量規定	
Identification A	確認試験 (1)	
Identification B	確認試験 (3)	
pH	pH	
Loss on drying	乾燥減量	
Limit of iron	純度試験 (2) 鉄	
Limit of sodium chloride	純度試験 (4) 塩化ナトリウム	
Limit of sodium glycolate	純度試験 (3) グリコール酸ナトリウム	
Assay	定量法	

調和年月：2006年6月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第一追補)	備考
<b>Hypromellose Phthalate</b>	<b>ヒプロメロースフタル酸エステル</b>	
Definition	基原、カルボキシベンゾイル基の含量規定	
Packaging and storage	貯法	
Viscosity	粘度	
Water	水分	
Residue on ignition	強熱残分	
Chloride	純度試験 (1) 塩化物	
Limit of free phthalic acid	純度試験 (3) フタル酸	
Phthalyl content	定量法	

調和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第一追補)	備考
<b>Anhydrous Dibasic Calcium Phosphate</b>	<b>無水リン酸水素カルシウム</b>	
Definition	成分の含量規定	
Identification (1)	確認試験 (1)	
Identification (2)	確認試験 (2)	
Acid insoluble substances	純度試験 (1) 酸不溶物	
Chloride	純度試験 (2) 塩化物	
Sulfate	純度試験 (3) 硫酸塩	
Carbonate	純度試験 (4) 炭酸塩	
Barium	純度試験 (6) バリウム	
Loss on ignition	強熱減量	
Assay	定量法	

昭和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方（第一追補）	備考
<b> Dibasic Calcium Phosphate</b>	<b>リン酸水素カルシウム水和物</b>	
Definition	成分の含量規定	
Identification (1)	確認試験（1）	
Identification (2)	確認試験（2）	
Acid insoluble substances	純度試験（1）酸不溶物	
Chloride	純度試験（2）塩化物	
Sulfate	純度試験（3）硫酸塩	
Carbonate	純度試験（4）炭酸塩	
Barium	純度試験（6）バリウム	
Loss on ignition	強熱減量	
Assay	定量法	

昭和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方（第一追補）	備考
<b>Microbiological Examination of Non-sterile Products:</b>	<b>4.05 微生物限度試験法</b>	
Introduction	1. 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験	
General procedures	1. 序文	
Enumeration methods	2. 基本手順	
Growth promotion test and suitability of the counting method	3. 生菌数測定法	
General considerations	4. 培地性能及び測定法の適合性	
Preparation of test strains	4.1. 一般要件	
Negative control	4.2. 試験菌の調製	
Growth promotion of the media	4.3. 陰性対照	
Suitability of the counting method in the presence of product	4.4. 培地性能	
Results and interpretation	4.5. 製品存在下での測定法の適合性	
Testing of products	4.6. 結果及び判定	
Amount used for the test	5. 製品の試験	
Examination of the product	5.1. 試験量	
Interpretation of the results	5.2. 製品の試験	
	5.3. 結果の判定	
<b>Microbiological Examination of Non-sterile Products: Test for Specified Micro-organisms</b>	<b>11. 非無菌製品の微生物学的試験：特定微生物試験</b>	
Introduction	1. 序文	
General procedures	2. 基本手順	
Growth promoting and inhibitory properties of the media and suitability of the test	3. 培地の性能試験及び試験の適合性	
Preparation of test strains	3.1. 試験菌の調製	
Negative control	3.2. 陰性対照	
Growth promotion and inhibitory properties	3.3. 培地の性能試験	
Suitability of the test method	3.4. 試験法の適合性	
Testing of products	4. 製品の試験	
Bile-tolerant gram-negative bacteria	4.1. 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌	
<i>Escherichia coli</i>	4.2. 大腸菌	
<i>Salmonella</i>	4.3. サルモネラ	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.4. 緑膿菌	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.5. 黄色ブドウ球菌	
<i>Clostridia</i>	4.6. クロストリジア	
<i>Candida albicans</i>	4.7. カンジダ・アルビカンス	
Recommended solutions and	5. 推奨される溶液及び培地	



調和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方（第一追補）	備 考
<p><b>Microbiological Examination of Non-sterile Products:</b></p> <p>Acceptance Criteria for Pharmaceutical Preparations</p> <p>Table 2. Acceptance criteria for Microbiological Quality of Non-sterile Substances for Pharmaceutidal use</p> <p>Table 1. Acceptance criteria for Microbiological Quality of Non-sterile Dosage Forms</p>	<p>参考情報</p> <p>23. 非無菌医薬品の微生物学的品質特性</p> <p>5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値</p> <p>表1 非無菌医薬品原料の微生物学的品質に対する許容基準値</p> <p>表2 非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値</p>	<p>日本薬局方独自記載事項：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 定義</li> <li>2. 試験の適用除外</li> <li>3. 試料の採取方法及び試験の実施頻</li> <li>4. 微生物管理計画書</li> </ol> <p>日本薬局方独自記載事項：</p> <p>微生物許容基準値に関する説明</p> <p>日本薬局方独自記載事項：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. 生薬及び生薬を配合した製剤に対す</li> </ol>

同条無水乳糖の項を次のように改める。

調和年月：2005年11月（Rev. 2）

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方（第一追補）	備 考
<p><b>Anhydrous Lactose</b></p> <p>Definition</p> <p>Clarity and color of solution</p> <p>Specific rotation</p> <p>Acidity or alkalinity</p> <p>Loss on drying</p> <p>Residue on ignition</p> <p>Water</p> <p>Protein and light-absorbing impurities</p> <p>Content of alpha and beta anomers</p>	<p><b>無水乳糖</b></p> <p>基原</p> <p>純度試験（1）溶状</p> <p>旋光度</p> <p>純度試験（2）酸又はアルカリ</p> <p>乾燥減量</p> <p>強熱残分</p> <p>水分</p> <p>純度試験（4）たん白質及び光吸収物質</p> <p>異性体比</p>	

参考情報 23. 非無菌医薬品の微生物学的品質特性の条を次のように改める。

## 23. 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

なお、三薬局方で調和されていない部分は「◆ ◆」で囲むことにより示す。

非無菌製剤における、ある特定微生物の存在は、製品の薬効の減少あるいは失効につながる可能性があり、また、患者の健康を損なう可能性もある。したがって、医薬品の製造業者は、製造、貯蔵及び流通に際し、最新のガイドラインにしたがって GMP を実施することにより、最終製品のバイオバーデンを確実に低くしなければならない。◆本指針は、非無菌医薬品（原料及び製剤）中に存在する増殖能力を有する微生物（細菌及び真菌）の限度の目安を基準値として示したものである。◆非無菌医薬品の微生物試験は、一般試験法「4.05 微生物限度試験法」の「生菌数試験」及び「特定微生物試験」に準拠して行う。◆非無菌医薬品に対して生菌数試験及び特定微生物試験を実施するに当たっては、微生物管理計画を確立し、それを当該医薬品の品質保証システムの重要な一部として位置づけなければならない。また、試験実施者及び責任者は、微生物の取扱い技術、バイオセーフティ対策及びデータ解釈について専門知識を有していなければならない。◆

### ◆1. 定義

#### 1.1 非無菌医薬品

日本薬局方の医薬品各条に記載されているもので無菌でないもの及び最終製品で無菌でないもの。

#### 1.2 医薬品原料

原薬、添加剤を含む医薬品製造に用いるすべての物質。ただし、医薬品製造用水及びガス類は除く。

#### 1.3 バイオバーデン

非無菌医薬品中に生存する微生物（細菌及び真菌）の数と種類。

#### 1.4 処置基準値

直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置をとらなければならないバイオバーデンに対して設定した基準値。

#### 1.5 警報基準値

予知される問題点を早急に警告するものとして、直ちに是正措置をとる必要はないが、調査は行う必要があるバイオバーデンに対して設定した基準値。

#### 1.6 品質保証システム

品質管理を実施するために必要となる製造業者の組織構造（責任、権限及び相互関係）及び実施手順。

### 2. 試験の適用除外

生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、通例、生菌数試験を適用しない。

### 3. 試料の採取方法及び試験の実施頻度

#### 3.1 試料の採取方法

一般に、非無菌医薬品や医薬品原料ロット中の微生物汚染は均一でない。偏りのある試料採取方法では、正確なバイオバーデン値を推測できない場合もある。したがって、回顧的又は同時的バリデーションで得られたバイオバーデンデータの解析に基づいて、非無菌医薬品又は医薬品原料ロットを代表できる採取方法を確立する必要がある。通例、同一製造番号の非無菌医薬品又は医薬品原料の任意に選択した異なる数箇所（少なくとも3箇所以上）から試料をほぼ同量ずつ採取し、それらを合わせたものを被験試料とする。

また、清浄度管理環境下での試料採取が困難な場合には、採取環境や採取器材に注意を払い、採取した試料のバイオバーデンが不注意による汚染によって影響されないようにしなければならない。乾燥又は非水性の非無菌医薬品や医薬品原料においては、採取試料中のバイオバーデンが変化しないことが確認されている場合、本試験を試料採取直後に行う必要はない。

#### 3.2 試験の実施頻度

試験の実施頻度は、別に規定されている場合を除き、種々の要因を考慮して設定しなければならない。これらの要因には次のものがある。

- a) 非無菌医薬品の剤形（用法）
- b) 製造方法
- c) 製造頻度
- d) 医薬品原料の特性（天然物より製したもの、化学合成で製したのもの等）
- e) ロットサイズ
- f) バイオバーデン値のばらつき（ロット間、季節変動等）
- g) バイオバーデンに影響を及ぼす変更事項（製造工程の変更、医薬品原料の入手先の変更、医薬品原料ロットの変更等）
- h) その他

医薬品の製造初期段階においては、医薬品原料や当該医薬品の微生物学的品質特性を把握するために、一般に高頻度に微生物限度試験を行う必要がある。しかし、回顧的又は同時的バリデーション等のデータを蓄積することによって、例えば、季節ごと、一定期間ごと、数ロットごと等、試験頻度を少なくすることができる。

#### 4. 微生物管理計画書

非無菌医薬品に「4.05 微生物限度試験法」を適用する場合には、当該医薬品からの微生物の回収法、培養法、計測法の妥当性を検証した上で、次の事項を定めた微生物管理計画書を作成しなければならない。

- a) 試験対象医薬品名（品目名）
- b) 試料採取頻度及び試験実施頻度
- c) 試料の採取方法（採取者、採取量、採取環境等を含む）
- d) 採取試料の試験室への移動（試験実施までの保存条件を含む）
- e) 試料の処理方法（微生物の回収方法）
- f) 生菌数の測定方法（供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法等を含む）
- g) 特定微生物の検出方法（供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法等を含む）
- h) 生菌数の算出方法及び検出菌の性状検査
- i) 微生物許容基準値（警報基準値、処置基準値）の設定
- j) 微生物許容基準値を超えた場合の対処方法
- k) 試験実施者、試験責任者等
- l) その他の必要な事項◆

#### 5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値

総好気性微生物数（Total Aerobic Microbial Count: TAMC）及び総真菌数（Total Combined Yeasts/Moulds Count: TYMC）に対する微生物許容基準値を設定する◆ことにより、医薬品原料中の微生物学的品質が維持されているか又は悪化しているかを製造初期段階に判断することができる。また、必要に応じて適切な是正措置をとることも可能となり、医薬品原料の微生物学的品質の維持、改善に役立てることができる◆。

合成及び鉱物由来原料に対する微生物許容基準値は、別に規定するもののほか、表 1 に従う。◆化学合成で製する医薬品原料は製造工程において高温処理、有機溶媒処理などを行うことにより一般に低いバイオバーデン状態にあるが、植物や動物由来の医薬品原料は、一般に合成原料よりかなり高いバイオバーデン状態にある。

非無菌医薬品の製造に用いる水の微生物学的特性は、最終製品の微生物学的品質に直接影響を及ぼすので、これらの微生物管理にも、細心の注意が必要である◆。

非無菌医薬品の最終製剤に対する微生物許容基準値の判定は、別に規定するもののほか、表 2 に従う。◆これらの基準値は、非無菌医薬品の適用法、水との親和性などにに基づき規定されている。経口用の液状製剤や水との親和性の高い非無菌医薬品については、一般に低い微生物許容基準値が設定されている◆。

表 2 には、微生物許容基準値が設定されている製剤において存在してはならない特定微生物も示している。ただし、これら検出されてはならない特定微生物をすべて網羅しているわけではない。ある特定の製剤では原材料

の特性や製造工程によっては、他の微生物に対する否定試験も必要である。

また、規定された試験では規定されたレベルでの有効な微生物測定ができない場合には、示された許容基準値に可能な限り近い検出限界を有することがバリデートされた試験方法を用いることができる。

表2に挙げた微生物に加えて、検出すべき他の微生物の重要性は次のような見地によって評価される：

- ・製品の用途：危険要素は投与経路（眼球，鼻，呼吸器官）によって異なる
- ・製品の性状：当該製品は微生物の発育を支持するのか，それとも十分な抗菌的活性を有するのか
- ・使用方法：
- ・使用者：新生児，幼児，衰弱した人に対するリスクも異なる
- ・免疫反応抑制剤：皮質ステロイドの使用
- ・疾患，外傷，臓器損傷の有無

必要に応じて、関連した要素のリスク評価は、微生物学を学び、微生物学的データの解釈について特別に訓練された職員によってなされる。

原料に対するリスク評価はその原料が供される工程，最新の試験技術，要望される品質規格の原料であることを考慮に入れる。微生物許容基準値が規定されているときは、以下のように判定する。なお、微生物許容基準値は、個々の試験成績，又は繰り返し測定を行う場合には繰り返し測定値の平均値とする。

- －  $10^1$  CFU:最大許容値=20,
- －  $10^2$  CFU:最大許容値=200,
- －  $10^3$  CFU:最大許容値=2000, 以下同様。

#### ◆6. 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物許容基準値

生薬及び生薬製剤の微生物限度の目安を基準値として表3に示す。カテゴリー1は、熱湯で処理して用いる生薬及びその製剤，カテゴリー2は、その他の生薬及びその製剤である。本指針では、生薬及び生薬製剤に対する特定微生物として、腸内細菌とその他のグラム陰性菌，大腸菌，サルモネラ及び黄色ブドウ球菌を掲げているが、生薬原料の由来や生薬を配合した製剤の製法によっては、これら以外の微生物（例えば *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aspergillus* 属や大腸菌群の一部の菌種）についても注意を払わなければならない場合がある。◆

表1 非無菌医薬品原料の微生物学的品質に対する許容基準値

	総好気性微生物数 (CFU/g 又は CFU/mL)	総真菌数 (CFU/g 又は CFU/mL)
医薬品原料	$10^3$	$10^2$

表2 非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

投与経路	総好気性微生物数 (CFU/g 又は CFU/mL)	総真菌数 (CFU/g 又は CFU/mL)	特定微生物
経口(非水性製剤)	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	大腸菌存在せず(1g 又は 1 mL)
経口(水性製剤)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	大腸菌存在せず(1g 又は 1 mL)
直腸	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	—
口腔粘膜			
歯肉			
皮膚	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	黄色ブドウ球菌存在せず(1g 又は 1 mL) 緑膿菌存在せず(1g 又は 1 mL)
鼻			
耳			
膣	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	緑膿菌存在せず(1g 又は 1 mL) 黄色ブドウ球菌存在せず(1g 又は 1 mL) カンジダ・アルビカンス存在せず(1g 又は 1 mL)
経皮吸収パッチ (粘着層及び支持材を含む1パッチに限定)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	黄色ブドウ球菌存在せず(1パッチ) 緑膿菌存在せず(1パッチ)
吸入 (噴霧用の液状製剤にはより厳しい要件が適用される)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	黄色ブドウ球菌存在せず(1g 又は 1 mL) 緑膿菌存在せず(1g 又は 1 mL) 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌存在せず(1g 又は 1 mL)

◆表3 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

微生物	カテゴリー1 (CFU/g 又は CFU/mL)	カテゴリー2 (CFU/g 又は CFU/mL)
好気性細菌	10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>
真菌	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
腸内細菌とその他のグラム陰性菌	※	10 <sup>3</sup>
大腸菌	10 <sup>2</sup>	非検出
サルモネラ	非検出	非検出
黄色ブドウ球菌	※	※

※基準値は設けていない。◆

参考情報に次の3.1. 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験を加える。

### 31. 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験

天然物の品質確保の第一歩は、基原の正しい原材料を使用することである。したがって、生薬の基原は、適否の判定基準であることが、生薬総則の第4項に明示されている。生薬の基原を鑑別する方法には、形態学的方法や、官能試験、化学的方法があり、それぞれ各条に適切な方法が明示されている。形態学的方法や、官能試験、化学的方法は、生薬の表現形質に基づく種の鑑別方法である。他方、近年分子生物学的な技術の進歩と植物の遺伝子情報の蓄積に伴い、それぞれの生薬の遺伝型を確認することで、種を鑑別する手法が確立されつつある。このような方法は、形態学的方法などによる植物の表現型に基づく鑑別法とは異なり、環境による影響を受けない。また、鑑別のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られやすい等の利点がある。

生物の進化は、遺伝子の突然変異により担われており、近縁種間における遺伝子の塩基配列の違いは、種の系統関係を反映している。この理論に基づき、近年微生物の鑑別では、核ゲノム上のリボソームRNA (rRNA) を

コードする遺伝子領域 (rDNA) の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法が採用されている。同様に遺伝子型を用いた高等植物の鑑別にも、この rDNA の塩基配列が最もよく用いられている。特に rDNA 領域の ITS (intergenic transcribed spacer) 領域では、コード遺伝子領域と比較して塩基置換が起りやすいため、近縁種を区別しやすいことになる。また、核ゲノム上の遺伝子は、両親に由来するため、種間雑種を確認出来る利点がある。高等植物には、更にミトコンドリアゲノム上の遺伝子と葉緑体ゲノム上の遺伝子がある。これらのゲノム上の遺伝子も鑑別のため良く用いられるが、通常単性遺伝であるため、種間雑種の確認はできない。

ここに示した方法は、近年、論文報告 [Y. Guo, *et al.*, *J. Nat. Med.* 60, 149-156 (2006)] された rDNA の ITS 領域の遺伝子配列に基づくソウジュツとビャクジュツの鑑定法を基礎として開発された、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験法で、バリデーションのための共同試験が終了したものである。各条では、ソウジュツの基原植物は、*Atractylodes lancea* De Candolle 又は、*A. chinensis* Koidzumi (*Compositae*)、ビャクジュツの基原植物は、*A. japonica* Koidzumi ex Kitamura 又は *A. ovata* De Candolle (*Compositae*) と規定されている。また、基原の適否は、基本的にソウジュツでは鏡検を含む生薬の性状で、ビャクジュツでは鏡検を含む生薬の性状と、確認試験の呈色反応で規定されている。論文では、これらの4種の植物について、前述した ITS 領域の塩基配列を比較することで、明確に区別できること、更に種特異的なプライマー対を用いた遺伝子の増幅 (PCR) を行い増幅バンドの有無を確認することにより、塩基配列の解析を行わずに種の鑑別が簡便に行えることを示している。

共同試験では、試験の簡便さを最大限考慮し、塩基配列の解析を行わず、種特異的なプライマー対を利用し、PCR 増幅バンドを観察する方法について検討した。このような、種特異的なプライマー対を利用した PCR に基づく試験法は、非常に感度の高い分析法である。したがって、粉末生薬の確認試験として用いる場合、分析する生薬のほとんどが不適なものでもわずかに適合植物由来の生薬の粉末が存在していても、増幅バンドが観察されることになる。よって、確認試験法として利用するには、他生薬由来の粉末の混入に注意しながら切断生薬、全形生薬の単一個体に対して利用することになる。他方、純度試験として用いる場合、どのような形態の生薬であったとしても、対象遺伝子に多型が存在せず正しく遺伝子増幅が行われる限り、純度試験で対象とする不適な植物の増幅バンドが確認されれば、生薬の形態にかかわらず、対象とする不適な生薬が混入していることが明らかとなる。

なお、ここで示した方法は、参考情報であり、現段階で本法を用いて得られた結果がそのまま各条の生薬の適否を左右するものでない。また、論文で示されたシーケンスを行うことで、基原種についてより正確な判定が行えることは言うまでもない。

## DNA 増幅装置

生薬より抽出精製して得られた DNA の増幅に用いる。機器により、温度調節方法等が微妙に異なるため、指定された条件で PCR を行っても、PCR 増幅バンドの強度等が異なることがある。したがって、PCR の増幅バンドの有無のみで、結果を判定する場合、事前にあらかじめ基原種が判明している試料を用い、得られた DNA を用いて PCR を行う時、適切な増幅バンドのみが得られることを確認し、得られない場合には、PCR の温度条件を微調整することが必要となる。

## 操作法

以下、操作法の一例を示す。

### 1. 鋳型 DNA の調製

生薬は、新鮮な植物体とは異なり乾燥物で、採取されてからある程度の時間を経たものである。したがって、DNA が断片化を起している場合が多く、また植物中には様々な PCR の反応阻害物が存在している可能性があり、鋳型 DNA の抽出精製は、最も注意を要する過程である。ジュツ類生薬の場合、生薬の周皮に阻害物が存在している場合が多いため、周皮を清潔なメス等ではぎ落として除いた試料を粉碎して使用する。

試料からの DNA の抽出精製法には様々な方法があるが、有害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれば、市販の DNA 抽出キットを用いることが推奨される。その場合、最終的に得られる DNA 量 (濃度) に注意して、最初の試料量と DNA を溶出させる液量を調整する必要がある。組換え DNA 技術応用食品の検

査方法に関する通知 (平成 13 年 3 月, 食発第 110 号, 一部改正, 平成 18 年 6 月, 食安発第 0629002 号 2.2.1.2) で使用されているシリカゲル膜タイプのキットを用い, 同法に準拠して抽出精製を行う場合, 試料採取量は 200 mg とし, AP1 緩衝液 1 mL, RNase A を 2  $\mu$ L, AP2 緩衝液 325  $\mu$ L を用いるのが適当である. また, 第一カラムに負荷する上清は, 清澄であることが最も重要で, 無理に 1 mL を負荷する必要はない. また, 最終的に DNA を溶出させる液量は, 50  $\mu$ L が適当であり, 通常 1 回目の溶出液を DNA 試料原液として用いる.

## 2. DNA 試料原液中の DNA の純度の確認並びに DNA の定量

原液中の DNA の純度は, 分光光度計を用い  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  の比で確認することが出来る. 同比が 1.5 になれば, DNA が十分に精製されていることを示す. DNA 量は,  $1\text{ }OD_{260\text{ nm}}=50\text{ }\mu\text{g/mL}$  で換算する. 上記の測定は, 適当に希釈した DNA 試料原液を用いて行い, 得られた結果を基に, 以後 PCR の反応に必要な濃度に水で希釈し, DNA 試料液として, マイクロ試料管に分注し, 必要場合は  $-20^{\circ}\text{C}$  以下で冷凍保存する. 分注した DNA 試料液は, 融解後直ちに使用し, 残った溶液は再度保存せず廃棄する. なお, DNA 試料原液の濃度が PCR で規定された濃度に達しないときは, そのまま DNA 試料液として用いる.

## 3. PCR

上記の通知で例示された定性 PCR 法 (食安発第 0629002 号 2.1.3.1.1.) で用いる市販の酵素を用いた場合, 酵素に添付されたマグネシウム入り PCR 緩衝液 2.5  $\mu$ L, 酵素に添付された dNTP (0.2 mmol/L), 5'及び 3'プライマー (0.4  $\mu$ mol/L) 及び Taq DNA ポリメラーゼ (1.25 units) を含む液に, 10 ng/ $\mu$ L に調製した DNA 試料液 5  $\mu$ L (DNA として 50 ng) を氷中で加え, 全量が 25  $\mu$ L で反応を行うのが適当である. なお, ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験を実施する場合, プライマー対は, 前述の論文 [J. Nat. Med. 60, 149-156 (2006)] で示された C, D (C は, *A. lancea* で陽性, D は, *A. chinensis* で陽性) を使用するが, プライマー対 A, B を組み合わせて使用すると, それぞれの検体の基原種を確認することが出来る. また, DNA が正しく抽出されていることを確認するため, 以下の陽性対照プライマー対を加えた反応液を調製するとともに, 陰性対照として, 調製した DNA 試料液を加えないもの, それぞれのプライマー対を加えないものも調製し, 同時に PCR を行う必要がある.

Pf: 5' - CAT TGT CGA AGC CTG CAC AGC A - 3'

Pr: 5' - CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C - 3'

PCR 反応は, 以下の条件で行う.  $95^{\circ}\text{C}$  に 10 分間保ち反応を開始させた後,  $95^{\circ}\text{C}$  0.5 分間,  $68^{\circ}\text{C}$  (プライマー対 C を用いる場合のみ  $69^{\circ}\text{C}$ ) 0.75 分間を 1 サイクルとして, 30 サイクルの PCR 増幅, 次に終了反応として  $72^{\circ}\text{C}$  で 7 分間保った後,  $4^{\circ}\text{C}$  で保存し, 得られた反応液を PCR 増幅反応液とする.

## 4. ゲル電気泳動

反応終了後, PCR 増幅反応液 5  $\mu$ L を, 適当量のゲルローディング緩衝液と混合し, 2%アガロースゲルのウェルに添加し, 1 倍 TAE 緩衝液 (参考情報, 遺伝子解析による微生物の迅速同定法参照) を用いて電気泳動を行う. この際, 適当な DNA 分子量標準も並行して泳動する. ゲルローディング緩衝液に含まれるブロモフェノールブルー色素がゲルの 1/2 から 2/3 まで進んだところで電気泳動を終了する.

## 5. PCR 産物の検出と判定

泳動後, 事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲルを用いていない場合, ゲルを後染色する. ゲルイメージ解析装置に, 電気泳動と染色が終了したゲルをのせ, 紫外線 (312 nm) を照射し, 電気泳動パターンを確認する. DNA 分子量標準と比較して, 目的の増幅バンドの有無を判定する. ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験の場合, まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で 305 bp のバンドが確認され, プライマー対を加えないもの, DNA 試料液を加えないものでバンドが確認されないことを確かめる. 次に, C プライマー対を加えたもので 226 bp のバンド, あるいは D プライマー対を加えたもので 200 bp のバンドが確認された場合, 試料はソウジュツと判定され (刻み生薬の場合は, ソウジュツの混入が認められ), 不合格となる. 陽性対照プライマー対を加えたもので 305 bp のバンドが確認され, プライマー対を加えないもの, DNA 試料液を加えないものでバンドが確認されず, C プライマー対で 226 bp のバンド, D プライマー対で 200 bp のバンドが確認されない場合, 試料はソウジュツではない (刻み生薬の場合は, ソウジュツの混入がない) と判定され, 純度試験は合格と

なる。また、陽性対照プライマー対でバンドが確認されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考えられるので、DNAの抽出からやりなおすことが求められる。また、プライマー対を加えないもの、DNA試料液を加えないものでバンドが確認された場合は、PCR操作に間違いがあったものとして、3.のPCRから実験をやりなおすことになる。