

市販点眼薬の微生物汚染について^{*1}

布施昌孝, 片倉道啓, 佐藤百合子, 吉田義孝, 照井和幸,

福島裕行^{*2}, 鈴木 彰^{*3}札幌医科大学付属病院薬剤部^{*2}札幌医科大学付属病院中央検査部^{*3}Microbial Contamination of Commercial Ophthalmic
Solutions and Ointments^{*1}MASATAKA FUSE, MICHIMIRO KATAKURA, YURIKO SATO, YOSHITAKA YOSHIDA,
KAZUYUKI TERUI, HIROYUKI FUKUSHIMA^{*2}, AKIRA SUZUKI^{*3}Hospital pharmacy, Sapporo Medical College^{*2} and Hospital Center
Clinical Laboratory, Sapporo Medical College^{*3}

(Received May 8, 1978)

Sterility tests were conducted on 15 kinds of ophthalmic solutions and 4 kinds of ophthalmic ointments used at Sapporo Medical College Hospital. Thioglycollate medium was used as culture medium for ophthalmic solutions and tryptone soya agar medium for ophthalmic ointments. It was found that the following 3 ophthalmic solutions were contaminated with *Candida Krusei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* and *Gaffkya tetragena*: Catalin, phospholine Iodide (Echthiophate Iodide) and Artificial Tear. Further, ophthalmic ointments containing cortisone acetate and flavin adenine dinucleotide were contaminated with *Staph. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Flavobacterium* and *Moraxella*. In the above tests no pathogenic microorganism was found, but it was reported that *Bacillus* and *Moraxella* are apt to cause an infection of the cornea.

医薬品の製造時の品質管理のひとつに微生物汚染対策があげられている。注射剤や点眼液は無菌であることが義務づけられているが、点眼液の製造については「日局9」から無菌試験の法制化が実施されたばかりなので、注射剤ほどのきびしい意識をもっていないのではないかと考えられる。なお、眼軟膏は局方の規定上は無菌製剤となっていないで「無菌操作法によって製する」という規則があるのみであるが、やはりこれも無菌製剤と考えるべきであろう。

点眼薬の微生物汚染については、すでに1927年頃より知られており、Daleら¹⁾の文献によると汚染菌のな

かで *pseudomonas* が最も多く、かつ重篤な症状が見られたとのことであるし、Kallingsら²⁾の汚染菌による多数の感染例についての論文も知られている。また、わが国では高野³⁾の詳細な報告がある。そこで本院で使用している15品目の点眼液と4品目の眼軟膏について微生物汚染をしらべてみたのでその結果を報告する。

実験の部

1. 試料

実験に使用した点眼薬は次頁の表のごとくである。

2. 試料の採取

同一ロットからランダムに5製品をとり、製品ごとに5検体で無菌試験を行った。

3. 培地の調製および実験操作

無菌試験用培地は図1に示したように、点眼液のとき

^{*1} 本論文の要旨は北海道薬学会第24回(札幌, 1977年6月)で発表。

^{*2,3} 札幌市中央区南1条西16丁目; Minami 1-jo
Nishi 16-chome, Chuo-ku, Sapporo, 060 Japan

点 眼 薬 名	Lot No.	メーカ-名
コンドロナファ 1%	C 7206	科研薬化工
コンドロナファ 3%	I 6160	〃
タチオン	KAH38	山之内製薬
アズレン	24 A 4	わかもと製薬
ノイボルミチン	NE124	参天製薬
デカドロン	C462J	日本メルク万有
フルメトロン 0.1%	IFM84	参天製薬
リンデロン	A210S	塩野義製薬
フラビタン複合	GF82	東亜栄養化学工業
ワカデニン 0.05%	IZC3	わかもと製薬
ウブレチド 0.5%	BYI271	鳥居薬品
カタリン	69 P 6	千寿製薬
フォスフォリンアイオ ダイド 0.06%	4ACZ	東菱薬品工業
ミドリ M	MM234	参天製薬
人工涙液マイティア	15N6	千寿製薬
酢酸プレドニゾロン	0011	武田薬品工業
コートン	J 7064	日本メルク万有
フラビタン	GJ34	東亜栄養化学工業
複合ワカデニン	16A3	わかもと製薬

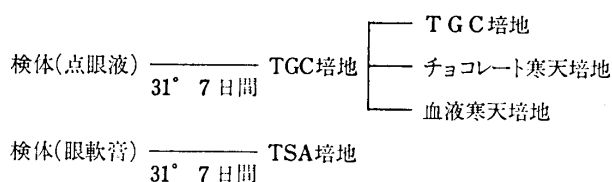


図 1. 実験に使用した培地

は無菌試験用チオグリコール酸培地 (TGC「ニッスイ」) を使用した。

20×15 mm の試験管に 15 ml の培地を分注し、121°, 15分間高圧蒸気滅菌を行った後、この試験管培地に検液 1 ml を加えた。内容量の多いコンドロロン (1%, 3%), およびマイティアのときは 25×200 mm の試験管を用い培地を 40 ml とし、これに検液 5 ml を加えた。これらの培地は製品 1 例に対し 7 本を用意し、そのうち 1 本を対照とし他の 5 本を無菌試験測定用とした。なお、残りの 1 本は菌の発育を確かめるために、あらかじめ *Bacillus subtilis* を添加して対照と比較しながら汚染の有無を判定した。

眼軟膏の無菌試験用培地はトリプトソイ平板寒天培地 (TSA「栄研」) を使用した。試験に使用する包装チューブの先端を火焰滅菌し、内容物のほぼ半分を押し出し、

中間の部分の約 0.2 g⁴⁾ を平板培地の表面に直接塗抹した。この塗抹に際しては培地に均一になるようにコンラージ棒を用いた。微生物汚染を調べるときには周囲からの細菌汚染を考えなければならないので、検液の分注は disposable 注射筒を使用し、実験の操作はクリーンベンチで無菌的に行った。また試験に使用する培地は、前もって 24 時間培養し、雑菌に汚染されていないことを確認して実験に供した。これらの培地は 31°, 7 日間培養したが、TGC 培地で汚染を調べたとき、汚染の判定がつけにくいものもあったので、さらにチョコレート寒天培地、血液寒天培地を用いてかさねて検討を加えた。

4. 細菌の分離および同定法

細菌の増殖が見られた培地は図 2 の方法にしたがって、まずグラム染色を行った後汚染菌を分離同定した。

実験結果および考察

点眼液で 3 品目、眼軟膏で 3 品目に汚染が見られた (表 1)。すなわちカタリンとフォスフォリンアイオダイドは 5 製品のうち 1 製品に汚染が見られ、培養管は 5 本とも陽性を示した。また、マイティアは 2/5・3/5 と 2 製品に汚染が認められた。しかし、これら 3 品目以外の点眼液では全然汚染が確認されなかった。一方眼軟膏ではコートンおよびフラビタンは 2 製品ずつに汚染が認められ、汚染数はそれぞれ 3/5・4/5, 4/5・5/5 であった。またワカデニンも 2 製品に汚染が認められ、このときは培地すべてに細菌の発育が認められた。しかしプレドニゾロンには汚染が認められなかった。

つぎに汚染が確かめられた細菌は同定の結果、表 1 のごとき種類の菌であることを知った。すなわち、Gram (+) 球菌が認められた点眼液は、マイティア、カタリンの本ロットのみであった。マイティアに検出された汚染菌はグラム染色で *Staphylococcus* であることが予想されたのでスタフィロコッカス培地 110 でこれを確認した。

Staphylococcus には大別して *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* の 3 種類が知られている。そのいずれかを確かめるために DNA 培地、EF 寒天培地およびコアグラゼ試験を行った結果 *S. epidermidis* であることを知った。マイティアにはこのほか Gram (+) 球菌である *Gaffkya tetragena* が検出されたが、この菌はグラム染色だけで同定された。またグラム染色でグラム陽性球菌の真菌様酵母がカタリンのなかに見られたが、真菌鑑別培地 (サブロー、コンミール、カンジダ選択培地) および糖利用、糖発酵試験で調べた結果、*Candida krusei* であることを知った。フォスフォリンアイオダイドに汚染の認められた Gram (-) 桿菌は、

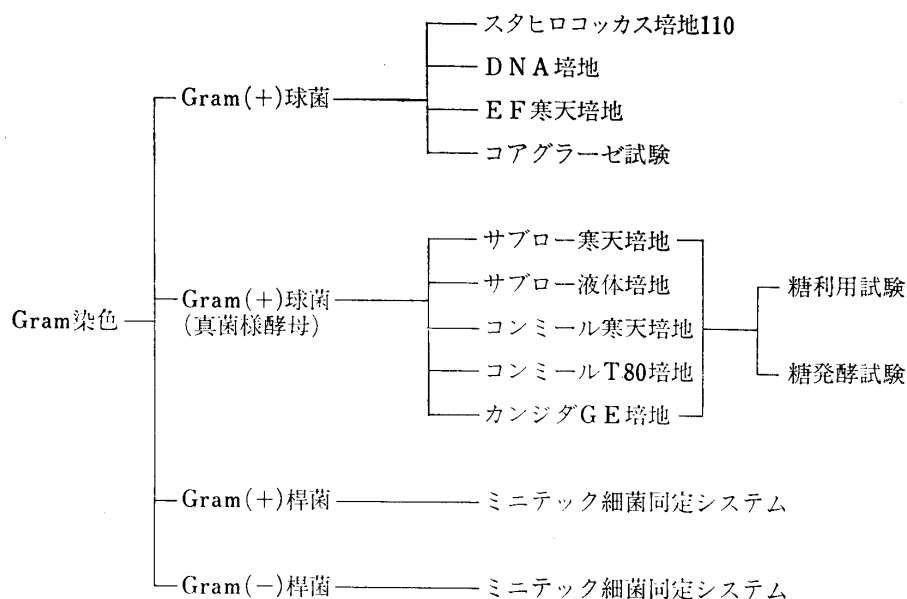


図2. 細菌の分離および同定法

表1. 点眼液, 眼軟膏の微生物汚染

		実験件数					検出した微生物
		NO. 1	2	3	4	5	
点眼液	カタリン (パラオキシ安息香酸プロピル0.02%)	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	Gram(+)球菌 真菌様酵母 <i>Candida krusei</i>
	フォスフォリンアイオグライド (クロロブタノール 0.5%)	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	Gram(-)桿菌 <i>Escherichia coli</i>
	人工涙液マイティア (塩化ベンザルコニウム0.005%)	0/5	0/5	0/5	2/5	3/5	Gram(+)球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> Gram(+)球菌 <i>Gaffkya tetragena</i>
眼軟膏	コートン	4/5	0/5	3/5	0/5	0/5	Gram(-)桿菌 <i>Flavobacterium</i>
	フラビタン	0/5	5/5	4/5	0/5	0/5	Gram(+)球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i> Gram(-)桿菌 <i>Moraxella</i>
	複合ワカデニン	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	Gram(+)桿菌 <i>Bacillus subtilis</i>

() 内は含有保存剤名

ミニテック細菌同定システムによる試験で *Escherichia coli* であることを確かめた。また眼軟膏の汚染で見られた細菌は Gram(+) 球菌, Gram(+) 桿菌と2種類の Gram(-) 桿菌であった。フラビタンに認められた Gram(+) 球菌はスタフィロコッカス培地 110 で *Staphylococcus epidermidis* であることが確かめられた。また、ミニテックス細菌同定システムによる試験でワカデニンの Gram(+) 桿菌は *Bacillus subtilis* である

ことを知り得た。Gram(-) 桿菌はフラビタンとコートンのなかから検出されたが、それぞれ *Moraxella*, *Flavobacterium* であることがミニテック細菌同定システムで明らかになった。Kallings⁹⁾ は幾多の点眼薬の微生物汚染について調べたが、*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Candida* などが検出されたと報告している。

今回著者らの実験からも *Bacillus subtilis*, *Candida krusei*, *Staphylococcus epidermidis* が検出されたが、

これらの菌は病原性を有していないといわれている。しかし、Staphylococcus は病原性の面では S.aureus のみを病原菌としているが、その他の菌種でも病原となり得るので、S.aureus 以外の菌種に対しても関心を向けるべきだといわれている。また Bacillus や Moraxella は横浜市大眼科⁶⁾の報告によると角膜の細菌感染症の起炎菌であるとのことである。この起炎菌として以前は Diplococcus pneumoniae が最も多かったが、最近抗生物質の使用で菌交代現象をきたし Pseudomonas による感染例が増加し、つづいて Diplococcus pneumoniae, Moraxella, Bacillus の順に炎症を起こすことが多いといわれている。

石関ら⁷⁾は138の点眼液を調べたうち7検体(5%)に汚染が見られ、Pseudomonas を検出している。Kallings²⁾も眼軟膏60チューブを試験したところ、47チューブ(78%)がPseudomonas に汚染されていることを報告している。

高橋ら⁸⁾は新潟地区を調査し、133の点眼液中33製品(25%)が汚染されていたが、汚染はアトロピン、テカイン、フルオレセイン、チンク水に多く Pseudomonas を検出したとのことである。また点眼液は開封しておくと、1週間後に50%のサンプルに細菌汚染が見られるが、防菌剤の添加によってある程度防止効果があると述べている⁹⁾。しかし防菌剤の効果に関しては、石関ら⁷⁾は防菌剤が添加されていても、点眼液中にはなお多くの細菌が検出されたと報告している。

なお著者らの実験でも、保存剤としてパラオキシ安息香酸プロピルの0.02%を含有しているカタリン、クロブタノールの0.5%を含有しているフォスフォリンアイオダイドや、0.005%の塩化ベンザルコニウムを含有しているマイティアでも汚染が認められた。点眼剤は、pHおよび滲透圧を涙液のそれに可能な範囲で近くするように緩衝剤を加えて調整しているが、その結果汚染を受けやすくなっているようである。そのため、防腐剤や殺菌剤が使用されている。従来は、水銀化合物が強い抗菌活性と幅広い抗菌スペクトルを有することから盛んに用いられてきたが、安全性の面から使用規制の傾向にあるため、今後ますます微生物汚染の対策が難しくなってくるのではないかと考えられる。

今回の実験で抗生物質点眼薬について調べなかったし、また一般生菌数の測定も行わなかった。Bowman & Holdowsky¹⁰⁾は1959年に抗生物質眼軟膏を調べたところ、汚染率は10%ぐらいであったものが、1972年¹¹⁾に調べた成績によると20%に増加したと述べているが、この原因は真菌の汚染によるものと考えられる。抗

生物質の点眼薬は一般に汚染に関しては安易に考えられるが、抗生物質といってもすべての菌に常に殺菌的に働くわけではないので、他の点眼薬同様、汚染に関して注意する必要があることは当然のことであり、この報告はそのことを示唆している。なお、紀氏ら¹²⁾は無菌試験と一般生菌数との関係について無菌の結果が陰性であっても一般生菌数は必ずしも0とは限らないし、また無菌試験の成績から、汚染管数が $\frac{2}{5}$ 以下であれば一般生菌数は 10^3 以下であり、 $\frac{4}{5}$ 以下のときは 10^3 以下を示し、 10^3 以上に増加するときは5本全部が陽性を示す例が多いと述べているので、今回は無菌試験しか行わなかったが、以上の事実に基づいて汚染度を推察した。

また著者らの実験成績でも眼軟膏に高い比率で汚染が見られたが、その原因は眼軟膏の無菌的な調製が技術的に困難なためであろうと考えられる。幸保¹³⁾は点眼薬の汚染は容器からも由来すると指摘し、プラスチック容器のように加熱滅菌のできないものはあらかじめガス滅菌した後、分注すべきであると示唆している。

点眼薬は眼粘膜に適応される薬剤で、微生物汚染に対しては特別の配慮を必要とする薬剤であるので、たとえ汚染菌が病原性のない菌であっても、そのことは好ましくない環境下で製造、保管された証拠のひとつであるので、望ましくない薬剤と考えるべきであろう。

文 献

- 1) J.K. Dale, M.A. Nook, A.R. Barbiers : J. Am. pharmaceut. Assoc., 20, 32 (1959).
- 2) L.O. Kallings, L.S. Ringerty : Acta pharm. Suecica, 3, 219 (1966).
- 3) 高野正彦 : 薬局, 21, 1531 (1970).
- 4) 日本抗生物質医薬品基準 p. 468 (1969).
- 5) L.O. Kallings : Secretariat of the European Free Trade Association, 17, (1973).
- 6) 田中直彦 : Medical Tribune, February, 10 (1977).
- 7) 石関忠一, 秋山喜彦, 岩原繁雄 : 衛生試験, 90, 131 (1972).
- 8) 高橋簞子, 大石正夫, 周田茂雄, 今井正雄 : 眼科臨床医報, 61, 850 (1967).
- 9) 高橋禎二, 金井 淳 : 日本コンタクトレンズ学会誌, 9, 108 (1967).
- 10) F.W. Bowman, S. Holdowsky : J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 48, 95 (1959).
- 11) F.W. Bowman, E.W. Knool, M. white, P. Milvec : J. Pharm. Sci., 61, 532 (1972).
- 12) 紀氏汎恵, 小野 彪, 森元君子, 本田一成, 沢ノ井政美, 伊佐幸雄, 平岡栄一, 米虫節夫, 城倉リキ子, 三浦喜温 : 薬剤学, 36, (1), (1976).
- 13) 幸保文治 : 日本医事新報, No. 2804 (1978).