

粉末生薬における汚染カビ

西川洋一, 瀬戸隆子, 安田一郎, 一言 広, 諸角 聖, 坂井千三
東京都立衛生研究所¹⁾

Mycoflora of Powdered Crude Drugs

YOICHI NISHIKAWA, TAKAKO SETO, ICHIRO YASUDA, HIROSHI HITOKOTO,
SATOSHI MOROZUMI and SENZO SAKAITokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health¹⁾

(Received January 18, 1978)

A total of 49 powdered crude drugs from 13 kinds of species were examined for possible fungal contamination and for the presence of mycotoxin. Both *Penicillium* and *Aspergillus* were detected in samples of all kinds of species except for Cinnamomi Cortex Pulveratus and Santhoxyli Fructus Pulveratus, *A. niger* being the most common species in the *Aspergillus*. In one sample of Glycyrrhizae Radix Pulveratus, there was detected a strain of aflatoxin-producing *A. flavus*, but no specimens were contaminated by mycotoxin such as aflatoxin, sterigmatocystin and ochratoxin A.

医薬品の微生物汚染が GMP の一課題としてとりあげられ, 非無菌製剤の各剤型における微生物基準設定の機運が高まりつつある. 医薬品の微生物汚染はスウェーデンなど諸外国の発症例のごとく患者に新たな感染症を起こすばかりでなく, 医薬品そのものの品質にも関係がある. とくに発ガン性のカビ毒である aflatoxin の発見以来, カビによる汚染が問題視されている²⁻⁵⁾. 動植物を基原とする生薬は天然物であるからカビが生じやすく, 日本薬局方⁶⁾では生薬総則に「生薬はカビ, 昆虫または他の動物による汚損物または混在物およびその他の異物をできるだけ除いたものであり, 清潔かつ衛生的にとり扱う」と規定されている. そこで医薬品製剤の品質と安全性確保の観点から, 市場の粉末生薬におけるカビおよび mycotoxin 汚染の実態を調査したので報告する.

実験方法

1. 試料

用いた試料は TABLE I に示すごとく, オウゴン末 1 検体, オウバク末 3 検体, オウレン末 2 検体, カンゾウ末 4 検体, キキョウ末 5 検体, ケイヒ末 8 検体, サンシン末 6 検体, サンショウ末 1 検体, シャクヤク末 5 検体, ショウキョウ末 3 検体, センキュウ末 6 検体, ソウジュツ末 1 検体およびビャクジュツ末 3 検体, 計 13 品目 49 検体である. これらの粉末生薬はいずれも 1975 年の東京市場品で, 日本薬局方品として 500 g 単位の包装がなされていたものである.

2. カビの分離

各試料からのカビの分離培養には chloramphenicol 100 μ g/ml を加えた potato dextrose agar (PDA) および glucose 20% を加えた PDA の 2 種の平板培地を使用した. 培養方法は通常の粉末食品培養法にしたがって行なっ

- 1) Location: 24-1, Hyakunincho 3-chome, Shinjuku-ku, Tokyo.
- 2) L. O. Kallings, O. Ringertz, L. Silverstolpe and F. Ernerfeldt, *Acta Pharm. Suecica*, **3**, 219 (1966).
- 3) 松島 崇, 伊藤 宏, 池田峰子, 植研, **32**, 201 (1957); **33**, 12 (1958).
- 4) 岡崎寛蔵, 加藤 宏, 若田部武男, 薬誌, **70**, 353 (1950); **71**, 1, 5 (1951).
- 5) 宇田川俊一, 倉田 浩, 法月克弘, 高鳥浩介, 中尾美津男, 高橋恵子, マイコトキシン, **3**, 4 号, 35 (1976).
- 6) 厚生省, 第九改正日本薬局方第二部, 生薬総則, 803 (1976).

TABLE I. List of Powdered Crude Drugs

Powdered Crude Drugs		Number of Sample
オウゴン	Ohgon (<i>Scutellariae Radix</i>)	2
オウバク	Ohbaku (<i>Phellodendri Cortex</i>)	3
オウレン	Ohren (<i>Coptidis Rhizoma</i>)	2
カンゾウ	Kanzo (<i>Glycyrrhizae Radix</i>)	4
キキョウ	Kikyo (<i>Platycodi Radix</i>)	5
ケイヒ	Keihi (<i>Cinnamomi Cortex</i>)	8
サンシシ	Sanshishi (<i>Gardeniae Fructus</i>)	6
サンショウ	Sansho (<i>Zanthoxyli Fructus</i>)	1
シャクヤク	Shakuyaku (<i>Paeoniae Radix</i>)	5
ショウキョウ	Shokyo (<i>Zingiberis Rhizoma</i>)	3
センキュウ	Senkyu (<i>Cnidii Rhizoma</i>)	6
ソウジュツ	Sojutsu (<i>Atractylodis Lanceae Rhizoma</i>)	1
ビャクジュツ	Byakujutsu (<i>Atractylodis Rhizoma</i>)	3
Total		49

た. すなわち, 0.05%寒天液 45 ml およびガラス玉を 200 ml の三角フラスコに入れ, 高圧滅菌 (121°, 15分) したものに, 5g の試料を無菌的に加え, よく振り混ぜたのち, その 1 ml を前記の平板培地に均一に塗抹した. これらの平板は 25°, 8 日間培養したのち, 発育したカビの集落を数えて総菌数を算定すると同時に, それらの集落は PDA 斜面培地に純粋分離したのち同定した. カビの同定は Raper & Thom⁷⁾, Raper & Fennel⁸⁾, Arx⁹⁾, Ellis¹⁰⁾ および Barnett¹¹⁾ の記載にしたがって行なった.

3. 分離カビの mycotoxin 産生試験

分離したカビ菌株のうち *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus* および *A. versicolor* の 3 種のカビについては各試料中の代表株を選び, それぞれの毒素産生能を検討した. すなわち, aflatoxin 産生用培地として 10 ml の SL 培地¹²⁾ を, ochratoxin A および sterigmatocystin 産生用としてそれぞれ 10 ml の YES 培地¹³⁾ を用いた. それらの各培地に被検カビの胞子の 1 白金耳量を接種したのち, 25° で静置培養した. aflatoxin および ochratoxin A は培養 8 日後に Eppley¹⁴⁾, また sterigmatocystin は 12 日後に直井ら¹⁵⁾ の方法によって産生毒素の検出を試みた. 対照用標準毒素として用いた aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, ochratoxin A および sterigmatocystin はいずれも MACOR Co. (Israel) 製である.

4. 生薬中の mycotoxin

全試料について前記の方法によって 3 種の mycotoxin の汚染を調査した.

実験成績

1. 生薬の汚染カビ数

13 種, 49 検体の試料における検体汚染率と汚染カビの生菌数を TABLE II に示した.

ケイヒ末では 8 検体中 3 検体にカビ汚染を認めたにすぎなかったが, そのほかの 12 種ではすべての検体に汚染が認められた. 全体でみると 49 検体中 44 検体 (90%) に汚染が認められ, 汚染生菌数は 3~12800/g の間に分布し, 平均

7) K.B.Raper and C.Thom, "A manual of the *Penicillia*," Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1949, p.132.

8) K.B.Raper and D.L.Fennel, "The genus *Aspergillus*," Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1965, p.122.

9) A.J.Ar, "The genera of fungi sporulating in pure culture," J.Cramer, Lehre, 1970, p.11.

10) M.B.Ellis, "*Dematiaceous hyphomycetes*," Common Wealth Mycological Institute, Surrey, 1971, p.13.

11) H.L.Barnett, "Illustrated genera of imperfecti fungi," Burgess Publishing Co., Minesota, 1960.

12) T.V.Reddy, L.Viswanathan and T.A.Venkitasubramanian, *Appl. Microbiol.*, **22**, 393(1971)

13) N.D.Davis, U.L.Diener and D.W.Eldridge, *Appl. Microbiol.*, **14**, 378(1966).

14) R.M.Eppley, *J.A.O.A.C.*, **51**, 74(1968).

15) 直井家寿太, 小川仁志, 風間栄治, 齊藤和夫, 志村公子, 木村康夫, 東京都立衛生研究所年報, **24**, 207(1972).

TABLE II. Moisture Contents and Fungal Counts of Powdered Crude Drugs

Drug	Moisture content (average, %)	No. of molded samples/Tested samples (positive rate, %)	No. of fungi/g	
			Range	Average
Keihi	11.2	3/8 (37.5)	3-73	10
Senkyu	12.9	6/6 (100)	13-894	229
Sanshishi	10.5	6/6 (100)	5-340	129
Shakuyaku	12.9	5/5 (100)	144-1069	382
Kikyo	12.4	5/5 (100)	10-75	36
Kanzo	10.1	4/4 (100)	125-414	232
Byakujutsu	13.8	3/3 (100)	60-1113	418
Ohbaku	9.5	3/3 (100)	168-795	391
Shokyo	11.0	3/3 (100)	43-1000	393
Ohren	8.6	2/2 (100)	188-12800	6494
Ohgon	8.6	2/2 (100)	1286-1478	1382
Sojutsu	12.4	1/1 (100)	161	161
Sansho	13.0	1/1 (100)	3	3
Total		44/49		

547/g であった。この菌数はこれまで調査した市販食品のそれ¹⁶⁾と比較して相当高い汚染菌数であった。

生薬の種類別では平均汚染カビ数が最も多いものはオウレン末で平均 6494/g であった。次いで比較的高いカビ数が認められたものは、オウゴン末 1382/g、ビャクジュツ末 418/g、ショウキョウ末 393/g、オウバク末 391/g およびシャクヤク末 382/g であった。比較的少ないものはサンショウ末 (平均 3/g)、ケイヒ末 (平均 10/g) およびキキョウ末 (平均 36/g) で、これらのうちケイヒについては微生物の発育阻害があるとの報告¹⁷⁾がなされている。

2. 汚染カビの菌属分布

分離されたカビのすべての株についてその菌属を同定した。結果は TABLE III に示す。

汚染カビのうち高頻度に見いだされた菌属は *Penicillium* (49.6%) および *Aspergillus* (47.0%) の 2 属で、ケイヒ末およびサンショウ末を除いた 11 種から分離され、この 2 属で全検出菌の 96.6% を占めていた。その他の菌属では *Mucor* および *Rhizopus* が菌数は少ないが多くの検体に分布していた。*Penicillium* 属については属の同定のみにとどめた。*Aspergillus* 属のうち最も高頻度に検出された菌群は *A. niger* で、全 *Aspergillus* の 52.4% を占めていた。次いで *A. glaucus* group と *A. flavus* group の菌が比較的多く検出された。これらの菌属および菌群の分布を生薬の種類別にみた場合、その分布に著しい差は認められなかった。

3. 分離カビの mycotoxin 産生性

前記分離カビのうち mycotoxin 産生性が知られている *A. flavus* (32 株)、*A. versicolor* (23 株)、*A. ochraceus* (11 株) について、それぞれ生薬由来の数株を選び合成培地上での毒素産生性を調査した。得られた成績は TABLE IV に示すとおりである。カンゾウ末の 1 検体から分離した *A. flavus* 4 株のうち 1 株に aflatoxin B₁, B₂ の産生性を認めた。しかし、その他の菌株ではいずれも mycotoxin の産生は認められなかった。

4. mycotoxin 汚染

全試料について aflatoxin, ochratoxin A および sterigmatocystin による汚染の有無を調査したが、いずれの試料にも mycotoxin の存在は認められなかった。

考 察

生薬は天然物たる本質、またはその生産過程または輸入経路によってはある程度の微生物汚染は避けられないものとする。しかし、生薬製剤および漢方製剤のなかにはエキス製剤を除いて、生薬をそのまま用いる場合が多く、ま

16) 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 善養寺浩, 倉田 浩, 一戸正勝, 食衛誌, **14**, 364(1973); 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 善養寺浩, 東京都立衛生研究所研究年報, **24**, 41(1973); **27**, 36(1976); 一言 広, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 坂井千三, 善養寺浩, 同上, **25**, 17(1974); **26**, 30(1975).

17) L. B. Bullerman, *J. Food Sci.*, **39**, 1163(1974); **42**, 1107(1977).

TABLE III. Distribution of Fungal Species in Powdered Crude Drugs

Fungus	Crude drugs													Total(%)
	Keihi	Senkyu	Sanshishi	Shakuyaku	Kikyo	Kanzo	Byakujutsu	Ohbaku	Shokyo	Ohren	Ohgon	Sojutsu	Sansho	
<i>Aspergillus</i> group		1133	676	1523	96	676	764	1028	877	3438	2241	133		12585(47.0)
<i>A. niger</i>		906	36	724	38	393	100	876	783	538	2130	75		6599(24.6)
<i>A. glaucus</i>			561	786	41	269	651	38	78			58		2482(9.3)
<i>A. flavus</i>		10 (10)	5 (5)		11 (11)	6 (6)	5 (5)	111 (98)	3 (3)	1900 (25)	58 (58)			2109(7.8) (221; 0.8)
<i>A. nidulans</i>		161		10	3			3	5					182(0.7)
<i>A. versicolor</i>		53	14	3			8		5					83(0.3)
<i>A. ochraceus</i>					3	8					48			59(0.2)
<i>A. terreus</i>			45						3		5			53(0.2)
<i>A. ustus</i>		3	15											18(0.1)
<i>A. spp.</i>										1000				1000(3.8)
<i>Penicillium</i>		60	18	2579	28	269	145	120	45	9500	525	3		13290(49.6)
<i>Mucor</i>	78	40	31	39			3			50				241(0.9)
<i>Rhizopus</i>		38	3	8	35	15	3	21	5			25		153(0.6)
<i>Cladosporium</i>					13	45								58(0.2)
<i>Aureobasidium</i>			10		30									40(0.1)
Other fungi	3	8	34	13	3	15	35		3				3	435(1.6)
Total	81	1279	772	4167	205	1020	1268	1169	930	12988	2764	161	3	26807

(), Number of *A. flavus*.

TABLE IV. Mycotoxin Production of Isolates on the Relevant Media

Fungus	No. of toxigenic strain/ Tested strain	Toxin production ^{a)}			Source of isolation
		afatoxin	sterigmatocystin	ochratoxin	
<i>A. flavus</i>	0/6	—			Senkyu
<i>A. versicolor</i>	0/6		—		
<i>A. flavus</i>	0/6	—			Sanshishi
<i>A. versicolor</i>	0/6		—		
<i>A. versicolor</i>	0/5		—		Shakuyaku
<i>A. flavus</i>	0/5	—			Kikyo
<i>A. ochraceus</i>	0/5			—	
<i>A. flavus</i>	1/4	+			Kanzo
<i>A. ochraceus</i>	0/4			—	
<i>A. flavus</i>	0/3	—			Byakujutsu
<i>A. versicolor</i>	0/3		—		
<i>A. flavus</i>	0/3	—			Ohbaku
<i>A. flavus</i>	0/3	—			Shokyo
<i>A. versicolor</i>	0/3		—		
<i>A. flavus</i>	0/3	—			Ohren
<i>A. flavus</i>	0/2	—			Ohgon
<i>A. ochraceus</i>	0/2			—	

^{a)}, On mycotoxin production medium (SL and YES).

た生薬の適切な滅菌法もない現状を考えると、生薬のカビ汚染および発ガン性など種々の毒性を有する mycotoxin 汚染の実態を明らかにすることは GMP 対策上意義深いものと考えられる。

すでに松島ら³⁾は 25° で relative humidity (R.H.) 75%, 84% および 100% に置いた場合の各種生薬に発生する糸状菌を観察し報告している。それによると *A. glaucus* group のカビ, *P. variable*, *P. frequentance*, *Rhizopus*, *A. awamori*, *A. niger*, *A. ochraceus* などが dominant または minor species としてみられると述べている。また宇田川ら⁵⁾は輸入植物性生薬における aflatoxin 産生性 *A. flavus* の汚染を調査し、ある種の生薬には *A. flavus* の汚染が特徴的にみられると報告している。

今回調査した粉末生薬13種49検体には aflatoxin, ochratoxin A および sterigmatocystin による汚染は認められなかった。しかし、オウレン末などの10種には多数の糸状菌が認められ、カンゾウ末の1検体より分離した *A. flavus* に aflatoxin B₁ および B₂ の産生性が認められた。このように高度な糸状菌による汚染は、わが国で消費される生薬の多くが輸入品で、貯蔵期間も比較的長く、かつ環境湿度の影響を受けやすい点と相まって、生薬がカビ汚染により変質または変敗、場合によっては mycotoxin 汚染の危険性が大きいことを示唆しているものと考えられる。これらのことから生薬の品質確保上カビ汚染防止対策が重要な課題と考える。

一方、ケイヒ末サンショウ末およびキキョウ末においては汚染カビ数が比較的少なかった。すでに岡崎ら^{4,18)}により各種生薬、精油および精油成分について、また Bullerman¹⁷⁾ および著者らのうちの一言ら¹⁹⁾によりケイヒの抗カビ作用がそれぞれ報告されていることから、少なくともケイヒ末においては抗カビ成分の含有が検出菌数の少なかった理由の一つとして考えられる。さらに Bullerman¹⁷⁾ はケイヒが aflatoxin 産生阻害作用を示すことを報告し、一言ら¹⁹⁾もケイヒおよびコショウは aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin および *Fusarium* toxin の産生基質とならないことを報告している。これらの知見から、生薬のカビ汚染および mycotoxin 汚染の危険性を把握するために、今後その他の生薬における汚染カビの動態について明らかにする必要があると考える。

18) 岡崎寛蔵, 若田部武男, 薬誌, 71, 481(1951); 岡崎寛蔵, 大島壮一, 薬誌, 72, 558, 561, 564, 1131(1952); 73, 344, 690(1953); 岡崎寛蔵, 本間昭子, 薬誌, 74, 174(1954).

19) H. Hitokoto, S. Morozumi, T. Wauke, S. Sakai and H. Kurata, "Mycotoxin, In Human and Animal Health," Pathotox Publishers Inc., Illinois, 1977, p.479.