

生薬における生菌数実態調査

多田恵弥*, 白鳥 誠, 山本博章, 表 貴之,
安藤英広, 伊藤紫野, 池戸真吾, 石間慶昭, 岡本巧誠, 久保範洋,
田中啓介, 野澤佳明, 平田智枝, 六川将宏, 杉本智潮, 富塚弘之
日本漢方生薬製剤協会 技術委員会

Survey on Total Viable Aerobic Count in Crude Drugs

Emi Tada*, Makoto Shiratori, Hiroaki Yamamoto, Takayuki Omote,
Hidehiro Ando, Shino Ito, Shingo Ikedo, Yoshiaki Ishima, Kousei Okamoto, Norihiro Kubo,
Keisuke Tanaka, Yoshiaki Nozawa, Tomoe Hirata, Masahiro Mutsukawa,
Chishio Sugimoto and Hiroyuki Tomitsuka

*Technical Committee, Japan Kampo Medicines Manufacturers Association (JKMA),
16-19 Nihonbashi Kodenma-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0001, Japan*

(Received July 29, 2014)

(Summary)

In the Japanese Pharmacopoeia, two microbial limit tests are described: the <4.05> Microbial limit test and <5.02> Microbial limit test of crude drugs. In 2007, the former was comprehensively revised through international harmonization involving the JP, EP, and USP (Supplement I, 15th edition, Japanese Pharmacopoeia). On the other hand, the latter was not covered by an agreement on international harmonization; there is a marked difference between the two tests. We conducted examinations, considering the specificity of crude drugs such as high bioburden and antimicrobial actions, based on the <4.05> Microbial limit test, and established a total viable aerobic count method for crude drugs.

Using this method, we performed a survey on the total viable aerobic count in crude drugs. We measured this parameter in 65 cut crude drug products for decoction (275 samples) and 34 powdered crude drug products (106 samples). The results of the first measurement, TAMC (3.3%) and TYMC (13.5%), and of the second one, TAMC (23.6%) and TYMC (28.3%), showed values exceeding the permissible microbial acceptance criteria for crude drugs presented as general information in the Japanese Pharmacopoeia. Overall, these values were higher than the results of a previously reported survey on the total viable aerobic count in crude drugs.

Keywords: Microbial limit test for crude drugs; Crude drug; Kampo formulation; Conventional crude drug product; Aerobic bacteria; Moulds and Yeasts; Total viable aerobic count; Total Aerobic Microbial Count; Total Combined Yeasts/Moulds Count; Japan Kampo Medicines Manufacturers Association

緒論

日本薬局方¹⁾の一般試験法には<4.05>微生物限度試験

法と<5.02>生薬の微生物限度試験法の二つの微生物限度試験が収載されている。このうち<5.02>生薬の微生物限度試験法は、生薬及び生薬を原料とする、非無菌医薬品の

微生物学的な品質を確保するための試験法として、2001 年、第十四改正日本薬局方の改正時に一般試験法として収載され、また微生物限度基準値は参考情報として収載された。2007 年、＜4.05＞微生物限度試験法は日、米、欧の三薬局方の国際調和に基づき第十五改正日本薬局方第一追補にて全面的に改訂されたが、＜5.02＞生薬の微生物限度試験法は国際調和の対象とはならなかった。＜5.02＞生薬の微生物限度試験法は、局方収載にあたり WHO のガイドラインや諸外国の局方を参照にするなど、国際的な視野に立って検討が進められた経緯がある²⁾ものの、その後は改訂作業が行われないままとなっており、第十六改正日本薬局方の改正時に培地の名称を修正する小規模な改訂が行われたに止まっているのが現状である。

生薬製剤及び漢方製剤は天産物の動植物を起源としており、それらの有効性と安全性は原料となる生薬の品質に依存する。生薬において、自然界に由来する土砂、重金属、ヒ素、残留農薬、微生物や放射性物質などの不純物質の管理は生薬製剤及び漢方製剤の品質保証において重要な課題となっている。さらに平成 26 年 7 月 1 日付で医薬品査定協定・医薬品査察協同スキーム（The Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme：PIC/S）への日本の正式加盟が決定したが、この PIC/S GMP ガイドラインのアネックス 7「植物性医薬品の製造」においても微生物に対する管理が求められている³⁾。

生薬の微生物限度試験法を適用するうえで考慮しなければならない点は、「使用する培地が生薬のバイオフィーマに期待する結果を与えるか」、「発育阻止物質の存在による微生物の増殖阻害はないか」、「付着微生物間での増殖阻害はないか」、「生薬は多くの性状を有する品目によりなり、これらに対する試料採取と調製法への対応」など、目的とする微生物を検出するのに適切かつ妥当性がある手法であるかが検証されていなければならない⁴⁾。このような背景から我々は、種々検討を行い、国際調和法である＜4.05＞微生物限度試験法を基本とした生薬の生菌数試験法を確立した⁵⁾。今回、この方法を用いて生薬及び生薬の粉末の生菌数につき実態調査を実施したので報告する。

実験方法

1. 試験法の設定

我々が確立した生薬の微生物試験⁵⁾について概説する。

検討開始にあたり、当協会の生薬委員会がまとめた「原料生薬使用量等調査報告書（平成 20 年度の使用量）」（以下、日漢協の原料生薬使用量等調査報告）⁶⁾より、使用量上位 30 品目からケイヒ、ニンジン、シャクヤク、ジオウ、カッコン、マオウ、キキョウ、タイソウ、ダイオウ、ボタンピ、ビャクジュツ、タクシャ、オウギ、トウキ、ソウジュツ、サイコの合計 16 品目 16 検体を収集した。これらを用いて、総好気性微生物数（total aerobic microbial count; TAMC）ではソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地（日本製薬株式会社製：日局試験用）、総真菌数（total combined yeasts/moulds count; TYMC）においてはサブロー・ブドウ糖カンテン培地（日本製薬株式会社製：日局試験用）を使用し、培養日数、培地への添加剤の影響、集落数の算出方法について検討を行い国際調和法である＜4.05＞微生物限度試験法に合わせた試験方法を設定した。さらに、設定した微生物試験法の生薬への適合性を確認するため、上述の 16 品目 16 検体に抗菌性を示すオウレンとコウボクの 2 品目 2 検体を加えた 18 品目 18 検体について＜4.05＞微生物限度試験法に記載されている「製品存在下での微生物回収」を実施し、本試験方法が許容基準値の測定が可能な方法であることを確認した。なお、「製品存在下での微生物回収」で用いた生薬については、日本照射サービス株式会社にて 30kGy の γ 線照射により付着微生物を殺滅したものを使用した。

2. 試験方法

設定した試験方法を以下に示す。

1) 試料溶液の調製

試料 10g をとり、pH7.0 のペプトン食塩緩衝液 90ml を加え 10 分間振とうし、10 倍希釈試料液を調製した。10 倍希釈試料液 1ml をとり 9ml のペプトン食塩緩衝液を加え、TAMC は 10^5 倍まで、TYMC は 10^4 倍まで 10 倍段階希釈を行い試料液とした。

2) 培養条件

①TAMC（カンテン平板混釈法）

直径 9～10cm のペトリ皿を使用し、一希釈段階ごとに 2 枚の培地を使用した。1ml の試料液又は試料液を希釈した液を無菌的にペトリ皿に分注した。これにあらかじめ 45℃ 以下に保温されて溶けた状態にある滅菌したソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 15～20ml を加え混和した。培地の固化後、30～35℃で 5～7 日間培養した。

②TYMC（カンテン平板混釈法）

直径 9～10cm のペトリ皿を使用し、一希釈段階ごとに 2 枚の培地を使用した。1ml の試料液又は試料液を希釈した

液を無菌的にペトリ皿に分注した。これにあらかじめ 45℃ 以下に保温されて溶けた状態にある滅菌したクロラムフェニコール添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地 15~20ml を加え混和した。培地の固化後、20~25℃で 5~7 日間培養した。

3) 菌数の測定

集落数が TAMC では 250 未満, TYMC では 50 未満で、かつ最も多い集落数を示す希釈段階のカンテン培地を選び出した。計測は培養後 1 日後より随時行った。培地ごとに集落数の算術平均をとり、試料 1g 当たりの菌数を算出した。

3. 生薬サンプル及びその収集

当協会の原料生薬使用量等調査報告より使用量上位 60 位の生薬のうち、第十六改正日本薬局方生薬総則に掲載されているものならびに、1996 年の生薬の微生物限度に関する研究⁷⁾で記載のあった、65 種の刻み生薬及び 34 種の粉末生薬を基本とし、合計 381 検体 (刻み生薬 65 品目 275 検体, 粉末生薬 34 品目 106 検体) を収集し実態調査に用いた。使用した生薬を以下に記載する。

1) 刻み生薬

インチンコウ、インヨウカク、ウイキョウ、ウコン、エンゴサク、オウギ、オウゴン、オウバク、オウレン、カッセキ、カッコン、カンキョウ、カンゾウ、キキョウ、キジツ、キョウニン、ケイガイ、ケイヒ、ケツメイシ、ゲンノショウコ、コウジン、コウベイ、コウボク、ゴシツ、ゴミシ、サイコ、サイシン、サンシシ、サンシュユ、サンヤク、ジオウ、シャクヤク、シャゼンシ、ジュウヤク、シュクシャ、ショウキョウ、セッコウ、センキュウ、センナ、センブリ、ソウジュツ、ソヨウ、タイソウ、ダイオウ、タクシャ、チョウジ、チョウトウコウ、チョレイ、チンピ、トウキ、トウニン、ニンジン、バクモンドウ、ハッカ、ハンゲ、ビャクジュツ、ブクリョウ、ブシ、ボウイ、ボウフウ、ボタンピ、ボレイ、マオウ、ヨクイニン、レンギョウの 65 生薬 275 検体

2) 粉末生薬

ウイキョウ末、ウコン末、エンゴサク末、オウゴン末、オウバク末、オウレン末、カンゾウ末、キキョウ末、ケイヒ末、ゲンチアナ末、ゲンノショウコ末、コウボク末、サンシシ末、サンヤク末、シャクヤク末、シュクシャ末、ショウキョウ末、センナ末、センブリ末、センキュウ末、ソウジュツ末、ダイオウ末、タクシャ末、チョウジ末、チョレイ末、トウガラシ末、トウキ末、ニンジン末、ビャクジュツ末、ブクリョウ末、ブシ末、ボタンピ末、ボレイ末、

ヨクイニン末の 34 生薬 106 検体

4. 生菌数試験の実施

当協会技術委員会不純物試験法部会参加会社 10 社にて、上記サンプルにつき、先に示した試験法で測定を行った。試験は各検体 (n=1) で行った。

結果

1. 刻み生薬における生菌数

刻み生薬における TAMC は 10^3 CFU/g 未満が 36.4%, 10^3 以上 10^5 CFU/g 未満が 53.1%, 10^6 CFU/g が 7.3%, 10^7 CFU/g 以上が 3.3%であった (Fig.1)。また TYMC では 10^3 CFU/g 未満が 73.8%, 10^3 以上 10^4 CFU/g 未満が 12.7%, 10^4 CFU/g 以上が 13.5%であった (Fig.2)。検出頻度と菌数が共に高い生薬としては、TAMC はウコン、カンキョウ、カンゾウ、サイコ、サイシン、ショウキョウ、センキュウ、トウキ、ハンゲ、TYMC はカンゾウ、サイコ、サイシン、ショウキョウ、センキュウ、ダイオウ、タクシャ、トウキ、ハッカ、ハンゲ、ビャクジュツであった。

2. 粉末生薬における生菌数

粉末生薬における TAMC は 10^3 CFU/g 未満が 15.1%, 10^3 以上 10^5 CFU/g 未満が 61.3%, 10^5 CFU/g 以上が 23.6%であった (Fig.3)。また TYMC では 10^3 CFU/g 未満が 71.7%, 10^3 CFU/g 以上が 28.3%であった (Fig.4)。検出頻度と菌数が共に高い生薬としては、TAMC はウコン末、センナ末、センキュウ末、トウガラシ末、トウキ末、ニンジン末、TYMC はオウゴン末、オウバク末、カンゾウ末、ダイオウ末、トウガラシ末、トウキ末であった。

まとめ

生薬の微生物学的品質は、日本薬局方の参考情報において熱湯で処理して用いる生薬及び生薬を配合した製剤 (カテゴリー1) とそのほかの生薬及び生薬を配合した製剤 (カテゴリー2) に分類され許容基準値が記載されている (Table 1)⁸⁾。今回の実態調査において、刻み生薬をカテゴリー1に相当するとした場合では TAMC の 3.3%, TYMC の 13.5% が、粉末生薬をカテゴリー2に相当するとした場合では TAMC の 23.6%, TYMC の 28.3%が許容基準値を上回る結果となった。生薬の生菌数実態調査としては、佐竹らの生薬の微生物限度に関する研究 (1996)⁷⁾で報告がされてい

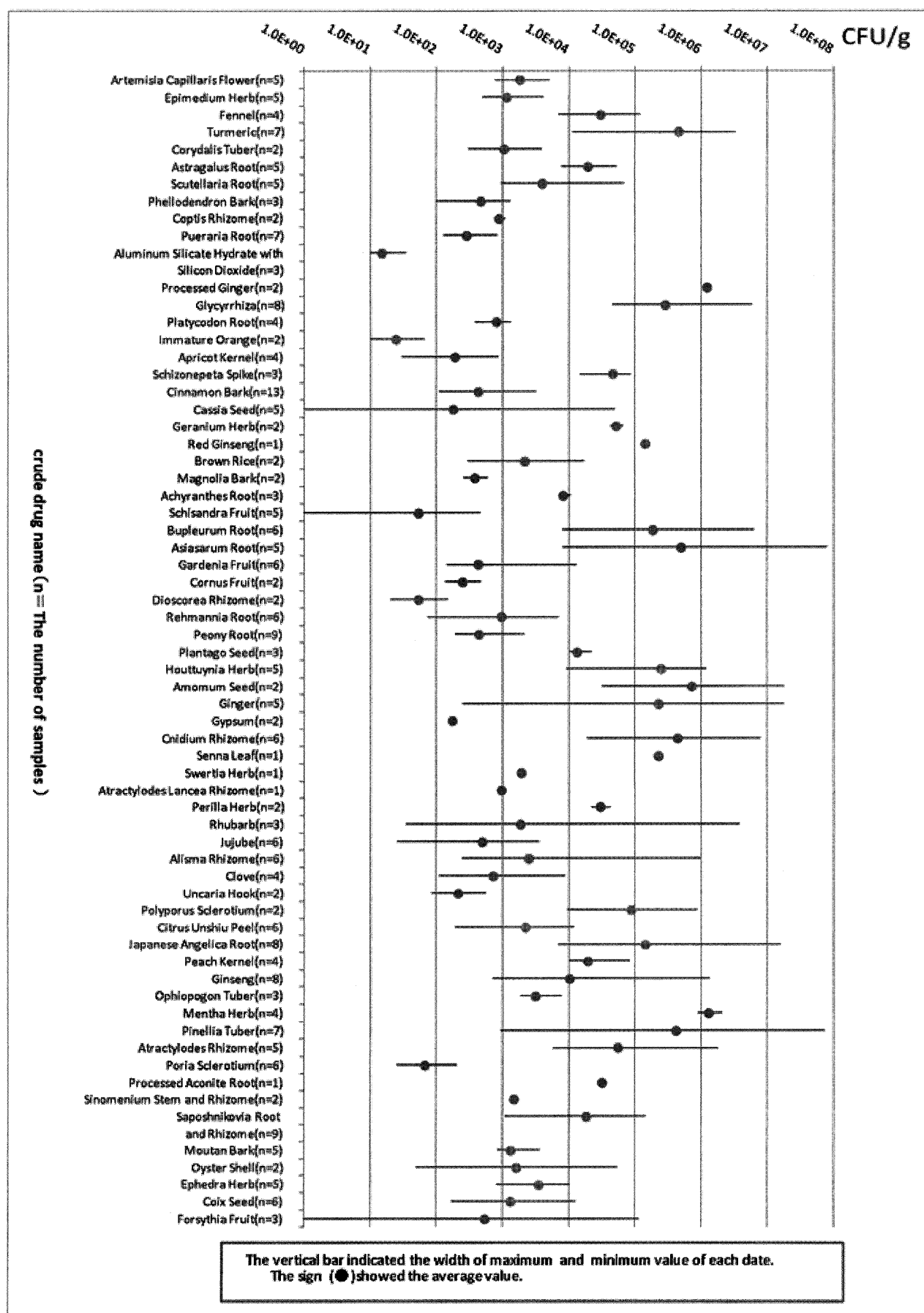


Fig. 1. Total aerobic microbial count in cut crude drugs

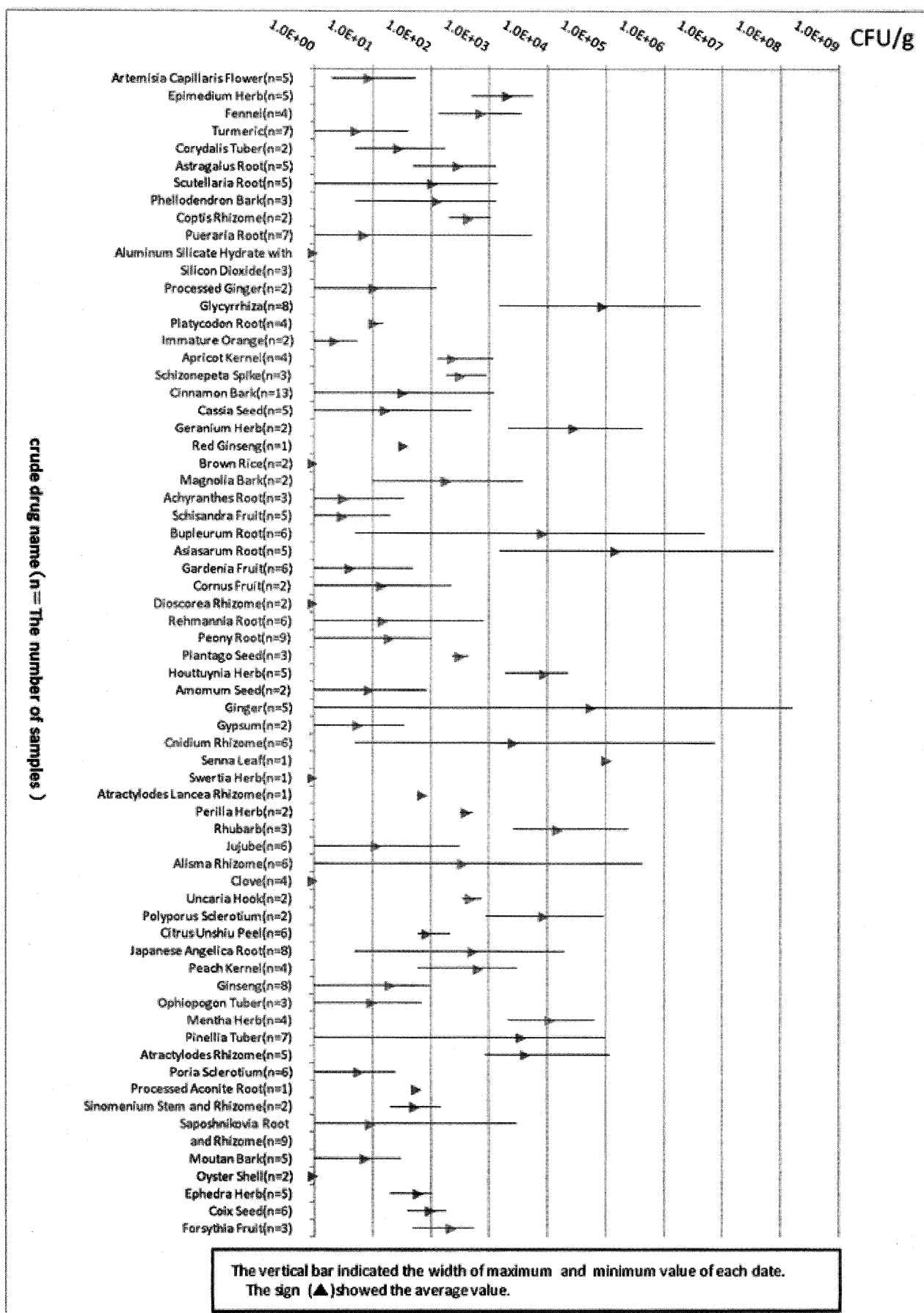


Fig. 2. Total combined yeasts/moulds count in cut crude drugs

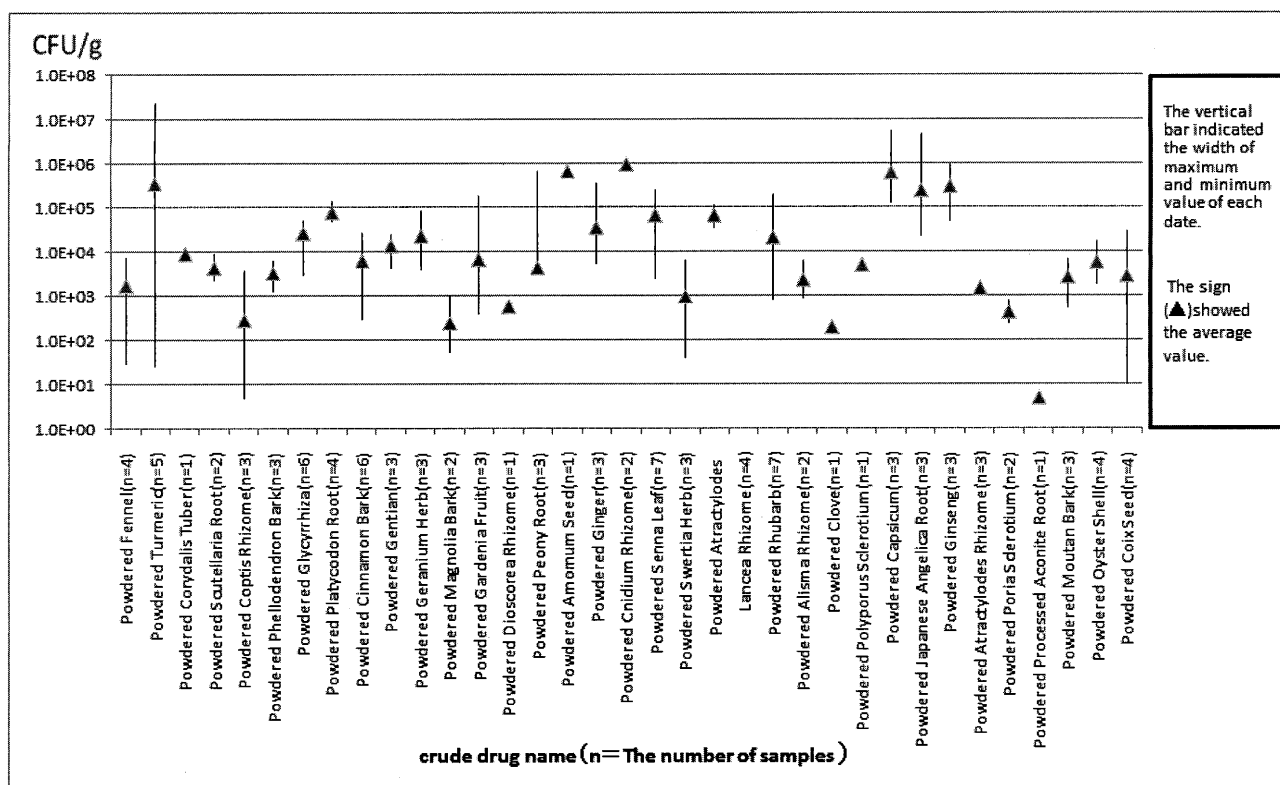


Fig. 3. Total aerobic microbial count in powdered crude drugs

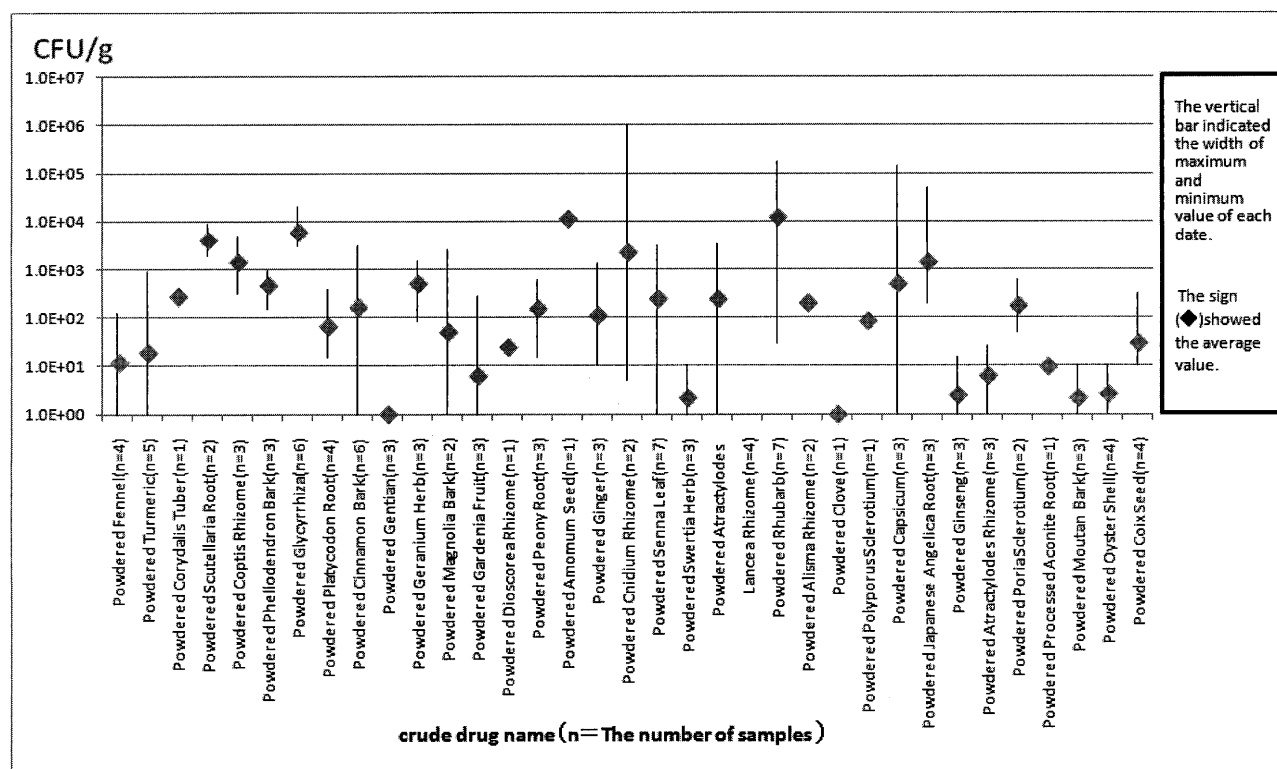


Fig. 4. Total combined yeasts / moulds count in powdered crude drugs

るが、本調査ではそれらより全体的に高い菌数が認められる結果となった。本調査に用いた試験法と現行の<5.02>生薬の微生物限度試験法は、主に培養日数と集落算出方法

が異なる。また、検討の結果、生薬の特性に対応するため抗生物質添加やかびの培地上の拡散を抑制するローズベンガルなどの添加剤の使用は必要であると判断した⁵⁾。本調

Table 1 Acceptance criteria for crude drugs and crude drug preparations

Micro-organisms	Category 1 (CFU / g or CFU / ml)	Category 2 (CFU / g or CFU / ml)
Aerobic bacteria	10 ⁷	10 ⁵
Moulds and yeasts	10 ⁴	10 ³
Enterobacteria and other gram-negative bacteria	※	10 ³
<i>Escherichia coli</i>	10 ²	Not detected
<i>Salmonella</i>	Not detected	Not detected
<i>Staphylococcus aureus</i>	※	※

※ : The limits are not specified.

査に用いた試験法は、国際調和法である<4.05>微生物限度試験法を基本としたものである。<4.05>微生物限度試験法においては、現行の<5.02>生薬の微生物限度試験法で使用されている抗生物質やローズベンガル等の添加剤の使用について抗生物質添加は但し書きとされ、添加剤について記載はされていない。しかし<4.05>法ではカンテン平板上に検出されたコロニーは全てカウントする方法であるため、高いバイオーバーデンをもつ生薬を試料とした場合、コロニーをカウントする際に TYMC 試験でも細菌が検出され、数値がその分上乗せされた値になる恐れがあること、糸状菌の拡散により菌数の計測が妨げられ試験に支障が出る危惧がある。

このように、<4.05>法に準じて設定した生薬を対象とする、その特殊性を考慮した微生物試験を用いて実施した本調査の結果は、生薬における生菌数につき、実態をより正しく反映しているものと考ええる。

刻み生薬は全形生薬を粗切や中切、細切などにしたものであり、エキシ・チンキ・流エキシなどの抽出用原料として利用される例が多い。煎剤やエキシ剤は製造時に生薬を熱湯で処理するために、生薬由来の易熱性菌は死滅する。同様に殺菌作用のあるエタノール等で処理されるチンキ剤等にも、生薬由来の微生物の残存のリスクは少ない。

粉末生薬など、一般的に抽出工程が無いまま用いられるものでは、必要に応じて微生物を制御する必要がある。工業レベルの微生物制御法は、高圧蒸気、加熱水蒸気、乾熱の方法が利用されている。これらは生薬の特性に応じて、生薬の形態と適用方法を組み合わせて行われている⁹⁾。

従って、製剤化後の服用する段階での微生物への対応は

概ねなされているため、本調査の結果を受けても、生薬製剤及び漢方製剤の微生物学的な安全性について、ただちに問題となる可能性は低いと考える一方で、微生物によるリスクはゼロにはならず、微生物汚染が生じた際の健康への影響を考えると、生薬をはじめ生薬製剤及び漢方製剤の総合的な品質の確保や安心安全のための微生物の管理が必要であると考えられる。近年 PIC/S GMP ガイドラインの Annex 7 にて微生物の管理の必要性が示され、現在は、日本の「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準」(Good Manufacturing Practice : GMP)¹⁰⁾においても微生物に対する管理が、生薬や生薬に関連する医薬品製造においても要求されているところである¹¹⁾。合わせて、生薬や生薬に関連する製剤に関する継続的な微生物に対する管理が、今後の重要な課題であると考ええる。

なお、今回使用した試料の一部につき、本調査に用いた試験方法にて外部試験機関にて試験を実施した結果、総じて同様な値が得られた。

謝辞

本調査の実施にあたり、終始有益なご助言、ご指導いただきました国立医薬品食品衛生研究所薬品部長の合田幸広博士、一般財団法人日本食品分析センター品質保証部の関口道子シニアマネージャーに深謝いたします。

References

- 1) “The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition”, The ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. (2011).

- 2) 生薬の微生物限度試験法について - 『防菌防黴』連載講座別刷り集 - 日本漢方生薬製剤協会技術委員会配布資料 (2004 年 3 月).
- 3) “Standards for manufacturing control and quality control of Kampo products and conventional crude drug products”, Compliance and Narcotics Division Pharmaceutical and Food Safety Bureau contact of February 16, 2012, The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 4) Shin GMP biseibutsushikenho, eds by Sasaki T., Tanamoto K., Kawamura K., Jiho, 2008, pp.226-243.
- 5) Tada E., Iwata T., Omote T., Doi K., Ri T., Yamamoto H., Shiratori M., Ando H., Okamoto K., Tanaka K., Niizawa S., Nozawa Y., Hattori Y., Hirata T., Mutsukawa M., Yamada S., Endo Y., Sugimoto C., Tomitsuka H., Abstract paper of the 40th Annual Meeting of the Society for Antibacterial and Antifungal Agents, Japan, pp. 192 (2013).
- 6) 原料生薬使用量等調査報告書—平成 20 年度の使用量—平成 23 年 7 月 15 日 日本漢方生薬製剤協会 生薬委員会
(<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/investigation03.html>).
- 7) Satake M., Sekita S., Yasuda I., Fujita M., Shiratori M., Hitomi N., Shimizu K., Okada M., Minoura S., Arata K., Nagai Y., Arimoto K., Iyakuin Kenkyu, 27, 706-707 (1996).
- 8) “The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition, general information, G4, microbial attributes of non-sterile pharmaceutical products”, The ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. (2011).
- 9) Shin GMP biseibutsushikenho, Second Edition, eds by Sasaki T., Tanamoto K., Kawamura K., Jiho, 2013, pp.231-247.
- 10) “About the handling of Ministerial Ordinance on Standards for Manufacturing Control and Quality Control for Drugs and Quasi-drugs”, Yaku-Shoku-Kanma-Hatsu 0830, No. 1 of August 30, 2013, The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- 11) “The collection of examples for GMP (2013 edition)”, Jimu-rennaku of December 19, 2013, The Ministry of Health, Labour and Welfare Pharmaceutical and Food Safety Bureau Compliance and Narcotics Division, Japan.