

A-10

医薬品製造用水の衛生微生物学的評価

かわい まこ まつてらえいいち かんた ひさし たに かつじ やまぐちのぶやす なす まさお
 ○川井 真好¹⁾, 松寺 栄一¹⁾, 神田 尚¹⁾, 谷 佳津治²⁾, 山口 進康²⁾, 那須 正夫²⁾

¹⁾ 大日本製薬株式会社 品質管理部

²⁾ 大阪大学大学院 薬学研究科 遺伝情報解析学分野 (衛生化学)

【目的】 高品質の医薬品を供給するためには、医薬品製造用水の厳重な微生物管理が重要であり、汚染菌数、菌種、および菌の生理活性を知る必要がある。しかしながら、現行の培養に基づく検出、同定方法では、医薬品製造用水中の培養困難な細菌についての知見は得られない。また、操作が煩雑で結果を得るまでに長時間を要する。本研究では、迅速に微生物の群集構造を知ることができる DGGE 法を用いて、医薬品製造用のイオン交換水中に存在する微生物を解析したので報告する。

【方法】 イオン交換水中の細菌をメンブレンフィルターに捕集し、凍結融解法およびフェノール-クロロホルム法により、DNA を抽出した。真正細菌の 16S rRNA 遺伝子の一部 (V6, 7, 8 領域) を PCR 増幅した後、得られた増幅産物を DGGE 法で解析した。さらに、DGGE のバンドから DNA を回収し、塩基配列を決定した。なお、イオン交換水中の全細菌数、エステラーゼ活性を有する細菌数、呼吸活性を有する細菌数の計数には DAPI, SYBR green I, CFDA, CTC を用いた。コロニー形成菌数の計測には、SCD 培地および R2A 培地を用いた。

【結果と考察】 イオン交換水中のほとんどの細菌はコロニーを形成しなかったが、 10^3 cell/mL の細菌がエステラーゼ活性、呼吸活性を有した。この結果より、イオン交換水中には、従来法では培養が困難であるが生理活性を保持している細菌が存在することがわかった。次に、細菌の群集構造を知るため、DGGE によるバンドパターンの比較を行った。凍結融解法およびフェノール-クロロホルム法を用いて細菌の DNA 抽出を行い、DGGE を行ったところ、DNA の抽出方法の違いによるバンドパターンに差は認められなかった。また、イオン交換水中の細菌群集の多様性は非常に低いことがわかった。イオン交換水中に存在する細菌の優占種を DGGE のバンドの塩基配列をもとに解析したところ、alpha-Proteobacteria に属する細菌であることがわかった。この細菌は通常よく用いられる SCD 培地および R2A 培地で優占的に検出される菌種と異なっていた。以上の結果より、今後、医薬品製造用水の微生物管理においては培養困難な細菌も考慮した管理が必要であると考えられる。