局方精製水の微生物学的調査研究

梶村計志, 坂上吉一, 横山 浩, 田中涼一
大阪府立公衆衛生研究所

Research of JP 11 Purified Waters on Microbiological Aspect

KEIJI KAJIMURA, YOSHIKAZU SAKAGAMI, HIROSHI YOKOYAMA and RYOUICHI TANAKA

*Osaka Prefectural Institute of Public Health, 3-69 Nakamichi 1 chome,
Higashinari-ku, Osaka 537, Japan*

(Received April 9, 1990)

pH values and microbial colony forming unit (CFU) of JP 11 purified waters (8 samples) were studied. pH values of 8 samples tested were between 5.64 to 5.98. No bacteria were detected from 2 test samples for 3 months. A few bacteria were detected in another samples at immediately after preparation, and after 1 month microbial CFU in 3 sample increased remarkably. The microbial CFU in these samples were 6.7×10^3 — 1.2×10^5 CFU/ml. Most bacteria isolated were gram negative rod after 1—3 month, and these were identified as *Shigella* sp. by using api 20NE system. Slight correlation between the increase of microbial CFU and the contents of total organic carbon (TOC) were found.

Keywords——purified water; microbial CFU; microbial CFU increase; microflora change; microbial CFU—total organic carbon content relationship

緒 言

日本薬局方精製水（以下、日局精製水）は、水道水、井戸水等を、蒸留、イオン交換、超ろ過などにより調製した水であり、医薬品等の製造用水として汎用されている。また近年、コンタクトレンズ使用者の増加に伴い、洗浄用としての需要が急激に増加しており、人体に適用することを考慮した場合、より良い品質の確保が望まれる製品である。石関ら¹⁾は精製水を含めた製造用水に、微生物汚染が見られるとき、それらが原因となる悪影響が製品全般に波及する可能性を指摘している。また、病院の薬剤部においても製造用水や調剤用水等に関する微生物汚染が、報告されている。^{2,3)}

精製水に関しては、第10改正日本薬局方⁴⁾より、その製剤通則及び各条の基原の項に細菌による汚染に対する注意事項が記載されている。しかし、現在のところ、医薬品各条において、微生物試験に関する規定はなく、理化学的な手法による品質評価が行われているのみである。

上記の点に着目し、著者らは今回、大阪府下の医薬品製造メーカーより入手した日局精製水の微生物学的品質を検討し、知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 実験材料 精製水——大阪府下の医薬品製造メーカーより入手した日局精製水8試料を実験に供した。

培地——一般細菌の検出及び増殖用に soybean casein digest（以下 SCD）寒天培地及び SCD 培地（日本製薬製）を使用した。

グラム染色及び同定セット——グラム染色用にフェーバーGセットF（日水製薬製）を、菌種の同定用に api 20NE（API System S.A.製）を使用した。

2. 精製水の pH 各試料の一定量を採取し、第11改正日本薬局方（以下、日局11）の方法⁵⁾に従い、pHを測定した。

3. 精製水中の菌数測定 各試料を滅菌生理食塩液で希釈した液（菌数が30—300 CFU/mlになるように調整したもの）を試験液とした。

液体培地段階希釈（以下 MPN）法——希釈液 1 ml ずつを SCD 培地 10 ml を入れた 3 本の試験管にそれぞれ加え、良く混和し、37℃で 2 日及び 5 日間培養したのち、培地の濁りの有無を確認し、最確数表により菌数を求めた。

平板混釈法——希釈液 1 ml ずつを入れたペトリ皿にあらかじめ滅菌したのち 45—50℃に保温した SCD 寒天培地 20 ml を加え、よく混釈したのち、37℃で 2 日及び 5 日間培養し、出現したコロニー数を測定した。なお、測定値は、ペトリ皿 3 枚の平均とした。

平板塗抹法——希釈液 0.1 ml ずつを SCD 寒天培地に加え、滅菌コンラージ棒にて塗抹し、37℃で 2 日及び 5 日間培養したのち、出現したコロニー数を測定した。なお、測定値は、ペトリ皿 3 枚の平均とした。

4. グラム染色による日局精製水中の細菌の形態学的分類並びに菌種の同定 各測定日ごとに検出した一般細菌をその外観等より分類したのち、グラム染色し、その形態を顕微鏡で観察した。さらに、api 20NE を用い菌種の同定を行った。

TABLE I. pH Values of JP 11 Purified Waters

Companies	pH values
A	5.80
B	5.78
C	5.90
D	5.81
E	5.79
F	5.98
G	5.64
H	5.69

5. 有機体炭素 (TOC) 量の測定 試料中の有機体炭素 (TOC) 量を Shimadzu TOC Analyzer TOC-500 (島津製作所製) を使用し測定した。

実験結果

1. 精製水の pH

日局精製水の pH 測定結果を Table I に示す。今回検討した 8 試料の pH は、5.64 から 5.98 までの範囲であり、これらはすべて、日局 11 の規格に適合していた。

2. 精製水中の一般細菌数

製造直後における日局精製水中の一般細菌数を 3 種類の試験方法で、培養 2 日後及び 5 日後に測定した結果を Table II に示す。

いずれの試験方法においても培養 5 日後の一般細菌数が 2 日後に比べ、顕著に増加している例が多く認められた。

したがって、今回の実験では、37℃、5 日間培養後の菌数を、精製水中の一般細菌数とした。

各試験方法間の菌数のばらつきについては、若干の試料で MPN 法による菌数が平板混釈法及び平板塗抹法による菌数に比べ、極端に異なった値になる場合が認められた。

3. 精製水中の一般細菌数の経日変化

日局精製水の製造直後、1 カ月後、2 カ月後及び 3 カ月後における、一般細菌数の変化を Fig. 1-1 から Fig. 1-6 に示した。

今回、実験に用いた 8 試料のうち、A 社及び B 社の 2 試料は製造後 3 カ月を経過しても、一般細菌は検出されなかった。F 社、G 社及び H 社の試料については、1 カ月後に一般細菌数が最大値を示し、その値は、MPN 法では 1.1×10^4 — 2.4×10^4 CFU/ml、

TABLE II. Microbial CFU of Purified Waters Measured by 3 Test Methods

Companies	Microbial CFU (CFU/ml)		
	MPN method	Plate dilution method	Plate smear method
A	0 ^{a)} (0) ^{b)}	0 (0)	0 (0)
B	0 (0)	0 (0)	0 (0)
C	3 (3)	77 (77)	27 (60)
D	210 (210)	807 (807)	743 (743)
E	23 (23)	3 (39)	17 (50)
F	1100 (1100)	27 (497)	343 (343)
G	39 (75)	49 (52)	40 (47)
H	91 (91)	2 (25)	23 (23)

Microbial CFU in 8 purified waters were countered by cultivation for 2 or 5 days,

a) Incubation for 2 days,

b) Incubation for 5 days.

Fig. 1. Time Course of Microbial CFU in JP 11 Purified Waters by Three Test Methods

□; MPN method, ▨; plate dilution method, ▩; plate smear method.

平板混濁法では 6.7×10^3 — 1.0×10^5 CFU/ml, 平板塗抹法では 9.3×10^3 — 1.2×10^5 CFU/ml であった。また、製造 2 カ月後及び 3 カ月後には菌数が 1 カ月後に比べ、減少する傾向を示した。C 社及び D 社の試料については、製造 2 カ月後に一般細菌数が最大値を示し、3 カ月後には前述の場合と同様、菌数が減少する傾向を示した。E 社の試料については、3 カ月後まで菌数がほぼ一定であった。

4. グラム染色による日局精製水中の細菌の形態

学的分類並びに菌種の同定

製造直後、1 カ月後、2 カ月後及び 3 カ月後に精製水中よりコロニーを分離し、外観、グラム染色及び鏡検により分類した結果を Fig. 2 に示す。

製造直後に分離されたコロニーは 19 種類で、その内訳は、グラム陽性球菌が 4 株 (21.1%)、グラム陰性球菌が 3 株 (15.8%)、グラム陽性桿菌が 1 株 (5.3%)、グラム陰性桿菌が 11 株 (57.9%) であった。1 カ月後では、10 種類に分類され、そのうちグ

Fig. 2. Classification of Bacteria Detected in Each of JP 11 Purified Waters

□; gram negative rod, ▨; gram negative cocci,
▤; gram positive rod, ▩; gram positive cocci.

ラム陰性桿菌が9株(90.0%), グラム陽性球菌が1株(10.0%), 2カ月後では, 9種類で, グラム陰性桿菌が8株(88.9%), グラム陰性球菌が1株(11.1%)であった。また, 3カ月後では分離された8種類すべてがグラム陰性桿菌であった。

これらのグラム陰性桿菌を api 20NE により, その生化学的性状を検討したのち, I.D.コード表に従い整理したところ, 上記の株はいずれも *Shigella* sp. であった。

5. 有機体炭素(TOC)量と精製水中の一般細菌数の関係

日局精製水中の TOC 量と製造1カ月後における一般細菌数との関係を Table III に示す。

日局精製水8試料中の TOC 量は, 今回の測定方法では TOC を検出しないものが1試料, 他は 0.03—0.58 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲であった。なお, 各日局精製水中の TOC 量は製造直後, 1カ月後, 2カ月後及び3カ月後ではほとんど変化しなかった。

今回の検討結果では, B社の精製水を除き, 比較的 TOC 量の多い精製水では菌が増殖しやすい傾向が認められた。

TABLE III. TOC Contents and Microbial CFU in JP 11 Purified Waters

Sample No.	TOC ($\mu\text{g/ml}$)	Microbial CFU ^{a)}	Growth rate ^{b)}
A	0	—	→
B	0.41	—	→
C	0.53	○	↑
D	0.31	○	↑
E	0.03	—	→
F	0.08	○○	↑
G	0.34	○○○	↑
H	0.37	○○○	↑

a) These indicate the Microbial CFU (CFU/ml) in JP 11 purified waters at 1 month after the preparation of purified waters. — < 25, $25 \leq \text{○} < 1000$, $1000 \leq \text{○○} < 10000$, $\text{○○○} \geq 10000$

b) Growth rate; (↑) Growth, (→) Microbial CFU did not changed remarkably for 3 months.

考 察

日局精製水の微生物学的品質評価について検討するため、大阪府下の日局精製水製造メーカーより入手した精製水を用い、pH 及び製造直後、1 カ月後、2 カ月後及び3 カ月後における一般細菌数の測定並びに検出細菌数の変化と菌種の同定及び TOC 量と一般細菌の増殖との関係について検討した。

日局精製水中の一般細菌数について、まず、製造直後における菌数を、MPN 法、平板混濁法及び平板塗抹法により検討した。37℃、2 日間並びに 5 日間培養後の一般細菌数を比較したところ、5 日間培養の方が 2 日間培養に比べ、菌数が多い傾向が認められた。

昭和 62 年度厚生科学研究「注射用水の品質バリデーションに関する研究」⁶⁾において、注射用水の原水等の生菌試験を行う場合、高汚染の試料では、7 日間培養後で判定すべきであると述べられている。今回の著者らの精製水における検討においても、2 日間培養と 5 日間培養を比較した場合、高汚染試料が認められたことから、5 日間培養後で判定するのが妥当であることが示唆された。これは、精製水中には細菌の栄養源となる有機物が比較的少なく、細菌が合成培地等の有機物の豊富な環境に置かれた場合、コロニーとして出現する際、通常の場合に比べ増殖速度が多少遅れるからであると考えられる。したがって、今回の検討では、37℃、5 日間培養後の菌数を、精製水中における一般細菌数とした。

日局精製水 8 試料のうち製造後 3 カ月を経過しても一般細菌が検出されない試料が 2 検体認められた。一方、他の 6 試料では、3 つの試験方法間で認められる一般細菌が 1 カ月後で 4.0×10^0 — 1.2×10^5 CFU/ml、2 カ月後で 7.0×10^0 — 9.3×10^4 CFU/ml、

3 カ月後で、 2.0×10^0 — 4.3×10^4 CFU/ml の範囲で検出された。

製造直後において細菌が認められた試料では、日数の経過と共に細菌の増殖が認められ、一定の最大ピークを示した後、菌数が徐々に減少する傾向が認められた。また、一定の最大ピークを示すまでの期間、最大値は各試料間で異なっていた。

第 11 改正日本薬局方解説書⁵⁾では、精製水は、製造直後ほとんど無菌である場合でも、約 15℃ で 1 週間放置するとき、かなり増殖し、2 週間後では 1 ml 中数千個に達する例が多いと述べられている。また、日本製薬工業協会の GMP 委員会⁷⁾は非無菌製剤の微生物汚染防止マニュアルの中で、精製水は脱イオン直後で生菌数が 500 CFU/ml、保存状態で 4000 CFU/ml と述べている。今回の著者らの検討結果でも、数千個以上の菌を認める精製水が 5 試料認められた。

佐藤ら³⁾は日局精製水の微生物汚染について検討しており、分離した 8 株の細菌はいずれもオキシダーゼ陽性のブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌で、*Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* 及び *P. stutzeri* であろうと推定している。今回の著者らの日局精製水の検討より、調製後 1 ケ月以上を経過した精製水に認められる一般細菌は大部分がグラム陰性桿菌であり、それらはいずれも *Shigella* sp.であることを同定した。

このことより、精製水中に存在する一般細菌は、時間の経過と共に、グラム陰性桿菌が優勢菌となることが示唆された。

精製水中の菌数の増加と精製水中の TOC 量の関係について検討したところ、今回の検討結果では両者の間に若干の正の相関関係が認められた。すなわち、TOC 量が検出限度以下でほとんど認められな

かった A 社の精製水は製造後 3 カ月後を経過しても菌が検出されなかった。精製水の TOC 量が 0 であり、また、製造直後の菌数も検出されないため、3 カ月経過したときにも菌が検出されなかったと考えられる。TOC 量が 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と極端に少ない E 社の精製水では、製造直後でわずかに菌が認められたが、菌の増殖に必要な有機物量が他社の精製水に比べ極端に少なく、したがって、製造後 3 カ月を経過しても極端な菌の増殖が認められなかったものと考えられる。また、B 社の精製水は TOC 量が 0.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と比較的多く、菌が増殖する可能性が考えら

れたが、出荷前に熱処理を実施しているため、細菌が存在し得なく、したがって、細菌の増殖も起こらなかったものと考えられる。なお、日局精製水の pH と精製水中の一般細菌数の増加の間には相関性は認められなかった。

以上のことより、日局精製水の微生物学的品質確保に際しては、精製水製造時に菌が混入しないように注意することに加え加熱処理などにより、精製水中の菌の増殖を防止すること、あるいは TOC 量を指標とする評価法の開発などが必要であると考えられる。

引用文献

- 1) 石関忠一, 月刊薬事, **24**, 1311, (1982).
- 2) 西田克治, 池田美彦, 西井久二, 杉岡信幸, 池田久三, 水野政直, 日本病院薬剤師会誌, **21**, 717, (1985).
- 3) 佐藤和朗, 服部裕次, 小川敦子, 病院薬学, **8**, 364, (1982).
- 4) 日本公定書協会編, “第 10 改正日本薬局方解説書,” 広川書店, 東京, 1981, pp.A-43, D-468—470.
- 5) 日本公定書協会編, “第 11 改正日本薬局方解説書,” 広川書店, 東京, 1986, pp.B-307—321, D-493—496.
- 6) 厚生省薬務局監視指導課監修, “注射用水の製造に関するバリデーション,” 薬業時報社, 東京, 1988, pp.194—196,
- 7) 日本製薬工業協会 GMP 委員会編, “非無菌製剤の微生物汚染防止マニュアル,” 1976, pp.24—25.