

ニトロプルシドナトリウム注射薬の無菌試験法

藤 下 修 *

Sterility Tests of Sodium Nitroprusside Injections

Osamu Fujishita *

Received October 30, 2009

Abstract

The sodium nitroprusside (SNP) injection produced cloudy appearance when mixed with the thioglycollate medium for sterility test. This might induce a false conclusion that this is due to a reaction involving the bacteria in the SNP injection. The precipitate was found to contain Fe, Zn, and Cu by energy micro analyzer of X-ray and inductively coupled plasma mass spectrometer, suggesting that the precipitate includes the reaction products, $[M^{2+}Fe(CN)_5NO]$, between the SNP injection and the bivalent metal ions $[M^{2+}]$ in the medium. Therefore, a filtration method may be appropriate for the sterility test of SNP injection.

緒 言

ニトロプルシドナトリウム（以下、SNP）には、血管拡張による強力な血圧下降作用があり、その注射薬（以下、SNP注）は、高血圧クライゼに対する緊急降圧や、麻酔時の低血圧維持などに用いられている。SNPは、その化学式： $Na_2 [Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$ が示すようにCNを含んでいるため、加熱による滅菌では、毒性の強いシアンを発生する恐れがある。従って、SNP注は通常、無菌操作法および濾過滅菌法により調製されている^{1, 2)}。SNP注は注射剤であるため、無菌試験法によって無菌性を証明しなければならない³⁾。しかし著者は、日本薬局方（以下、日局）の通常は無菌試験法ではSNP注の無菌性を容易に証明できない現象が起こることを経験した。そこで、SNP注の無菌性を証明すると共に、本剤に適した無菌試験法の検討を行った。

* 薬 学 部
Faculty of Pharmaceutical Sciences

方 法

1. 無菌性の証明

1) 1%SNP注5mLの調製

次のような行程でSNP注の調製を行なった。i) SNP原末（和光純薬）3.405 gを無菌室にて秤量した。ii) 無菌室に設置したクリーンベンチ内で、滅菌したメスシリンダーにSNP原末を入れ、あらかじめ調製しておいたクエン酸ナトリウム（和光純薬）の2.5%滅菌溶液を加え全量300mLとし、SNPを溶解させた。iii) SNP溶液を滅菌したフラスコに移し、滅菌シリンジを用いて、孔径0.22 μ mのメンブランフィルター（ミリポア製マイレックスGSフィルター）で濾過しながら、滅菌した褐色アンプルに5 mLずつ無菌的に充填後、ただちにアンプルシーラーでアンプルを溶封した。

2) 対照液の調製

1) の ii) および iii) と全く同様の操作によって、SNP原末の入っていない、溶媒のみの2.5%クエン酸ナトリウム注射液を調製し、陰性（以下、-）の対照液とした。一方、ビオフェルミンR（ビオフェルミン製薬）1 gを注射用水（大塚製薬）20mLに溶解し、その上澄液を陽性（以下、+）の対照液とした。なお、1 gのビオフェルミンRには*Streptococcus faecalis* 約 1×10^8 個が含まれている⁴⁾。

3) 無菌試験

日局の無菌試験法に準じ、無菌試験用のチオグリコール酸培地（I）（栄研化学および日本製薬）を用いて液状チオグリコール酸培地（I）の調製を行った。その培地15mLにSNP注1 mLを加え、32.5°Cで14日間培養した。同様に、（-）および（+）の対照液の各1 mLをそれぞれの培地15mLに加え培養した。（N = 各5）

4) 固形培地法

日局の無菌試験用培地は液状であり、細菌のコロニーの確認が困難であるため、液状チオグリコール酸培地（I）に寒天（和光純薬）を1.5%になるように加え、直径90mmの滅菌シャーレ（テルモ製）に入れて固形培地を作成した。それにSNP注1 mLを添加して32.5°Cで14日間培養し、コロニーの有無を検討した。同様に、（-）および（+）の対照液の各1 mLをそれぞれの培地15mLに加え培養した。（N = 各5）

5) メンブランフィルター法

SNP注5 mLをクリーンベンチ内で直径47mm、孔径0.22 μ mのメンブランフィルター（ミリポア製）でろ過し、注射用水（大塚製薬）100mLで洗浄した後、濾過したフィルターを無菌試験用の液状チオグリコール酸培地（I）15mLに加え、32.5°Cで14日間培養した。同様に、（-）および（+）の対照液の各5 mLをそれぞれ濾過、洗浄し、そのフィルターを培養した。（N = 各5）

6) SNP注および対照液の高圧蒸気滅菌

前述のように、SNPは加熱によりシアンを発生する恐れがあるため、通常は加熱滅菌を行わないが、SNP注の無菌性を証明するため、無菌操作法で調製したSNP注を、さらに高圧蒸気滅菌法により115℃で30分間滅菌した。高圧蒸気滅菌を行なったSNP注1 mLを無菌試験用の液状チオグリコール酸培地（I）15mLに加え、32.5℃で14日間培養した。同様に、高圧蒸気滅菌した（-）および（+）の対照液の各5 mLをそれぞれの培地15mLに加え培養した。（N = 各5）

2. 濁り現象の原因調査

- 1) チオグリコール酸培地（I）の成分、すなわち、L-シスチン（和光純薬）、寒天（和光純薬）、塩化ナトリウム（和光純薬）、ブドウ糖（中外製薬）、酵母エキス（日本製薬）、カゼイン製ペプトン（日本製薬）、チオグリコール酸ナトリウム（和光純薬）、レザズリン（和光純薬）の各溶液15mLとSNP注1 mLとを混和し、どの成分によって濁り現象が生じるかを検討した。各溶液の濃度はチオグリコール酸培地（I）に含まれる各成分の濃度と同じにした。
- 2) 無菌試験によって生じたSNP注とチオグリコール酸培地（I）からなる混濁液を通常の濾紙で濾過し、その沈殿物をX線分析装置（E-MAX：堀場製）、および蛍光X線分析装置（理学電機ウルトラトレースシステム）により分析した。また沈殿物を加熱およびアルカリ処理により水溶液とし、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS：横河電機PMS2000）により分析した。

表1 各試料の培養結果

	チオグリコール酸 液状培地	チオグリコール酸 固形培地	メンブラン フィルター法
1% SNP 注	(+)	-	-
2.5% クエン酸 Na 注	-	-	-
5% ビオフェルミン上澄液	+	+	+
（高圧蒸気滅菌後）			
1% SNP 注	(+)	-	-
2.5% クエン酸 Na 注	-	-	-
5% ビオフェルミン上澄液	-	-	-

+：菌の発育あり（陽性）、-：菌の発育なし（陰性）、（+）：濁り現象

*）2.5% クエン酸 Na 注：-の対照液、5% ビオフェルミン上澄液：+の対照液

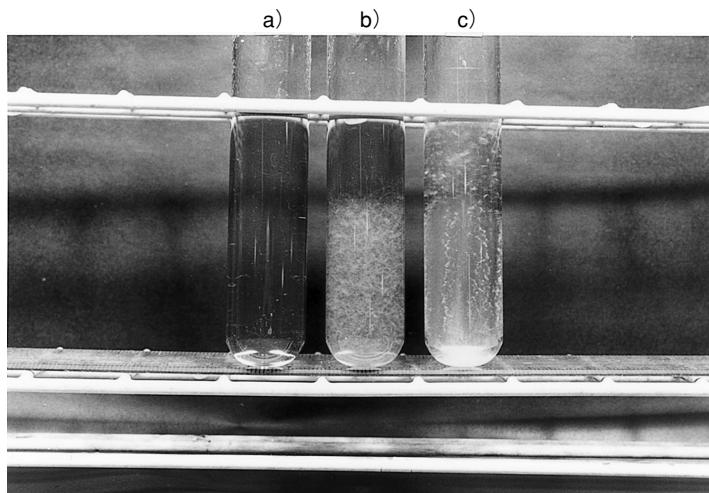


図1 チオグリコール酸培地中のSNP注による濁り現象

a) : 2.5% クエン酸Na注 (−の対照液), b) : 1% SNP注,
c) : 5% ビオフェルミン上澄液 (+の対照液)

結果および考察

実験結果をまとめると、表1のようになる。SNP注は、通常の無菌試験では濁り現象を生じ(図1 b)、さらに高圧蒸気滅菌した後でも濁り現象を生じた。しかし、メンブランフィルター法で細菌を濾過捕集する方法では濁り現象は見られず、細菌の発育は認められなかった。また、固形培地法でも細菌コロニーの形成は観察されなかった。従って、SNP注は無菌であるにもかかわらず、通常の無菌試験では濁り現象を生じ、あたかも細菌汚染が起きているような現象が起こることが確認された。

(−)の対照液である、SNP原末を加えていない溶媒である2.5%クエン酸Na液のみでは、通常の無菌試験でも、また高圧蒸気滅菌後も濁り現象は生じなかった(図1 a)。また、メンブランフィルター法でも、細菌の発育は認められず、固形培地法でも細菌コロニーの形成は観察されなかった。従って、SNP注の調製における無菌操作法には問題はなく、濁り現象が起こる原因は、SNPとチオグリコール酸培地の成分との関係にあることが推察された。

(+)の対照液である、ビオフェルミンRの上澄液では、通常の無菌試験で濁り現象が生じ(図1 c)、高圧蒸気滅菌後では濁り現象が生じなかった。また、メンブランフィルター法でも、細菌の発育は認められ、固形培地法でも細菌コロニーの形成が観察された。しかし、高圧蒸気滅菌後はいずれも細菌の発育やコロニーの形成は観察されなかった。従って、無菌試験用のチオグリコール酸培地、高圧蒸気滅菌法、およびメンブランフィルター法のいずれも問題はなく、固形培地法の有用性も確認された。

チオグリコール酸培地(I)の各成分のうち、L-シスチン、寒天、塩化ナトリウム、ブドウ糖、カゼイン製ペプトン、チオグリコール酸ナトリウム、レザズリンの各溶液はSNP注と混和しても、いずれも濁り現象は生じなかった。酵母エキスのみがSNP注との濁り現象を示した。

酵母エキス溶液とSNP注との沈殿物からは、X線分析装置および蛍光X線分析装置により、Fe、Znが検出された。また、ICP-MSでは、Fe、Znの他に、ごく微量のCuも検出された。これらの金属イオンはチオグリコール酸培地中では酵母エキスのみに含まれているものである⁵⁾。また、SNPはFe、Zn、Cuなど2価の金属陽イオン (M^{2+}) と不溶性の錯化合物 [$M^{2+}Fe(CN)_5NO$] を形成することが知られている⁶⁾。従って、濁り現象の原因はチオグリコール酸培地中の酵母エキスに含まれる金属イオンと考えられる。

日局の無菌試験法のうち、培地に試料を直接加える直接法は、SNP注のように培地の成分と化学反応を起こすような試料では、培地が混濁して判定が困難となる。日局では、そのような場合には新しい培地に移植して再度培養することとなっている³⁾。また、米国薬局方 (USP) もそのような場合には新しい培地に移植して再度培養することとなっているが、試料と培地成分との相互作用により生じた粒子により判定が困難な場合の評価方法については触れていない⁷⁾。

一方、メンブランフィルター法は通例、大容量の試料を試験に供するときや、製品が微生物発育阻止活性を示すときに用いる方法である³⁾。しかし、SNP注のように小容量でなおかつ微生物発育阻止物質を含まないものであっても、培地の成分と化学反応を起こすことが明らかである試料については、直接法で再度培養を繰り返す方法よりも、SNPと培地の成分とが直接接触することのないメンブランフィルター法によって無菌試験を行うのが適当であると考えられる。

また、筆者が考案した固形培地法は、コロニーの発育によって細菌の有無が容易に判定でき、また細菌数も確認できるので、SNP注など、無菌試験法の直接法では培地と反応して判定がつきにくいものの無菌試験法として有用性があると考えられる。

謝 辞

本研究に関してご指導・ご協力いただいた九州大学病院薬剤部、大石了三教授および関係の方々、X線分析、蛍光X線分析、誘導結合プラズマ質量分析にご協力いただいた九州大学特殊廃液処理施設ならびに中央分析センターの方々に感謝いたします。

また、米国薬局方 (USP) の無菌試験法に関して助言いただいた、NIH (米国立衛生研究所) のDr. Karim A. CalisおよびUSPの関係の方々に感謝いたします。

引用文献

- 1) Martindale The Extra Pharmacopoeia, 28Ed., The Pharmaceutical Press, London, 1982, pp.166-168.
- 2) 日本病院薬剤師会編, “病院薬局製剤第三版-特殊処方とその調製法”, 薬事日報社, 東京, 1990, pp. 64-66.
- 3) 日本公定書協会監修, “第十五改正日本薬局方解説書”, 廣川書店, 東京, 2006, pp.B-499-B-510.
- 4) フェルミンR, インタビューフォーム, ビオフェルミン製薬, 1997, p.4.
- 5) 粉末酵母エキスS, ミネラル分析値, 日本製薬社内資料.
- 6) O. R. Leeuwenkamp, W.P.Van Bennekom, E. J. Van Der Mark and A. Bult, *Pharm. Weekblad Sci. Ed.*, **6**, 129-140 (1984).
- 7) “The United States Pharmacopoeia” ,23 Revision,1995,pp.1686-1690.