

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」

|

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 の  
生物学的同等性試験

<社内資料>

試験薬：クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後)

対照薬：クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前)

ニプロ株式会社

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 の処方変更を行うにあたり、処方変更前後の製剤において殺菌効果に差がないことを確認するため、処方変更前の製剤を対照とした殺菌力試験を実施し、処方変更前後での製剤間の生物学的同等性を確認した。

1. 各試験結果

1. 1 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定試験

最小発育阻止濃度 (MIC) を *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* 及び *Serratia marcescens* の 6 菌株を用いて、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0、100、200 及び 400µg/mL の 11 段階の濃度で測定を実施した。各試験菌株の測定結果を表 1 及び 2 に示した。クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後) 及びクロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前) の最小発育阻止濃度 (MIC) は、それぞれの菌株において同じ値を示し、差は認められなかった。

表 1 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定結果 (1 回目)

試験菌株	最小発育阻止濃度 (MIC) ※ : µg/mL	
	クロルヘキシジン グルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後)	クロルヘキシジン グルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.0	25.0
<i>Proteus vulgaris</i>	25.0	25.0
<i>Escherichia coli</i>	3.12	3.12
<i>Enterobacter cloacae</i>	25.0	25.0
<i>Serratia marcescens</i>	50.0	50.0

※ クロルヘキシジングルコン酸塩としての濃度

表 2 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定結果 (2 回目)

試験菌株	最小発育阻止濃度 (MIC) ※ : µg/mL	
	クロルヘキシジン グルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後)	クロルヘキシジン グルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.78	0.78
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.0	25.0
<i>Proteus vulgaris</i>	25.0	25.0
<i>Escherichia coli</i>	3.12	3.12
<i>Enterobacter cloacae</i>	12.5	12.5
<i>Serratia marcescens</i>	50.0	50.0

※ クロルヘキシジングルコン酸塩としての濃度

1. 2 フェノール係数測定試験

最小発育阻止濃度 (MIC) 測定試験においてクロルヘキシジングルコン酸塩に最も抵抗性を示した *Serratia marcescens* を用いて測定した。測定結果を表 3 に示した。

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後) 及びクロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前) のフェノール係数は同じ値を示し、差は認められなかった。

表 3 フェノール係数算出結果 (*Serratia marcescens*)

クロルヘキシジングルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更後)	クロルヘキシジングルコン酸塩 消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前)
1.6	1.6

### 1. 3 Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度推定試験

最小発育阻止濃度（MIC）測定試験においてクロルヘキシジングルコン酸塩に最も抵抗性を示した *Serratia marcescens* を用いて測定した。3 回の試験の測定結果を表 4 に示した。クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」（処方変更後）及びクロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」（処方変更前）の Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度は同じ値を示し、差は認められなかった。

表 4 Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度推定試験結果

繰返し回数	推定有効濃度（w/v%）			
	クロルヘキシジングルコン 酸塩消毒用液 5% 「NP」 （処方変更後）		クロルヘキシジングルコン 酸塩消毒用液 5% 「NP」 （処方変更前）	
	clean な状態	dirty な状態	clean な状態	dirty な状態
1 回目	0.06	0.60	0.06	0.60
2 回目	0.06	0.60	0.06	0.60
3 回目	0.06	0.60	0.06	0.60

### 2. 結論

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 の処方変更前後の製剤において最小発育阻止濃度（MIC）測定試験、フェノール係数測定試験及び Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度推定試験を実施した結果、3 試験において、処方変更前の製剤と処方変更後の製剤に差は認められず、生物学的同等性（殺菌力）が確認された。

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」

|

クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 の  
生物学的同等性試験

< 社内資料 >

試験薬：クロルヘキシジングルコン酸塩消毒用液 5% 「NP」 (処方変更前)

対照薬：先発品

当資料は大阪府公衆衛生研究所 薬事指導部の協力のもと菱山製薬株式会社  
(現 ニプロファーマ株式会社) 研究開発部が実施した試験の結果に基づき作成した。

ニプロ株式会社

試験は、外用殺菌消毒剤である両剤の生物学的同等性を証明するために、特定の菌種を選定した *in vitro* 試験及び手指に存在する細菌を対照とし実際の手指を用いた *in vivo* 試験の両方法で行った。

### 1. *in vitro* 試験による生物学的同等性試験

試験は、最小発育阻止濃度の測定、フェノール係数の測定、Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度の測定の 3 方法で行った。

この 3 方法を採用したのは、すでに英国の公的機関で採用されている方法であり、殺菌消毒剤の同等性試験を行うのにふさわしい方法であると考えられるためである。

試験を行うに当たり、まず初めに手指の優勢菌である *Staphylococcus aureus* を含め、最近問題となっている院内感染起因菌（日和見感染菌）のうち、きわめて代表的な下記の 6 菌株を選定した。

*Pseudomonas aeruginosa* IFO 13275

*Proteus vulgaris* IFO 3988

*Escherichia coli* IFO 3806

*Staphylococcus aureus* IFO 12732

*Enterobacter cloacae* IFO 13595

*Serratia marcescens* IFO 12498

#### (1) 最小発育阻止濃度（MIC）の測定

供試菌として上記の 6 菌株を用い、日本化学療法学会の標準法である寒天平板希釈法<sup>1)</sup>に従って測定した結果、表 1 のとおり 6 菌株に対して試験薬及び対照薬とも同じ最小発育阻止濃度を示した。

表 1 MIC

	MIC (µg/mL) ※	
	試験薬	対照薬
<i>P. aeruginosa</i> IFO 13275	25	25
<i>P. vulgaris</i> IFO 3988	100	100
<i>E. coli</i> IFO 3806	1.56	1.56
<i>S. aureus</i> IFO 12732	1.56	1.56
<i>E. cloacae</i> IFO 13595	6.25	6.25
<i>S. marcescens</i> IFO 12498	50	50

※ クロルヘキシジングルコン酸塩として

(2) フェノール係数の測定

供試菌のうち、最もクロルヘキシジングルコン酸塩に対して抵抗性を示した *P. vulgaris* を用い、常法<sup>2)</sup> に従って、フェノール係数を測定したところ、試験薬及び対照薬ともフェノール係数 3 を示した。

(3) Kelsey-Sykes 改良法による有効濃度の測定

供試菌のうち、最もクロルヘキシジングルコン酸塩に対して抵抗性を示した *P. vulgaris* を用い、Kelsey-Sykes 法を一部改良した方法<sup>3)</sup> によって、清潔な状態及び不潔な状態での有効濃度を測定した。

その結果、試験薬及び対照薬とも、清潔な状態では 0.030w/v%、不潔な状態では 0.10w/v% が有効濃度となった。

以上の結果より、最小発育阻止濃度、フェノール係数、Kelsey-Sykes 法による有効濃度の測定において、試験薬と対照薬は同じ値を示し、in vitro 試験において両製剤が同等であることが証明された。

2. in vivo における生物学的同等性試験

in vitro 試験では、特定の細菌について 2 製剤の効力評価を行ったが、外用殺菌消毒剤の効果を評価する場合、実際に使用する部位での殺菌効果についても検討することが理想であり、本薬剤の場合、使用部位がおもに手指などの皮膚であるため、実際に人の手指を用いた in vivo 試験を同時に実施した。

外用殺菌消毒剤の in vivo 試験としては、現在、スタンプアガー法、ベースン法、グローブジュース法<sup>4) 5)</sup> 等があるが、今回は、その中で特に定量的な評価において優れており、FDA (米国食品医薬品局) が外科用手指消毒薬の有効性試験法として推奨しているグローブジュース法を一部改変した方法<sup>6)</sup> により生物学的同等性試験を行った。

グローブジュース法とは、試験薬剤により消毒を行った手指を手術用のゴム手袋をはめ、その中にサンプリング液に加えて手袋上部よりマッサージをし、手指の表面からサンプリング液に移行した細菌の数を測定するもので、今回は、被験者 8 名を 4 名ずつ 2 群に分け、さらに左右の手をそれぞれ独立した検体とし、1 群 8 検体の 2 × 2 型ラテン法<sup>7)</sup> で割付け、クロスオーバー法により試験を行った。

なお、同等性の判定は、測定した菌数の対数値をもとに、経口投与製剤と同様の統計解析<sup>7) ~ 9)</sup> をし、同等性の検定を行った。

統計解析の結果、試験薬と対照薬との消毒後手指菌数の対数値平均の差は 2.33% と対照薬の 20% 以内であり、分散分析においては、群又は持込み、時期、

薬剤間、被検手間及び被検手／群のすべてについて有意差は認められなかった。このことより、試験薬と対照薬が生物学的に同等であることが証明された。

また、実験精度において、検出力、最小検出差、信頼区間はすべて基準を満たしていることより、この実験法が同等性試験を行うのに適切な方法であったことがわかる。

参考として、消毒前及び消毒後の手指菌数の測定結果を表 2 に示す。

試験薬剤の皮膚消毒での最高使用濃度は、クロルヘキシジングルコン酸塩として 0.5w/v% であることより、両製剤とも蒸留水により 10 倍積し、クロルヘキシジングルコン酸塩として 0.5w/v% の濃度としたものを用いて試験を行った。

表 2 消毒処理前・処理後の手指菌数

被験者	消毒前		消毒後 (試験薬)		消毒後 (対照薬)	
	右手	左手	右手	左手	右手	左手
1	$3.42 \times 10^6$	$8.07 \times 10^6$	$1.64 \times 10^5$	$2.23 \times 10^5$	$4.56 \times 10^5$	$2.46 \times 10^5$
2	$1.10 \times 10^6$	$2.95 \times 10^6$	$4.26 \times 10^4$	$7.08 \times 10^4$	$1.36 \times 10^5$	$1.94 \times 10^5$
3	$3.69 \times 10^6$	$1.03 \times 10^7$	$5.91 \times 10^5$	$1.01 \times 10^6$	$4.76 \times 10^5$	$1.14 \times 10^5$
4	$1.97 \times 10^5$	$1.01 \times 10^5$	$6.93 \times 10^4$	$1.48 \times 10^4$	$7.71 \times 10^4$	$9.72 \times 10^4$
5	$7.35 \times 10^5$	$3.45 \times 10^6$	$7.80 \times 10^4$	$1.30 \times 10^5$	$3.06 \times 10^4$	$8.70 \times 10^4$
6	$5.61 \times 10^5$	$4.02 \times 10^5$	$6.81 \times 10^4$	$2.56 \times 10^5$	$6.75 \times 10^4$	$6.75 \times 10^4$
7	$3.57 \times 10^5$	$3.66 \times 10^5$	$9.24 \times 10^3$	$4.26 \times 10^5$	$6.78 \times 10^4$	$1.44 \times 10^5$
8	$1.00 \times 10^6$	$3.12 \times 10^4$	$1.10 \times 10^4$	$1.93 \times 10^4$	$8.91 \times 10^4$	$6.06 \times 10^4$

### 3. 結果

以上の結果から、in vitro 試験により、手指優勢菌である *S. aureus* を含めた特定の菌株に対しての試験薬と対照薬の同等性が証明され、また、in vivo 試験により、実際に使用する条件下での両製剤の同等性が証明された。

文献

- 1) 五島 瑳智子 : *CHEMOTHERAPY*, 29, 76-79 (1981)
- 2) 厚生省編集 : 衛生検査指針 [I], 38-48 (1952)
- 3) J. C. KELSEY et al. : *The Pharmaceutical Journal*, 30,  
528-530 (1974)
- 4) *Federal Register*, 39, 33137-33139 (1974)
- 5) *Federal Register*, 43, 1242-1243 (1978)
- 6) 山崎 浩史 他 : 防菌防黴, 16, 443-448 (1988)
- 7) 江島 昭 他 : 医薬品研究, 13, 1106 (1982)
- 8) 江島 昭 他 : 医薬品研究, 13, 1267 (1987)
- 9) 江島 昭 他 : 医薬品研究, 15, 123 (1984)