

乳酸菌製剤の圧着分包による生菌数への影響

加藤一哉¹，近藤誠一¹，一色恭徳¹，片山 怜¹，舟越亮寛²，
前野拓也³，福田太仁夫⁴，夏目秀視^{*1}

城西大学薬学部¹，大船中央病院薬剤部²
厚生中央病院薬剤部³，川口市立医療センター薬剤部⁴

**Effect of Pressure-Heat Sealing Used in Making Discrete Powder
Preparations of Live Lactic Acid Bacteria**

Kazuya Kato¹, Seiichi Kondo¹, Yasunori Isshiki¹, Rei Katayama¹, Ryokan Funakosi²,
Takuya Maeno³, Tanio Fukuda⁴ and Hideshi Natsume^{*1}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University¹

Department of Pharmacy, Ohuna Chuo General Hospital²

Department of Pharmacy, Kosei Chuo General Hospital³

Department of Pharmacy, Kawaguchi Municipal Medical Center⁴

[Received March 23, 2007
Accepted November 11, 2007]

We investigated the numbers of live bacteria in the lactic acid bacteria containing powder products Lac-B[®] granular powder (*Bifidobacterium*), Lebennin[®](Antibiotics-resistant lactic acid bacteria), and Biolactis[®] powder (*Lactobacillus casei*) before and after applying the pressure-heat sealing used in making discrete preparations of these products. The numbers of live lactic bacteria in all preparations were significantly reduced by pressure-heat sealing with a drop to 1/4 of that stated in the package insert for Lac-B[®] granular powder. In the case of Lebennin[®] and Biolactis[®] powder, the bacteria numbers dropped to 1/10 and 1/70 of those stated, respectively. It is thus unlikely that the number of live bacteria stated in the package inserts would be achieved for these products and one could not expect the clinical effects of the bacteria to be fully manifested when discrete preparations of the latter two products were orally administered.

In order to clarify whether the numbers of live lactic acid bacteria were reduced by heat-treatment during the sealing of the package, all products were maintained at 115 °C for 5 seconds in a thermostat. The results were almost identical to those obtained for pressure-heat sealing, suggesting that the decreases in numbers of the live bacteria in discrete preparations was mainly due to the heat-treatment involved in pressure-heat sealing.

In conclusion, we propose that when making discrete preparations of lactic acid bacteria products, in particular Lebennin[®] and Biolactis[®] powder, no heating should be used in the sealing process.

Key words pressure-heat sealing, live lactic bacteria product, number of live bacteria, storage conditions

緒 言

乳酸菌群の細菌を主成分とする乳酸菌製剤は、生きた細菌が腸管内に達し、腸内細菌のバランスを整えることにより整腸作用を現す^{1,2)}。一方、製剤中または服用後において死滅した細菌は腸内に存在する有害物質を吸着し、体外に排出する作用を持つと考えられており、必ずしも無駄になるわけではない²⁾。しかしながら、生菌に

よる整腸作用を期待する場合、製剤中に存在する生菌数が薬効を左右する。

一般に乳酸菌製剤であるビオラクチス散[®]((株)ヤクルト)は乳幼児に対して少量で処方するが、分包品しか扱っていない場合、分包品を再分包する必要がある。また、同じく乳酸菌製剤であるラックビー微粒[®](興和(株))、レベニン[®](わかもと製薬(株))は分包品で対処できない量の処方が出た場合、同様に再分包する。加えてバラ包装の場合は処方に応じて適量分包する。圧着による分包時に

* 埼玉県坂戸市けやき台1111, Keyakidai, Sakado-shi, Saitama, 350 0295 Japan

は、圧着部を 115 ℃ 前後で加熱するため、熱により生菌数が減少し、薬効に大きく影響する可能性がある。

また、これら乳酸菌製剤は分包品、圧着分包品ともに薬剤部から病棟へ払い出された後、使用前まで保管されるが、場合によっては温度、湿度の影響を受ける可能性がある。高橋らは、ラックビー微粒[®]が調剤されてから患者が服用するまでの過程における生菌の死滅条件を評価し、4~5 ℃ の低温で保存し、さらに吸湿を避けて保存することで 10 日間は生菌数に影響がないと述べている³⁾。ラックビー微粒[®]、レベニン[®]は室温保存となっているが、ビオラクチス散[®]は冷所保存が必要な製剤であり、室温保存下では生菌数に影響することが予想される。

そこで、本研究では、ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]を圧着分包した時の生菌数に対する熱の影響を検討するとともに、ビオラクチス散[®]の室温保存下における生菌数への影響について評価した。

材料および実験

1. 材料

ラックビー微粒[®](*Bifidobacterium spp.*; 偏性嫌気性菌)、レベニン[®](*Bifidobacterium infantis*; 偏性嫌気性菌)、*Lactobacillus acidophilus*; 通性嫌気性菌、*Streptococcus faecalis*; 通性嫌気性菌) およびビオラクチス散[®](*Lactobacillus casei*; 通性嫌気性菌)、はそれぞれ興和(株)、わかもと製薬(株)、および(株)ヤクルトより購入した。BL 寒天培地は日水製薬(株)より購入した。リン酸二水素カリウム(KH₂PO₄、特級)、リン酸水素二ナトリウム無水和物(Na₂HPO₄、特級)、L-cysteine、Tween 80 は和光純薬工業(株)から購入した。Agar は SIGMA 社(St. Louis, MO, USA)より購入した。アネロパック[®]・ケンキは三菱ガス化学(株)より購入した。

2. 圧着分包による乳酸菌製剤の生菌数への影響

圧着分包前後におけるラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]の各製剤中に含まれる生菌数をコロニーカウント法により調べ、比較した。

1) 分包方法

各乳酸菌製剤(1包、1.0 g)を開封し、分包機(TOSHO 製、OMP-90-AS)の分包量を 3 分の 1(約 0.333 g)に設定した後、圧着分包した。なお、圧着部の温度は 115 ℃ であった。

2) 培地の選択

今回使用した製剤は、*Bifidobacterium* 属、*Lactobacillus* 属、*Streptococcus* 属の通性および偏性嫌気性菌を含有するため、培地として嫌気性菌特に乳酸菌の分離、鑑別の基礎培地として汎用されている BL 寒天培地を選択した。

3) 培地の調製

3 L のビーカーに BL 寒天培地 58 g を入れ、そこへ蒸留水 1000 mL を加え、攪拌した。その後、115 ℃ で 20 分間高圧蒸気滅菌した。滅菌後ただちに滅菌シャーレに分注して平板培地とした。調製した平板培地は室温で 1 時間放冷後、実験に供した。

4) 乳酸菌製剤の希釀

乳酸菌製剤は通性もしくは偏性嫌気性細菌を含有するため、嫌気性菌用の希釀液を調製した。希釀液を、ビーカーにリン酸二水素カリウム 4.5 g、リン酸水素二ナトリウム水和物 6.0 g、L-cysteine 0.5 g、Tween 80 0.5 g、Agar 1.0 g をとり、全量を 1 L になるよう蒸留水を加え調製した。この希釀液を用いて、製剤中の生菌数を適切な濃度に希釀した。すなわち、製剤を 0.1 g とり、1 mL の嫌気性菌用希釀液に懸濁し、これをサンプル原液とした。この溶液から 10~10⁸ 倍まで希釀した測定用希釀液を調製し、それぞれの測定用希釀液 0.1 mL を、コンラージ棒を用い BL 寒天平板培地に塗抹した。

5) 培養および判定

嫌気性条件とするために、アネロパック[®]・ケンキ(三菱ガス化学(株))を用いた。このパックに 4)で調製した培地を入れ、37 ℃ に設定した恒温器(F 0-30、東京硝子機器(株))中で一晩培養した。培養後、平板培地 1 枚あたりに 10 から数 100 個のコロニーが形成されたものを選びコロニーを計数した。得られた計数値から、本品 1.0 g 当たりの生菌数(Colony Forming Unit, CFU/g 製剤)を次式によって算出した。

$$N = aX$$

N : おのののの乳酸菌製剤 1.0 g あたりの生菌数

a : コロニー計測値

X : 希釀倍数

6) 統計処理

統計解析を対応のある t 検定にて実行した。p < 0.01 を有意であると判定した。

3. 乳酸菌製剤の生菌数に対する熱の影響

圧着時にかかる熱が生菌数を減少させる主な要因であるか評価するため、加熱試験を行った。分包前の各製剤を恒温器に入れ、115 ℃ で 5 秒間、熱した。その後 1. と同様の手順で生菌数を算出した。加熱を 5 秒間としたのは、分包機による圧着時にかかる熱が約 5 秒程度であるためである。

4. ビオラクチス[®]の室温保存下における生菌数への影響

冷所保存が必要なビオラクチス散[®]の室温保存下における生菌数への影響を評価した。ビオラクチス散[®]をキャビネット保管庫で 1, 4, 7 日間室温保存した。その

後、2.と同様の手順で生菌数を算出した。

結 果

表1に添付文書中に記載されている各製剤中の生菌数、圧着分包前後の生菌数および恒温器中で115, 5分間の熱処理をした時の各乳酸菌製剤の生菌数を示す。添付文書中に記載されている各製剤中の生菌数と圧着分包前の生菌数を比較した結果、ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]のいずれも大きな変化はみられなかった。よって、圧着分包前の各製剤は、添付文書に記載されている生菌数を保証していると考えられた。ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]における圧着分包後の生菌数は、それぞれ 8.5×10^7 (cfu/g), 5.5×10^7 (cfu/g), 8.0×10^7 (cfu/g)であり、すべての製剤で生菌数は有意に減少した。

恒温器中で115, 5分間の熱処理を行うと、いずれの製剤も含有する生菌数が減少し、ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]の生菌数はそれぞれ 1.0×10^8 (cfu/g), 6.5×10^7 (cfu/g), 1.0×10^8 (cfu/g)であった。この熱処理による生菌数の減少は、どの製剤も圧着分包

後の生菌数に非常に近く、有意差は認められなかった。

冷所保存が必要なビオラクチス散[®]を室温保存した場合の生菌数の経時的变化を図1に示す。ビオラクチス散[®]の生菌数は室温保存7日目までわずかに減少傾向にあったが、大幅な生菌数の減少はみられず、室温保管前の生菌数と有意差はなかった。

考 察

ビフィズス菌(*Bifidobacterium* 属)製剤の保存温度と防湿に関しては、これまで比較的詳細に検討されている³⁻⁵。菌の死滅速度はアレニウス式に従い、高温になるほどその速度は速い。37℃の保存温度では1日で半減する。また、相対湿度の上昇、特に50%前後で生菌数は指数関数的に減少する。このように、乳酸菌製剤の保存においては温度と湿度管理に関して注意が喚起されている。緒言でも述べたように、乳幼児への少量投与やバラ包装の製剤の圧着分包は多くの病院や薬局で日常的に行われてあり、比較的の頻度も高い。用いられる分包機は分包する際、加熱圧着するものが多く、そのために乳酸菌製剤は短時間高温にさらされる。しかしながら、こ

表1. 乳酸菌製剤の添付文書記載の生菌数、圧着分包前後の生菌数および加熱試験後の生菌数

	添付文書に記載されている純生菌数 (CFU/g)	圧着分包前の生菌数 (CFU/g) 平均値±S.E., n=4	圧着分包後の生菌数 (CFU/g) 平均値±S.E., n=4	加熱試験後生菌数 (CFU/g) 平均値±S.E., n=4
ラックビー微粒 [®]	1×10^8	$3.3 \times 10^7 \pm 0.3 \times 10^8$	$8.5 \times 10^7 \pm 0.5 \times 10^8$ *	$1.0 \times 10^8 \pm 2.0 \times 10^7$ ***, ***
レベニン [®]	$1.2 \times 10^7 \sim 9 \times 10^8$	$5.8 \times 10^7 \pm 0.9 \times 10^8$	$5.5 \times 10^7 \pm 1.7 \times 10^8$ *	$6.5 \times 10^7 \pm 0.5 \times 10^8$ ***, ***
ビオラクチス散 [®]	$1.5 \times 10^9 \sim 2.1 \times 10^{10}$	$5.3 \times 10^9 \pm 0.6 \times 10^9$	$8.0 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^8$ *	$1.0 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$ ***, ***

* 圧着分包前後の各乳酸菌製剤における生菌数の有意差 ($p < 0.01$)

** 圧着分包前と加熱試験後の各乳酸菌製剤における生菌数の有意差 ($p < 0.05$)

*** 圧着分包後と加熱試験後の各乳酸菌製剤における生菌数の有意差 (not significant)

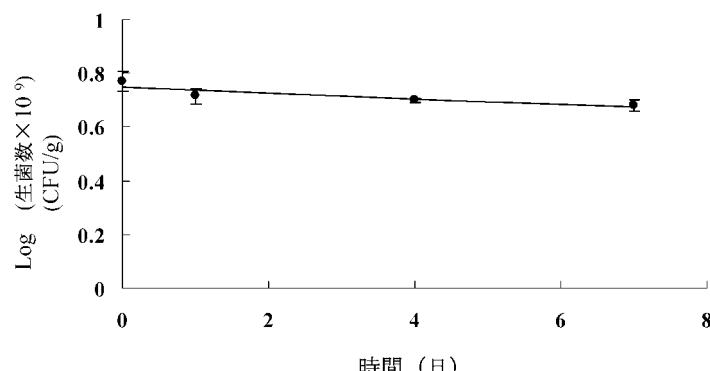


図1. 室温保存した時のビオラクチス[®]中の生菌数

の経時変化

Data represent the mean ± S.E. (n = 3 ~ 4)

これまで圧着時の熱処理が乳酸菌の生菌数に影響するかどうかは検討されていない。また、病棟へ払い出した後、または調剤薬局においては患者が持ち帰った後、たとえ注意喚起を行っても室温で保管することは十分考えられる。そこで、ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]の3種の乳酸菌製剤を圧着分包した時の生菌数への影響と、冷所保存となっているビオラクチス散[®]を室温保存した時の生菌数への影響を検討した。

ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]のいずれも圧着により生菌数が有意に減少した(表1, p < 0.01)。しかしながら、ラックビー微粒[®]の場合、その減少は4分の1程度であり、添付文書記載の保証生菌数から著しいずれはなかった。一方、レベニン[®]とビオラクチス散[®]の場合、生菌数の減少はそれぞれ10分の1と70分の1となり、大幅な減少がみられた。今回用いたレベニン[®]では保証生菌数の下限を超えることはなかったが、菌の培養条件や使用期限に近い等の理由で生菌数が少ない場合には、圧着により保証生菌数を下回る可能性がある。ビオラクチス散[®]は圧着により保証生菌数の下限を大幅に下回った。以上をまとめると、レベニン[®]やビオラクチス散[®]を分包機で圧着分包する場合、生菌数を保証できないと考えられる。

生菌数の減少が圧着時の熱によるものかどうかを調べた。恒温器中、115℃で5秒間これらの乳酸菌製剤を熱処理すると、どの製剤も有意に生菌数が減少した(表1)。その減少の程度は、表1に示した圧着分包後のそれとほぼ等しく、減少した生菌数に有意差はなかった。この結果より、乳酸菌製剤の圧着分包時の生菌数の減少は圧着時にかかる熱が主な要因の一つであることが示唆された。

ラックビー微粒[®]、レベニン[®]、ビオラクチス散[®]の添付文書に記載されている効能・効果は、腸内細菌叢の異常による諸症状の改善となっている。示された臨床成績では、特に、下痢に対する効果は高く、どの製剤も75%以上の有効改善効果を示している。本検討結果から、ビオラクチス散[®]は圧着により保証生菌数の下限を大幅に下回り、レベニン[®]も場合によっては下回る可能性がある。各製薬メーカーに保証生菌数を下回った場合の臨床効果について問い合わせた結果、そのようなデータはないとの回答であった。今回、臨床的な検討は行っていないが、保証生菌数を下回る製剤の服用は、一般論的に添付文書記載の臨床成績を上回るとは考えにくく、臨床効果が減少する可能性が高い。生菌数の減少がどの程度まで臨床成績に影響するかは、大変興味の持たれるところと思われるが、レベニン[®]やビオラクチス散[®]の加熱圧着による分包は好ましくないと考えられる。

一方、今回試験した3種の製剤中にはそれぞれ異なった乳酸菌が含まれている。表1に示したように、ラックビー微粒[®]は主に *Bifidobacterium spp.*、ビオラクチス散[®]

は主に *Lactobacillus casei*、レベニン[®]は *Bifidobacterium infantis*、*Lactobacillus acidophilus*、*Streptococcus faecalis* の3種の混合物であり、圧着時の熱による生菌数の減少の程度は、乳酸菌の種別により異なることが推察される。これら3種の生菌数の減少程度はビオラクチス散[®] > レベニン[®] > ラックビー微粒[®]であり、熱処理は *Lactobacillus* 属に最も影響している可能性が高い。したがって、今回試験した製剤以外でも、特に *Lactobacillus* 属を含有する製剤では、圧着分包は極力避けた方がよいであろう。

先述したように、生菌を死滅させるもう一つの要因として湿度が考えられる。高橋らはビフィズス菌製剤の吸湿量が4.2%を超えると生菌の死滅速度が速くなると報告している³⁾。しかしながら、本報告で示唆した数秒単位の圧着分包化での生菌数の減少には、湿度はほとんど影響ないと考えられる。ただし、再分包後の保管状態によっては生菌数への影響が現れることが予想される。ラックビー微粒[®]やビオラクチス散[®]では、取り扱い上の注意として開封後の防湿が、レベニン[®]は貯法の項目に防湿とある。したがって、気密性の高い容器での保管は極めて重要となろう。

ラックビー微粒[®]やレベニン[®]は室温保存であるのに対し、ビオラクチス散[®]は冷所保存となっており、これら乳酸菌製剤を病棟に払い出した後、保存方法の違いに注意が必要である。しかし、同じ乳酸菌製剤であっても保存方法が異なる場合、注意は散漫になりやすい。また、患者が持ち帰った後、室温で保管してしまうことは考えられる。このように、保存方法の異なる製剤がある場合、病棟での指導および患者への服薬指導に関しては注意換気を徹底する必要がある。しかしながら、室温で保管してしまったり、冷室や冷蔵庫の故障に気付かなかつた場合に、病棟より「室温で放置した製剤は使用できるのか」、患者から「冷蔵庫に入れ忘れた製剤を飲むことができるのか」といった問い合わせがきたとき、どのように対応すべきであろうか。そこで、室温以下では生菌の死滅速度は遅い場合が多いため、室温保存下でのビオラクチス散[®]の生菌数の経時変化を調べた(図1)。その結果、生菌数は減少傾向にあるものの、保存1週間では有意な変化は認められなかった。したがって、上述のような問い合わせがきた場合、問い合わせ先の製剤の保管状況、特に温度と湿度の情報を聞き出し、それらの状況により対応を取るべきと考えられる。

以上結論として、レベニン[®]やビオラクチス散[®]は、加熱圧着による分包は極力避け、手間はかかるものの薬包紙で包み防湿性の高いチャック付きのポリエチレン袋などに入れ、気密性の高い容器に保管することが重要と考えられた。

引用文献

- 1) T. Yamagishi, T. Serikawa, R. Morita, K. Takahashi and S. Nishida, Effect of lactobacillus Product administration on the anaerobic intestinal flora of aged adults, *Japan. J. Microbiol.*, **18**, 211 216 (1974).
- 2) 梅崎良則, 乳酸菌と腸の科学, *Human Sci.*, **16**, 18 21 (2005).
- 3) 高橋文枝, 田村善蔵, 矢沢幸平, ピフィズス菌製剤の生菌を死滅させる要因, *病院薬学*, **6**, 50 54 (1980).
- 4) 高橋文枝, 田村善蔵, 矢沢幸平, ピフィズス菌製剤の分包紙および保存法の検討, *病院薬学*, **6**, 55 58 (1980).
- 5) V. Damjanovic and D. Radulovic, Predicting the stability, of freeze-dried *lacto-bacillus bifidus* by the accelerated test, *Cryobiology*, **5**, 101 104 (1968).