

- (4) 作業衣等の交換頻度、滅菌方法及び条件、更新等の管理基準を設定し管理すること。

<検討内容>

作業衣の交換頻度について、当初は洗濯・滅菌回数を管理する旨の記載を行っていたが、実際的に管理が難しいと意見があり本文からは削除した。管理基準の設定方法の例示として示す方向で検討する。

- (5) 作業者が無菌医薬品製造区域内で必要最低限のもの以外に触らないなどの行動制限に関する事項を規定し、定期的に教育訓練及び確認を行うこと。

#### 4 製造用水

- (1) 製造用水の管理基準は、用途に応じ適切な管理値を設定し、定期的に確認すること。  
なお、製造用水が管理基準に適合しない場合は、その原因を究明すると同時に、製品の品質に影響を及ぼすかどうかを評価し、その結果に基づき製造した製品に対して適切な処置を講じること。

- (2) 製造設備及び容器について、脱ピロジェン処理を行う工程がない場合は、薬剤が直接触れる部位への最終の洗浄用水は、エンドトキシン及び微生物に対して管理されたものを用いること。

また、脱ピロジェン処理を行う工程がある場合は、これらが設定したワーストケース以下であることを定期的に確認すること。

<検討内容>

設備や容器の洗浄に用いる水について、通常は蒸留水あるいはUF水を使用しているが、洗浄後に脱ピロジェン処理を行うかどうかに関わらず、洗浄用水についてエンドトキシンや微生物に対し留意している必要があるとの意見があった。

また、脱ピロジェン処理の有無により、洗浄用水に対するこれらの管理レベルは異なっても問題はないという意見があり、このような表現とした。

- (3) 超ろ過法により製した注射用水を薬液の調製に用いる場合は、微生物の膜透過性に注意するとともに、エンドトキシン等の除去性能を検証しておくこと。

## 5 原料・容器等

- (1) 原料・容器等の受入については、必要に応じ、微生物、パイロジェン等に関する基準を設け、受入試験を行うこと。

### <検討内容>

原料・容器等の受入時には、微生物、パイロジェン等に関する基準を設け管理すべきではないかという意見があった。原料については製剤中の割合により、また、容器についても脱パイロジェン処理の有無によりこれらの管理レベルが異なると考えられるので、必要に応じ行うこととして、このような表現とした。

- (2) 原料・容器等が保管中に品質劣化や微生物汚染を受けないよう保管管理基準を設定し管理すること。
- (3) サンプルング場所の空気清浄度レベルは、原則として秤量を行うエリアと同等以上とする。
- (4) サンプルング時において、原料と直接接触する器具類は、洗浄したものを使用し、必要に応じて滅菌したものを使用すること。

### <検討内容>

サンプルングに用いる器具について、必ずしも滅菌してある必要はないとの意見があり、必要に応じて行うこととした。

- (5) 容器、ゴム栓の洗浄については、その効果をチャレンジ試験等により検証しておくこと。
- (6) 容器、ゴム栓は、可能な限り事前に滅菌して使用するとともに、滅菌バリデーションを実施すること。  
なお、注射剤に使用する容器については、可能な限り脱パイロジェン処理を行うとともに、その効果をチャレンジ試験等により検証しておくこと。

## 6 構造設備・製造工程等

- (1) 製造設備・機器は、適切に設計され、あるいは選定されたものであり、適格に移動することが確認されたものであること。
- (2) 無菌性保証に影響を及ぼす接液部の配管等は、滅菌が可能な設備であること。

### <検討内容>

製造ライン中の配管の滅菌について、耐圧仕様でない既存の設備などはSIPを実施できないという意見があったが、その配管が無菌性保証に影響を与えるのであれば、滅菌されていなければならないと考え、このような内容を記載した。

- (3) 秤量、調製時において、原料と直接接触する器具類は、洗浄したものを使用し、必要に応じて滅菌したものを使用すること。

### <検討内容>

秤量、調製時に用いる器具について、必ずしも滅菌してある必要はないとの意見があり、必要に応じて行うこととした。

- (4) 薬液タンク、充填機、配管等の接液部について、その洗浄のバリデーションを行うこと。

### <検討内容>

当初は、エンドトキシンを洗浄対象の1つとして洗浄バリデーションを実施するよう記載していたが、実機にエンドトキシンを持ち込むことは、次製品への影響が懸念されるとの意見があり、削除した。

## 7 試験検査

- (1) 全ての試験検査は、適切に標準化され、精度管理されたものであること。また、必要な人員が確保されていること。
- (2) 無菌試験、培地充填試験等を行う試験者及び作業者については、教育訓練手順書等に教育訓練内容及び修得度の評価方法を明確に規定し、その能力の確保を行うこと。

なお、関係する学会や講習会等に積極的に参加し、試験者及び作業者の技術向上を図ること。

- (3) 試薬類の保管管理及び使用の基準を設定し管理を行うこと。
- (4) 培地の性能試験は、調製するごとに、市販培地にあつては原則、購入するロットごとにその性能を試験すること。
- (5) 試験結果が規格値に適合しない場合は、原因を調査し、明らかに試験自体に問題があったと認められた場合は再試験を行うことができる。なお、その場合は再試験結果の信頼性の確保に留意すること。

## 8 その他

他社製の無菌医薬品あるいは無菌医療用具等を組み合わせる場合は、当該製造（輸入販売）業者に対し、査察等を定期的に行い、その品質を確認すること。また、原料及び容器等の製造業者に対しても、必要に応じ査察等を行うこと。

## 第三章 各論

### 1 最終滅菌法により製造される医薬品

この項では、高圧蒸気滅菌により最終滅菌される医薬品についての管理内容を記載する。なお、高圧蒸気以外の湿熱滅菌等については、本項に準じた管理を行うこととする。

- (1) 高圧蒸気滅菌については、該当する手順書や製品標準書等に次のパラメーターの許容変動域を規定すること。なお、温度、圧力、時間については常時モニターすることが望ましい。
  - ア 熱履歴（通例、 $F_0$ 値で表示）
  - イ 温度
  - ウ 圧力
  - エ 時間
  - オ 製品の載荷形態／載荷密度
  - カ その他、必要な事項

また、高圧蒸気滅菌に必要なユーティリティ及び制御装置については、次の項目に

ついて、その品質及び精度を定めること。

- ア 使用する蒸気の品質
- イ 滅菌器の中に圧戻し等のため導入する空気の品質
- ウ 冷却のために用いる水の品質
- エ 温度制御装置の精度
- オ 圧力制御装置の精度
- カ 時間制御装置の精度
- キ その他

(2) 微生物除去のためのろ過フィルターを用いる場合については、作業後に（必要に応じて使用前にも）完全性試験を実施すること。なお、作業終了時又は品目切り替え時には、フィルターを交換すること。

(3) 充填機の配管等の分解洗浄・滅菌を行う場合、滅菌後の組立作業は可能な限りグレードAの環境下で行うこととし、その作業者に対し、組立作業時にラインを汚染しないよう教育訓練を徹底すること。

(4) オーバーキル法により滅菌する医薬品については、次のとおりとする。

- ア 製造区域等からの微生物モニタリングについては定期的に調査を行うことが望ましい。なお、得られた微生物については、必要に応じその熱抵抗性、性状等を調査すること。また、データベース化することが望ましい。

<検討内容>

オーバーキル法であれば、微生物モニタリングの重要性は低いですが、ある程度の管理は行っているべきと考えているので、このような内容を記載することとした。

また、得られた微生物についてはデータベース化することで、苦情等が発生した際に対処できるという事があり、記載することとした。

- イ 滅菌条件は、D値が1.0以上で菌数既知のB Iを用い、指標菌を12べき乗(12D)減少させるに等しい条件を設定すること。

(5) B I とバイオバーデン併用法により滅菌する医薬品については次のとおりとする。

- ア 滅菌条件は、広範なバイオバーデン調査によって得られた平均バイオバーデン数に3倍の標準偏差を加えたものを最大バイオバーデン数とみなし、目標とする無菌性保証水準を基に、B I を用いて滅菌条件を設定すること。

イ B Iとして用いる指標菌については、*Bacillus stearothermophilus*等熱抵抗性の強い菌種を選定し、バイオバーデン調査においてB Iの指標菌より熱抵抗性の強い菌種が検出された場合には、その菌を指標菌とすること。

なお、B Iを自社で作成する場合は、I S O基準（ISO-11138-1等）に従って適切に管理すること。

ウ 製造区域等からの環境微生物のモニタリングについては定期的に、バイオバーデンについては頻繁に調査を行うこと。なお、得られた微生物については、必要に応じその熱抵抗性、性状等を調査すること。また、データベース化することが望ましい。

(6) 絶対バイオバーデン法により滅菌する医薬品については次のとおりとする。

ア 滅菌条件の設定におけるバイオバーデン数については、広範なバイオバーデン調査によって得られた平均バイオバーデン数に3倍の標準偏差を加えたものを用いること。

イ 滅菌条件の設定に用いる指標菌については、被滅菌物や製造環境から検出された菌の中から、最も熱抵抗性の強い菌を使用すること。

なお、指標菌の選定にあつては、菌の熱抵抗性が製品により異なる場合があるので、十分留意し選定すること。

また、B Iを自社で作成する場合は、I S O基準（ISO-11138-1等）に従って適切に管理すること。

#### <検討内容>

B Iを自社で作成する場合についてはI S O基準に従って行うように記載していることに対し、B I E Rを購入しなければならないか質問があった。

B I E Rについては、県内で数社が所有しているが、所有していない会社からは、資金的に購入が難しいという意見があった。

ウ 製造区域等からの環境微生物のモニタリング及びバイオバーデンについては頻繁に調査を行うこと。なお、得られた微生物については、その熱抵抗性や性状等を調査すること。また、必要に応じデータベース化すること。

## 2 ろ過滅菌及び無菌操作法により製造される医薬品

この項では、ろ過滅菌により製造される医薬品を中心として、無菌操作法により製造される製剤についての管理内容を記載する。

(1) 無菌操作法により製造される医薬品については、培地充填試験により、その無菌性保証水準が $10^{-3}$ 以下であることを定期的に確認すること。

(2) 滅菌を目的とした滅菌用フィルターは、膜の有効ろ過面積当たり、適切な条件下で培養された*Brevundimonas diminuta*又はこれより小さい適当な菌を $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>以上をチャレンジして、2次側に無菌ろ液の得られることを自社又は外部委託等により確認すること。

### <検討内容>

ろ過滅菌工程におけるバクテリアチャレンジテストについては、ほとんどがフィルターメーカーに委託しており、このような表現となった。

(3) ろ過滅菌工程については、ろ過圧力、ろ過時間等について工程管理するとともに、ろ過フィルターについては、作業後に（必要に応じて使用前にも）完全性試験を実施すること。また、作業終了時又は品目切り替え時には、フィルターを交換すること。

(4) ろ過滅菌製剤における製造ラインのろ過滅菌後の配管、タンク、充填機等の接液部については滅菌バリデーションを行うこと。

(5) 充填機の配管等の分解洗浄・滅菌を行う場合、滅菌後の組立作業はグレードAの環境下で行うこととし、その作業員に対し、組立作業時にラインを汚染しないよう教育訓練を徹底すること。

(6) 製造区域等からの環境微生物のモニタリングは製剤特性を考慮し無菌性保証に必要な項目を選定して、グレードA及びBは作業シフト毎、グレードC及びDでは各事業所毎に適切と思われる頻度で測定し、必要に応じて頻度を見直すこと。なお、得られた微生物については、必要に応じ性状等の調査を行うとともに、データベース化すること。

<検討内容>

「作業シフト毎」の定義を明確にするべきであるという意見があったが、環境微生物の動態に変化を与える毎とQ&A等に記載することとした。

- (7) 凍結乾燥機を用いる場合について、凍結乾燥機の真空室のリークテストは年1回以上行うこと。なお、日常管理として作業後（必要に応じて作業前にも）のリーク量の確認を行うことが望ましい。

また、凍結乾燥機はEOGや高圧蒸気等により滅菌し、その効果を定期的に確認すること。これらの滅菌ができない場合は、ホルマリン燻蒸等により殺菌を行い、その効果を定期的に確認すること。

<検討内容>

凍結乾燥機のリークテストについては、日常で行う簡易なテストと定期的に行う厳密なテストの2種類があるので、このような表現とした。

なお、旧式の凍結乾燥機については、EOGや高圧蒸気による滅菌が不可能なものがあり、従前から凍結乾燥製剤を製造している業者には対応が難しいため、それに替わる当面の措置として、ホルマリン燻蒸等による殺菌について記載した。

- (8) 1つのロットを複数バッチに分割して凍結乾燥を行う場合については、無菌試験を当該バッチ毎に行うこと。

<検討内容>

1つのロットの製剤に対する無菌試験のサンプリング本数は、14局に記載されているが、1つのロットを複数バッチに分割して凍結乾燥を行う場合も見受けられるので、このような項目を記載した。

## ガイドライン運用上の注意

このガイドラインは、平成12年度及び平成13年度における医薬品品質確保対策事業として実施した「医薬品の無菌バリデーション検討会」の検討結果等に基づき、医薬品安



全対策の一環として、今後、埼玉県薬事行政や製薬企業が無菌性保証水準の向上を図るための基本的な考え方をまとめたものである。

このガイドラインは法的強制力は伴わないが、「無菌医薬品を使用する患者の立場」に立って、品質保証の観点からガイドラインの早期達成に向けて努めるものとする。

また、このガイドラインの内容について、科学水準の進歩や薬事関係法令の改正等（以下、「新基準」という。）により、新基準との間に矛盾が生じた場合は、新基準に準拠して運用するものとし、速やかに必要な改訂を行うものとする。

## 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

### 分担研究報告書

#### 非無菌水試料における New Method による微生物モニタリング

分担研究者 那須正夫

大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）

協力研究者 山口進康

大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）

**研究要旨：**非無菌水試料における New Method による微生物モニタリングの実用性を評価するため、市販されているミネラルウォーター中に存在する微生物の現存量および生理活性を、蛍光染色法によりシングルセルレベルで測定した。微生物現存量の測定には核酸結合性の染色剤 DAPI を、生理活性を有する微生物数の測定には細胞内エステラーゼ活性を評価可能な CFDA、ならびに呼吸している細胞のみを染色可能な CTC を用いた。

#### A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養が困難であることが、明らかとなってきている（添付資料1）。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量・解析するための手法が検討されている（添付資料2）<sup>1, 2), 3)</sup>。中でも蛍光染色法は結果が1、2時間以内に得られることから、環境微生物学分野を中心に広く用いられてきている。

そこで、新手法を用いた非無菌水試料に対する以下の微生物モニタリングの実用性について、考察した。

1. 蛍光染色法を用いた非無菌水試料中の微生物現存量測定。
2. 蛍光染色法による非無菌水試料中の生菌数測定。

#### B. 研究方法

1. 存在する微生物の現存量は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)<sup>4)</sup> を用い、蛍光顕微鏡下で直接計数した。DAPI は DNA に特異的に結合

する蛍光染色剤である。各試料に終濃度 1 µg/ml となるように DAPI を加え、約 5 分間染色した。染色された微生物をろ過によりポリカーボネート製フィルター上に捕集し、蛍光顕微鏡下で直接観察・計数した。

2. 生菌数（エステラーゼ活性）は 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA) を用い、蛍光顕微鏡下で直接計数した<sup>5)</sup>。6CFDA は細胞内のエステラーゼの作用により蛍光を発する染色剤である（添付資料3、4）。試料にリン酸緩衝液を添加後、終濃度 150 µg/ml となるように 6CFDA を加え、約 5 分間染色した。染色された微生物を 1. と同様にして蛍光顕微鏡下で直接観察・計数した。
3. 生菌数（呼吸活性）は 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) を用い、蛍光顕微鏡下で直接計数した<sup>5)</sup>。CTC は細胞の呼吸により蛍光を発する染色剤である（添付資料3、5）。試料に終濃度 2 mM となるように CTC を加

え、約 30 分間染色した。染色された微生物を 1. と同様にして蛍光顕微鏡下で直接観察・計数した。

4. 計数においては、精度を上げるために以下の点に注意した。
  - 1) 1 視野あたりの菌体数を 50 個以上となるようにろ過量を調整した。
  - 2) フィルター上の菌体分布のバラつきによる影響を防ぐために、20 視野以上を観察し、計数した。
  - 3) 1 視野あたり 5 個以下の視野が 5 視野以上ある場合は、N.D. とした。
5. 国内外の学会等において新手法を紹介し、各手法のスムーズな導入を目指した。

#### C. 研究経過

1. 市販のミネラルウォーター 1 品目（除菌処理がされていないもの）について、DAPI 染色により存在する微生物を観察した。その結果、定量に十分な量の微生物が存在していた（添付資料 6）。
2. 市販のミネラルウォーター 5 品目について、DAPI 染色により求めた微生物の現存量は、除菌処理を行っていない旨を明記している 3 品目で試料 1 mL あたり約 10 万個であった。除菌処理をされた 2 品目については、検出限界以下であった（添付資料 7）。
3. 市販のミネラルウォーター 5 品目について、R2A 培地<sup>6)</sup>を用いて生菌数を測定したところ、コロニーは検出されなかった。
4. 市販のミネラルウォーター 1 品目（除菌処理がされていないもの）について、CFDA 染色により求めた生菌数（エステラーゼ活性を有する微生物数）は、試

料 1 mL あたり約 4 万個であり、全菌数の 20%を占めていた（添付資料 8）。

5. 市販のミネラルウォーター 1 品目（除菌処理がされていないもの）について、CTC 染色により求めた生菌数（呼吸活性を有する微生物数）は、試料 1 mL あたり約 4 万個であり、全菌数の 22%を占めていた（添付資料 8）。

#### D. 考察

1. 市販のミネラルウォーター中の微生物は、貧栄養下で生息する従属栄養細菌の検出に適した R2A 培地上ではコロニーを形成しないにもかかわらず、エステラーゼ活性、呼吸活性を有していたことから、これらの検出に蛍光染色法が有用であることが明らかとなった。
2. ミネラル成分の多い試料に対しては、CFDA 添加時に試料が白濁することがあった。このような試料に対しては染色時にリン酸緩衝液を添加しない方がよいと考えられた。
3. CTC は冷蔵保存とともに染色性が低下するので、用事調製が望ましいと考えられた。

#### E. 結論

今回の研究により、非無菌水試料における蛍光染色法による微生物モニタリングが十分可能であることがわかった。ただし、微生物数が少ない場合は計数時の誤差が大きくなるので、以下の点に注意が必要である。

- 1) 視野あたり 50 個以上の菌体が見えるようにろ過量を調整する
- 2) フィルター上の菌体分布のバラつきによる影響を防ぐために、20 視野以上を観察し、計数する。

3) 視野あたり 5 個以下の視野が 5 視野以上ある場合は、N. D. とする。  
なお、今回の研究では計数に蛍光顕微鏡

を使用したが、より簡便かつ客観的に定量するために、画像解析装置<sup>7)</sup>の使用が有効であると考えられる。

## F. 参考論文、学会発表

### 参考論文

1. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：蛍光染色によるシングルセルレベルでの細菌の検出。衛生化学、43: 145-154、1997.
2. 谷佳津治、山口進康、那須正夫：微生物生態学の手法にみる 90 年代の進展。Microb. Environ., 12: 41-56, 1997.
3. 山口進康、那須正夫：蛍光染色法による特定微生物の迅速・簡便な検出。食品工業、41: 24-32, 1998.
4. Porter, K. G., and Y. S. Feig: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25: 943-948, 1980.
5. Yamaguchi, N., T. Kenzaka, and M. Nasu: Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. Microb. Environ., 12: 1-8, 1997.
6. Reasoner, D. J., and E. E. Geldreich: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49:1-7, 1985.
7. Ogawa, M., K. Tani, N. Yamaguchi, and M. Nasu: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water. submitted.

### 学会発表

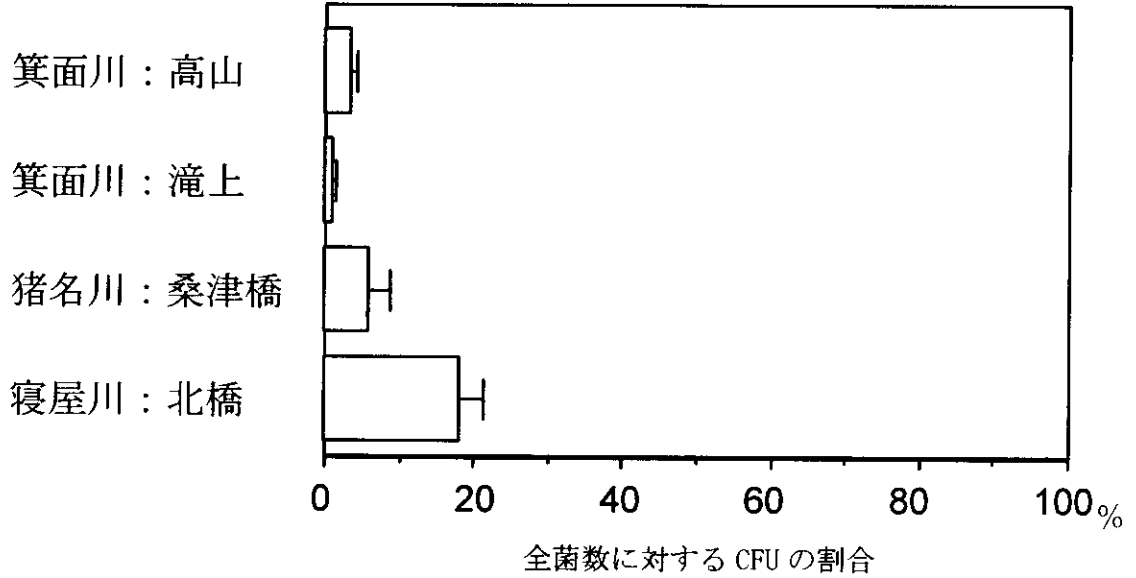
1. 小林 剛、山口進康、那須正夫：FISH—FCM 法による細菌の迅速な定量、日本薬学会第 122 年会、平成 14 年 3 月 28 日（千葉）。

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

添付資料

1. 都市河川における培養可能な細菌の割合.

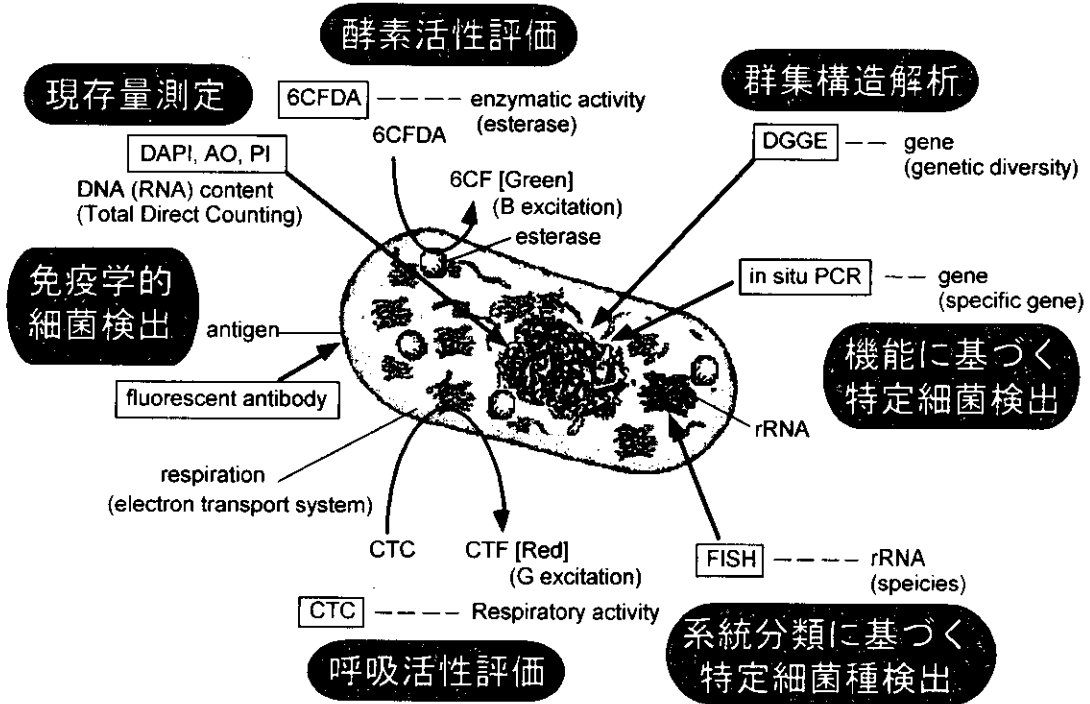


箕面川：有機物汚染が進んでいない。

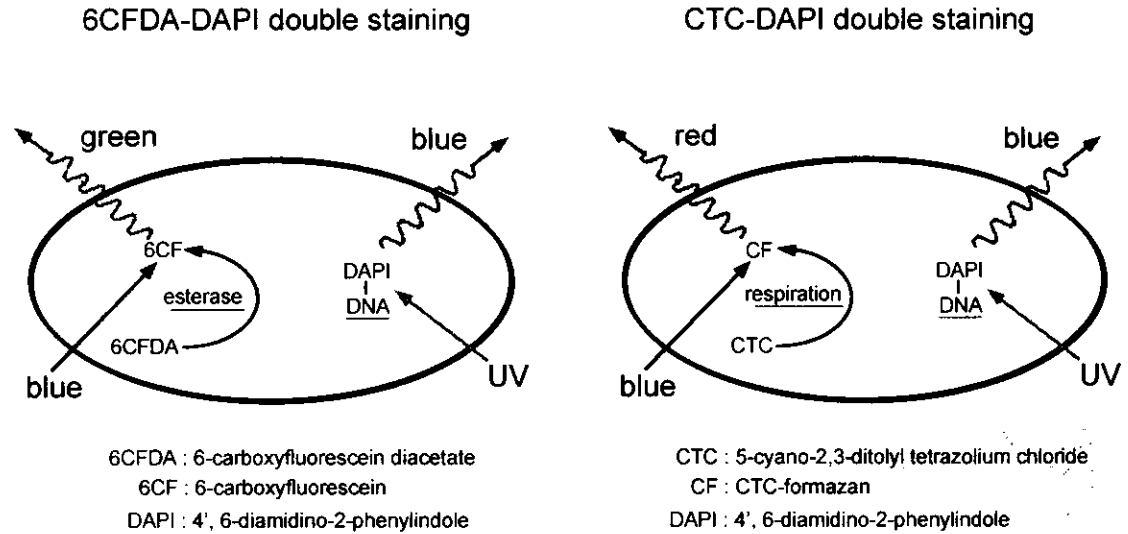
猪名川：有機物汚染が見られる。

寝屋川：有機物汚染が進行。

2. 微生物を検出・定量・解析するための新手法.



3. 蛍光活性染色法の原理.



4. CFDA-DAPI 二重染色法による水試料中の微生物の検出.

青色励起光下

紫外線励起光下

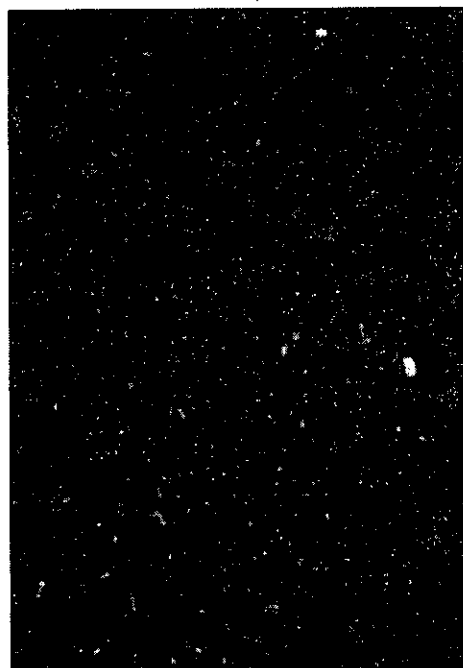
青色励起光下では、エステラーゼ活性を有する微生物のみが、緑色蛍光を発する。  
紫外線励起光下では、全ての細菌が青色蛍光を発する。

5. CTC-DAPI 二重染色法による水試料中の微生物の検出.

青色励起光下



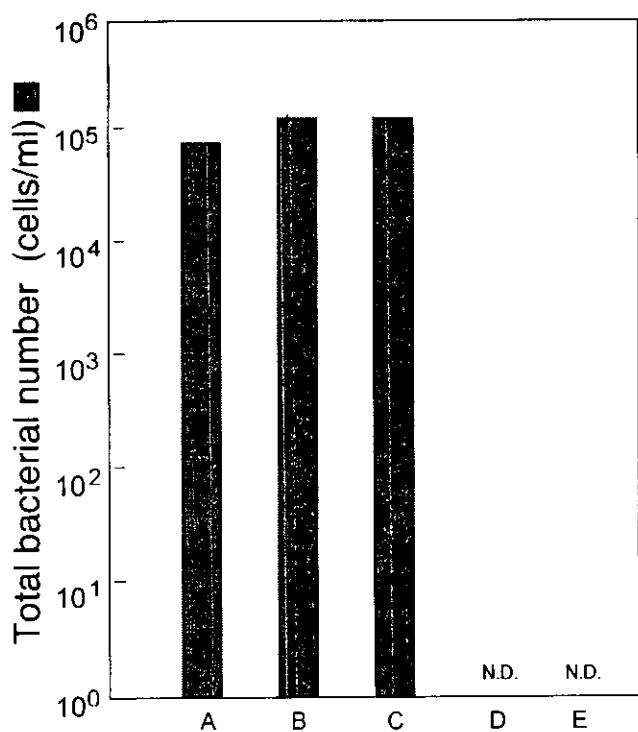
紫外線励起光下



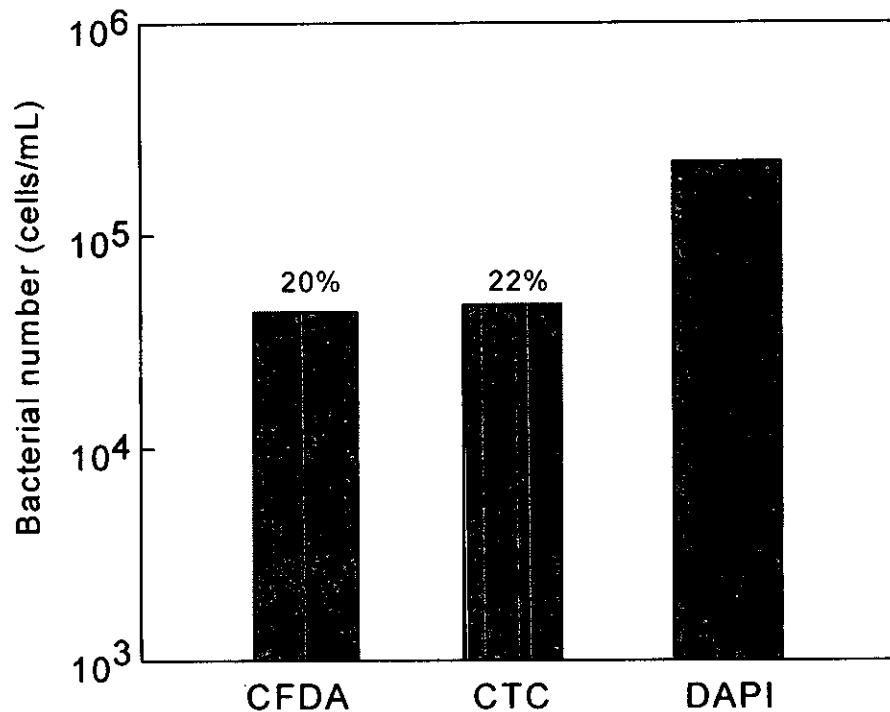
青色励起光下では、呼吸活性を有する微生物のみが、赤色蛍光を発する。  
紫外線励起光下では、全ての細菌が青色蛍光を発する。

6. 市販ミネラルウォーター（除菌処理をしていない）中の微生物を DAPI 染色後、  
蛍光顕微鏡下で観察した結果.

7. 市販ミネラルウォーター5種中の全菌数. DAPI 染色法によりシングルセルレベルで測定.



8. 市販ミネラルウォーター（除菌処理をしていない）中の全菌数および生菌数. CFDA-DAPI 二重染色法, CTC-DAPI 二重染色法によりシングルセルレベルで測定.

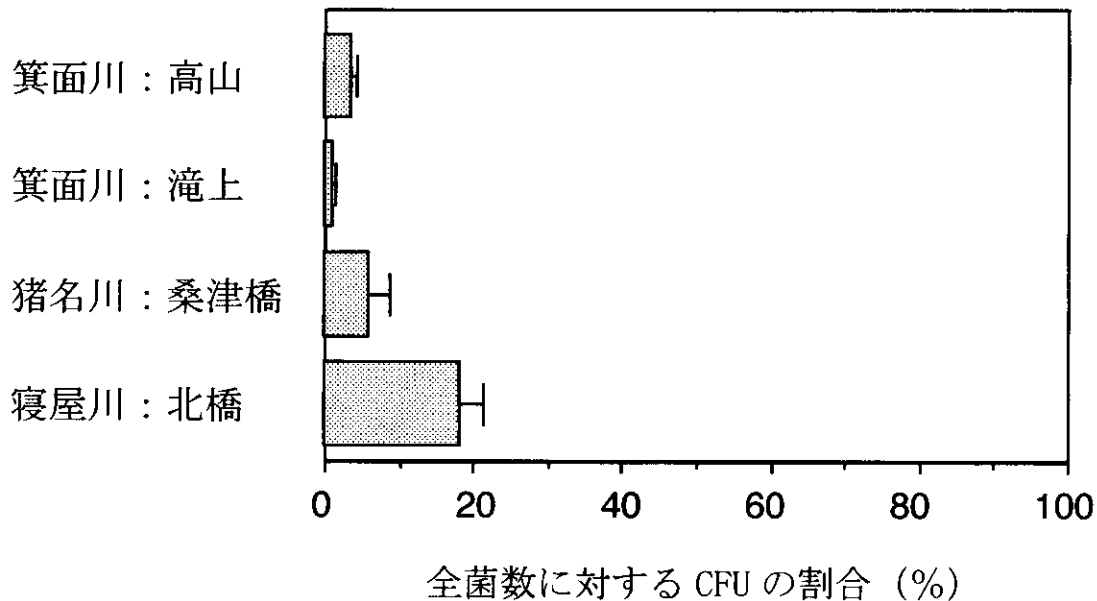


Bacterial cells in 40 mL of the sample were trapped on filter and stained



添付資料

1. 都市河川における培養可能な細菌の割合.

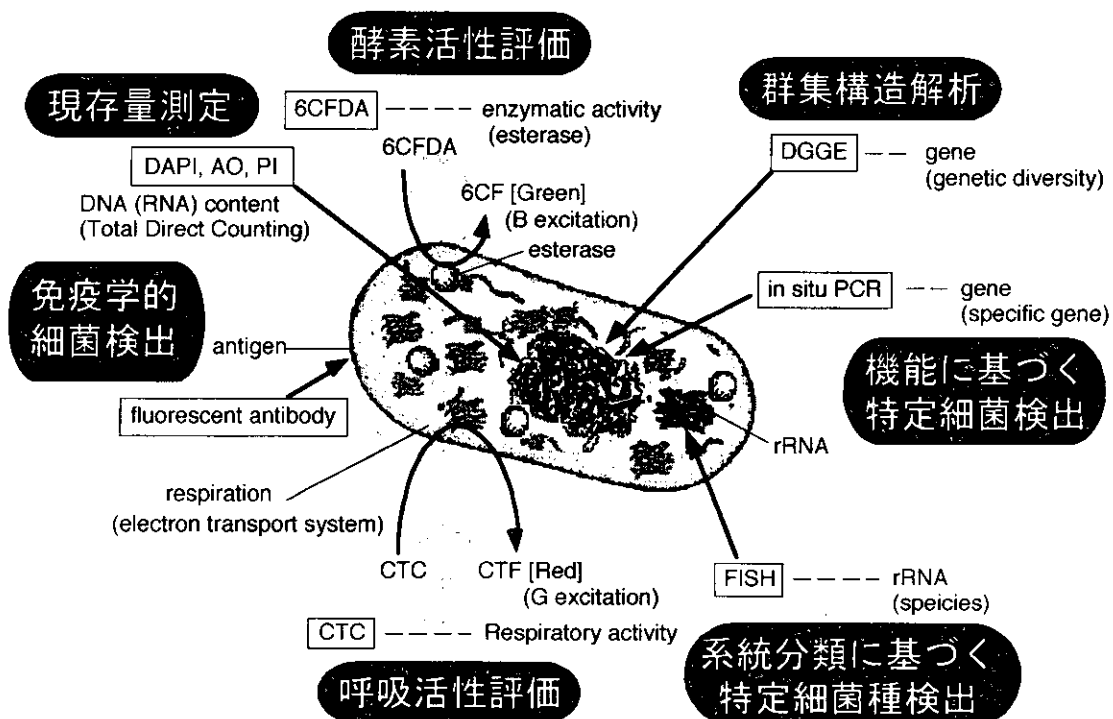


箕面川：有機物汚染が進んでいない。

猪名川：有機物汚染が見られる。

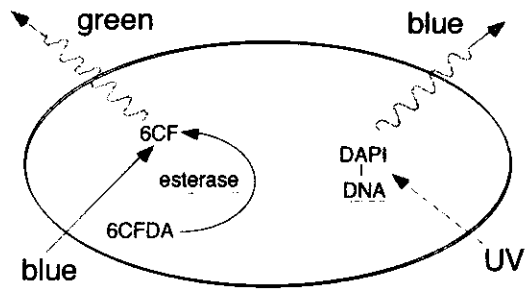
寝屋川：有機物汚染が進行。

2. 微生物を検出・定量・解析するための新手法.



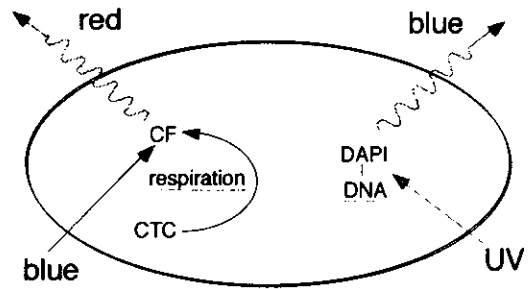
3. 蛍光活性染色法の原理.

6CFDA-DAPI double staining



6CFDA : 6-carboxyfluorescein diacetate  
 6CF : 6-carboxyfluorescein  
 DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

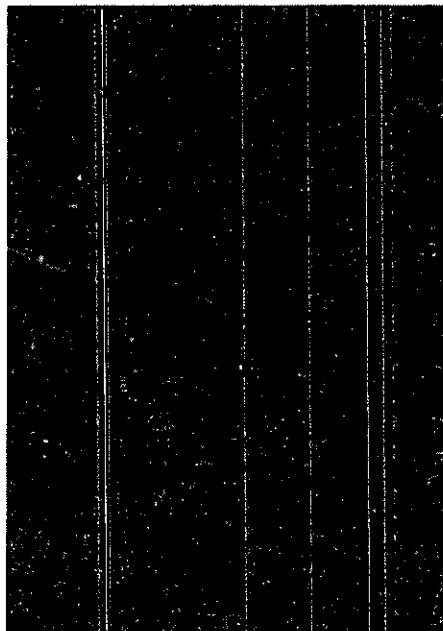
CTC-DAPI double staining



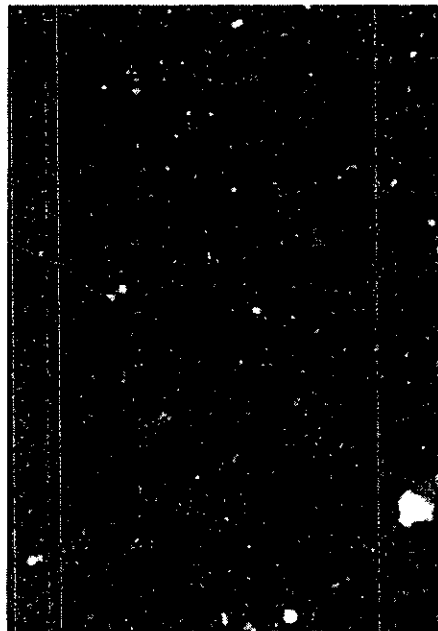
CTC : 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride  
 CF : CTC-formazan  
 DAPI : 4', 6-diamidino-2-phenylindole

4. CFDA-DAPI 二重染色法による水試料中の微生物の検出.

青色励起光下



紫外線励起光下



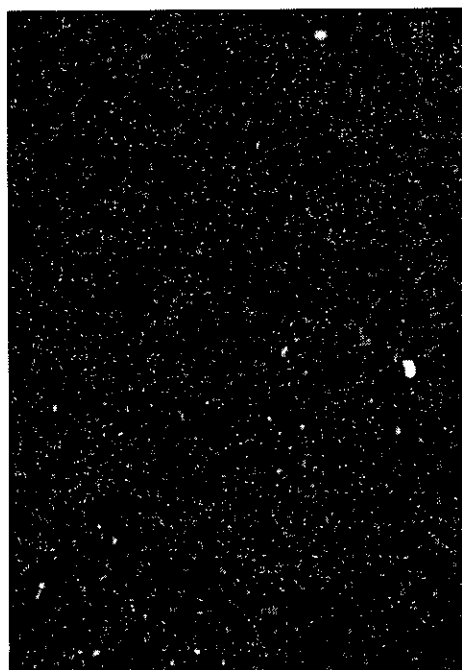
青色励起光下では、エステラーゼ活性を有する微生物のみが、緑色蛍光を発する。  
 紫外線励起光下では、全ての細菌が青色蛍光を発する。

5. CTC-DAPI 二重染色法による水試料中の微生物の検出.

青色励起光下

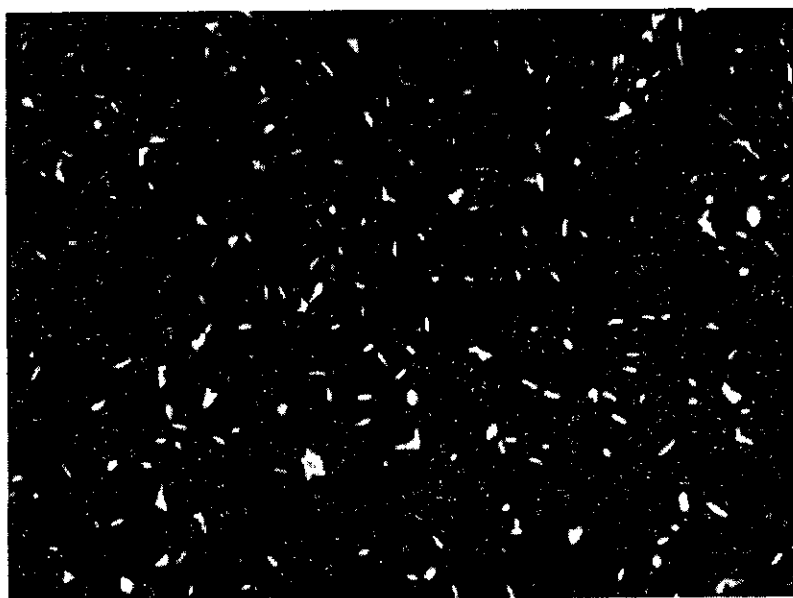


紫外線励起光下

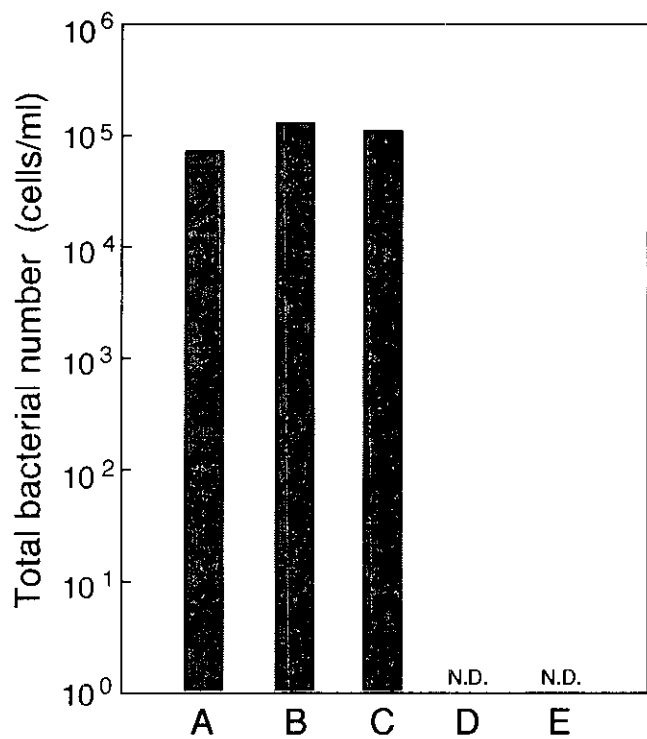


青色励起光下では，呼吸活性を有する微生物のみが，赤色蛍光を発する。  
紫外線励起光下では，全ての細菌が青色蛍光を発する。

6. 市販ミネラルウォーター（除菌処理をしていない）中の微生物を DAPI 染色後，  
蛍光顕微鏡下で観察した結果。



7. 市販ミネラルウォーター5種中の全菌数. DAPI 染色法によりシングルセルレベルで測定.



8. 市販ミネラルウォーター（除菌処理をしていない）中の全菌数および生菌数. CFDA-DAPI 二重染色法, CTC-DAPI 二重染色法によりシングルセルレベルで測定.

