

問 III 1 (2) 微生物除去のためのろ過フィルターについて、ステンレス製であっても、作業終了時または品目切り替え時に交換しなければなりませんか。

答 ろ過フィルターの仕様が洗浄・滅菌して使用できるものであり、ロット毎又は品目切り替え時にバリデートされたCIP・SIPが行われるのであれば、作業終了時や品目切り替え時に必ずしも交換する必要はないと考えます。

問 III 1 (2) 微生物除去のためのろ過フィルターも、バクテリアチャレンジ試験を実施する必要がありますか。

答 バイオバーデン数を抑えるためのろ過フィルターであれば、実施することが望ましいと考えます。

問 III 1 (5) ウ(6)ウ「バイオバーデンについては頻繁に調査を行うこと。」とありますが、どのくらいの頻度で実施する必要がありますか。

答 毎ロット行うべきと考えます。

問 III 2 (5) 「滅菌後の組み立て作業はグレードAの環境下で行うこと」とありますが、滅菌袋からの取り出し等全てグレードAの環境下で行わねばなりませんか。

答 グレードAの環境下で行ってください。

問 III 2 (6) 「グレードA及びBは作業シフト毎」とありますが、作業シフトとは、どのようなものですか。

答 作業シフトとは、ある工程についてその一連の作業を行う時間の範囲です。

なお、この項目では、環境微生物の動態に変化がない範囲です。

問 III 2 (7) 「その効果を定期的に確認すること。」とありますが、培地充填試験でトータルで無菌を確認できれば、問題ないですか。

答 培地充填試験で無菌であっても、凍乾機内が、無菌であることの保証にはなりません。

モニタリング頻度(Aの空気を対象)

製造毎	9
毎週1回	2
毎月1回	1
2ヶ月に一回	1

警報及び処置基準値に達した際の具体的処置手順

有	8		
無	5	原案作成済	1
		検討中	1
		未検討	3

II 2(3) 消毒薬の選定等

使用されていた薬剤

エタノール	5
グルタルアルデヒド	2
塩化ベンザルコニウム	8
次亜塩素酸	1
過酢酸+過酸化水素	1
塩化ベンザルコニウム+ベンジルアルコール	1
ポピドンヨード	1
グルタル酸クロルヘキシジン	2
過酢酸	1
ヒビテン	1
ヒビテン+エタノール	1
界面活性剤	2
塩酸アルキルジアミノエチルグリシン	1

定期的な消毒に使用されていた薬剤

ホルマリン、オゾン、グルタルアルデヒド

II 3(4) 無塵衣の滅菌方法

高圧蒸気滅菌(自社)	9
高圧蒸気滅菌(外注)	1
EOG滅菌	2
電子線滅菌	1

II 5(5) 容器、ゴム栓の洗浄における洗浄力の検証

チャレンジテストによる検証

有	10	付加物	エンドトキシン、カーボン、ガラス、昆虫、糸、樹脂片、ゴム片、紙片、毛髪、リボホリサッカライド、ポリエステル、金属粉、ブラシの毛、墨汁、段ボール、プラスチック粉、鳥の羽根
無	2		
該当無し	1	当該製造所では洗浄作業無し	

II 8 原料・容器等の製造所への査察の実施

有	11	実施頻度は原料・容器等により異なるが概ね1~3年に1回
無	2	2社とも今後、実施予定

本ガイドラインへの対応状況(対象施設数は13社である)の一部を参考として示す

II 1(3) 調製から滅菌までの間に要する最大許容時間の設定

設定有	設定根拠有	3
	設定根拠無	10
設定無		0

II 1(4) 滅菌工程を支援するシステムのバリデーションと日常管理の実施

実施	8	対象としているシステム	ピュアスチーム発生装置、WFI製造装置
未実施	5		

II 1(10) BIの仕様の文書化

有	11	全てGMP関係文書体系下で管理されている
無	2	

II 1(12) 定期的な再バリデーションの実施規定

有	11	実施頻度	1年に1回	7	品目ごとに頻度を設定
			1年2回	1	
			1年1回もしくは2回	2	
			3～5年に1回	1	
無	2	2社とも今後実施予定			

II 2(1) 空気清浄度に係る微粒子数モニタリング

各グレードにおける空気清浄度に対する警報及び処置基準値

設定有	13	警報基準のみ設定	1
		処置基準のみ設定	5
		両基準を設定	7
設定無		0	

II 2(1)E グレードAにおけるHEPAフィルターのリークテストの実施

実施	9	1年に1回実施	6
		1年に2回実施	2
		3年に2回実施	1
未実施	4	このうち、1社については実施予定有り	

リークテストに用いる物質

エミリー	5
DOP	1
グローブ	1
DEHS[セバシン酸ジ-(2-エチルヘキシル)エステル]	2

II 2(2)A 環境微生物モニタリングの手順書の内容

モニタリング対象物

規定あり	13	空気	13
		床	10
		壁	9
		機械表面	10
		着衣	9
		手袋	9
規定無し	0	その他	手洗台、消毒液、製品に封入する窒素 各1社ずつ

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

3. 非無菌水試料における微生物モニタリング法の比較

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微生物モニタリング法の実用性を評価するため、市販のミネラルウォーターおよび医薬品製造用水中に存在する生菌数を、メンブランフィルター法、マイクロコロニー計数法、蛍光活性染色法により測定した。蛍光活性染色を行った試料の測定には、通常の見視計測に加えて、画像解析法および菌数自動測定装置を用い、結果を比較した。

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、明らかとなってきた。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^{1, 2), 3)}。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。

昨年度は蛍光染色法を用いた非無菌水試料中の微生物現存量および生菌数の測定法について検討し、その有用性を報告した。そこで本年度は、市販のミネラルウォーターおよび医薬品製造用水中に存在する生菌数を、メンブランフィルター法、マイクロコロニー計数法、蛍光活性染色法により測定し、非無菌水試料における微生物モニタリング法としての各手法の実用性を評価した。

B. 研究方法

1. ①市販のミネラルウォーター（ろ過に

より除菌）、②市販のナチュラルミネラルウォーター（除菌・殺菌処理なし）、③医薬品製造用水（精製水）、④山間部にて採取した河川水の計4試料について、i) メンブランフィルター法、ii) マイクロコロニー計数法、iii) 蛍光活性染色法により生菌数を測定した。

2. メンブランフィルター法およびマイクロコロニー計数法においては、培地としてSCD培地（日局試験用；日本製薬製）および貧栄養環境中の微生物検出に適したR2A培地⁴⁾（Difco製）を用いた。メンブランフィルター法では、試料水中の微生物をニトロセルロースフィルターに捕集した後、フィルターを培地上に置いた。25℃で3～8日間培養を行い、生じたコロニーを見視により計数した。マイクロコロニー計数法では、試料水中の微生物をポリカーボネートフィルターに捕集した後、フィルターを培地上に置き、25℃で12時間インキュベートした。生じたマイクロコロニーを蛍光染色剤DAPI⁵⁾により染

色し、蛍光顕微鏡下で目視により計数した。

3. 蛍光活性染色による生菌数計数においては、細菌細胞内のエステラーゼ活性を指標として 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA) を用いた染色を行った。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。試料にリン酸緩衝液を添加後、終濃度 150 $\mu\text{g/ml}$ となるように 6CFDA を加え、約 3 分間染色した。計数にあたっては、i) 蛍光顕微鏡下で直接目視⁶⁾、ii) 本研究室で開発した画像解析モジュール BACS⁷⁾、iii) 本研究室が企業と共同で開発を進めている菌数自動測定装置により得られた結果を比較した。目視および BACS を用いた計数においては、6CFDA 染色後の試料に DAPI を添加し対比染色した後、ポリカーボネートフィルターに捕集しプレパラートとした。生菌自動測定装置を用いた計数においては、試料中の微生物を一旦ポリカーボネートフィルターに捕集した後、PSA シート (図 1)⁸⁾ に菌体を転写し、測定装置にセットした。
4. 蛍光染色法を用いた計数においては、精度を上げるために以下の点に注意した。
 - 1) 1 視野あたりの細胞数が 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 視野あたりの細胞数が 5 個以下の視野が 5 視野以上ある場合は、検出限界以下とした。

C. 研究経過

1. 市販のミネラルウォーター (ろ過により除菌されたもの) においては、いずれの方法を用いても、微生物は検出されなかった。
2. 市販のナチュラルミネラルウォーター (除菌・殺菌がされていないもの) においては、培養法で得られた生菌数はマイクロコロニー計数法および蛍光活性染色法で得られた値の 1/100 ~ 1/1,000 であった。マイクロコロニー計数法で得られた生菌数と蛍光活性染色法で得られた生菌数は近い値であった (図 2)。
3. 医薬品製造用水 (精製水) においては、培養法では SCD 培地に比べて R2A 培地を用いた方が 10 倍高い生菌数が得られた。マイクロコロニー計数法において、12 時間のインキュベーションではマイクロコロニーは生じなかった (図 3)。
4. 山間部で採取した河川水 (滅菌水で 10 倍希釈) においては、マイクロコロニー計数法では 12 時間のインキュベーションでは十分なマイクロコロニーが形成されず、検出限界以下であった。蛍光活性染色法では $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL の値となった (図 4)。
5. DAPI 染色法により求めた微生物現存量 (全菌数) は、①市販のミネラルウォーター (ろ過により除菌): 検出限界以下、②市販のナチュラルミネラルウォーター (除菌・殺菌がされていないもの): 7.0×10^4 cells/mL、③医薬品製造用水 (精製水): 3.5×10^4 cells/mL、④河川水 (滅菌水で 10 倍希釈): 4.6×10^4 cells/mL であった。全菌数に対

する生菌数の割合は、10～50%であった。

D. 考 察

1. メンブランフィルター法、マイクロコロニー計数法ともに、R2A 培地により得られた生菌数は SCD 培地により得られた値と同等以上であったことより、有機物質をほとんど含まない非無菌水試料中の生菌数を求めるには R2A 培地が適していることが確認できた。
2. いずれの試料においても、メンブランフィルター法で得られた生菌数は、マイクロコロニー計数法、蛍光活性染色法で得られた値の 1/10～1/1,000 であり、メンブランフィルター法は非無菌水試料中の生菌数を過小評価していることが確認できた。
3. 蛍光活性染色法で得られた生菌数は、マイクロコロニー計数法により得られた値と近かった。マイクロコロニー計数法では結果を得るのに 12 時間以上を要するのに対し、蛍光活性染色法では 30 分以内に結果を得られることか

ら、非無菌水試料の微生物モニタリングに蛍光活性染色法は実用的な手法であることが示された。またメンブランフィルター法、マイクロコロニー計数法では対処できなかった試料についても、蛍光活性染色法では生菌数の測定が可能であった。

4. 画像解析装置および自動菌数測定装置で得られた生菌数は、蛍光顕微鏡により得られた値より若干低かったものの、培養法で得られる値の 10～100 倍を示し、計数の簡便化・標準化のために有用であると考えられた。

E. 結 論

今回の研究により、非無菌水試料に対し蛍光染色法による微生物モニタリングが実用的であることがわかった。また、より簡便かつ客観的に定量するために、画像解析装置、自動菌数測定装置の使用が有効である。

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. 見坂武彦、那須正夫：環境中の細菌を迅速に検出する。ファルマシア、39：137-141、2003.
4. 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.
5. Porter, K. G., and Y. S. Feig: The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. Limnol. Oceanogr. 25: 943-948, 1980.
6. 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.

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.
8. Yamaguchi, N., A. Ishidoshiro, Y. Yoshida, T. Saika, S. Senda, and M. Nasu: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, in press.

添付資料

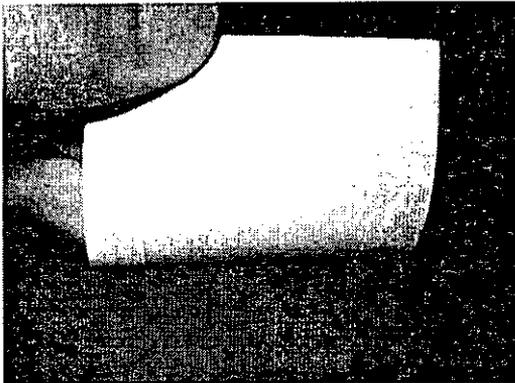


図1. PSAシートによる微生物サンプリング.

粘着面上に回収した微生物を直接蛍光染色剤で染色し、計数する。様々な固体表面から微生物数を測定可能である。

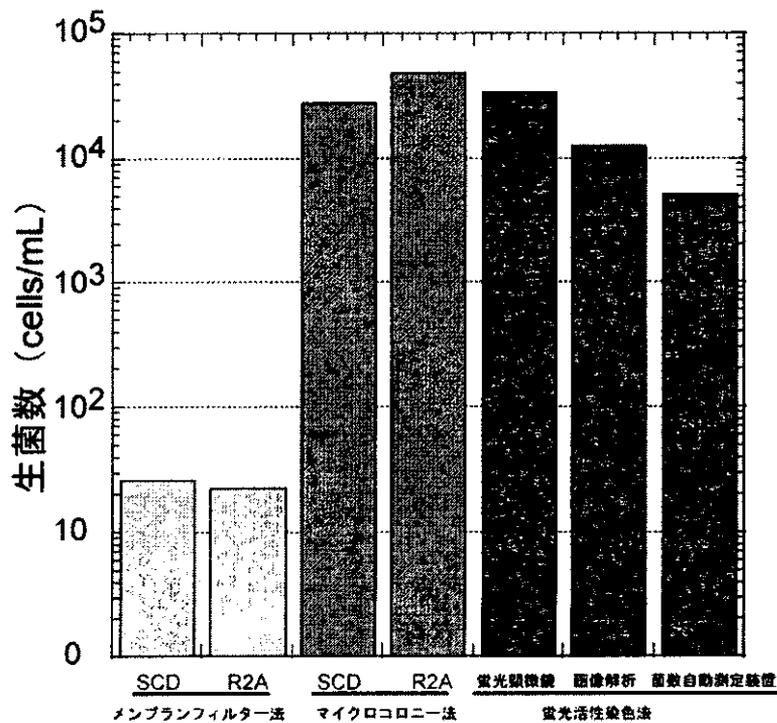


図2. 市販のナチュラルミネラルウォーター中の生菌数

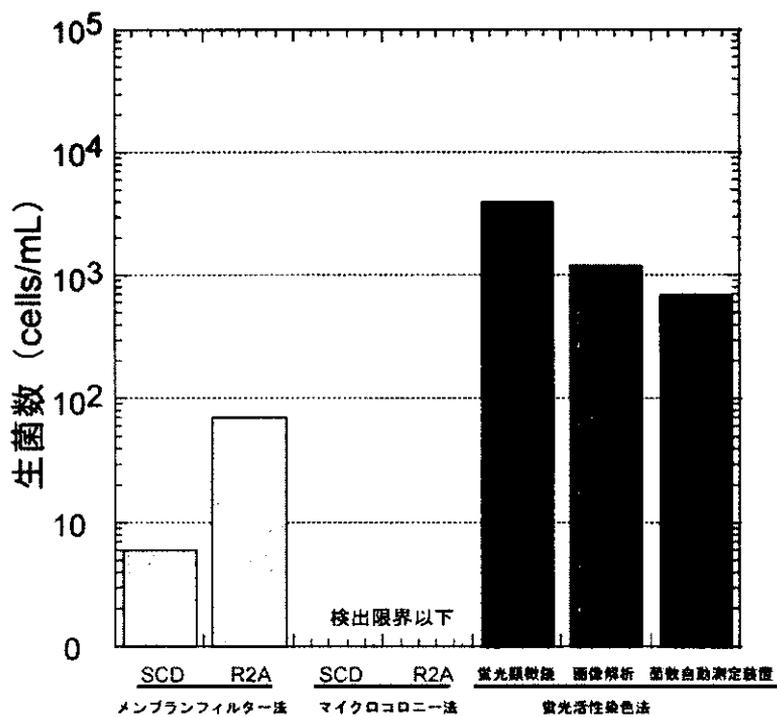


図3. 医薬品製造用水中の生菌数.

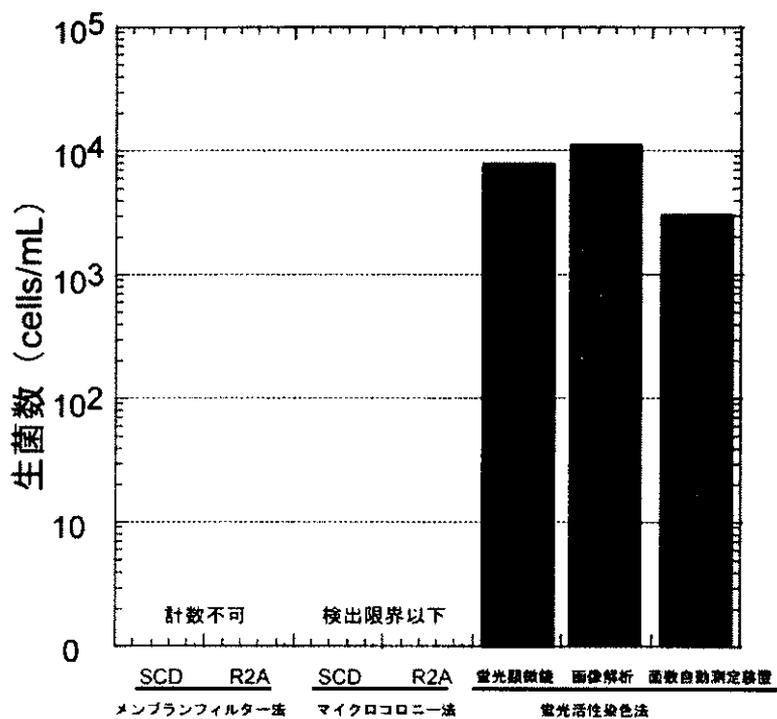


図4. 山間部より採取した河川水中の生菌数.

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

PSA シート法による固体表面の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：医薬品製造や調剤の環境における微生物モニタリング法として、粘着シートを用いて固体表面から微生物を回収し、蛍光染色法を用いて微生物を直接計数する PSA シート法を開発した。本手法を用いて蛇口や皮膚等の固体表面上の微生物現存量（全菌数）ならびに生菌数を測定し、従来法により得られた値と比較した。

A. 研究目的

医薬品製造や調剤の環境においては、医薬品に対する微生物汚染の防止が重要である。そのためには机や調剤用具、作業従事者の皮膚等の表面上の微生物モニタリングが有効である。

固体表面の微生物数測定には拭き取り法やスタンプアガー法が広く用いられている。しかしながら培養に依存した手法では結果を得るのに約1日を要し、効果的な微生物モニタリングを行うために、より迅速な手法が必要とされている。また環境中に存在する微生物の多くは通常の方法では培養が困難な状態にあり¹⁻³⁾、培養に依存しない手法を用いる重要性が認識されつつある。

そこで固体表面上の微生物数を培養することなく迅速かつ簡便に測定するために、粘着シートによる微生物サンプリング法と、シート上に捕集した微生物を蛍光染色し直接計数する方法（PSA シート法）を検討した⁴⁾。

B. 研究方法

1. サンプリングには、ポリウレタンの基材に不溶性のアクリル製粘着剤を重層

した PSA シートを用いた（図1-1）。PSA シートの作成にあたっては、シートの微生物汚染の防止に留意するとともに、ガンマ線滅菌を行った。シートのサイズは5.8×4.6cmであり、測定面積に応じて細分が可能である。

2. 微生物数の測定対象として、研究棟内の手すり、エレベーターのボタン、水道の蛇口、電話受話器を選んだ。同時に研究室内スタッフの頬および手の甲表面の微生物数を測定した。
3. 微生物のサンプリングにあたっては、各固体表面に PSA シートの粘着面を5回圧着し（図1-2）、粘着面に蛍光染色剤を直接滴下することにより捕集した微生物の染色を行った。
4. 固体表面上の微生物現存量（全菌数）測定にあたっては、核酸結合性の蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた。固体表面上の生菌数測定においては、細菌細胞内のエステラーゼ活性を指標として 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA) を用いた染色を行った。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。各試薬を用いて約5分間染色した後、PSAシートをスライドガラス上に乗せ、蛍光顕微鏡下で菌数を測定した。なおSYBR Green IIおよび6CFDAの励起には波長488nm付近の青色励起光を用いた。

5. 計数にあたっては、蛍光顕微鏡30視野以上を観察し、各視野における菌数の平均値をもとに、固体表面上の全菌数、生菌数を算出した。
6. PSAシートおよび拭き取り法による固体表面上の微生物回収率の測定にあたっては、培養した表皮ブドウ球菌をプラスチック表面上に一定量滴下し、乾燥させたものを試料とした。
7. 拭き取り法にはふきふきチェック（栄研化学）、スタンプアガー法にはフードスタンプ（標準寒天；日水製薬）を使用した。微生物数の測定は添付書に準じて行った。

C. 研究経過

1. PSAシート上に捕集された微生物はSYBR Green IIおよび6CFDAにより染色され、明るい緑色蛍光を発した（図2）。
2. 各固体表面について、PSAシートの転写回数（微生物を捕集するために圧着・剥離を繰り返す回数）を求めたところ、5回以上では捕集される微生物数は増加しなくなった。そこで転写回数を5回と決定した。
3. プラスチック表面を対象として、拭き取り法およびPSAシート法の微生物回収率を比較したところ、各々30%ならびに55%であった（表1）。
4. 研究棟内の手すりなどを対象として、

スタンプアガー法およびPSAシート法で得られる微生物数を比較したところ、PSAシートで得られた全菌数はスタンプアガー法で得られた値の10,000倍以上の値となった（図3）。

5. 研究室のスタッフの頬表面を対象として、PSAシートにより求めた生菌数は1cm²あたり $1.5 \pm 0.29 \times 10^4$ であった。スタンプアガー法で得られた値は 8.8 ± 2.2 であった（図4）。

D. 考察

1. PSAシート法は拭き取り法よりも簡便でありながら、同等以上の微生物回収率を有することが確認できた。また、粘着剤の組成を改良することにより、さらに高い回収率を得ることができると考えられた。
2. PSAシート法はスタンプアガー法と同等に簡便でありながら、はるかに高い微生物数を得ることが可能であった。結果を得るまでに要した時間は約30分であったことから、スタンプアガー法に代わる微生物モニタリング法として有用であると考えられた。
3. PSAシートに捕集した微生物を6CFDAで染色することにより、固体表面上の生菌数を高精度に測定可能であることがわかった。
4. 画像解析装置および自動菌数測定装置の使用により、計数の簡便化・標準化が可能であると考えられた。

E. 結論

PSAシート法は迅速・低コストかつ再現性の高い方法であり、固体表面上の全菌数・生菌数を1時間以内に測定可能である。したがって、医薬品製造や調剤環境の微生物

物モニタリングに実用的な手法であると考
えられた。

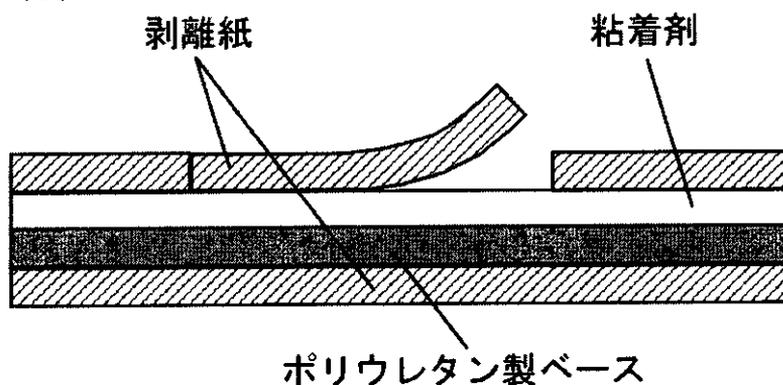
F. 参考論文、学会発表

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. 見坂武彦、那須正夫：環境中の細菌を迅速に検出する. ファルマシア、39: 137-141、2003.
4. Yamaguchi, N., A. Ishidoshiro, Y. Yoshida, T. Saika, S. Senda, and M. Nasu: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. J. Microbiol. Methods, in press.

添付資料

(1)



(2)

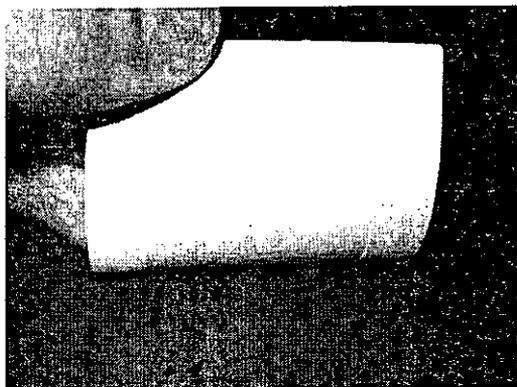


図1. PSAシートによる固体表面の微生物モニタリング。

- (1) ポリウレタンのベースと不溶性の粘着剤から構成される。
- (2) 使用時には剥離紙をはがし、測定対象の表面に圧着する。

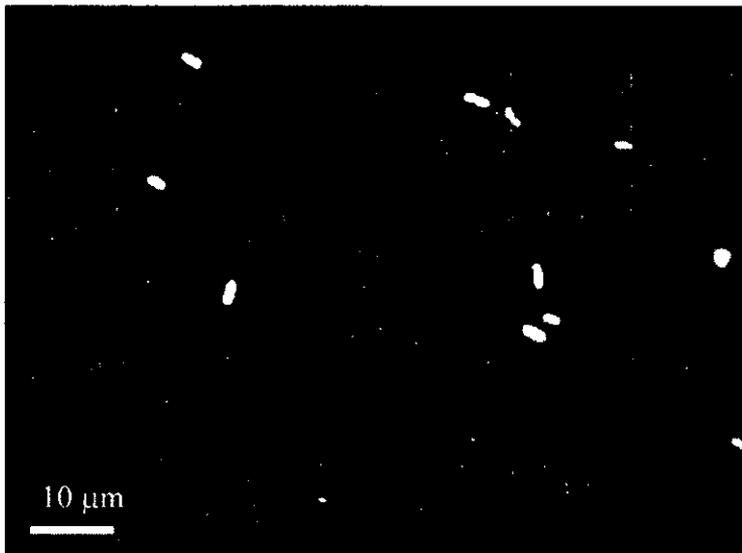


図2. PSA シート上に捕集された微生物の蛍光顕微鏡像。

ヒトの頬表面の微生物を PSA シートで回収。

核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II で染色後，蛍光顕微鏡青色励起光下で観察。

個々の菌体が緑色蛍光を発している。

表1. 拭き取り法および PSA シート法によるプラスチック表面からの微生物回収率。

	初期菌数 (cells)	捕集された細菌数 (cells)	回収率 (%)
拭き取り法 (n=8)	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$	$(3.3 \pm 1.3) \times 10^5$	27 ± 7.2
PSAシート法 (n=8)	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$	$(5.0 \pm 0.7) \times 10^5$	54 ± 4.6

PSA シート法では拭き取り法よりも高い回収率を得られることがわかる。

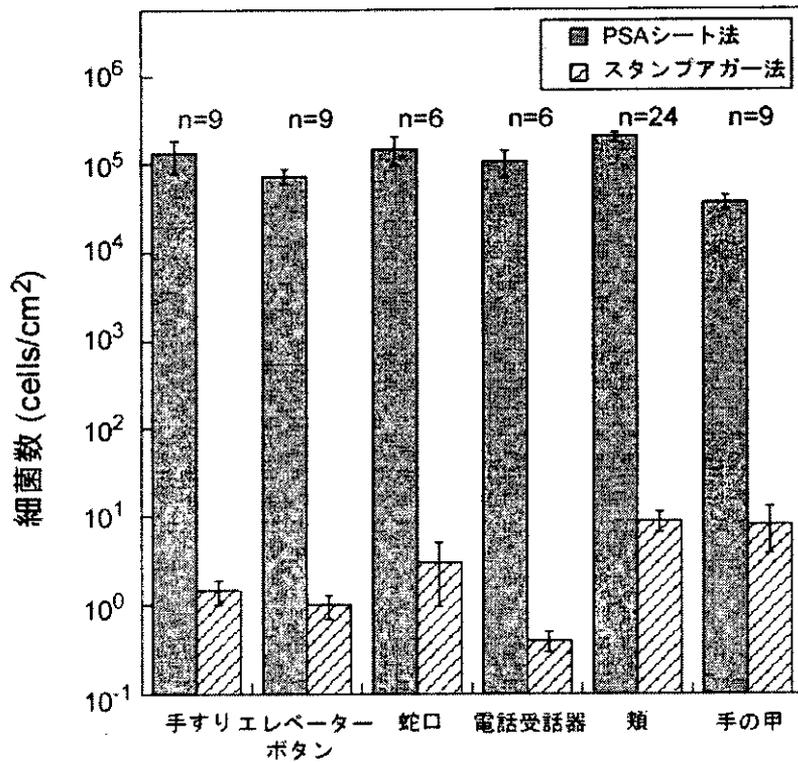


図3. スタンプアガー法およびPSAシート法により得られた各固体表面の細菌数の比較結果.

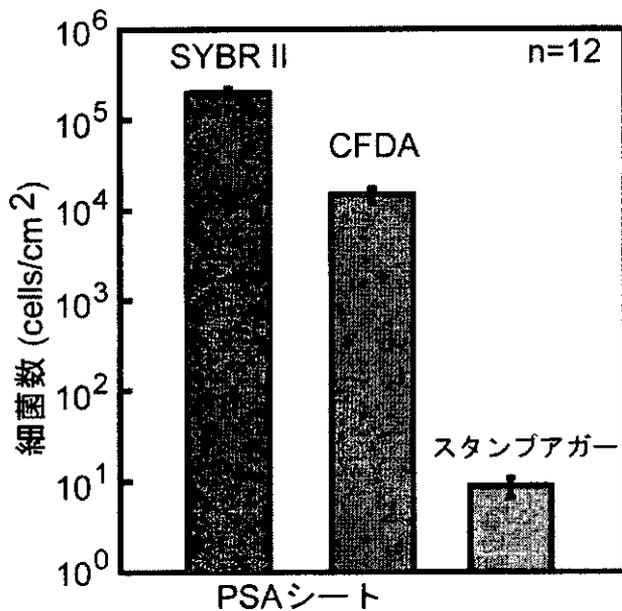


図4. PSAシートによるヒトの皮膚表面の生菌数測定結果.

従来のスタンプアガー法よりも高い生菌数を得ることができる.

SYBR II : 蛍光染色剤 SYBR Green II により求めた全菌数.

CFDA : 蛍光染色剤 6CFDA により求めた生菌数.

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

4. 医薬品製造におけるバイオセーフティ対策に関する研究

分担研究者	佐々木学	社団法人	北里研究所生物製剤研究所品質保証部門部門長補佐
共同研究者	佐々木次雄	国立感染症研究所細菌第二部室長	
	小幡朗	デンカ生研株式会社ワクチン製造部製造一課長	
	鈴木崇宣	財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所品質保証部課 品質保証課長	
	高田光昭	日本ビーシージー製造株式会社製造第一部副部長	
	鳥居宏明	明治乳業株式会社医薬事業部細胞工学センターG係長	
	長谷川和光	財団法人 化学及血清療法研究所薬事部品質保証室長	
	松本英男	三菱ウエルファーマ株式会社鹿島工場品質保証室	
	山本浩	財団法人 日本ポリオ研究所技術部部長	
	渡辺秀夫	武田薬品工業株式会社社会光工場生物製剤部生物第一GM	

研究要旨：本研究は、平成13年度厚生科学研究において考察した。日本及びWHOのバイオセーフティガイドラインの紹介と海外における規制に関する情報の紹介及び新型インフルエンザウイルス流行時の感染対策としての「インフルエンザワクチン製造施設のバイオセーフティ対策」を海外研修者へのテキストとして利用できるよう、ワクチン製造企業が参加する社団法人細菌製剤協会（9社）及び国立感染症研究所（佐々木次雄）とともに考察した。

A. 研究目的

1. 平成13年度の研究成果「医薬品製造におけるバイオセーフティ対策」（インフルエンザワクチンを例に）について、外国の研修者用テキストとして使用できるよう英文にする。
2. パソコンでの研修、教育訓練用として使用できるようCDに納める

B. 研究方法

平成13年度の研究成果である「厚生科学研究「日本及びWHOのバイオセーフティガイドラインの紹介」及び新型インフルエンザウイルス流行時の感染対策としての「新型インフルエンザワクチン

ン製造施設のバイオセーフティ対策」の
を基に、ワクチン製造企業が参加する社
団法人細菌製剤協会のGMP専門委員
会（9社）（以下、GMP委員会という。）
及び国立感染症研究所（佐々木次雄）と
ともに英訳等に関して研究を進めるこ
ととした。

C. 研究結果

1. 「医薬品製造におけるバイオセーフティ対策」（インフルエンザワクチンを例に）の英文を作成した。（別添資料ー1）
2. 英文をCDに納め研修用テキスト使用できるものとした。内容としては本文

をPDFファイルにし、図はボタンにより参照できる構造にし、パソコン等を用い使用できるものとした。

3. 日本文も英文と同様にCDに納め研修用テキスト使用できるものとした。

D. 考 察

1. 今までのバイオセーフティ対策は、研究室における対策が中心であった。本研究が製造施設を取り上げ考察したことは、今後の日本における製造施設を考える上で重要なことと考える。今回さらに英文化及びC

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 佐々木学、坂口孝廣、藤田弘之：生物学的製剤等GMP基準の現状と対応(ワクチン製剤)、PHARM TECH JAPAN Vol.14(No.12) 臨時増刊号 p101-111,1998

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

Dに納め、研修等のテキストとして普及しやすい構造とした。今後の製造施設における適切なバイオセーフティ対策を実施する上で参考になればと思います。

E. 結 論

本研究において考察したように、普及しやすいように英文化、CDに納める方式とし、製造施設における適切なバイオセーフティ対策、また、国内外の研修者へのテキストとして使用されることを望みます。

Biosafety for pharmaceutical manufacturing - A case study on influenza vaccine manufacturing -

1. Introduction

The guideline for the management of manufacturing facilities for biologicals in Japan is governed by the Pharmaceutical Affairs Law (Ministerial ordinance on manufacture facilities, manufacturing process, and quality control of pharmaceuticals). In accordance with the Biosafety Guidelines for Personnel Engaged in the Production of Vaccine and Biologicals (World Health Organization, WHO), the Guideline for the Biosafety Biological Manufacture was established by the Ministry of Health, Labor and Welfare. In this report we describe the Japanese and WHO guidelines for biosafety, and discuss biosafety countermeasures in influenza vaccine manufacturing facilities.

Definition of "new type of influenza virus":

New types of influenza virus include those described in, as follows *9) . "Fifteen subtypes of influenza virus A type are known that differ in the structure and function of their surface hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) molecules. Only a few of these subtypes are infectious for humans; the rest are non-infectious. When a non-infectious subtype undergoes a critical antigenic shift, it emerges as a new infectious agent within an interval of tens of years. Such a virus is called a 'new type of influenza virus', because it is new to humans. "Influenza subtypes that were once pandemic but disappeared in later years and subsequently reemerged are included in the category of the 'new types of influenza virus'. The biosafety level of new types of influenza virus should be classified according to the WHO's Risk Groups. A new type virus with potent virulence is managed under BSL3.

2. Japanese and WHO guidelines for biosafety

2.1. Classification of microorganisms

2.1.1 Japanese guideline for biosafety

Microorganisms are classified according to BSL level based on information in the WHO guideline for biosafety in view of the latest scientific knowledge. The "Biosafety manual for infective microorganisms" from the Japanese National Institute of Infectious Disease is referred to for classification of microorganisms.

2.1.2 WHO guideline for biosafety

- Risk Group 1 ----- no or very low individual and community risk
- Risk Group 2 ----- moderate individual risk, low community risk
- Risk Group 3 ----- high individual risk, low community risk
- Risk Group 4 ----- high individual risk and community risk

2.1.3 Classification of microorganisms for vaccine manufacture

- BSL1 ----- attenuated measles virus, attenuated mumps virus, attenuated rubella virus, attenuated varicella virus, attenuated polio virus, BCG
- BSL2 ----- Bordetella pertussis, Corynebacterium diphtheriae, Clostridium tetani, Vibrio cholerae, Japanese encephalitis virus, influenza virus (a strongly virulent new type influenza virus is BSL3)

2.2. Coverage of controlled areas for infective microorganisms

2.2.1. Japanese guideline

- 1) Coverage of facilities for biologicals is referred for microorganisms of BSL1, BSL2 and BSL3. However, it isn't referred for microorganisms after inactivation or removal.
- 2) Biohazard information labels must be displayed in controlled areas where microorganisms are used.

2.2.2. WHO guideline

Coverage of facilities for biologicals is referred for microorganisms of each risk group.

2.3. Guideline for manufacturing facilities

2.3.1. Manufacturing facilities for BSL1

Special manufacturing facilities are not required by either the Japanese or WHO guidelines.

2.3.2. Manufacturing facilities for BSL2

Item	Requirement	Japan	WHO
Facility	Manufacturing facilities are separated from other facilities. Restriction of entry to the manufacturing facilities.	No	No
	Prevention of microorganism leakage.	No	No
	Double-door entry.	No	No
Air	Independent air conditioner.	No	No
	Air supply through an HEPA filter linked to the exhaust system (negative pressure control).	No	No
	Air of high-risk work rooms is exhausted through an HEPA filter (air circulation is available).	Yes	Yes
	Monitoring of work areas.	No	No
	If the air conditioner accidentally stops, the air does not leak outside the room.	No	No
	Emergency electrical power source for continuous air conditioner operation in emergency blackouts is secured.	No	No
Manufacturing	Operations with microorganism aerosols are performed in a safety cabinet (class IIA or higher type) or equivalent system, and the air is exhausted directly outside through an HEPA filter (air circulation is available).	Yes	Yes

2.3.3. Manufacturing facilities for BSL3

Item	Requirement	Japan	WHO
Facility	Manufacturing facilities are separated from other facilities. Restriction of entry to the manufacturing facilities.	Yes	Yes
	Prevention of microorganism leakage.	Yes	Yes
	Double-door entry.	Yes	Yes
Air	Independent air conditioner.	Yes	Yes
	Air supply through an HEPA filter linked to the exhaust system (negative-pressure control).	Yes	Yes
	Air in high-risk work rooms is exhausted through an HEPA filter (circulation is unavailable).	Yes	Yes
	Monitoring of work area.	Yes	Yes
	If air conditioner accidentally stops, the air does not leak outside the room.	Yes	Yes
	Emergency electrical power source for continuous air conditioner operation in emergency blackouts is secured.	Yes	Yes
Manufacturing	Operations with microorganism aerosols are performed in safety cabinet (class IIB or better type) or equivalent system, and the air exhausted directly outside through an HEPA filter (circulation is unavailable).	Yes	Yes

2.3.4. Guideline for solid waste, fluid waste, disinfection and sterilization, emergency measures, education and training

Item	Requirement	Japan	WHO
Solid waste	(BSL1) Waste is packaged in a controlled area, and then carried out and incinerated in a factory (Trust of incineration is available).	Yes	Yes
	(BSL2) Waste is packaged in a controlled area, after inactivation of the outside of the container is carried out and incinerated in a factory (Trust of incineration is available after inactivation)	Yes	Yes
	(BSL3, ① or ②) ①Waste is incinerated in the factory after appropriate chemical or heat disinfection. (Trust of incineration is unavailable) ② Waste is directly transported to an incinerator by an in-line system in the factory. (Trust of incineration is unavailable)	Yes	Yes
Fluid waste	(BSL1) Waste containing microorganisms and waste that came into contact with microorganisms is drained to out of the facility after adequate heat (or disinfectant) sterilization.	Yes	Yes
	(BSL2 and BSL3) Waste containing microorganisms and waste that came into contact with microorganisms is drained to out of facility after adequate heat (or disinfectant) sterilization a waste tank.	Yes	Yes