

Figure 9 Autoclave for biohazard

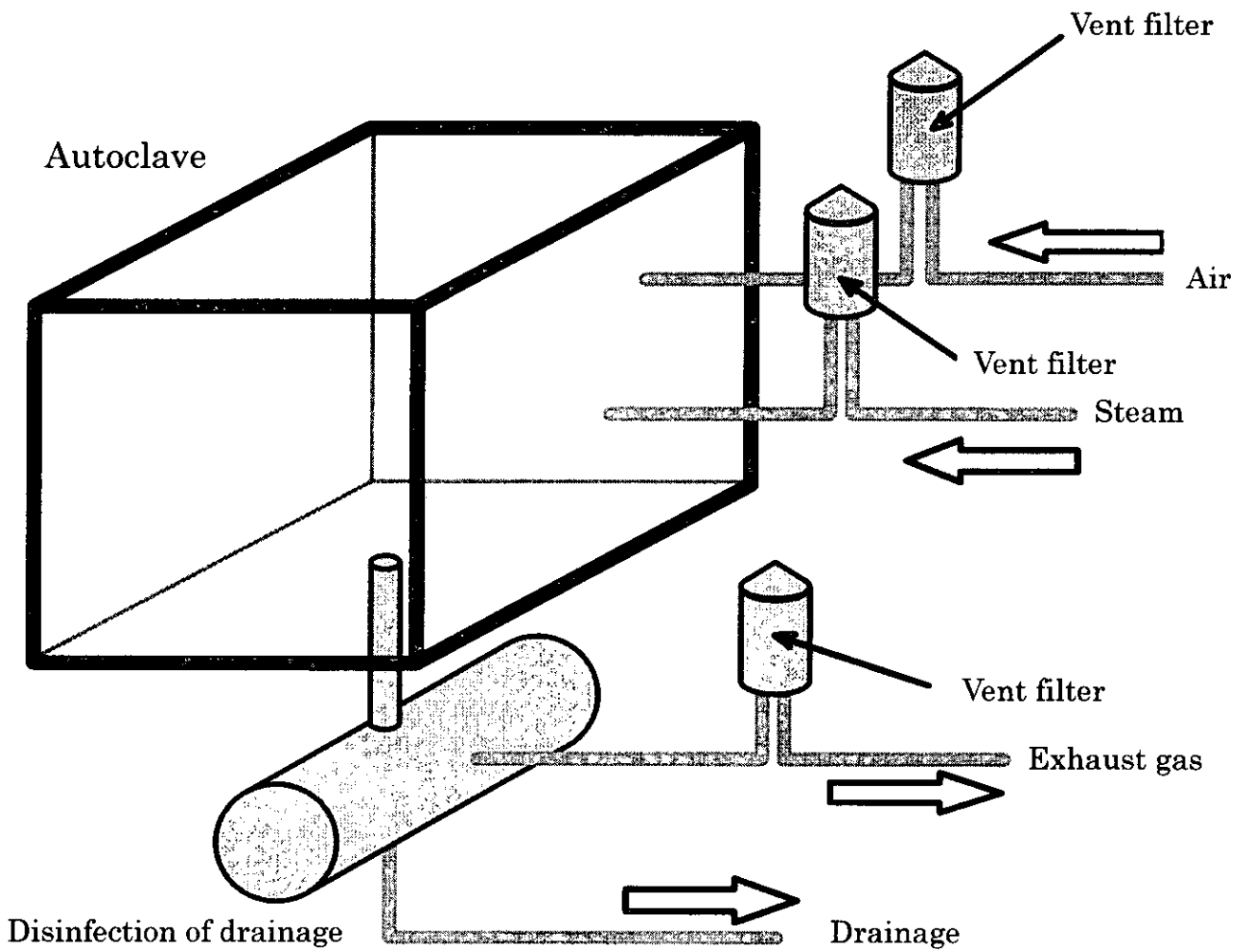


Figure 10 Transportation flow of disposal egg

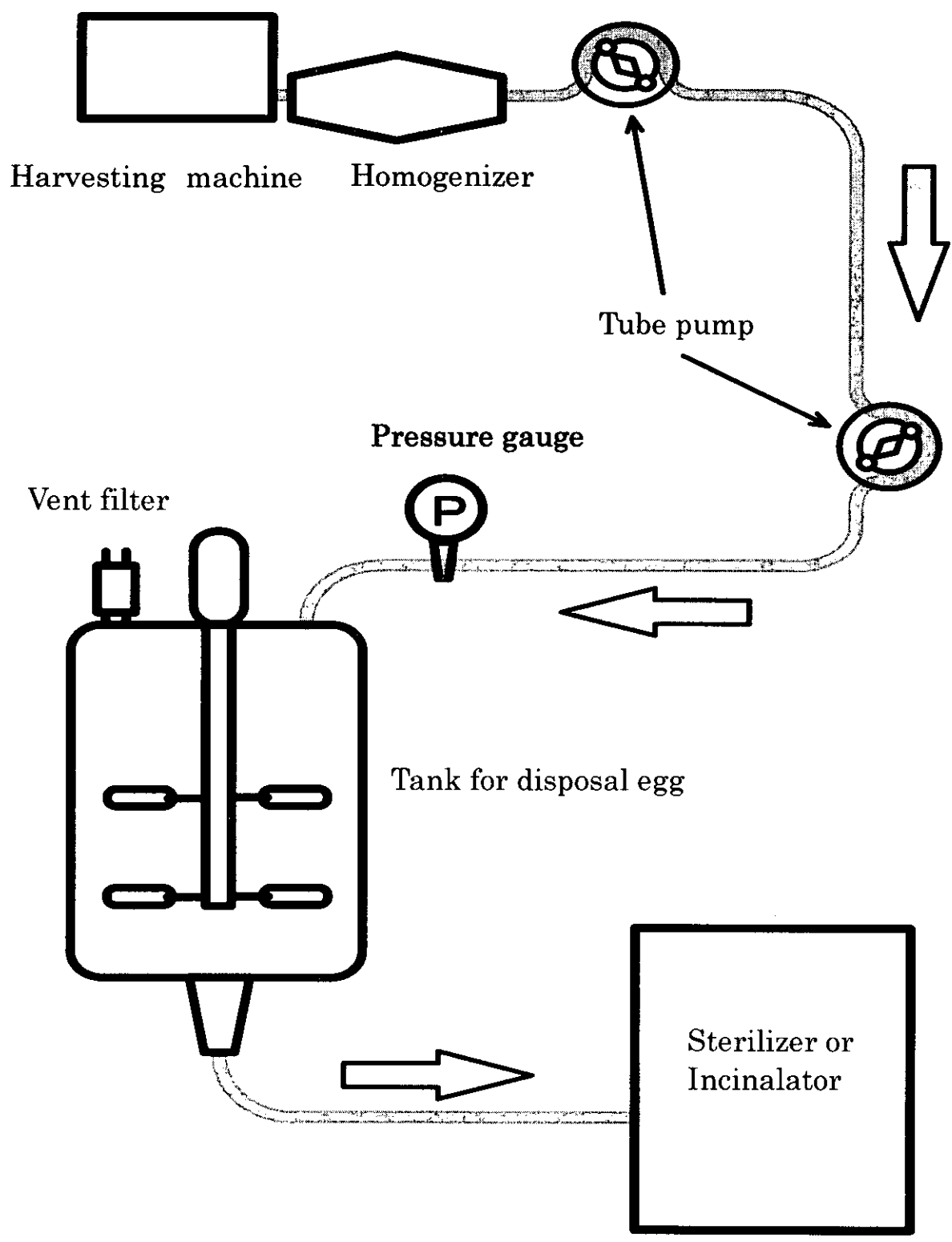


Figure 11 Disposal system for waste fluid

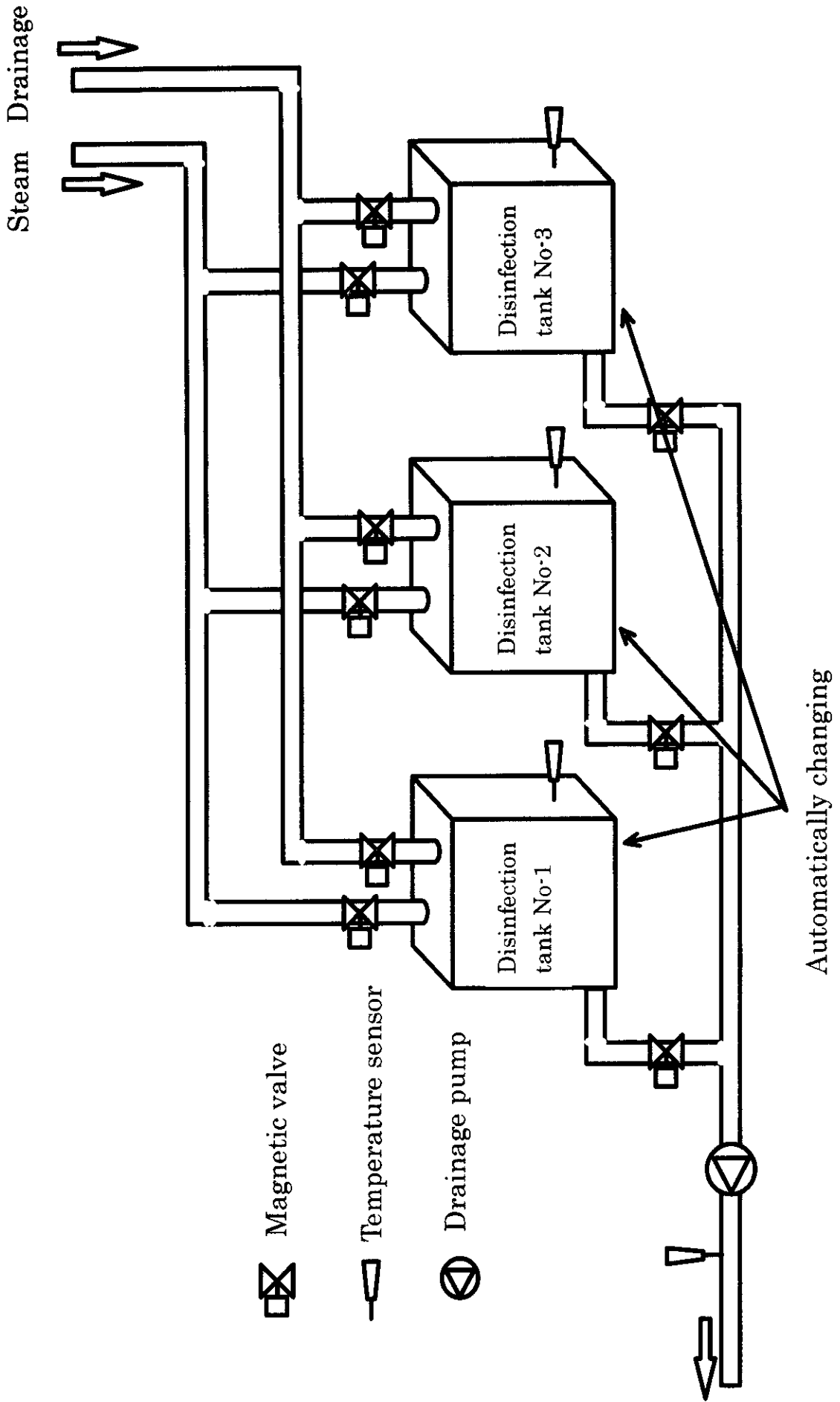
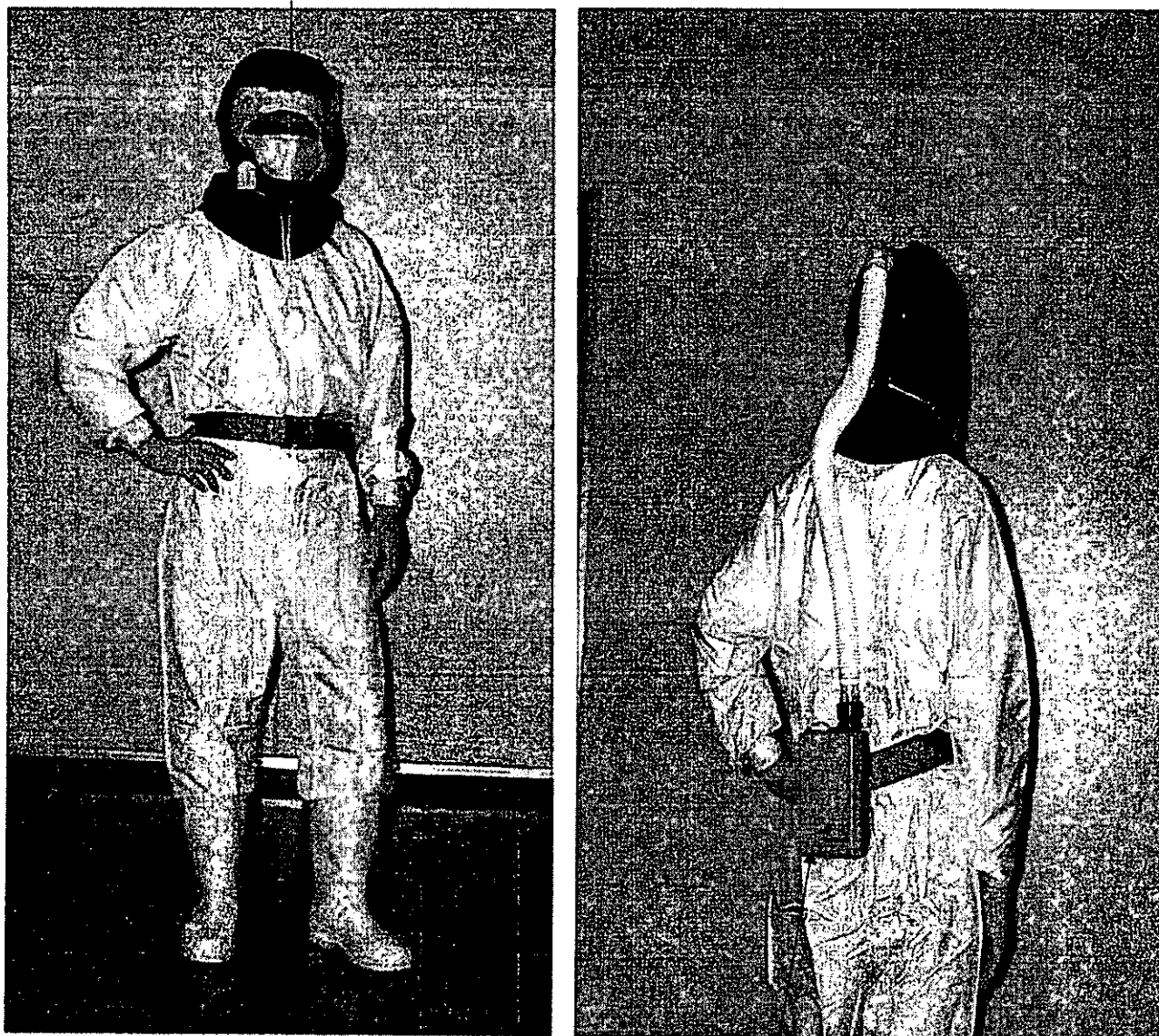


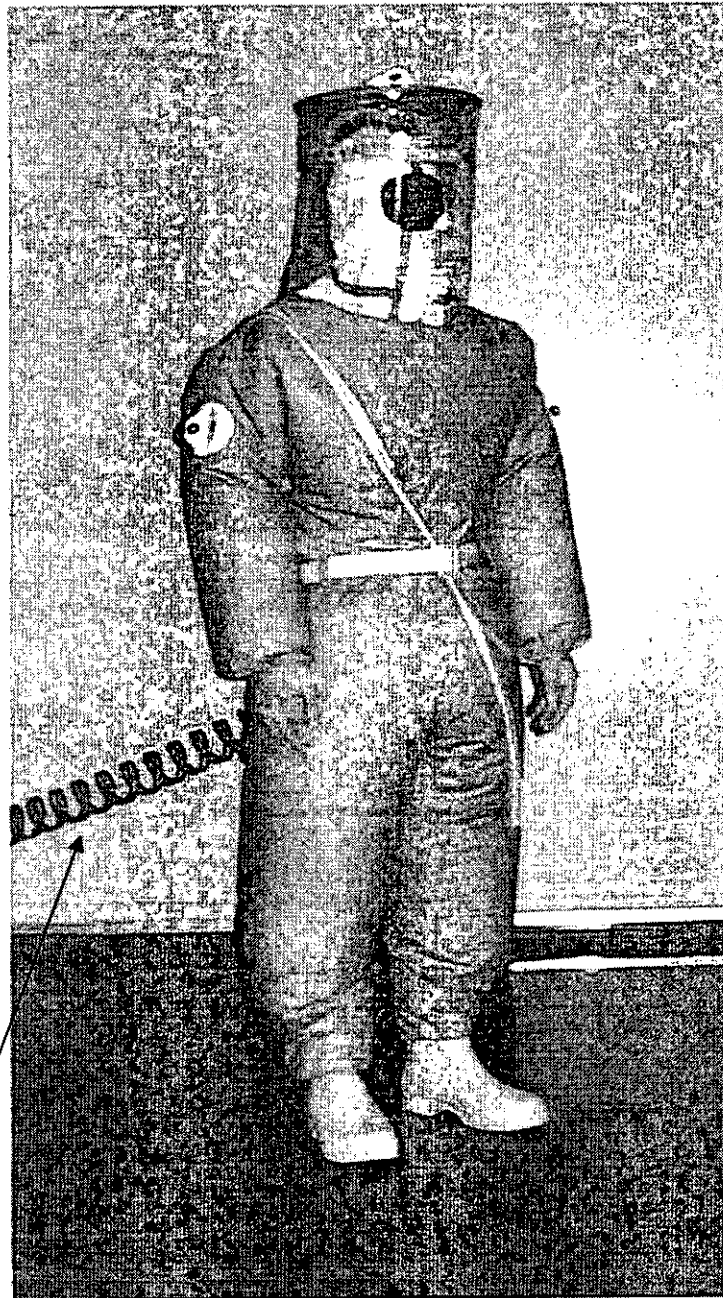
Figure 12 Protective clothing for biohazard

Head is maintained at positive pressure



Air flow pump unit with HEPA filter

Figure 13 Compression type protective clothing



Air tube

Figure 14 Protective clothing in emergency for



An oxygen cylinder

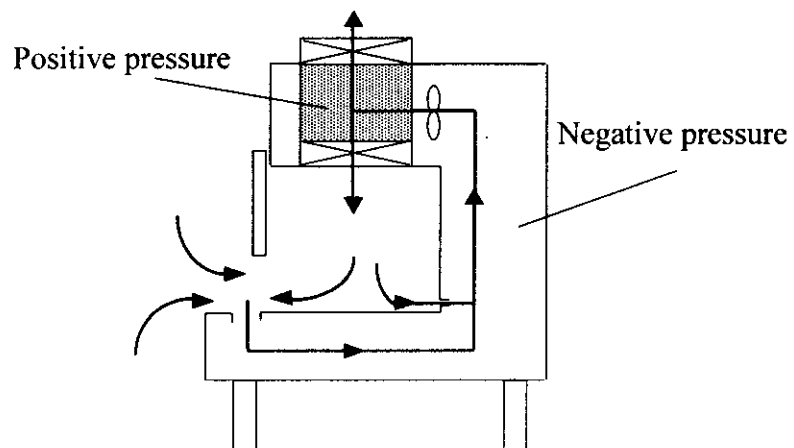
Classification of safety cabinet

- **Class I** **Only worker protection,
Exhaust to the room**

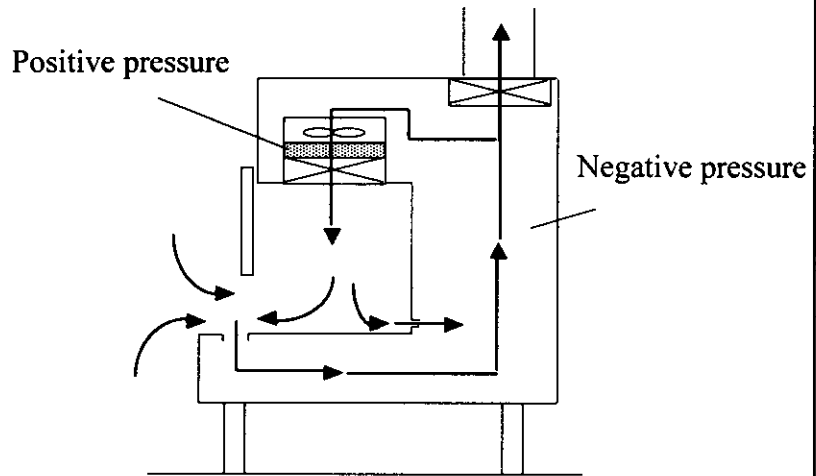
- **Class II**
 - Type A** **Exhaust to the room**
 - Type B1, B3** **Exhaust to outside of the room**
 - Type B2** **Exhaust to outside of the room
Air(All fresh)**

- Class III** **Glove box**

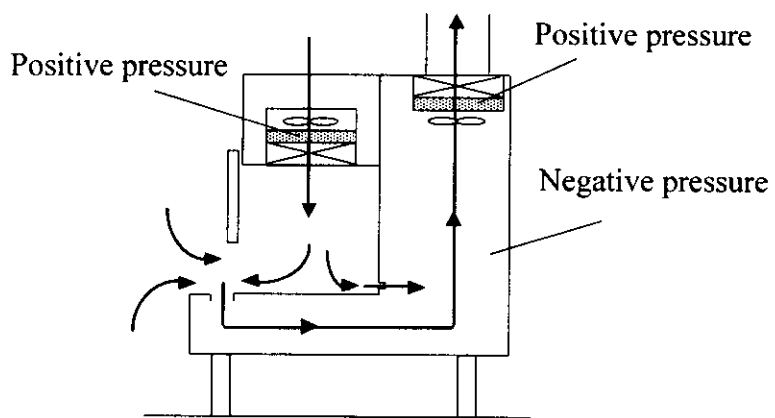
Safety cabinet (Class II type A)



Safety cabinet (Class II typeB1)



Safety cabinet (Class II typeB2)



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

5. ろ過滅菌法に関する研究

分担研究者 曲田純二 日本ミリポア(株)バイオファーマシューティカル事業本部次長

研究要旨：無菌医薬品製造における重要工程の一つであるろ過滅菌工程に関しては、ISO 13408-2 Filtration が 2003 年中に国際規格として発効される予定であり、また FDA から 1987 年以來の「Sterile Drug Products produced by Aseptic Processing Draft」が提案されるなど、国際標準化が進められている。一方、そのようなガイドラインでは個別・詳細な項目までは一般的に踏み込まれない。その中で主要な管理項目であるバクテリアチャレンジ試験について、ケースバイケースで判断されることが多く、その科学的妥当性について検証することは無菌医薬品製造をろ過滅菌工程に依存する場合重要である。今回、いくつかの実験を通し、判断基準を実証することを試みた。

A. 研究目的

ろ過滅菌で製造される無菌医薬品において、留意すべき重要な具体事項を実証する。

B. 研究方法

医薬品の模擬液を用い、フィルターに対するバクテリアチャレンジ試験を実施した。

C. 研究経過

1. アイソレーターの導入やバイオ医薬品の増加などに見られるように無菌操作によって製造される無菌医薬品が年々増加するに従い、無菌操作法に関するガイドラインの充実が産業界および規制当局から求められている。
2. 事実、ISO 13408-2 : Filtration は 2003 年中に日米欧の合意のもと発効される予定であり、米国 FDA は 2002 年 9 月に無菌操作法全体を網羅するガイドラインのドラフトを発表し現在産業界の意見集約を始めている。
3. このようなガイドラインでは個別詳細の事例までは網羅できないため、しば

しばバリデーション上判断が難しいケースも生じる。

4. 今回、ろ過滅菌工程で重要なバリデーション項目である、バクテリアチャレンジ試験について 2, 3 の実験を通し、判断例を作成した。

D. 考 察

1. バクテリアチャレンジ試験においては、少なからず医薬品自体に抗菌性を持つことから、模擬液による「置換法」が使用される。その判断および実施事例を検証した。
2. 一方、抗菌性があっても模擬液が調整不可能な場合、当該医薬品を使用せざるを得ないケースもある。その場合、抗菌性が影響しない時間を 1 工程とし、実際のろ過工程時間まで繰り返す手法でバリデートを行った。
3. さらに、高粘度薬液のように、0.2/0.22um フィルターのろ過が困難な場合、0.45um フィルターの直列ろ過で

バリデートを試みることもある。本実験ではその直列ろ過ではバクテリア捕捉性能を実証できず、0.2/0.22um フィルターで再度ろ過面積の増加などで対処する必要性が認められた。

E. 結 論

バクテリアチャレンジ試験において当該医薬品を用いた「直接懸濁法」が望ましいことは言うまでもない。また、高粘度薬液などの場合も安易に 0.2/0.22um フィルターを避けることも問題である。抗菌性を有する場合の試験や難ろ過溶液のバクテリアチャレンジ試験のバリデーションは予備実験を十分に行い、計画・実施すべきである。

F. 研究発表

「ヘルスケア製品（医薬品・対外診断薬・医療用具）の無菌操作層におけるろ過滅菌」曲田純二：PDA Journal of GMP and Validation in Japan Vol.4 No.2, 2002

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

「ヘルスケア製品（医薬品・体外診断薬・医療用具）の無菌操作法における、ろ過滅菌」

日本ミリポア(株) バイオフィーマシューティカル事業本部

マーケティングサービス部次長 曲田純二

ろ過滅菌工程のバリデーションに関しては各国の規制当局より Good Manufacturing Practice (GMP) の観点から要求され、ISO/TC 198/ WG9 においては、その管理項目の日米欧での統一化が図られている。この作業部会で作成された ISO 13408/ Part2 (Filtration) は現在 DIS (Draft International Standard: 国際規格案) の段階にあり、国際規格発効に近い状態にある。

ISO/TC 198/ WG9 のこの1年間の活動を顧みると、2001年12月にドイツ ケルンにおいて開催され、ISO 13408/ Part2 (Filtration) についても全体ではおよそ80項目について討議された。変更点の一部の例は下記のとおりである。

ろ過前のバイオバーデンを測定することについては”Should”から”Shall”に変更され、より強い要求事項となった。ただし、過去の実験結果が安定して低いバイオバーデンを示している場合などは除外されている。また、メンテナンスと変更管理に関し、フィルター使用者と製造者は同意文書を取り交わすことが追記された。これは特に製造者側に変更届けを義務付けることであり、使用者側の管理として重要な追加事項と思われる。

このような議論の末、取りまとめられた本 DIS は主要メンバー20カ国に回覧され、投票の結果、反対意見は皆無であった。2002年5月には京都国際会議が開催され、この DIS を FDIS (Final Draft International Standard: 最終国際規格) に昇格して投票を実施する方向で、現在調整中である。

ちなみに、国際規格作成作業はまず WD (Working Draft: 作業分科会原案) が作成され、次に CD (Committee Draft: 委員会原案) としてまとめられる。この CD に対する、参加国の投票が行われ、合意されると DIS (Draft International Standard: 国際規格案) となり、ついで同投票後 FDIS (Final Draft International Standard: 最終国際規格案) となりこれを経て国際規格発効となる。

今回、この ISO/DIS 13408/ Part2 (Filtration) をもとに、微生物管理に関する国際基準の、ろ過滅菌工程のバリデーション・管理項目について紹介する。

1. 管理項目の構成

ISO/DIS 13408/ Part2 (Filtration) の主要構成は下記のとおりである。

① 適用範囲

：ヘルスケア製品（医薬品・体外診断薬・医療用具）の無菌操作におけるろ過滅菌工程を対象とし、ウィルス除去や、バクテリア細胞ワクチンなどフィルター孔径より大きい医薬

品は適用外である。

② 引用規格

：すでに国際規格として 1998 年に発効された ISO 13408 Part 1（一般要求事項）が基本となる。

③ 用語と定義

：たとえば、「ろ過滅菌フィルターとは、明確化されたろ過工程条件下で、ある流体（液体あるいはガス）から、明確化されたチャレンジ微生物を除去する能力を持つフィルター」と定義されている。

④ フィルター製造者のデータに基づくフィルターおよびフィルターアッセンブリーの選択

⑤ フィルター使用者のデータに基づく、製品（医薬品）特性を考慮した選択基準

⑥ ろ過工程

⑦ ろ過システム的设计

⑧ 定期的手順

⑨ 工程のドキュメンテーション

⑩ メンテナンスと変更管理

⑪ 操作者の訓練

本稿では、上記のうち④から⑦について解説する。

2. フィルター製造者のデータに基づくフィルターおよびフィルターアッセンブリーの選択

表 1 は、一般にフィルター製造者より提供される品質保証項目である。

また、シートおよびディスクフィルターの場合、カートリッジおよびカプセルフィルターと異なりフィルター製造者は全数の完全性試験を実施していないため、特にフィルター使用者でのフィルター使用前後の完全性試験結果が重要であろう。

表 1. 液体およびガス用フィルターに要求される品質保証

品質保証項目	液体ろ過滅菌フィルター	ガスろ過滅菌フィルター
完全性試験	○	○
エンドトキシン／パイロジェン	○	
バクテリアチャレンジ試験	○	○
酸化物質あるいは全有機炭素	○	
粒子離脱性	○	○
ファイバー離脱性	○	○
生物学的安全性	○	○
抽出物試験	○	
耐熱性	○	○
耐圧性	○	○

流量—水	○	
流量—エア		○

3. フィルター使用者のデータに基づく、製品（医薬品）特性を考慮した選択基準

ここでは、製品とフィルターの適合性としてろ過工程での吸着や安定性などの評価と、工程特性として必要膜面積や前ろ過の必要性の検討を、実際の製品と使用するフィルターを用いて試験する。

ヒアルロン酸のような高粘度薬液などの場合、0.2/0.22 μ m フィルターで薬液自体が通過しないことが実証された場合、0.45 μ m フィルターの多段ろ過でろ過滅菌が実施されるケースもある。ただし、そのような場合の0.2/0.22 μ m フィルターでの評価時には、同じ公称孔径でも材質によってろ過特性が異なったり、また同じ材質表示でも親水化技術の違いによってろ過特性が異なる場合があるため、複数のフィルター材質を検討すべきである（1）。

4. ろ過工程

4. 1. 工程のパラメーター

主には、洗浄、滅菌操作、ろ過工程条件、完全性試験操作がパラメーターとして上げられる。

4. 1. 1. 洗浄

フィルター使用者は洗浄工程において、そのろ過液が抽出物、不溶性粒子および酸化物質の許容限度内であることを確認する必要がある。その場合、フィルター製造者からの情報も有用である。

たとえば、抽出物試験の一つにUSP 過マンガン酸還元物質試験があるが、下記はフィルター製造者から提供されるその試験の一例と結果(表2)である。

カートリッジフィルターを60分、126℃ (21psig or 1.46barg 蒸気) でオートクレーブ滅菌を行う。その後、純水を用い流量800～850ml/分で1000mlろ過する。ろ液を100ml毎、1000mlまで継続的に採取する。100ml毎にUSPの方法で過マンガン酸カリウム還元物質の試験を行う。各2ロット、計4本の10”カートリッジフィルターを試験に用いる。

試験結果として、10”カートリッジフィルターは4本全部、10”カートリッジフィルターあたり1000mlで洗浄後、過マンガン酸カリウム還元物質の存在を示さなかった。

表2. USP 過マンガン酸還元物質試験

洗浄量 (ml)	#1	#2	#3	#4
100	Fail	Fail	Fail	Fail
200	Pass	Pass	Pass	Fail
300	Pass	Pass	Pass	Pass
400	Pass	Pass	Pass	Pass

500	Pass	Pass	Pass	Pass
600	Pass	Pass	Pass	Pass
700	Pass	Pass	Pass	Pass
800	Pass	Pass	Pass	Pass
900	Pass	Pass	Pass	Pass
1000	Pass	Pass	Pass	Pass

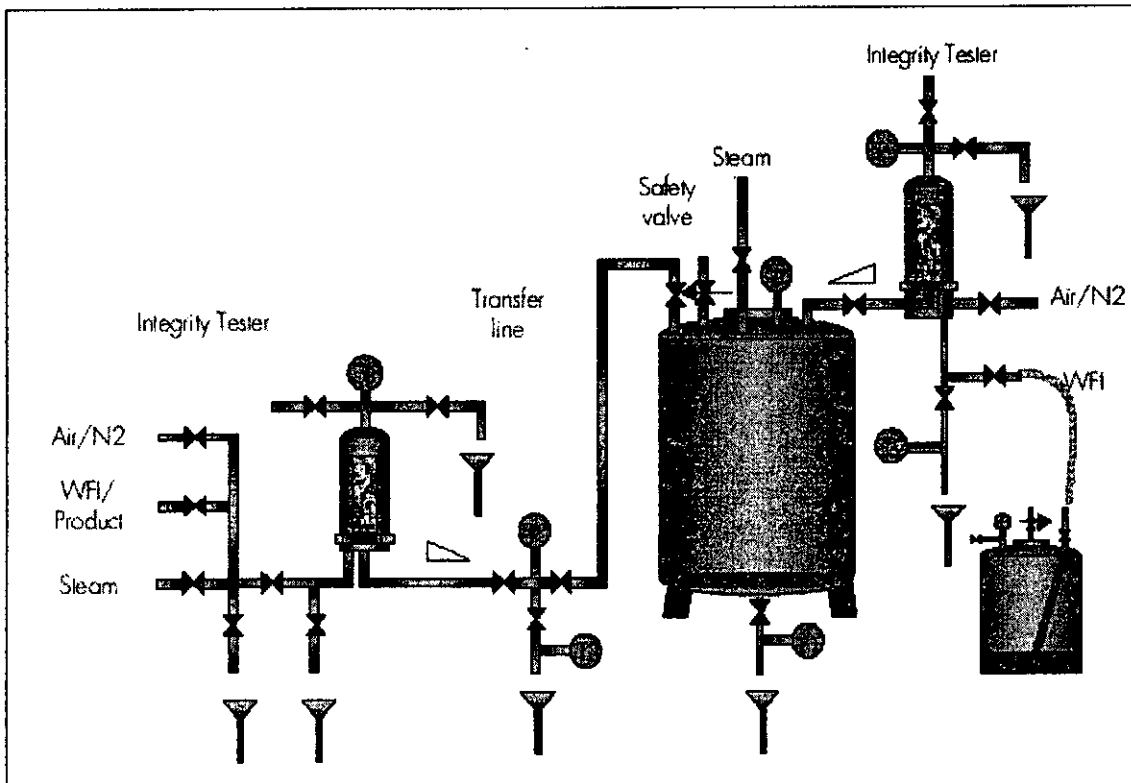
4. 1. 2. 滅菌操作

フィルター使用者はフィルター、ろ過システム、流路の滅菌手順を確立する。フィルターについては温度により許容圧力が変わるため、SIP時には温度と圧力の記録が重要である。図1は一般的なろ過滅菌システムであり、また表3には、ある親水性PVDFカートリッジフィルターのSIP時のパラメーターを示した。

表3. 親水性PVDFカートリッジフィルターのSIPパラメーター

必要最低蒸気圧	>1.2 bar
必要最低圧縮エア	>1.5 bar (必要最低蒸気圧の300mbar以上)
コールドポイントにおける最低温度	>121.1℃
SIP時の最大正差圧	<350 mbar
SIP時の最大逆差圧	<100 mbar
冷却時の最大正差圧	<350 mbar
最低滅菌時間	121.1℃で30分
冷却時間	およそ30分

図1. ろ過滅菌フィルターアセンブリー：ろ過滅菌フィルター、滅菌タンク、ベントフィルター



4. 1. 3. ろ過工程条件

ろ過工程における主要なパラメーターには下記が上げられる。

- ① 製品のろ過、ホールディング時間およびバイオバーデンへの影響
- ② 製品によるフィルターのコンディショニング（必要な場合）
- ③ 製品がフィルターへ接触するろ過時間・全時間（ろ過を実施する前にフィルターへ製品が接触する時間を含む）
- ④ 多数回ろ過を実施する場合、その最大回数
- ⑤ 流量
- ⑥ ろ過量
- ⑦ 温度
- ⑧ 差圧

4. 1. 4. 完全性試験操作

文書化された完全性試験手順として、許容される限度値、不合格時の検討法およびそのフィルター完全性試験を繰り返し実施できる設計を含め確立されることが必須である。あるろ過工程がバリデートされた後、その製造工程において使用されるフィルター交換品が同じ機能することの確認が重要であり、その手法としてバブルポイント、拡散流量およびプレッシャーホールドが完全性試験として使用される。

また、その完全性試験手順がバクテリア捕捉試験と相関性があることの実証が必要である。標準的なバクテリア捕捉試験は、有効ろ過面積 cm^2 あたり少なくとも 10^7cfu (colony forming units) のチャレンジレベルで実施する。その際使用されるフィルターは、最小完全性試験規格値にできるだけ近く、また標準的に製造されるフィルターであることが必要である。

4. 2. 各製品に対するフィルターによるバクテリア捕捉性能のバリデーション

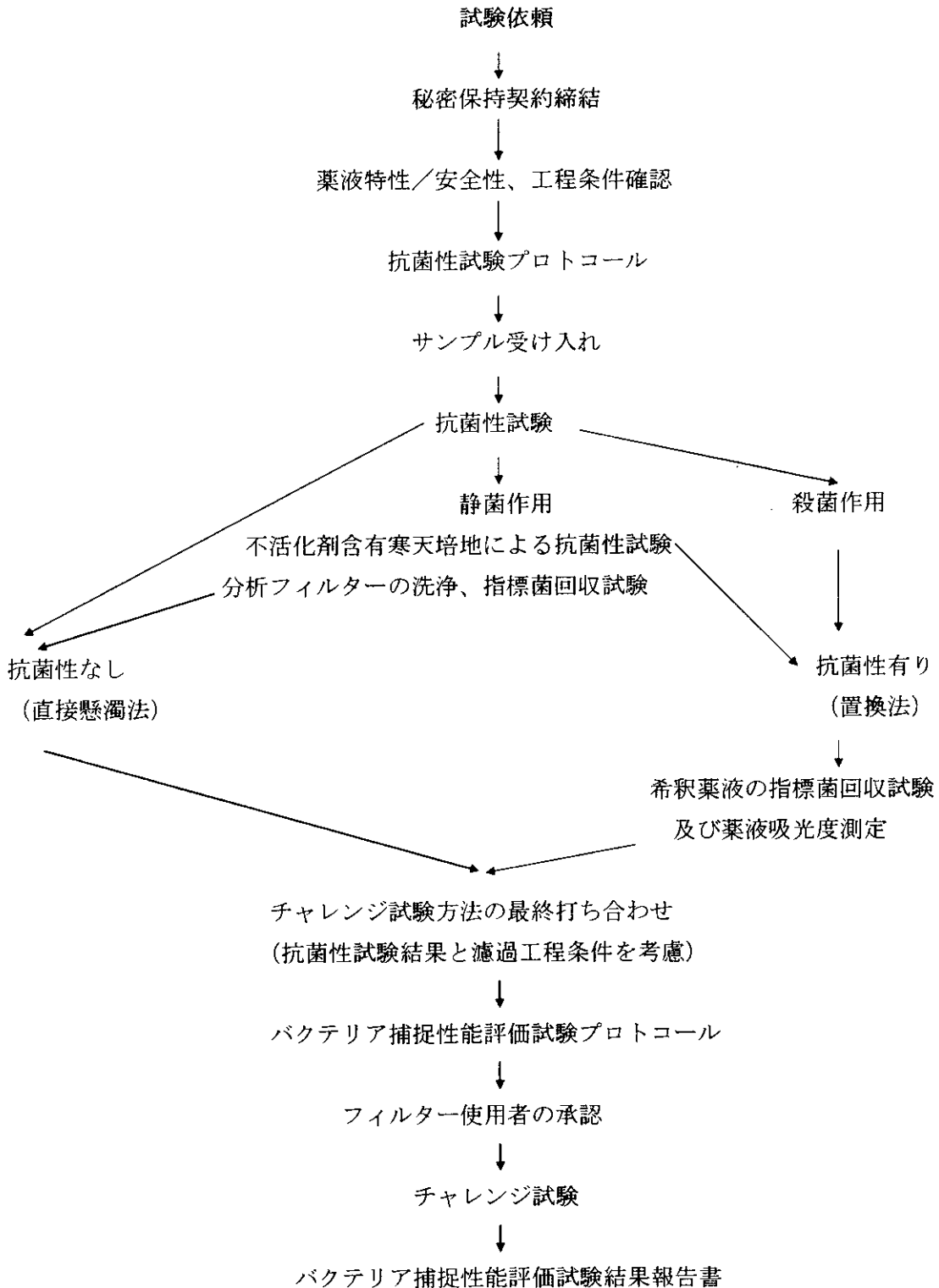
4. 2. 1. バクテリアチャレンジ試験

(1) 製品をろ過する滅菌フィルターは、妥当なバクテリアチャレンジ試験によって最初の PQ (Performance Qualification) 段階でバリデートされる必要がある。その際、3ロット以上のフィルター群から、それぞれ少なくとも1つのフィルターを用いて、3回の連続した捕捉結果が得られることを実証する。不合格であった場合は原因を分析する。

- ①この試験は製造する環境汚染を避けるために、一般に実験室でのスケールダウンモデルシステムで実施される。なお、その手法は一般に、American Society for Testing and Materials(ASTM), Health Industry Manufacturers Association(HIMA)および FDA Aseptic Processing Guideline に基づいている(2, 3)。

図2は弊社で受託業務として実施する、バクテリア捕捉性能試験の概要である。

図2. バクテリア捕捉性能評価試験



②このチャレンジ試験で不合格になった場合、追加の試験の実施については不合格原因の

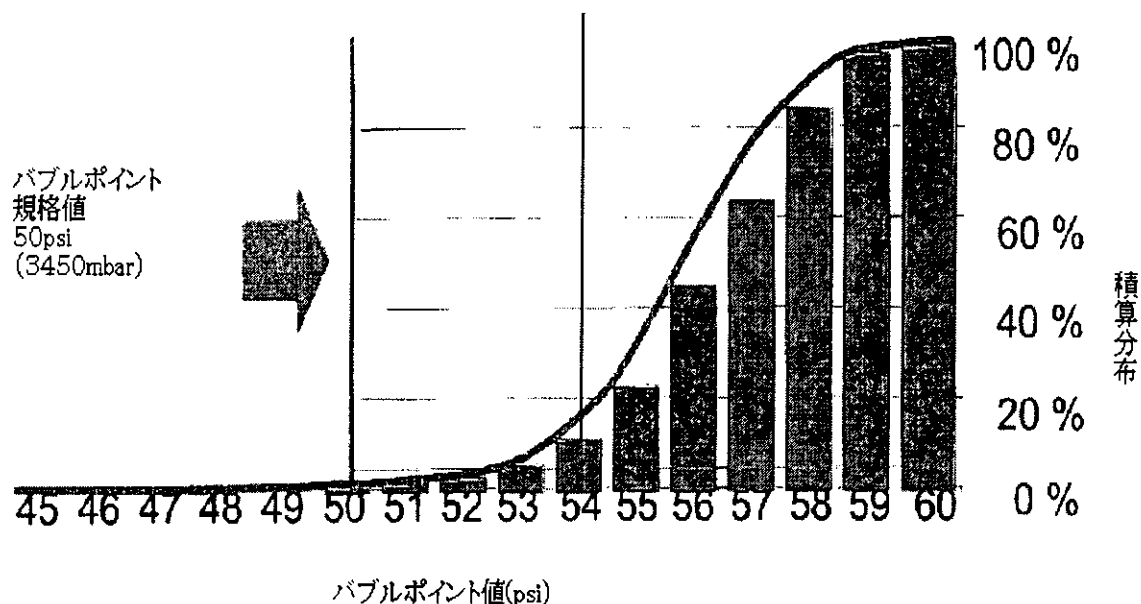
検討結果に基づき判断する。

(2) 製品に対するフィルターのバクテリア捕捉性能は、ワーストケース条件下で製品固有の条件あるいは製品グループでバリデートする。バリデーションにおいて製品のグルーピングを実施する正当性については文書化された根拠に基づき、判断する。

(3) 製品固有のバクテリアチャレンジ試験においては、製品製造に使用されるフィルターと同じメンブレンをフィルター製造者から入手し、また完全性試験の許容限度値にできるだけ近い（通常その規格限度値の10%以内）メンブレンを選択する必要がある。

図3に、弊社の親水性 PVDF ろ過滅菌カートリッジフィルターの過去5年間の製造記録より完全性試験（バブルポイント）値の分布を示した。規格値は 3450mbar(50psi)であり、多くのフィルターは 3795mbar (55psi) 以上のバブルポイント値であるが、バクテリアチャレンジ試験時には少なくとも1ロットは 3726mbar (54psi) 以下のバブルポイント値のフィルターを使用する。

図3. 親水性 PVDF 滅菌ろ過カートリッジフィルターの完全性試験（バブルポイント）値の分布(5年間の製造記録より)



(4) 製造におけるワーストケースをシミュレートしたチャレンジ条件を選択するために下記を考慮する。

- ① pH
- ② 粘性

- ③イオン強度
- ④浸透圧
- ⑤活性成分の濃度
- ⑥表面張力
- ⑦チャレンジする微生物に対する製品の影響
- ⑧製品のバイオバーデンの特性
- ⑨ろ過時間／フィルターが製品に接触する総時間
- ⑩フィルター単位面積当たりのろ過量
- ⑪流量／流束
- ⑫差圧
- ⑬温度
- ⑭滅菌条件
- ⑮多数回滅菌の影響

上記の中で⑨ - ⑫について、より高い条件が主たるワーストケースとして設定される。それ以外の因子についての考え方の一例が表 4 である。

表 4. ワーストケース条件の 1 考察

PH 例として、親水性PVDF膜は、pH4以上の水溶液中で負電化を持つ。正電化を表面に持つ微生物の場合、その吸着効果を考慮する必要があるだろうか？ 0.45umおよび0.22umでの異なるpH条件でのバクテリア捕捉試験においてその影響は確認されていない。むしろ、生理食塩水での各種pH条件での <i>B. Diminuta</i> の生存試験で、pH6-8がもっとも生存率が高いことから、pH6-8がワーストケースと考えるのが妥当であろう。
粘性 ヒアルロン酸、オイル様成分、ワセリンなどのろ過においては、微粒子様成分のフィルター細孔の移動があるため、長時間および高温・高压条件がワーストケースとなるであろう。温度に関しては、 <i>B. Diminuta</i> が生存しかつその濃度が変化しない範囲での、よりプロセスに近い高温条件がワーストケースと設定されるべきかもしれない。
浸透圧 浸透圧の変化は微生物を膨張させたり、縮小させる可能性がある。最も高い浸透圧がワーストケースとなる。一方、浸透圧の急激な変化は微生物の生存率を低下させる可能性があるため、試験時には留意する。
イオン強度 例えば、親水性 PVDF 膜は負荷電を持っているが、溶液中のイオン強度の増加により中性化し、むしろ疎水相互作用による微生物の吸着除去効果を引き起こす可能性がある。したがって親水性 PVDF 膜の場合、低イオン強度条件がワーストケースとされる。一方、この傾向は膜素材によって異なるため、ケースバイケースである。
表面張力 界面活性剤などの存在は、膜と微生物との疎水性、静電的吸着作用を阻害するため、その存在がワーストケースとなる。界面活性剤の抗菌性試験は必要である。

(5) フィルターおよびろ過条件が、バリデーション試験時のワーストケースを越えて

変更された場合には再バリデーションを実施する。

4. 2. 2. チャレンジ溶液とチャレンジ微生物

バクテリアチャレンジは、工程および製品固有の特性に基づいて実施する。

(1) チャレンジ溶液

試験を実施する溶液は実際にろ過滅菌される製品溶液である。製品溶液に抗菌性があったり、あるいはその他の特性によりこれが不可能な場合、シミュレートした溶液あるいはシミュレートした条件に変更して実施する。

シミュレートの検討においては下記を考慮する。

①製品溶液の改変（例：抗菌性成分の低減あるいは除去）

シミュレートする溶液はその製品特性および次のような溶液特性項目において製品にできるだけ近似させる必要がある—pH、粘度、イオン強度、浸透圧、表面張力およびチャレンジ微生物に対する製品の影響。

②製品と微生物の接触時間の低減

③製品温度の低減

④製品あるいは工程での抗菌性耐性を持つ小さい微生物の使用

⑤予定される製品の接触時間、製品にフィルターを接触させた後、上記①から④のいずれかを実施

(2) チャレンジする微生物

低いチャレンジレベルが許容される理論的根拠が無い限りは、*Brevundimonas diminuta* チャレンジ試験を実施する。そのチャレンジレベルはろ過面積 平方センチメートルあたり最低 10 の 7 乗個以上でなければならない。

もし、*Brevundimonas diminuta* よりもより通過しやすい微生物の存在が懸念される場合には、妥当な微生物を使用することを検討する。その懸念されるケースには下記が上げられる。

①生物由来成分の存在

②殺菌工程のないシステムからの水の使用

③フィルターを通過しやすい既知の微生物の存在

④多形型微生物の存在（例：ペニシリン溶液中の L form、マイコプラズマ）

ここで、*Brevundimonas diminuta* を使用することが不可能であり、かつより通過しやすい微生物の存在が確認されない場合、フィルター使用者が何らかの代替微生物を使用するに際してはその選択の正当性を実証する必要がある。

またその微生物をチャレンジ試験用に培養する場合、その細胞の大きさが十分に均一な分布になるように培養条件を適切に選択する必要がある。

(3) 微生物学的バリデーション

チャレンジ試験における微生物学見地からのバリデーションとして、次のことを確認する必要がある。

- ①抗菌特性による特別の手順を必要としない限り、バッチサイズと適用されるフィルター面積に合致した製品容量中にチャレンジ微生物を分散する。
- ②予定されたチャレンジが実際に遂行されていることとその試験中に生菌数が維持されていることを示すために、チャレンジ懸濁液中の生菌数を経時的に適切な回数のサンプリングを行い測定する。
- ③ろ過液にチャレンジ微生物が存在することことを想定し、微量の微生物を回収することができるように試験を設計する。

(4) 許容限度

ろ過液の微生物試験において、無菌であること、すなわちチャレンジ微生物がまったく検出されないことが必須である。

5. ろ過システムの設計

設計時の考慮点として、無菌的接続箇所、SIP時のコールドスポットの発生、ガスフィルターへの結露、製品の無菌性の維持などが上げられる。

また、SIP後（製品ろ過）使用前の完全性試験については、定置式および閉鎖式の完全性試験が実施できるよう、システムを設計する。ISO/TC 198/WG9の議論では、ろ過後の完全性試験は必須であるが、ろ過前の実施については推奨になっている。一方、FDA、EC、PDAではこのSIP後、使用前の完全性試験の実施を強く推奨している（3、4、5）。背景にはフィルターが最もダメージを受ける可能性が高い工程がSIPであるためである。

6. 最後に

今回、ろ過滅菌に関する国際基準として、フィルターの選択、ろ過工程、システム設計について、医薬品・体外診断薬・医療用具の無菌操作法の日米欧統一化を目的として活動しているISO/TC 198/WG9での検討内容を基本に紹介した。本稿では、定期的手順、ドキュメンテーション、メンテナンスと変更管理、教育・訓練については割愛したが、たとえば訓練に関しては、完全性試験不合格時の調査手順の確立など、必須事項として上げられている。機会があればそれら重要管理項目および実施法についても紹介したい。

参考文献

1. Kunio Kawamura, et al. "Absolute or Sterilizing Grade Filtration". PDA Journal. Volume 54, 2000,485-492
2. American Society for Testing Materials(ASTM). Standard test method for