

determining bacterial retention of membrane filters used for liquid filtration. ASTM Standard F838-83, ASTM, Philadelphia, PA, 1983(revised 1993).

- 3 . FDA. Guideline on sterile drug products produced by aseptic processing. Center for Drug Biologics, Rockville, MD, June 1987
- 4 . Revision of annex 1 to EC Guide to GMP for sterile medicinal products, 1997
- 5 . PDA Technical Report No.26 on Sterilizing Filtration of Liquids, 1998

#### Sterilizing Filtration in Aseptic Processing of Health Care Products

Junji Magata

Nihon Millipore Ltd.

Regulatory agencies in Japan, US and EU have been requiring validation for sterilizing filtration as part of aseptic processing to pharmaceutical industry. ISO 13408 offers guidance to filter users concerning general requirements for set up, validation and routine operation of a sterilizing filtration process, to be used for aseptic processing of health care products. ISO/TC 198/WG9 has been working for definition of requirements for filter selection, fluid specific selection criteria, filtration process, system design, routine process, documentation, maintenance & change control and operator training. At present, it is a step of Draft International Standard.

Key words: Sterilizing Filtration, Aseptic processing, ISO/DIS 13408-2, Bacterial challenge test, FDA, EC

## バクテリアチャレンジ試験（バクテリア捕捉性能評価試験）

日本ミリポア（株） 曲田 純二

ろ過滅菌によって無菌医薬品を製造する場合、もっとも重要な管理項目として、バクテリアチャレンジ試験がある。対象となる医薬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。原則として、試験に使用するバクテリアは、*Brevundimonas diminuta* である。ある特定の工程内のバイオバーデンにおいて、*B. diminuta* よりも小さいバクテリアが特定された場合、それを指標菌として検討することができる。

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。

バクテリア捕捉性能試験の主要工程は、薬液特性／安全性およびろ過工程条件の確認、抗菌性試験の実施、バクテリア捕捉性能確認試験プロコールの作成、バクテリアチャレンジ試験の実施である。医薬品メーカーが受託試験機関に当業務を依頼する場合は各工程で相互承認を文書で確認しながら進めなければならない。

### 1. 薬液特性／安全性およびろ過工程条件の確認

ここでは、特にワーストケースのろ過工程を設定する必要があり、その判断のための主要なパラメーターは下記である。

- 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

### 2. 抗菌性試験の実施

点眼剤や抗菌剤などに代表されるように、医薬品自体が抗菌性を有するケースは少なくない。試験にあたっては、バクテリアと医薬品の接触時間を上記1⑨のろ過時間／フィルターが製品に接触する総時間と同じく設定する。この試験結果、抗菌性が認められない場合は医薬品にバクテリアを直接添加する「直接懸濁法」を選択し、それが認められる場合抗菌物質を除去ないし低減した模擬液にバクテリアを添加する「置換法」を選択する。模擬液については、上述のpH、粘性、イオン強度、浸透圧などの当該医薬品の組成との同質性を考慮して作製する。当然、模擬液についても再度抗菌性試験を実施する。

本試験において抗菌性の有無の判断は重要である。ろ過滅菌においては *B. Diminuta* を  $10^7$ cfu/

フィルター $\text{cm}^2$ 以上チャレンジし、フィルター2次側が無菌であることの実証が必要である。一方、 $10^9\text{cfu}/\text{cm}^2$ など高濃度のバクテリアをチャレンジすると、フィルターの表層にバクテリア自身の層が形成され、そのバクテリア層による捕捉効果が発生する。すなわち、抗菌性が $10^2\text{cfu}$ 認められたとして、 $10^9\text{cfu}/\text{cm}^2$ になるよう、バクテリア捕捉試験確認試験プロトコルを作成することは妥当ではない。その観点から抗菌性の有無の判断には、 $10\text{cfu}$  (1 log) がボーダーラインとして妥当である。参考資料1に抗菌性評価試験例を示した (Page7)。

### 3. バクテリア捕捉性能確認試験プロコルの作成

参考資料2は、抗菌性が認められない場合の直接懸濁法のプロトコルである (Page8)。

### 4. バクテリアチャレンジ試験の実施

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。下記は不合格事例である。その対処法については、参考資料2の7. 再試験の規定を参照。

- ①  $0.45\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルターを指標菌が通過しなかった場合 または 2次側濾液を全量濾過した分析フィルター上に指標菌の コロニーが検出出来ない場合
- ② 指標菌のチャレンジ菌数が  $1\times 10^7\text{cfu}/\text{cm}^2$ 以上であることを確認出来ない場合
- ③ 菌チャレンジ試験後に  $0.22\mu\text{m}$  試験フィルターの菌チャレンジ液による バブルポイントが測定できず、明らかな試験フィルター破損や シール不良等を確認した場合
- ④  $0.22\mu\text{m}$  試験フィルターの 2次側に微生物汚染を確認した場合
- ⑤ 微生物の発育を確認し、なおかつその試験の状況が不備であったために試験が無効であったことが証明できない場合

### 研究事例1. 模擬液にも抗菌性が認められるケース

薬液に抗菌性(殺菌作用)があり、模擬液(薬液から防腐剤除去)をチャレンジ試験液に選定した。ところが模擬液にも抗菌作用があるため、抗菌性試験をMF法、また寒天培地に不活化剤を含有したものでおこない、この模擬液がチャレンジ試験液として適用できるか検討した。結論として、本手法により当模擬液で可能と判断し、チャレンジ試験が実施された。すなわちろ過工程と同時間まず当該医薬品をろ過した後、模擬液によるチャレンジ試験を再度同時間行われた。結果はフィルター3ロットとも7LRV以上を達成し合格した。

薬液は コントロール液中の生菌数に比べ、生菌数減少が1桁以上であり、指標菌に対し抗菌性があることを確認した(表1参照)。一方、模擬液も通常のTSA培地ではコントロール液中の生菌数に比べ、生菌数減少が1桁以上であり、指標菌に対し抗菌性があることを確認した(表2参照)。この模擬液に代わる液の調整は成分組成的に困難であるため不活化剤添加(0.05% チオグリコール酸ナトリウム)TSA培地で再度抗菌性試験を実施したところ、コントロール液中の生菌数に比べ、生菌数減少が1桁未満であり、指標菌に対し抗菌性がないことを確認した(表3参照)。しかし菌液塗抹培地上に、静菌作用と思われる発育阻止円が観察されたため、指標菌回収試験を実施し(表4参照)、菌チャレンジ液の模擬液として妥当か否かを検討した。

その結果、当模擬液は本試験の菌チャレンジ液としても差し支えないと判断した。また、使用する分析フィルターの材質はセルロース材質、分析フィルターの洗浄には不活化剤添加(0.05% チオグリコール酸ナトリウム)0.1% ペプトン水 1000mL/フィルター、分析フィルターの培養には不活化剤添加(0.05% チオグリコール酸ナトリウム)TSA培地を使用することとする。

試験手法が薬液のみをろ過後、模擬液に指標菌を懸濁してチャレンジする「置換法」となる為、試験装置の薬液除去確認試験を行った。

その結果、開始時及び終了時ともに薬液をシQ水(以下、純水)にて $10^2$ 倍以上希釈した場合、希釈抗菌性用コントロール液(純水)と同程度(生菌数が1桁未満の減少)の指標菌の回収を観察した(表5参照)。

以上より、薬液の希釈率が  $10^2$ 倍を洗浄基準とし、つまり、本試験では、最終洗浄液の一部を サンプルングし、分光光度計を用いて 257nmの波長時の吸光度を測定し、この時の吸光度が 2.3445以下であれば洗浄が終了したとみなす。

## 試験結果

表 1： 抗菌性試験結果（薬液中での指標菌の生菌数）\*1)

			(cfu/mL)
試験液名	開始時	240分後	結果
薬液	$2.1 \times 10^4$	0	抗菌性有り
コントロール液	$8.3 \times 10^5$	$8.2 \times 10^5$	-

\*1 試験温度は、22℃であった。

表 2： 抗菌性試験結果（模擬液中での指標菌の生菌数）\*2),\*3), \*4)

			(cfu/mL)
試験液名	開始時	240分後	結果
模擬液	$2.2 \times 10^5$	$3.3 \times 10^1$	抗菌性有り
コントロール液	$8.5 \times 10^5$	$9.2 \times 10^5$	-

\*2 試験温度は、22℃であった。

\*3 通常のTSA培地を使用した。

\*4 原液塗抹培地上に 静菌作用と思われる発育阻止円が観察された。

表 3： 抗菌性試験結果（模擬液中での指標菌の生菌数）\*5),\*6), \*7)

			(cfu/mL)
試験液名	開始時	240分後	結果
模擬液	$5.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	抗菌性なし
コントロール液	$6.3 \times 10^5$	$5.3 \times 10^5$	-

\*5 試験温度は、20-22℃であった。

\*6 0.05%チオグリコール酸ナトリウム添加TSA培地を使用した。

\*7 原液と 10倍希釈液の塗抹培地上に 静菌作用と思われる発育阻止円が観察された。

表 4： 指標菌回収試験結果 \*8)

試験液名	分析フィルター	結果 (cfu)	回収率(%) (コントロール比)
模擬液	HAWG047	123	94.6
コントロール液	HAWG047	130	-
模擬液	HVLP047	113	79.0
コントロール液	HVLP047	143	-

\*8 試験条件

- 使用液量 : 模擬液 2.2L、コントロール液 100mL使用
- 接触時間 : 240分
- 分析フィルター : HAWG047(セルロース材質) 及び HVLP047(テフロン材質)
- 洗浄液 : 不活化剤(0.05%チオグリコール酸ナトリウム)添加 0.1% ペプトン水  
コントロール液 洗浄用には0.1% ペプトン水
- 洗浄液量 : 1,000mL  
コントロール液洗浄は 100mL
- 使用培地 : 不活化剤(0.05%チオグリコール酸ナトリウム)添加TSA培地
- 試験温度 : 22-23°C
- 培養温度 : 30°C

表 5： 希釈薬液抗菌性試験結果 \*4)

薬液 希釈率	吸光度(abs.) (257nm) *5)	生菌数 (cfu) *6)	
		開始時	終了時
10 <sup>-2</sup>	3.2079	47	2
10 <sup>-3</sup>	2.3445	103	28
10 <sup>-4</sup>	0.9183	60	17
コントロール	-	63	57

- \*4 菌添加希釈薬液の静置温度は 21-22°C であった。
- \*5 測定波長は、257nm で行った。
- \*6 各菌添加希釈薬液の塗沫は 3枚ずつ行い、塗沫後の TSA培地は 30±2°Cで 2日間培養した。生菌数は平均値を示した。

研究事例 2. 必要医薬品量が少なく、ろ過工程のシミュレーションができず、かつ抗菌性を有するケース  
貴重な医薬品のため、当該薬液量ではろ過工程条件のバッチ量, ろ過時間などのシミュレーションが

できない。循環する薬液にチャレンジ液を添加しながらチャレンジ試験を行なう。また工程時間では菌が1Log以上減少するが、工程時間の半分では菌の減少が1Log以内であることから、工程時間の半分までチャレンジ試験を行ない、その後、新たな薬液に新たに菌を懸濁した新鮮なチャレンジ液を調製後、工程時間の残り後半のチャレンジ試験を行なった。チャレンジ結果は合格であった。

注意事項：薬液は循環しても変性しないことを確認した。

「抗菌性試験プロトコル（文書番号 xxxxxxxxx）」に基づき、事前に薬液の抗菌性試験を行った。その結果、360分後の薬液中の生菌数がコントロール液（0.76% 塩化ナトリウム溶液）中の生菌数に比較し1桁以上の減少を示したことより、この経過時間での薬液には抗菌性が認められた。しかし、180分後の薬液中の生菌数が1桁未満の減少を示したことより、この経過時間では抗菌性が無いことを確認した。

以上より、本試験は、開始時から約150分後までを前半、それ以降終了時までを後半とし、菌懸濁液（3-3 菌チャレンジ液の調製 参照）を前半、後半の開始直前にそれぞれ調製する。これを前半開始時、及び後半開始時にそれぞれ試験フィルターの1次側に断続的に直接添加してチャレンジする。これにより、総合で指標菌を $1 \times 10^7$ cfu/cm<sup>2</sup>以上チャレンジすることとする。なお、本試験ではワンパスろ過によるろ過時間のシミュレートができないことより、圧力制御によるろ過工程の断続ろ過回数を考慮した循環ろ過にて行うこととする。

以上より、本試験ではスケールダウンしたバッチ量、ろ過圧力及び接触時間をシミュレート項目とし、ろ過時間を実測値、ろ過流速（平均）を計算値（バッチ量/ろ過時間）とする。

表6：ろ過工程条件及び試験条件の表

項目	ろ過工程条件	菌チャレンジ条件 *1)
薬液名	E液	E液
バッチ量 (L)	400	10.66以上
圧力(入圧) (kPa)	150	150以上
流速 (mL/min)	-	計算値 *2)
ろ過時間 (min)	300	実測値 *3)
接触時間 (min)	300	300以上
断続回数 (回)	64-96	96以上 *4)
ろ過温度 (°C)	15-30(室温)	室温(測定値) *5)
使用フィルター	GVWP293	GVWP047
有効ろ過面積 (cm <sup>2</sup> )	518	13.8
使用液量 (L)	-	5

\*1 ろ過は、薬液 約 5L を用いて圧力制御の循環ろ過法で行う。このとき、少量の薬液に懸濁した指標菌を試験フィルターの1次側より断続的に添加する。

\*2 流速は (バッチ量)/(ろ過時間)により算出する。

\*3 ろ過時間は総ろ過時間を実測する。

\*4 実際のろ過は96回以上の断続ろ過とする。ただし、各断続サイクルでのろ過時間は、ろ過液量を考慮しながら適宜決定する。

また、ろ過途中、目詰まりなどによりろ過流速が低下し、設定接触時間内でのバッチ量のシミュレートが困難な場合、バッチ量のシミュレートを断念し、接触時間のみをシミュレートする。

\*5 試験テーブル上に設置した水の温度を測定し記録する。

図 1 に 循環式バクテリア捕捉性能評価試験装置図 を示す。

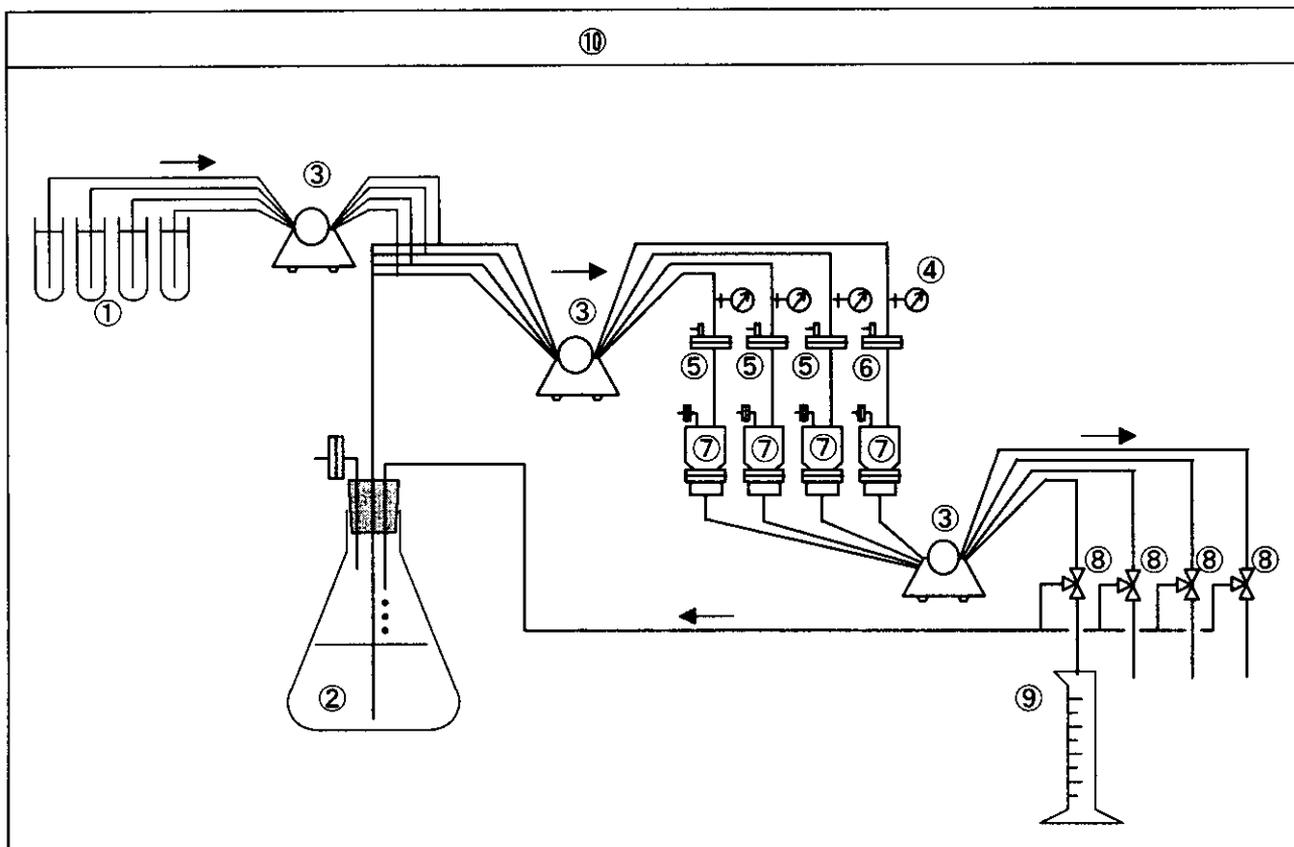


図 1 : 除菌性能評価試験装置図

1. 菌液容器
2. 1次側容器(薬液)
3. 4ヘッド・ペリスタリックポンプ(ワトソンモローポンプ)
4. 圧力計
5. 0.22 $\mu\text{m}$  テュラポア® メンブレンフィルター (0.22 $\mu\text{m}$  試験フィルター)
6. 0.45 $\mu\text{m}$  テュラポア® メンブレンフィルター (0.45 $\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルター)
7. ステリフィルホルダー (分析フィルター含む : 材質:セルロース混合エステル HAWG047)  
試験前半終了後、あたらなステリフィルホルダー (分析フィルター含む)を取り付ける
8. 流路切替バルブ
9. ろ過量測定用 メスシリンダー
10. クリーンルーム

### 研究事例3：高粘度薬液の、0.45μm直列2段ろ過

当該高粘度薬液は0.22μmではろ過が困難であり、ろ過工程として0.45μmの直列2段ろ過を試みた。0.45μmの直列2段でチャレンジ試験をおこなったが、指標菌を完全に除菌することができなかった。

したがって、現在のろ過工程条件の変更（例：①製品変性を生じない程度の熱をかけることによる粘性の低減②使用フィルターのろ過面積を増加しフィルター面積あたりの薬液付加量を低減することで、その結果、ろ過時間を短くする、単位面積当たりのろ過流量やろ過流速を減少させることの検討）を検討する必要がある。

#### 菌チャレンジ結果(LRV)

試験 番号	試験薬液 (菌チャレンジ液)	フィルター ロット No. (ポアサイズ)	段	1次側菌数 *10) (cfu)	2次側菌数 *11) (cfu)	LRV *12)	総 LRV *13)
1a	F液	R7SM40505 (0.45 μm)	1	$2.8 \times 10^8$	$7.9 \times 10^5$	2.5	5.7
			2	$7.8 \times 10^5$	$4.9 \times 10^2$	3.2	
1b	F液	R9DKA1007 (0.45 μm)	1	$2.6 \times 10^8$	$5.0 \times 10^4$	3.7	7.4
			2	$4.9 \times 10^4$	$1.0 \times 10^1$	3.7	
1c	F液	RH963705R01-H (0.45 μm)	1	$3.1 \times 10^8$	$9.4 \times 10^4$	3.5	7.4
			2	$9.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^1$	3.9	
1d	F液	R8PM39052 (0.45 μm)	1	$2.8 \times 10^8$	$8.9 \times 10^6$	1.5	1.5
			-	-	-	-	

\*10 1段目フィルターの1次側菌数は、試験終了時の菌チャレンジ液菌濃度に各試験フィルターの1段目ろ過流量を乗じて算出した。

2段目フィルターの1次側菌数は、塗抹法より測定した2段目1次側菌濃度(1段目濾液菌濃度)に各試験フィルターの2段目ろ過流量を乗じて算出した。1段目濾液菌濃度(cfu/mL)は、試験番号1aで $3.3 \times 10^2$ 、1bで $2.3 \times 10^1$ 、1cで $3.6 \times 10^1$ 、1dで $3.9 \times 10^3$ であった。

\*11 1段目フィルターの2次側菌数は、塗抹法より測定した1段目濾液菌濃度に各試験フィルターの1段目ろ過流量を乗じて算出した。

2段目フィルターの2次側菌数は、メンブレン法より測定した2段目濾液菌濃度に各試験フィルターの2段目ろ過流量を乗じて算出した。2段目濾液菌濃度(cfu/mL)は、試験番号1aで $2.1 \times 10^{-1}$ 、1bで $4.5 \times 10^{-3}$ 、1cで $5.0 \times 10^{-3}$ であった。

\*12 式1より、1段目、2段目の各LRVを算出した。

ただし、1段目試験フィルターのLRVは、試験開始時と終了時に1段目ろ液を2段目の試験フィルターホルダーのエアベントよりサンプリングして測定したため、参考値とする。

$$\text{式 1: LRV} = \log_{10}(\text{1次側菌数}/\text{2次側菌数})$$

\*13 式2より、総LRVを算出した。

$$\text{式 2: 総LRV} = \text{1段目 LRV} + \text{2段目 LRV}$$

## 参考資料 1. 抗菌性評価試験結果

### 1. 序文

本試験の目的は、C液（以下、薬液）が除菌性能評価試験の指標菌 *Brevundimonas diminuta* Institute For Fermentation, Osaka (IFO) 14213 (American Type Culture Collection (ATCC) 19146)（以下、指標菌）に対し抗菌性を有するか否かを確認することであり、抗菌性を有する場合には、除菌性能評価試験時に指標菌を懸濁する代わりに液（模擬液、代用液等）を検索することであった。

### 2. 試験条件

試験は、先に提出した「抗菌性試験プロトコル(文書番号 xxxxxxxxx)」に基づいて行い、これに PROCESS OPERACING PARAMETERS シート（薬液特性表）の製造条件を基に試験条件を決定した。

試験条件は、接触時間 380min以上 及び 室温(実測値)とした。

試験には、薬液 及び 0.76% 塩化ナトリウム水溶液（以下、コントロール液）を用いた。

### 3. 試験結果

#### 3-1. 抗菌性試験結果

表 1： 薬液中での指標菌の生菌数 \*1)

試験液名	開始時	380分後
薬液	$9.8 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$
コントロール液	$5.0 \times 10^5$	$4.9 \times 10^5$

(cfu/mL)

\*1 試験温度は、21 - 22 °Cであった。

### 4. 結論

抗菌性試験プロトコルに基づき、室温にて薬液の抗菌性試験を行った。

コントロール液中の生菌数に対し、規定時間（380分以上：顧客ろ過工程時間 320分 + 分析フィルターの回収操作等の時間 60分）経過後の、薬液中の生菌数の減少が 1桁未満であり、指標菌に対し抗菌性がないことを確認した(表 1 参照)。

以上より、薬液の除菌性能評価試験では、薬液に指標菌を懸濁してチャレンジする「直接懸濁法」を用いることとする。

以上

## 参考資料 2. バクテリア捕捉性能確認試験プロトコール

### 1. 序文

本試験の目的は、C液(以下、薬液)中に懸濁した *Brevundimonas diminuta* Institute For Fermentation, Osaka (IFO) 14213 (American Type Culture Collection (ATCC) 19146) (以下、指標菌)を、0.22 $\mu$ m テュロポア<sup>®</sup>メンブレンフィルターを用いたろ過により完全に捕捉することを確認することである。

この試験は、ろ過滅菌工程において 孔径 0.22 $\mu$ m テュロポア<sup>®</sup>メンブレンフィルターの スタックタイプ カートリッジフィルター：MCG40S(有効ろ過面積：2,000cm<sup>2</sup>)を用いて行う薬液のろ過工程条件を フィルターの有効ろ過面積比でスケールダウンし、孔径 0.22 $\mu$ m テュロポア<sup>®</sup>メンブレンフィルターの 直径 47mm ディスクフィルター：GVWP047 (有効ろ過面積：13.8cm<sup>2</sup>) (以下、0.22 $\mu$ m 試験フィルター)を用いて行う。

試験条件は、顧客工程条件の バッチ量(L)、圧力(差圧：kPa)、接触時間(min)を考慮する。

指標菌は、有効ろ過面積あたり  $1 \times 10^7$ cfu/cm<sup>2</sup>以上をチャレンジする。

圧力は、kPa単位で示す。なお、必要時に参考値として psi または kg/cm<sup>2</sup> の単位に換算した値を示す。この時、1psi = 6.89472kPa 及び 1kg/cm<sup>2</sup> = 98.0665kPa とする。

「抗菌性試験プロトコール(文書番号 xxxxxxxxx)」に基づき、事前に薬液の抗菌性試験を行った。その結果、薬液は指標菌に対し抗菌性がないことを確認した。

これより、薬液の除菌性能評価試験は、薬液に指標菌を直接懸濁しチャレンジする「直接懸濁法」を用い評価する。

抗菌性試験結果は「抗菌性試験結果報告書(文書番号 xxxxxxxxx)」を参照。

本試験では、ろ過実工程と同様にろ過圧力(差圧)をコントロールする「定圧力法」を用いる。

## 2. 判定基準

- 2-1 0.22  $\mu\text{m}$  試験フィルターの除菌性能は、有効ろ過面積  $1\text{cm}^2$ あたり  $1 \times 10^7\text{cfu}$ 以上の指標菌をチャレンジし、完全に捕捉することで評価する。  
捕捉の確認は、菌チャレンジ液の2次側濾液を回収ろ過した孔径0.45  $\mu\text{m}$  セルロース混合エステル材質メンブレンフィルターの直径47mmディスクフィルター：HAWG047（以下、分析フィルター）を培養し、そのフィルター上の、指標菌のコロニーの有無で行う。  
0.22  $\mu\text{m}$  試験フィルターは、3ロットについて試験を行う。
- 2-2 指標菌は、Saline Lactose Broth (SLB) 培地で培養する。この指標菌が  $1 \times 10^7\text{cfu}/\text{cm}^2$ 以上のチャレンジを行った時に孔径0.45  $\mu\text{m}$  テュボア®メンブレンフィルターの直径47mmディスクフィルター：HVLPO47（以下、0.45  $\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルター）を通過することを確認する。  
通過の確認は、培養後の、分析フィルター上の指標菌のコロニーの有無で行う。  
この指標菌のサイズコントロール試験をポジティブコントロール試験とする。
- 2-3 菌チャレンジ試験開始時及び終了時に菌チャレンジ液の生菌数を測定し、菌チャレンジ試験終了時の菌濃度と菌チャレンジ液量より菌チャレンジ数を算出して  $1 \times 10^7\text{cfu}/\text{cm}^2$ 以上の指標菌をチャレンジした事を確認する。
- 2-4 試験装置の無菌性は、0.22  $\mu\text{m}$  試験フィルターの2次側分析フィルター上に微生物の発育が無いことにより確認する。これをネガティブコントロール試験とする。

## 3. 菌チャレンジ液の調製

*Brevundimonas diminuta* Institute For Fermentation, Osaka (IFO) 14213 (American Type Culture Collection (ATCC) 19146) を指標菌とする。

すべての試験操作は、クリーンベンチ、安全キャビネット及びクリーンルーム内で行う。操作手順を以下に示す。

3-1 指標菌 入手 及び 復元方法

3-2 指標菌の培養

3-3 菌チャレンジ液の調製

上記3-1から-3は詳細割愛。

## 4. 装置の準備

全ての試験装置は、 $121^\circ\text{C}$ 、30分間オートクレーブで滅菌し、装置の組み立ては、クリーンルーム内で行う。

各試験フィルターは、滅菌前にあらかじめ各々ステンレス製試験フィルターホルダーに装着し、純水を用い完全性試験（バブルポイント試験）を行う。

菌チャレンジ試験の加圧には、 $\text{N}_2$ ガスを用いる。 $\text{N}_2$ ガスラインは、エアフィルター（疎水性ミリディスク：型番 MCGB10S）を介し、1次側容器に接続する。1次側容器は加圧タンクを用いる。1次側容器の2次側を4本のラインに分岐し、各々のラインにバルブを介し試験フィルターホルダーを接続する。

試験フィルターホルダーの 2 次側は、シリコンチューブで ステリフィルホルダー(型番 XX1104710)を接続する。ステリフィルホルダーに  
あらかじめ、分析フィルターをセットする。  
この分析フィルターは、ASTM の ガイドラインの微生物検査法に基づくものである(図 1 参照)。

## 5. 試験条件

表 1 に ろ過工程条件 及び 試験条件を示す。この試験条件は、PROCESS OPERATING PARAMETERS シ  
ート：薬液特性表に薬液の製造工程条件を元にして算出したものである。これらの数値は、有効ろ  
過面積の比例計算により 有効ろ過面積 $2,000\text{cm}^2$  の スタックタイプ カートリッジフィルターを 有効ろ過面積  
 $13.8\text{cm}^2$  の ディスクフィルター (GVWP047) に スケールダウンしたものである。  
表 1 の最後の 1 行は、本試験で設定した使用試験液量である。

## 6. 試験概要

本試験は、薬液を用いて行う。試験系は、図 1 に示した様に 4 つのラインに分岐し、そのうちの 3  
つは ロットの違う  $0.22\mu\text{m}$  試験フィルター、もう一つは、 $0.45\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルターである。  
試験番号を次に示す。

試験番号	試験薬液(菌チャレンジ液)	メンブレンポアサイズ
1a	C液	$0.22\mu\text{m}$
1b	C液	$0.22\mu\text{m}$
1c	C液	$0.22\mu\text{m}$
1d	C液	$0.45\mu\text{m}$

各試験フィルターに、薬液に懸濁した 指標菌を チャレンジする。  
SLB培養液 及び 菌チャレンジ液の生菌数は、TSA平板培地への塗抹法で測定する。ASTMの ガイドラインに基  
づき、0.1%ペプトン水 (Difco Laboratories Michigan) を段階希釈用液として用いる。  
塗抹したTSA平板培地は、 $30\pm 2^\circ\text{C}$ 、2日以上培養する。これは、指標菌を  $1\times 10^7\text{cfu}/\text{cm}^2$ 以上 チャレン  
ジしたことを確認するためである。

それぞれの ステリフィルホルダー中の分析フィルターにすべての菌チャレンジ液の濾液を回収する。  
各分析フィルターを 0.1%ペプトン水 100mLで洗浄後、TSA平板培地上で  $30\pm 2^\circ\text{C}$ 、7日以上培養し、指標菌  
の通過の有無を確かめる。コロニーの同定は、画線培養、グラム染色 及び 生化学試験にて行う。

除菌性能評価試験前の水による完全性試験(バブルポイント試験：規格値  $0.22\mu\text{m}$  試験フィルター：  
 $344.73\text{kPa}$  {50psi}以上、 $0.45\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルター： $151.68\text{kPa}$  {22psi}以上)、試験後の菌チャレンジ  
液による完全性試験は、完全性試験機にて測定する。

菌チャレンジ試験後の バブルポイント値は、いかなる場合にも製品出荷の可否判定には使用できない。  
これは、各試験フィルターに残存する薬液 または菌チャレンジ液により、バブルポイント値が変化する可能性が  
あるからである。それゆえ、チャレンジ試験後の バブルポイントの受諾基準値は設定していない。

これらの試験の理論的根拠は、ASTM<sup>8-1)</sup>、FDA「Guideline on Sterile Drug Products Produced by  
Aseptic Processing」<sup>8-2)</sup> 及び PDA Technical Report No.26<sup>8-3)</sup> に適合したものである。

## 7. 再試験の規定

- 7-1 0.45 μm サイズコントロールフィルターを指標菌が通過しなかった場合 または 2次側濾液を全量ろ過した分析フィルター上に指標菌のコロニーが検出出来ない場合、SLB培養液での培養状態 及び 生菌数、菌チャレンジ液中の生菌数、及び 試験操作等を調査し、原因が特定できた場合は改善後、本プロトコルに準じて再試験を行う。但し、用いた菌チャレンジ液に問題がある場合は、必要に応じ再度菌チャレンジ液の検討からやり直す(プロトコルの再検討)。  
特定できない場合は、プロトコルの再検討を行う。
- 7-2 指標菌のチャレンジ菌数が  $1 \times 10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>以上であることを確認出来ない場合、SLB培養液での培養状態 及び 試験操作等を調査し、原因が特定された場合は、改善後本プロトコルに準じて再試験を行う。但し、用いた菌チャレンジ液に問題がある場合は、必要に応じプロトコルの再検討を行う。特定できない場合は、プロトコルの再検討を行う。
- 7-3 菌チャレンジ試験後に 0.22 μm 試験フィルターの菌チャレンジ液によるバブルポイントが測定できず、明らかな試験フィルター破損やシール不良等を確認した場合は、同一ロットの別のフィルター 1枚を用いて再試験を行う。
- 7-4 0.22 μm 試験フィルターの 2次側に微生物汚染を確認した場合、試験室の環境モニタリング、試験器具、試験方法、コントロール 及び 試験中に実施した無菌操作を再調査し、その試験が無効であると判明した場合、その汚染した 0.22 μm 試験フィルターと同一ロットのフィルター 1枚について再試験を行う。
- 7-5 微生物の発育を確認し、なおかつその試験の状況が不備であったために試験が無効であったことが証明できない場合、不成功であった 0.22 μm 試験フィルターと同一ロットのフィルター 3枚について再試験を行う。  
その再試験でチャレンジ微生物の除去を証明した場合、最初の微生物発育は偽陽性とする。  
再試験の結果、チャレンジ微生物の除去を証明できなかった場合、微生物発育は陽性とする。

## 8. 参考文献

- 8-1 *American Society for Testing Materials. Standard test method for determining bacterial retention of membrane filters utilized for liquid filtration. 1993 ASTM Standards on Materials and Environmental Microbiology, Second Edition, Designation F838-83, pp50-55.*
- 8-2 *Center for Drugs and Biologics and Office Regulatory Affairs, Food and Drug Administration. Guideline on Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing. June 1987. pp27-31.*
- 8-3 *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology : Technical Report No. 26, Sterilizing filtration of Liquids.*

## 9. ろ過工程条件 及び 試験条件

表 1 に ろ過工程条件 と 47mm ディスクフィルターに スカールダウンした試験条件を示す。

表 1： ろ過工程条件 及び 試験条件 の表

項目	ろ過工程条件	試験条件 *1)
液名	C液	C液
バッチ量 (L)	100	0.690 以上
圧力(差圧) (kPa)	100	100 以上
ろ過時間 (min)	—	実測値 *1)
接触時間 (min)	320	320 以上 *1)
流速 (mL/min)	350	計算値 *2)
ろ過温度 (°C)	25	室温 (測定値) *3)
使用フィルター	MCGL40S	GVWP047
有効ろ過面積 (cm <sup>2</sup> )	2,000	13.8
使用液量 (L)	—	4.4 *4)

- \*1 菌チャレンジは、定圧力断続ろ過法で行う。  
菌チャレンジろ過時の断続ろ過は、開始時、その後の 20 分毎 及び ろ過終了時にろ過(計 17 回の断続ろ過)を行う。  
なお、各断続ろ過でのろ過時間は、ろ過速度 及び 1 次側の菌チャレンジ液の残量を考慮し、その都度決定する。  
また、工程時間内に バッチ量の シュレートを不可能な状況になった場合は、途中で連続ろ過に切り替えるか または ろ過を バッチ量が網羅されるまで延長する。
- \*2 ろ過流速は、バッチ量をろ過時間で除した計算値とする。
- \*3 試験温度は、テーブル上に設置した コントロールの水温を記録する。
- \*4 菌チャレンジ時の必要液量は、約 1.6 倍の安全率を含む容量を設定した。

## 10. 装置図

図 1 に 除菌性能評価試験装置図を示す。

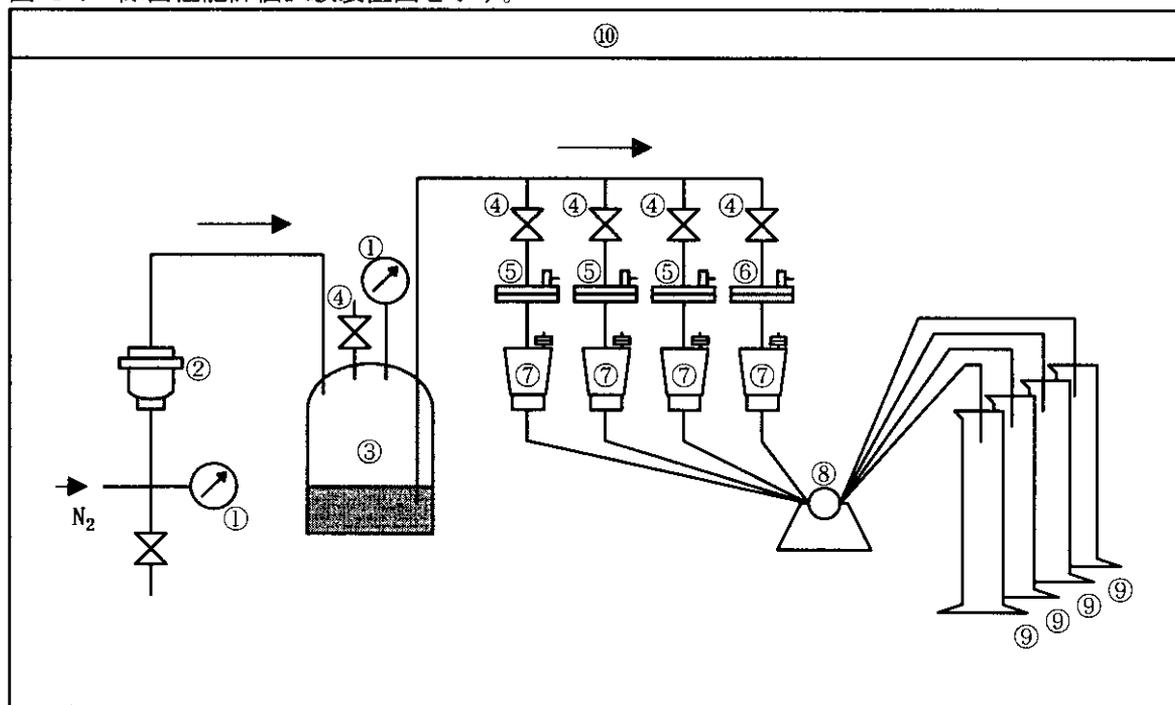


図 1 : フィルターの除菌性能評価試験装置 (菌チャレンジ時)

1. 圧力計
2. エアフィルター (MCGB10S)
3. 菌チャレンジ液 (C液)
4. バルブ
5. 0.22  $\mu\text{m}$  テュラポア® メンブレンフィルター (0.22  $\mu\text{m}$  試験フィルター)
6. 0.45  $\mu\text{m}$  テュラポア® メンブレンフィルター (0.45  $\mu\text{m}$  サイズコントロールフィルター)
7. ステリフィルホルダー (分析フィルター)
8. 4ヘッドペリスタルティックポンプ
9. 濾液受器
10. クリーンルーム

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

医薬品、医療用具等の無菌性保証の方法及びその妥当性に関する研究

## 6. 新技術に関する無菌性評価及びその妥当性に関する研究

— 主にS I Pに関する報告 —

分担研究者 阿部 寛（大塚製薬株式会社生産本部品質保証部品質保証課）

**研究要旨：**無菌操作を伴う医薬品、医療用具等の製造につき、より高度な無菌性保証を行う目的でC I P、S I P、アイソレータ、BFS（ブロー／フィル／シール）の新しい技術が導入されている。そこで、今回 ISO/TC198/WG9 での検討及び作成が進められている S I Pに関する国際規格の情報収集を行うとともに解説書の作成作業等を行った。また、その他 ISO/CD13408-6「Isolator Technology」についてもその内容調査に努めた。

### A. 研究目的

無菌操作で製造される医薬品につき、無菌保証をより高度に行う目的で人の介在を最小限もしくは完全に無くする新しい技術の導入が行われている。今回は、ISO/TC198/WG9 で作成作業が進められている「S I P」を中心に調査を行った。

無菌性保証の観点から、全体のプロセスもしくは一部の滅菌を行うために、無菌製剤製造ライン（調製・ろ過設備、充填設備、凍結乾燥機、用水設備）にS I Pを導入する場合が一般的となってきた。しかし、設計する上での基本的な考え、その妥当性評価並びにバリデーション（DQ、IQ、OQ、PQ）については、情報の共有化を図り、遵守すべき基本的事項（特に設計の考え、S I Pのバリデーション方法）を標準化する必要がある。今回、国内ガイドライン作成を前提としてこれらの情報収集を行うとともにS I Pガイドラインの解説書の作成等を行った。

### B. 研究方法

国内ガイドライン作成を前提として、ISO/TC198/WG9 においてドラフトの作成が進められているS I Pの内容調査を行い、これらの情報収集を基にガイドラインドラフト並びに解説書の作成を中心に作業を進めた。その他、ISO/CD13408-6「Isolator Technology」についても内容調査に努めた。

（倫理面への配慮）

特になし。

### C. 研究経過

#### 1. S I Pの解説書の作成

S I P 国際規格「ISO/WD13408-5 Sterilization in place」につき、内容調査を行い、S I Pプロセス設計からバリデーション及び日常管理に至るまでの管理方法及びその評価方法を考察し、国内ガイドラインドラフト（添付資料1）及びその解説書（添付資料2）を作成した。

## 2. アイソレータについて

アイソレータについては、審議段階である ISO/CD 13408-6、Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing (FDA DAFT) Appendix 1、PIC/S ISOLATORS USED FOR ASEPTIC PROCESSING AND STERILITY TESTING の情報を調査し、その内容をまとめた。

(添付資料3)

## D. 考 察

S I P については、I S O 規格では「Sterilization in place」を意味するものとして蒸気以外の滅菌剤を含めて適用できるものとして規定しているが、大部分は水蒸気（スチーム）を使用するため、滅菌剤として蒸気を使用する S I P を中心に調査を行った。S I P は、C I P と同様に装置の設計が最も重要な部分であり、システム及び構成部品（配管システム、タンク、ろ過装置、バルブ等）は滅菌の容易さ（蒸気と空気との置換、凝縮水の除去、滅菌剤の浸透性等）を考慮して、設計及び製作を行う必要がある。次に滅菌条件及び滅菌手順を確立し、滅菌の妥当性を物理的及び微生物学的に証明する必要がある。また、予め作成したバリデーション実施計画書に従い、予測的バリデーション（DQ、IQ、OQ、PQ）を実施する。その他、日常的な管理、メンテナンス、作業者の訓練、定期的な再バリデーションを規定し、遵守することも重要である。

アイソレータについては、現時点で C D 段階である ISO/CD 13408-6(01/06/03)、PIC/S ガイドライン(06/24/02)、F D A コンセプトペーパー(09/27/02)の最新情報を

調査した結果、アイソレータの設計、除染（微生物汚染除去）に関する事項、物/供給品の搬送、工程及び環境モニタリング、人、メンテナンスの各項目に記載されている基本的な考え方及び内容はほぼ同じものであり、今後、これらの内容を基に国内ガイドラインの作成を進める必要があると思われる。

## E. 今後の方針

C I P、S I P に関する国際規格は、ワーキングドラフト（WD）段階であるが、今年中に委員会原案である C D とする作業が進められている。現段階で内容的に主要な部分の変更はないと思われるが、今後の動向に注目し、ドラフトの改訂に伴い、より詳細な解説書に改訂する必要がある。

その他、アイソレータ、凍結乾燥機、B F S についても I S O 規格、F D A のコンセプトペーパー、P I C ガイドラインの情報収集及び調査を行い、基本的な部分の標準化に努める。

## F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

## 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

### S I P（定置滅菌）に関する指針（案）

本基準は、無菌医薬品のS I P（定置滅菌）における設計から日常管理に至るまでの管理方法及びその評価方法を示す。

#### 1. 定義

本節で用いる用語の定義は、以下のとおりである。

##### 1.1 S I P

適切な滅菌剤を使用し、装置を分解することなく定置的に一連のシステムを滅菌する方法

##### 1.2 工程パラメータ

工程変数に対する値

##### 1.3 工程変数

S I P工程に関連する条件であり、滅菌効果に影響をあたえるもの。

備考：工程変数には、時間、温度、圧力、滅菌剤の濃度等が含まれる。

#### 2. バリデーション責任者

バリデーション責任者は、S I Pバリデーション手順書に基づき、次の各号に掲げる業務を行うこと。

- 1) S I Pシステムのバリデーション実施計画書を作成する。
- 2) バリデーション実施計画書に従い、S I Pバリデーションを実施する。
- 3) S I Pバリデーションの結果を判定し、滅菌が確実に行われていることを確認する。
- 4) S I Pバリデーション結果を製造管理者に対して文書により、報告する。
- 5) 日常のS I P工程管理を実施する。

#### 3. 滅菌剤の選定

滅菌剤の品質規格を確立し、文書化すること。システム内に導入される滅菌剤の品質をモニターすること。

#### 4. S I P装置

装置は使用する滅菌剤及び製品への適合性を考慮して、設計し、製作すること。

考慮する要因には、少なくとも以下のものを含めること。

- 1) 装置の内表面の円滑さ
- 2) すべての滅菌すべき表面への滅菌剤の到達性
- 3) 配管システムのデッドレグの存在
- 4) 適切な排出口（トラップ、オリフィス、バルブ）の設置
- 5) システムの排水性（システム内の凝縮水を除去するための配管の傾斜）

- 6) 装置（たとえば、配管、タンク、バルブ、フィルター、ガスケット、センサー）に使用される材料の滅菌剤との適合性

## 5. 滅菌効果の評価方法

滅菌評価方法を確立し、文書化すること。

無菌性保証レベルを確立し、そのレベルに到達していることを科学的根拠により実証すること。

## 6. SIP工程パラメータ

工程パラメータを規定し、文書化すること。

工程パラメータは、予め定められた許容レベルまで滅菌可能であること。工程パラメータには以下のものを含む。

- 1) 滅菌剤の種類及び濃度
- 2) 滅菌剤の量
- 3) 滅菌剤との接触時間
- 4) 滅菌剤の温度又は圧力
- 5) 滅菌の全工程時間

## 7. バリデーション

バリデーションは、設計適格性確認、据付時適格性確認、運転時適格性確認、稼働性能適格性確認からなる一連のプロセスである。

### 7.1 バリデーション実施計画書

バリデーションを開始する前に、バリデーション実施計画書を作成すること。バリデーション実施計画書には、実施方法、判定基準を明確に規定し、対象設備及び機器、実施場所、対象品目及び工程、バリデートすべきパラメータを含めること。また、実施予定、実施担当者を記載し、実施前にバリデーション責任者が承認すること。

### 7.2 設計適格性確認

SIPシステムは、その使用目的に応じて適切に設計すること。システム設計、使用する設備、装置及び材料設計の使用目的要件への適合性は、バリデーションの最初の段階で検証すること。

### 7.3 据付時適格性確認

SIPシステム、装置及びその構成材料が確実に据付けられていることを検証すること。試験に用いる計測機器については、試験の前後で校正を行うこと。モニタリング、制御、指示又は記録に使用されるすべての計測系の校正を実施すること。

#### 7.4 運転時適格性確認

予め規定した許容範囲内でS I Pシステムに滅菌剤を供給する能力があることを実証すること。S I Pプロセスの予め設定した各工程が確実に作動することを確認すること。最も滅菌が困難な部分を得られたデータから特定すること。

#### 7.5 稼働性能適格性確認

稼働性能適格性確認を開始する前に、据付時適格性確認及び運転時適格性確認を完了しておくこと。

S I P工程につき、少なくとも連続した3回の試験を実施し、工程の再現性及び微生物的な評価を実施すること。

### 8. 従業員の教育

S I P作業者に対して、教育訓練プログラムに従い、特別な教育訓練を実施すること。

### 9. 日常的モニタリング及び管理

S I P工程ごとにデータを記録及び保存し、定期的に照査すること。

### 10. 定期的な再バリデーション

保守点検に関する手順書を作成し、定期的に点検及び整備を行うこと。

原則として年に1回は、S I Pの定期的な再バリデーションを実施すること。

関連する測定機器（温度計、圧力計、タイマー等）は、定められた手順に従い、定期的に校正すること。

### 11. 変更管理

S I P設備の主要な部分、S I Pパラメータ、S I P手順等を変更する場合は、変更管理に従い、再バリデーションを実施すること。