

厚生労働科学研究費補助金

医薬品等医療技術リスク評価研究事業

無菌医薬品製造に関する国際規格の
国内導入に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元 憲一

平成16年3月

厚生労働科学研究費補助金 医薬品等医療技術リスク評価研究事業

無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究

平成15年度 研究組織

主任研究者

棚元 憲一 国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部 部長

分担研究者

佐々木次雄	国立感染症研究所	細菌第二部	室長
那須 正夫	大阪大学大学院	薬学研究科	教授
川村 邦夫	大塚製薬株式会社	GMP 医薬品品質管理	顧問
中川 恭好	独立行政法人製品評価技術基盤機構	バイオテクノロジー本部生物遺伝資源部門(NBRC) 遺伝資源保存課	研究員
佐々木 学	社団法人北里研究所	生物製剤研究所	GMP 管理室長

協力研究者

浦山 由巳	千代田化工建設株式会社医薬品エンジニアリング部
梶原 庸生	日本製薬株式会社 東京研究所
小久保 護	澁谷工業株式会社微生物制御技術部
小暮 慶明	デンカ生研株式会社ワクチン製造部
五反田 亨	社団法人北里研究所 生物製剤研究所
佐々木裕子	国立感染症研究所細菌第二部
白木澤 治	日揮株式会社 GMP 技術部
城野久美子	日本製薬株式会社 東京研究所
菅谷 真二	キリンビール株式会社医薬カンパニー品質保証室
田中 憲志	日本製薬株式会社 東京研究所
谷 壽一	シーアンドエス株式会社代表取締役
長井 正昭	社団法人北里研究所 生物製剤研究所
西畑 利明	参天製薬株式会社執行役員

服部 信章 社団法人北里研究所 生物製剤研究所
原 芳明 ザルトリウス株式会社マーケティング部
樋本 勉 参天製薬株式会社生産物流本部
藤田 弘之 (財)阪大微生物病研究会観音寺研究所品質保証部
曲田 純二 日本ミリポア株式会社バイオフィーマシューティカル事業本部
松原 正利 日本製薬株式会社 東京研究所
水田 泰一 デンカ生研株式会社管理本部
村上天吉郎 堀ガラス株式会社
山口 進康 大阪大学大学院 薬学研究科
岩崎電気株式会社

目 次

I 総括研究報告

- 無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究 1
棚元憲一

II 分担研究報告

1. 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針案作成 7
川村邦夫、佐々木次雄
2. USP/EP微生物試験法の評価研究, 微生物の迅速試験法の日局導入 113
那須正夫、山口進康
3. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究 123
佐々木 学、佐々木次雄、長井正昭、五反田亨、服部信章、
岩崎電気株式会社
4. 日局指定菌株の特性と維持管理に関する研究 133
中川恭好

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
総括研究報告書

無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究

主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長

研究要旨：無菌医薬品製造に関するガイドライン作成に向け、わが国を代表する企業関係者の研究協力を得て、第一次ドラフトを作成した。無菌製造の一例としてインフルエンザHAワクチンを取り挙げ、光パルス滅菌法による無菌性保証及び有効性に関する長期安定性を検証した。微生物の迅速検出法では、蛍光活性染色法の標準化と計数値の個人差の確認、および蛍光活性染色法の生薬衛生微生物管理への応用を検討した。さらに新たな細菌迅速定量法として、マイクロコロニー法を検討した。日局指定菌株の特性と維持管理研究では、日本薬局方に収載されている14株について ssu rDNA 塩基配列を決定し、BLAST による同源性検索を行い、これら菌株に分類学的な問題がないことを確認した。

分担研究者

佐々木次雄	国立感染所研究所 安全性研究部室長
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 生化学・教授
川村邦夫	大塚製薬（株）、GMP 医薬 品質管理・顧問
中川恭好	生物遺伝資源センター 研究員
佐々木学	北里研究所生物製剤研究所 薬事部門GMP管理室長

EU-GMP として発行されている。本研究では医薬品の無菌製造法に関する ISO 規格案や欧米から出されている無菌製造法に関するガイドライン等を参考に、日本版「無菌医薬品製造に関するガイドライン」を作成する。尚、作成したガイドラインは、監視指導・麻薬対策課長通知として発行する方向で調整中である。また無菌製造の一例としてワクチンの製造、特にインフルエンザHAワクチンを取り挙げ、新しい最終滅菌技術として注目されている光パルス滅菌法による、無菌性保証（チャレンジテスト）及び有効性に関する長期安定性を検証する。

A. 研究目的

わが国では、医薬品の製造及び品質管理に関しては、省令 GMP として施行されている。現在、改正作業中の医薬品 GMP 中に、無菌医薬品の製造に関する要件がかなり導入されてきてはいるが、多岐にわたる無菌医薬品製造工程について詳細に触れるのは無理がある。無菌医薬品の製造に関しては、米国では FDA ガイドラインとして、EU では

さらに本研究では国際規格を反映した日局微生物試験法の充実を目指す。具体的には「微生物の迅速検出法の日局導入」、「日局指定菌株の特性と維持管理」及び USP/EP 収載試験法の日局導入評価研究を行う。蛍光染色法による微生物定量ではプロトコルの整備とともに、蛍光顕微鏡観察者間の目視計数値の個人差を明らかにする。また、生薬の衛生微生物管理に対する本方法の可

能性を確認する。また、日局指定株が適正に維持することは日局微生物試験法全体に関わる重要な課題である。これらの指標菌は、培養中に変異を起こすことがあり、試験目的としている性状からかけ離れてしまう可能性が常にある。そのため、菌株が本来有すべき性状を示すと同時に理想的な保存管理方法について日局参考情報に示す方向で検討する。また、製薬用水中の微生物数評価培地として、R2A 培地を提案しているが、その培地性能評価試験に用いる指定菌の選定及び培養条件についても検討する。

B. 研究方法

1. 無菌医薬品製造に関するガイドライン

作成：指針案作成のために各分野から総勢 15 名の協力研究者からなる研究班を立ち上げた。指針作成に必要な関連資料（無菌医薬品製造に関する ISO 13408 シリーズ、空気清浄に関する ISO 14644 シリーズ、FDA ガイドライン、EU-GMP、PICs ガイドライン等）をベースにガイドライン素案の作成を行った。

2. 微生物の迅速検出法の日局導入：1) 医薬品製造用水（精製水）、ナチュラルミネラルウォーター（除菌・殺菌処理がされていないもの）および河川水に対し、6CFDA-DAPI 二重染色を行い、蛍光顕微鏡下で全細菌数ならびにエステラーゼ活性を有する細菌数を測定した。計数は顕微鏡操作に慣れた者および不慣れな者が行い、得られた結果を比較した。2) 微生物による汚染が危惧される動物性生薬であるゴオウ（牛黄）を試料として、6CFDA-DAPI 二重染色法により存在する微生物を蛍光顕微鏡下で定量した。3) マイクロコロニー法は、ナチュラル

ルミネラルウォーター中の細菌を孔径 0.2 μm のポリカーボネートフィルター上に捕集し、フィルターを SCD 培地および R2A 培地上に 24 時間静置した。生じたマイクロコロニーを蛍光染色剤 DAPI で染色し、蛍光顕微鏡下で観察・計数した。対照として、SCD 培地および R2A 培地を用いた培養（メンブランフィルター法）を 25℃で 3 日間行い、生じたコロニーを目視計数した。

3. 日局指定菌株の特性と維持管理：日局指定菌の性状についてまとめると同時に、遺伝学的に、small subunit rRNA 塩基配列や全タンパク質の SDS 電気泳動パターン等により、指定株であるかどうかを確認する方法についても追及する。今年度は 14 株について問題がないか確認を行った。

4. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究：インフルエンザ HA ワクチンを対象としてパルス光滅菌による無菌性保証の検証を行った。容器としてポリプロピレン容器、ガラス容器を選択し、容器の分光特性（容器の透過率）の確認を、また光量は 500J、1000J、1500J とし照射条件の確認を行った。無菌性保証の検証（チャレンジテスト）は、2 種の菌（*Bacillus Subtilis*, *Aspergillus niger*）を使用し、ワクチンの安定性に関しては、長期安定性（0 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月）で検証した。

C. 研究経過

1. 無菌医薬品製造に関するガイドライン 作成

今年度は、第 1 回班会議で項立ての確認とドラフト作成者の決定、執筆方法について確認した。また、監視指導・麻薬対策課との間で、本ガイドライン作成の目的及び

成果物の活用方法について確認した。第 2 回及び 3 回班会議で、各協力研究者が作成したドラフトについて意見交換し、第 4 回班会議で全ドラフトを一つに繋ぎ合わせ、添付の平成 15 年度研究報告とした。平成 16 年度は、文体等を整理し、パブコメを求めて最終案を作成する。平成 17 年度は英訳版を作成し、日本の顔が世界にも見えるようにする。

2. 微生物の迅速検出法の日局導入

1) CFDA-DAPI 二重染色法のプロトコールを作成した。調べたいずれの試料に対しても、DAPI 染色に比べ、6CFDA を用いた場合に、染色された菌体の陽性・陰性の判定の個人差による計数値の差が見られた。2) ゴオウ中の細菌数測定にあたり、SCD 培地を用いた平板培養法ではコロニーを形成しなかった。非培養法である CFDA-DAPI 二重染色法で得られた全細菌数は 3×10^8 cells/g、エステラーゼ活性を持つ細菌数は 3×10^5 cells/g であった。3) ナチュラルミネラルウォーター中の細菌のマイクロコロニー形成 (図 3) には、SCD 培地よりも R2A 培地が適していた。

3. 日局指定菌株の特性と維持管理

14 株中 13 株は登録されている学名と一致したため、保存菌株に問題がないことが確認できたが、*Micrococcus luteus* NBRC 12708 は、*Kocuria rhizophila* であることを明らかにした。

4. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究

透過率測定、チャレンジ試験、力価試験等の結果、ガラス容器へのパルス光滅菌装置による照射は効果がないこと。また、ポリプロピレン容器においても、殺菌効果が

低いこと、力価が低下すること等課題があることが判明した。

D. 考 察

本研究班は大きく分けて二つの研究項目からなる。一つは「国際規格を反映した無菌医薬品の製造に関する指針作成」であり、もう一つは「国際規格を反映した日局微生物試験法の充実」である。日本薬局方参考情報には、最終滅菌法及び滅菌指標体、最終滅菌医薬品の無菌性保証、培地充てん試験法、無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法等の無菌医薬品製造に関するチャプターが幾つかある。これらのチャプターは GMP を補完する目的で導入されたが、無菌医薬品の製造法は多岐にわたるため、一つの完結したチャプターとして導入することは日局には馴染まないと考えられる。そこで、FDA ガイドライン (Guideline for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, 2002 年)、EU-GMP、WHO-GMP 等を参考に、平成 17 年の薬事法改正に向けて、無菌医薬品製造に関する日本版ガイドラインを作成し、省令 GMP と対にして製薬企業や薬事監視の場で活用できる指針作成を目指している。今年度の報告に第一次ドラフトを収載したが、EU-GMP や FDA ガイドライン等と比較した場合、無菌医薬品製造に関する記載要件が具体性に富み、製薬企業や薬事監視担当者等関係者には理解しやすいものになっていると思われる。平成 16 年度は、要件の吟味、文体の整理等を行い、活用しやすいものに仕上げる予定である。

「国際規格を反映した日局微生物試験法の充実」として、日局が現在検討中の「培

養法を用いない微生物の迅速検出法」や「日局指定菌株の特性と維持管理」に関するチャプターの導入のための基盤となる研究の推進を行っている。

微生物の迅速検出法に関する研究では、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する方法として、6CFDA-DAPI 二重染色法の検証を行った。この方法は、DAPI 染色により求まる細菌数（全細菌数）と CFDA 染色により求まる細菌数（エステラーゼ活性を有する細菌数）の測定が可能となるが、特に生薬の菌数測定に有用であることを示すと共に、その精度研究を行った。またマイクロコロニー法が従来法に近似していること、計数値は平板培養法よりも高く、より正確に生菌数を測定できること、計数しやすい等の利点を備えていることから有用であることを見いだした。現在あらゆる分野での微生物管理は有害微生物の迅速・適確・高感度な検出・同定が求められている。しかし従来法は煩雑な操作と長期にわたる培養、さらには科学的な不確定さ等、時代に対応できない本質的な欠陥を抱えていて、有害微生物による被害が生じた際に迅速・適確な対応がなされていない。諸分野における科学技術の発展した今日、最新の技術を応用した迅速・適確な検出法を確立し、微生物問題を対処する必要がある。本研究はその意味において画期的な研究であり、将来のより適切な試験法の開発につながるものである。

一方、現在日局に微生物関連の試験法が記載されているが、その多くの試験法に標準菌株が記載されている。言うまでもなく試験成績はこの標準菌株を基準として行われ、評価されるものであることから、標準

菌株の品質は科学的に十分保証されたものでなければならない。そのような見地から、標準菌株の科学的検証を行っている。

今年度の *ssu rDNA* 塩基配列に基づく検証に引き続き、今後、さらに保存菌株に対して市販同定キットを用いた性状調査、特定微生物試験、抗生物質力価試験を行い、各菌株の性状を明らかにする。また一般ユーザーが利用しやすい保存法による菌株の保存可能期間についても検討を行うことになる。

E. 結 論

今年度は、以下の成果を得た。

- 1) 平成17年の薬事法改正に伴う省令GMPの見直し作業に合わせて、「無菌操作法による無菌医薬品の製造」に関する指針案を作成した。
- 2) 非無菌水試料の衛生微生物管理には、蛍光活性染色法に加えて、マイクロコロニー法が有効であることを明らかにした。また蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法ともに細菌数の測定にあたっては、計数の自動化が重要であることを確認した。
- 3) 表現型のみで同定され、これまで保存されてきたNBRCが保有する薬局方収載株のうち、14株について *ssu rDNA* 塩基配列に基づく再同定を行い、その株が分類学的には問題なく維持されてきていることを確認した。
- 4) 分光透過率測定、チャレンジ試験、力価試験等の結果から、ガラス容器へのパルス光滅菌装置による照射は効果がないこと。また、ポリプロピレン容器においても、殺菌効果が低いこと、力価が低下すること等課題があることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther.* 100(2):171-194, 2003.
2. Muroi M., Ohnishi T. & Tanamoto K. Lipopolysaccharide-mimetic activities of Toll-like-receptor 2-stimulatory substance(s) contained in *Escherichia coli* lipopolysaccharide preparations. *Infect.Immun.*71,3221-3226,2003
3. Ohnishi, T. Muroi M., & Tanamoto K. N-linked glycosylation critical to the Toll-like receptor 4 function require the presence of MD-2. *Clin, Diagn. Lab. Immunol.* 10,405-410,2003
4. 棚元憲一 局方微生物試験法の現状、国際調和と将来展望－第14改正日本薬局方を中心として－*Bokin Bobai* 31, 19-25, 2003
5. Kawamura, K. and Abe, H.: "A Novel Statistical Approach to Design and Evaluation of Media Fill Tests" *PDA J.Pharm. Sci. Tech.* 投稿中
6. 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.
7. Maruyama, F., Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69: 5023-5028
8. Araya, R., Yamaguchi, N., Tani, K. and Nasu, M.: Change in the bacterial community of natural river biofilm during biodegradation of aniline-derived compounds determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Health Sci.*, 2003, 49: 379-385
9. Yamaguchi N., Sasada M., Yamanaka M. and Nasu M.: Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk and ground beef by flow cytometry. *Cytometry*,2003, 54A: 27-35
10. Ogawa M., Tani K., Yamaguchi N. and Nasu M.: Development of multicolor digital image analysis system to enumerate actively respiring bacteria in natural river water *J. Appl. Microbiol.* , 2003, 95: 120-128
11. Yamaguchi N., Ishidoshiro A., Yoshida Y., Saika T., Senda S. and Nasu M.: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, 2003, 53: 405-410.
12. Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. and Nasu M.: Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2003, 43: 111-119.
13. Bernardet, J.-F. and Nakagawa, Y. An Introduction to the family *Flavobacteriaceae*. *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd edition, 2003
14. Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Identification of strains assigned to the genus *Gluconobacter* Asai 1935 based on the sequence and the restriction

analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. J. Gen. Appl. Microbiol. In press.

15. Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. Proceedings of the 15th Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB), inpress.
16. Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi S., and Abe, M. *Ochrobactrum* sp. as a novel nitrogen-fixing symbiont of *Acacia* tree. J. Gen. Appl. Microbiol. inpress.

2. 学会発表

1. 棚元憲一：局方収載微生物試験法－最近の国内及び国際的動向を中心として－、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
2. 佐々木次雄：無菌医薬品の無菌製造法ガイドラインの現状と運用について、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
3. 川村邦夫：バイオを含む医薬品の開発、品質管理の国際動向、日本防菌防黴学会主催「第 19 回 GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、平成 16 年 3 月 5 日、東京
4. Suzuki, K., Nakagawa, Y. and Sakane, T. NBRC (Nite Biological Resource Center) – Our role and activity. International Symposium of Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba Univ., October 2003, Tokyo, Japan.
5. 鈴木健一朗、中川恭好、坂根 健. 一般微生物の系統保存事業. 第 26 回日本分子生物学会年会特別企画「バイオリソース」、12 月 10～13 日、神戸
6. Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. The 15th Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB), February 2004, Chiang Mai, Thailand.

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

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針案作成

分担研究者 川村 邦夫 大塚製薬株式会社徳島本部顧問
佐々木次雄 国立感染症研究所細菌第二部第二室長

研究要旨：平成 17 年の薬事法改正に伴う省令 GMP の見直し作業に合わせて、「無菌操作法による無菌医薬品の製造」に関する指針案を作成した。平成 15 年度に 4 回の研究会議を開催し、そこで作成したものを中間報告書として提示する。平成 16 年度中に更に数回の研究会議を開催し、文体等を整理した上でパブコメを求め、最終案を作成する。また平成 17 年度には英訳版も作成する。最終的には、GMP を補完するものとして製薬企業や薬事監視の場で活用できるものを目指す。

A. 研究目的

日本薬局方参考情報には、無菌医薬品製造に関するチャプターが幾つかある（最終滅菌法及び滅菌指標体、最終滅菌医薬品の無菌性保証、培地充てん試験法、無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法、他）。これらのチャプターは GMP を補完する目的で導入されたが、無菌医薬品の製造法は多岐にわたり、日局に一つの完結したチャプターとして導入するには限界があった。そこで、FDA ガイドライン（Guideline for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, 2002 年）、EU-GMP、WHO-GMP 等を参考に、平成 17 年の薬事法改正に向けて、無菌医薬品製造に関する日本版ガイドラインを作成し、省令 GGMP と対して製薬企業や薬事監視の場で活用できるものを目指す。

B. 研究方法

無菌医薬品の製造は多岐にわたるため、各方面専門家の協力が不可欠である。そこで、指針案作成のために各分野から総勢 15 名の協力研究者からなる研究班を立ち上げた。佐々木（分担研究者）が指針作成に必

要な関連資料（無菌医薬品製造に関する ISO 13408 シリーズ、空気清浄に関する ISO 14644 シリーズ、FDA ガイドライン、EU-GMP、PICs ガイドライン等）をベースにガイドライン素案を作成し、班員に全体像が見えるようにした。

C. 研究経過

平成 15 年度は、第 1 回研究会議で項立ての確認とドラフト作成者を決め、執筆方法について確認した。また、監視指導・麻薬対策課から山本専門官に出席をいただき、本ガイドライン作成の目的及び成果物の活用方法について確認した。第 2 回及び 3 回研究会議で、各協力研究者が作成したドラフトについて意見交換した。第 4 回研究会議で全ドラフトを一つに繋ぎ合わせ、平成 15 年度研究報告とした。平成 16 年度は、文体等を整理し、パブコメを求めて最終案を作成する。平成 17 年度は英訳版を作成し、日本の顔が世界にも見えるようにする。

D. 考察

EU-GMP や FDA ガイドライン等と比較した場合、無菌医薬品製造に関する記載要件が具体性に富み、関係者（製薬企業や薬

事監視担当者等)には理解しやすいものになっていると考える。平成16年度は、要件の吟味、文体の整理等を行い、活用しやすいものに仕上げたい。

E. 結論

平成16年度中にパブコメを求め、最終版を仕上げる。平成17年度には英語版も作成し、日本版ガイドラインを完成させる。

F. 研究発表

1) Kawamura, K. and Abe, H.: "A Novel Statistical Approach to Design and Evaluation of Media Fill Tests" PDA J.Pharm.Sci.Tech. 投稿中

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

平成 15 年度厚生労働科学研究(医薬品等医療技術リスク評価研究事業
無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究
研究代表者: 棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部/部長)

無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針(案)

●「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」作成班●

分担研究者:

川村邦夫 (大塚製薬株式会社徳島本部:顧問)
佐々木次雄 (国立感染症研究所細菌第二部:室長)

協力研究者:

浦山由巳 (千代田化工建設株式会社医薬品エンジニアリング部:部長)
小久保護 (澁谷工業株式会社微生物制御技術部:部長代理)
小暮慶明 (デンカ生研株式会社ワクチン製造部:部長付)
佐々木学 ((社)北里研究所品質保証部門:部門長)
佐々木裕子 (国立感染症研究所細菌第二部:主任研究官)
菅谷真二 (キリンビール株式会社医薬カンパニー品質保証室:室長)
白木澤治 (日揮株式会社 GMP 技術部:担当課長)
水田泰一 (デンカ生研株式会社管理本部:技術顧問)
谷 壽一 (シーアンドエス株式会社代表取締役:社長)
西畑利明 (参天製薬株式会社執行役員:研究開発本部長)
原 芳明 (ザルトリウス株式会社マーケティング部:部長)
樋本 勉 (参天製薬株式会社生産物流本部:グループマネージャー)
藤田弘之 ((財)阪大微生物病研究会観音寺研究所品質保証部:部長)
曲田純二 (日本ミリポア株式会社バイオフィーマシューティカル事業本部:次長)
村上大吉郎 (堀ガラス株式会社:マネジメントカウンセラー)

目次

1. 序論
2. 用語定義
3. 品質管理システム
4. 作業員
5. 作業員による汚染防止
6. 建物及び施設
7. 無菌医薬品の製造区域
8. 無菌医薬品の製造区域の清掃及び消毒
9. 無菌操作区域の防虫対策
10. 原材料、容器、栓の管理
11. 無菌中間製品の保管・輸送管理
12. 環境モニタリング
13. 製造設備及びユーティリティの適格性評価
14. 製薬用水
15. 滅菌工程
 - 15.1 一般要件
 - 15.2 高圧蒸気滅菌
 - 15.3 乾熱滅菌
 - 15.4 電子線、 γ 線滅菌
 - 15.5 高周波滅菌
16. 無菌製造設備の定置洗浄（CIP）
17. 無菌製造設備の定置滅菌（SIP）
18. 充填工程
 - 18.1 液剤
 - 18.2 粉末
19. ろ過滅菌工程
 - 19.1 液剤
 - 19.2 空気・ガス
20. 凍結乾燥工程
21. その他の無菌製造設備
 - 21.1 アイソレータ
 - 21.2 ブローフィルシール
 - 21.3 バイオハザード対策
 - 21.4 ケミカルハザード対策
 - 21.5 細胞培養／発酵により製造する原薬
22. プロセスシミュレーション
23. 試験・検査
24. 点眼剤
25. 眼軟膏

1. 序論

本指針は、無菌医薬品の品質確保対策の一環として、無菌医薬品製造業者並びに薬事監視者に無菌性保証に関する基本的な考え方や製造管理のあり方を示し、無菌医薬品の品質を確保することを目的とする。

本指針は、無菌操作法で製造される注射剤に適用するが、主な考え方は、点眼剤やその他の無菌医薬品にも適用できる。なお、本指針と同等以上、あるいは合理的な根拠により医薬品の品質が確保される場合には、一律にその適用を求めるものではない。

2. 用語定義

2.1 許容基準値(acceptance criteria)：規定された試験法で予め定めた許容可能な最低基準値と最大基準値。

2.2 処置基準(action level)：微生物の数（及び必要に応じて種）に対して設定した基準値をいい、この値を超えた場合には直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置をとる。

2.3 エアロック(air lock)：通常、異なる空気清浄度を有する隣接した部屋の気圧を維持するために、インターロックされた扉をもつ小さな部屋を指す。無菌操作のエアロックは、清浄度管理の低い区域から異物や菌が浸入しないように、また封じ込み施設では気圧の低い区域から高い区域に病原体等が浸入しないようにするのが目的である。

2.4 警報基準(alert level)：微生物の数（及び必要に応じて種）に対して設定した基準値をいい、この値は予知される問題点を早期に警告するものであり、その設定レベルを超えた場合には直ちに是正措置を必要とはしないが、調査は行う必要がある。

2.5 無菌充填(aseptic filling)：滅菌した製品を重要作業区域内で滅菌した容器に充填後、打栓又は密封する作業をいい、無菌操作法の一部である。

2.6 無菌操作施設(aseptic processing facility)：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料及び設備を規制しているクリーンルームを含む建物をいう。

2.7 無菌操作(aseptic processing)：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び作業員を規制している管理された環境下で無菌製品の充填やその他の作業を行うこと。

2.8 無菌操作区域 (APA: aseptic processing area): 微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び作業員を規制している高度に管理された環境をいう。無菌操作区域は、更に重要操作区域と清浄区域に分けられる。

2.9 バリア(barrier): クリーンルーム環境内で作業員の直接介入を防止するように、物理的に切り離れた製造区域をいう。

2.10 バッチ/ロット(batch/lot): 一定の規格内で均質な性状と品質が期待できる医薬品または他の材料の一定量で、同じ製造工程で一つの製造指示書に従って製造されたものを指す。

2.11 バッチ記録(batch record): バルク製品又は最終製品のあるバッチの製造に関する全ての文書をいう。これは製品のバッチ毎の履歴並びに最終製品の品質に関係するあらゆる関連事項を含む。

2.12 バイオバーデン(bioburden): 非無菌医薬品中に生存する微生物(細菌及び真菌)の数と種類をいう。

2.13 バイオロジカルインジケータ(BI: biological indicator): 滅菌工程の管理又は指標として使用される微生物学的テストシステムで、規定された条件下で特定の滅菌工程に対して、既知の抵抗性を示すものをいう。

2.14 バルク製品(bulk product): 全ての加工工程を完了し、最終の充填だけを残す状態にある製品の一群をいう。

2.15 校正(calibration): 一定の条件下で、機器あるいは測定システム(特に秤量においては)、記録器、及び制御器により示される値あるいは測定で得られた値とそれに対応する公定標準品の既知の値との相関を確立する一連の操作をいう。予め測定結果の許容範囲を定めておくこと。

2.16 変更管理(change control): 製品、工程あるいは手順に対して提案された変更に対して正式な評価と適切性の決定を行うこと。

2.17 ケミカルインジケータ(CI: chemical indicator): 滅菌工程の管理又は指標として使用されるテストシステムで、プロセスに暴露することで生じる化学的あるいは物理的な変化

に基づき、予め規定した一つあるいは複数の滅菌プロセスの変数の変化を表すシステムをいう。

2.18 洗浄(cleaning)：次の工程あるいは意図する使用に必要な程度まで対象物から汚染を除去すること。

2.19 清浄区域(clean area)：重要操作区域のバックグラウンドとなる区域、並びに滅菌前の容器・器具、原料、中間製品の微生物及び微粒子による汚染を特に厳しく管理する必要のある製造作業を行う区域をいう。空気の清浄度レベルは、グレードBが適用される。

2.20 空気の清浄度レベル(cleanliness level)：製造区域の空気の品質を 1立方メートルあたりに含まれる 0.5 μm 以上の微粒子数の最大許容値によって規定したものをいう。グレードAからグレードDまでの4段階からなる。

2.21 コロニー形成単位(CFU: colony forming unit)：単一あるいは複数の細胞から発育した微生物の集落をいう。

2.22 変更管理システム(change control system)：工程管理が継続的に実施されていることを保証するため、医薬品の品質に影響をもたらす可能性のある全ての変更事項を対象として評価するように立案設計されたシステム。

2.23 重要操作区域(critical processing zone)：滅菌された容器、原料、中間製品、及びこれらと直接接する面が、環境に曝露される製造作業を行う限定された区域をいう。空気の清浄度レベルは、グレードAが適用される。

2.24 重要工程(critical processing)：医薬品の品質に影響する可能性のある工程をいう。

2.25 培養条件(culture condition)：微生物の発育と増殖を促進するために用いられる培養期間と培養温度、培地等の定められた条件の組み合わせをいう。

2.26 除染(decontamination)：再現性のある方法で生存微生物を除去、または予め指定されたレベルまで減少させること。

2.27 消毒(disinfection)：製品上の生存微生物数を、引き続き取扱い・使用するのに適当であると予め指定されたレベルまで減少させること。

2.28 D値 (D value) : 微生物の死滅率を表す値で、供試微生物の 90%を死滅させ、生存率を 1/10 に低下させるのに要する時間又は 1/10 に低下させるのに要する線量をいう。

2.29 エンドトキシン(endotoxin) : グラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖で、発熱活性をはじめ多彩な生物活性を有する。

2.30 環境管理プログラム(environmental control program) : 製造区域の環境悪化を事前に予知し、製品の品質に悪影響を及ぼすことを防ぐとともに、適切な清浄度管理により、高度な無菌医薬品の製造を行うことを目的に、製造空間又は表面について、要求される清浄度を保持するために必要とされるあらゆることについて計画をたて、組織し、実施することをいう。

2.31 フィルター(filter) : 粒子を分離するのに用いる多孔性の物体又は装置。

2.32 最終製品(finished product) : 最終容器に充填され、ラベル貼付され、全製造工程を終えた製品。

2.33 ガスフィルター(gas filter) : 製品に直接又は間接的に接触する気体中から微生物や微粒子を除去するために圧縮ガスラインに組み込まれた疎水性フィルターをさし、ベントフィルターともいう。

2.34 更衣(gowning) : 作業員が無菌操作区域に立ち入るのに必要な更衣を無菌的に完全に行うこと。

2.35 HEPA フィルター(high efficiency particulate filter) : 規定されたサイズの微粒子を規定された効率で除去することを目的に設計された微粒子補足フィルターをいい、0.3 μ m の微粒子を少なくとも 99.97%の効率で捕捉する空気用フィルターをいう。

2.36 HVAC システム(HVAC system) : 空気の加温、換気を含む空気調節システムをいう。

2.37 アイソレータ(isolate) : 製造区域が環境及び作業員の直接介入から物理的に完全に隔離された装置をいい、除染後、HEPA 又は ULPA フィルターでろ過した空気を供給し、外部環境からの汚染の危険性を防ぎながら連続して使用できる装置。

2.38 フィルターの完全性試験(integrity test for filters) : フィルターが物理的欠陥をもたず、定格づけられた捕捉性能をもつことを非破壊的な方法で確認する試験。

2.39 容器の完全性試験(integrity test for containers)：無菌性剤の容器が密封状態にあり、製造から使用に至るまでの間、微生物汚染が防止できることを保証するために実施する試験。

2.40 層流 (LAF: laminar airflow)：空気の流れが単一方向性で、均質な流速をもった気流をいう。

2.41 凍結乾燥機のリーク試験(leak test)：減圧下の凍結乾燥機内への外部空気の侵入が規定量以下であることを確認する試験。通常、一定の真空度に減圧した後、圧力の上昇を経時的に追跡し、時間あたりのリーク量に換算する。リーク試験の判定基準は、凍結乾燥機の庫内容量、製造プロセスにおける減圧の保持時間、凍結乾燥機周辺の外部空気のバイオバーデンを考慮し、凍結乾燥機の庫内の微生物汚染の危険性をミニマムにするレベルに設定する。

2.42 維持(maintenance)：目的とするものがその要求された機能を果たせるような状態に維持したり修理したりすることを意図した全ての技術的かつそれに付随する管理活動の組合せをいう。

2.43 製造(manufacture)：原材料の受領から加工、包装を経て最終製品として完了するまでの、医薬品の製造に係わる全ての作業をいう。

2.44 製造業者(manufacturer)：製造工程のうちの一工程でも実施した企業をいう。

2.45 培地充填(media fills)：無菌操作法で製造される無菌医薬品の無菌性を無菌培地を用いて検証するプロセスバリデーションの一方法。

2.46 微生物(microorganism)：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称。ただし、本指針では細菌及び真菌を指す。

2.47 オーバーキル滅菌(overkill sterilization)：被滅菌物上に存在するバイオバーデン数や検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条件で滅菌を行うことを前提としている。通例、D値が1.0以上のバイオロジカルインジケータを用い、指標菌を12べき乗(12D)減少させるに等しい滅菌条件をいう。

2.48 工程パラメータ(process parameter)：工程変動要因を特定する数値。

2.49 製品(product)：原料、中間製品、最終製品を含む医薬品の総称。

2.50 製造区域(processing area)：培養、抽出・精製、原料秤量、容器・栓等の洗浄・乾燥、滅菌、薬剤の調製・充填作業、閉塞、包装等の作業を行う場所、及び更衣を行う場所をいう。

2.51 滅菌フィルター(product sterilizing filter)：規定された条件下でのチャレンジ試験において規定された数の指標菌を補足する能力を有する親水性フィルターを指し、通例、孔径 0.20/0.22 μ m フィルターをいう。

2.52 品質システム(quality system)：品質管理を実施するために必要となる製造業者の組織構造（責任、権限及び相互関係）及び実施手順。

2.53 シフト(shift)：同じ作業員又はグループによってなされる一定の作業又は作業時間をいい、通常、1シフトは12時間以内である。

2.54 標準操作手順書(SOP: standard operating procedure)：製造作業の操作・実施に関する承認された文書のことをいい、特定の製品又は資材に関するもの、及びこれに限定されず、一般性のある操作法（例えば、機械設備の操作、保守及び清掃、バリデーション、施設の清掃と環境管理、サンプリング、査察等）の実施に関して指図するための文書等がこれに含まれる。ある種の SOP は製品ごとの標準書及びバッチ製造文書を補足するために用いることがある。

2.55 無菌(sterile)：生育可能な微生物の存在しない状態。

2.56 無菌性保証水準(SAL: sterility assurance level)：適切な滅菌工程で処理された滅菌製品中に存在が推測される汚染菌の最大生存確率をいう。10⁻ⁿで表される。

2.57 滅菌(sterilization)：病原性、非病原性を問わず、全ての種類の微生物を殺滅し、微生物が全く存在しない状態を得るための方法。

2.58 支援区域(support area)：滅菌前の容器、原料、中間製品が、環境に曝露される製造作業を行う区域、無菌操作に使用する器具、装置などを洗浄する区域等をいう。

2.59 システム(system)：行動と技術の両者が相互に協調して一つの組織体となったものを