

観点で管理すること。

4) 重要な工程管理パラメータ、例えば、細胞増殖、生存率（バイテク工程について）及び生産性は微生物、マイコプラズマ等の汚染により悪影響を受けるためモニターすること。

5) 製造工程において、培養槽中に連続的に培地を供給し、かつ、連続的に培養液を排出させる装置方式を用いる場合には、培養期間中の当該培養槽における培養条件を維持するために必要な措置を講じること。

6) 細胞培養及び発酵装置をバイテク製品の生産に使用する場合、使用後清掃し滅菌すること。クラシカル発酵工程用の発酵装置は適切に清掃し消毒すること。細胞培養装置及び発酵装置の洗浄については被洗浄物の特性を考慮した洗浄方法を設定すること。CIP、SIP等の他に分解洗浄、手洗浄なども構造特性など考慮して必要に応じて行う。

7) 培養培地は培養／発酵液の品質を保護するために必要な場合には使用前に適切な方法で滅菌すること。バイテク製品では培地は原則的に滅菌して使用する。

8) 汚染を検出し、取るべき処置の方針を決定するために適切な手順を備えること。これには、製品に対する汚染の影響を判定するための手順及び装置から汚染を除去し、次のバッチに使用する条件に戻すための手順が含まれる。発酵工程の間に観察される混入微生物を適切に確認し、必要ならばそれらの存在の製品品質への影響を評価すること。そのような評価の結果は生成物の処置の際に考慮すること。

21.5.3 ハーベスト、分離及び精製

1) 細胞又は細胞組成物を除去する、又は、細胞破壊後の細胞組成物を採集するハーベスト工程は、ハーベスト及び環境、作業員への微生物汚染を最小限にするために設計した装置及び区域で行うこと。

2) 精製工程で開放システムを使用する場合、精製中間体の品質を保持するのに適切に管理した環境条件で実施する。バイテク製品では通常H E P Aフィルターで濾過した空気を用いる区域で実施する。

3) 製造に用いた生物体、細胞残渣及び培地成分を除去又は不活化するためのハーベスト及び精製手順は、分解、汚染及び品質の低下を最小限にしなが、中間体又は原薬を一定した品質で得ることを保証するのに適切な手順にすること。

4) 精製工程で使用する緩衝液、カラムクロマトグラム装置等などは適切な微生物負荷となるように管理すること。また、必要に応じてエンドトキシンの測定を行うこと。

5) 全ての装置は、使用後適切に清掃をするともに必要に応じて消毒を行うこと。

6) 精製された中間体は濾過などの方法で滅菌するか、適切な微生物レベルへ管理して保管する。

22. プロセスシミュレーション

22.1 プロセスシミュレーションと培地充填試験

プロセスシミュレーションは、培地充填試験を包含したもの、あるいは培地充填試験と同義語と解釈される。培地充填試験は、無菌製品の製造工程の無菌性を確認するために、薬液（薬品）の代わりに「培地」を充填して、これを培養し、微生物が存在しないことを確認する方法である。

無菌製品を、広義に正確に解釈した場合、無菌製品のうち、「充填」操作は無菌製品製造の一部であり、他にも種々の無菌操作があり、これらの無菌性の確認も重要である。また、微生物の増殖を確認するためには、常に「培地」が最適とは限らず、他の物性の似たものを使用することのほうが、より適切である場合もある。

このような理由から、語義の上からも、実説的にも、無菌製品のプロセス全般を、微生物の検出できるものを用いてシミュレートして、無菌製品製造にかかわる工程全般の完全性を確認する目的で、プロセスシミュレーションを行う。

22.2 プロセスシミュレーションの範囲

単に、無菌充填工程にとどまらず、無菌製品全般を対象としてシミュレーションを行う。

22.3 試験と判定

培地充てん試験では、何本の培地充てん試験を行って、陽性率は、何%以下、あるいは、何本中、何本以下のように表現されている。現在の日本薬局方では、「0.1%の汚染率をじゅうぶん検出できる数の容器に培地を充てんし、95%信頼上限での汚染率が0.05%以上、0.1%未満を警報基準、0.1%以上を処置基準値とする。」と記載している。培地充てん試験法は、プロセスの無菌保証の精度を確認するための優れた方法であり、ほぼ現在の基準をそのまま、適用することができるが、最近の技術の進歩を考えると、次のような観点から、国際的に更に広い視点から新しい基準に基づく判定を行う必要がある。

- 1) 最近、容器への「充てん」を考えて場合、高速の充てんが可能になっており、1日10万本の高速充てんも可能になっている。0.1%の基準からいえば、100本の汚染を許容することになるが、このような多くの汚染は実際には起きておらず、また、許容されるべきではない。
- 2) 0.1%の汚染率をじゅうぶん検出できる数の容器に培地を充てんし、95%信頼上限での汚染率が0.1%以上を処置基準値とする。」という基準は、充てん本数による保証精度の差が著しく、充てん本数を多くした場合、確実に汚染しているものを、培地充てん適として許容することになる。(たとえば、平均汚染率 16,790本の培地充てんを行ったとき、0.1%以下であり、処置基準に合格、となるが、統計学上ゼロと有意差があり、無菌ではないことが確実である。また、18,530本中4本の陽性は、0.05%以下であり、警報基準に合格するが、統計学上ゼロと有意差があり、無菌ではないことが確実である。(K.Kawamura and Abe: J.Pharm.Scie.Tech.Under submission, 川村、阿部: PDA J.GMP Validation Japan Vol.4, No.2, 2002)
- 3) 充てん本数の多い(10,000本以上では、ゼロとの有意差の有無による判定を行わな

ければならない。

4) プロセスシミュレーションに於ける試料(サンプル数)は、無限母集団(今後製造される製品の量)から抜取った試料(サンプル数)と考えることができる。

従って、1g、100本の試験も、100g、100本の試験も等価である。100g、1本試験と1g、100本とは同じに考えることはできない。ただし、陽性が1本でも処置を行う事とするときは、等価である。

以上の原則により、プロセスシミュレーション試験の暫定判定基準を次ぎの表のとおりとする。(K.Kawamura and Abe: J.Pharm.Scie.Tech.Under submission),

Table プロセスシミュレーション試験(培地充填試験)の判定値:
「ゼロとの有意差の有無」と「0.1%以下」、「0.05%以下」の関係
Comparison among the Action Levels by the Criteria of “No Statistically Significant Difference from ZERO”
and by the Criteria of “Less Than 0.05% and 0.1%”

Number of units in media fill test	Less than 0.1%	Less than 0.05%	No Difference from ZERO
3,000	1(*1)	—	4(*3)
4,750	2	—	4
6,300	3	1(*2)	4
7,760	4	1	4
9,160	5	2	4
10,520	6	2	4
11,850	7	2	4
13,150	8	3	4
14,440	9	3	4
15,710	10	4	4
16,970	11	4	4
18,320	12	5	4
21,040	14	6	4

Calculation formula:

$$*1: P(x) = {}_n C_x p^x \cdot (1-p)^{n-x}, \text{ where } n=3000, p=0.001, x=0 \\ = {}_{3000} C_0 p^0 \cdot (1-0.001)^{3000-0} = 0.0497(4.97\%)$$

$$*2: P(x) = {}_n C_x p^x \cdot (1-p)^{n-x}, \text{ where } n=6300, p=0.0005, x=0 \\ = {}_{6300} C_0 p^0 \cdot (1-0.0005)^{6300-0} = 0.0428(4.28\%)$$

$$*3: P(x) = {}_n C_x p^x \cdot (1-p)^{n-x}, \text{ where } n=3000, p=3/3000, x=0$$

$$= 3000C_{op}^0 \cdot (1-0.001)^{3000-0} = 0.0497(4.97\%)$$

Table ゼロとの差の有無を考慮したプロセスシミュレーションの判定値
Proposed Criteria for Media Fill Test

Number of Fills	Action Level (Less than 0.1% & No Difference from Zero)	Alert Level (Less than 0.05% & No Difference from Zero)
3,000	1(*)	——
4,750	2(*)	——
6,300	3(*)	1(**)
7,760	4(*)	1(**)
10,520	4(***)	2(**)
13,150 or more	4(***)	3(**&***)

*: The limits by ISO 13408-1(less than 0.1%)and “No difference from zero”,

** : The limits by ISO 13408-1(less than 0.05%)and “No difference from zero”,

***: The limits by “No difference from zero”.

(K.Kawamura and H.Abe: PDA J.Pharm.Sci.&Tech.)

22.4 実施頻度

- 1) 年1回(FDA は年2回を推奨しているが、安定した工程で変更の無い場合に、年2回行う必要は無い。)
- 2) 休止期間のある場合運転再開時
- 3) 工程変更時
- 4) 製品試験で無菌性異常発生時

22.5 培地シミュレーション試験手順 (留意事項)

- 1) 培地シミュレーション試験は、清浄作業期間の別の異なる時間に行う。
- 2) 無菌操作中に起こるおそれのある許容介入事象および禁止介入事象の表を用意しておく。
- 3) 培地シミュレーション操作は、実際の工程で通常実施される大部分の操作が含まれているよう十分な時間をかけて実施する。

- ①通常起こり得る稼働の中断を想定する
- ②要員とその配置、従事者の特定と訓練度
- ③無菌原料、ゴム栓等の供給

- ④シフト及び関係する全従事者
- ⑤ラインスピード（汚染の機会の多い例を想定）
- ⑥作業中に行う工程管理作業
- ⑦容器サイズ

- 4) 培地シミュレーション試験は、許容介入の実質的な数が最大である、ライン障害を修理した、無菌作業に関係する機器の修理または交換を行った、ラインフィルターの交換を行った、多数の要員が関与した、等の「最悪のケース」の条件を含む操作条件の下で行う。
- 5) 実作業をシミュレーションする時間：最長稼働時間により起こる現象を想定する
- 6) その他、通常の無菌操作に付随して起こる作業による中断を考慮する。

22.6 培地シミュレーション試験手順（固形あるいは粉末医薬品への適用の留意事項）

培地充填試験法は、局方参考情報の記載、「無菌操作法で製造される医薬品の無菌性保証の適切性を充填医薬品の代わりに無菌培地などを用いて検証するプロセスバリデーションの一方法である。」に基づき、また、固形あるいは粉末医薬品への適用に際しては、局方参考事項「4.3 B 粉末製品の培地充填」記載に従い、「粉末製品」も対象とする。液状製品は、充填直前に除菌ろ過することが可能であるため、菌汚染の可能性のある工程は、充填工程が主な工程となる。

一方、粉末製品では、充填工程以外に、粉末医薬品の製造工程で無菌操作を行わなければならない。充填以外の無菌操作での汚染の可能性が、充填操作よりも微生物汚染の可能性が高いことが多い。例えば、「晶出」、「乾燥」、「粉碎」、「混合」、「凍結乾燥」などがその代表例である。粉末充填工程は、粉末注射剤に潜在する汚染工程の極一部に過ぎない。汚染の可能性は充填以外の、それ以前の工程に多いと考えられるので、培地充填にとどまらず、前工程のシミュレーションを行わなければならない。

（固形微粒（粉末）製品の製造工程の一例とそのプロセスシミュレーションの参考例を図に示す。）

本基準では、「充填工程」に限定せず、製品の無菌性保証上必要と考えられる全ての工程を対象として、シミュレーションを行うことを前提とする。

（除菌ろ過直後に無菌充填するもの以外は、充填（製品化）前の工程について、「晶出」、「乾燥」、「凍結乾燥」、「粉碎」、「混合」、「搬送」などの各工程、あるいは、「これらを組み合わせた工程」に付いて、シミュレーション用滅菌粉末（放射線滅菌済 乳糖など）を用いて、シミュレーション試験を行い、充填工程のみではなく、原料製造工程についても、シミュレーションを行い、無菌性の保証を確認する。）

（参考： Kunio .Kawamura: Scale-Up, Validation, and Manufacturing of Microspheres, Chapter 16 of Sustained-Release Injectable Products Ed.by J.Senior and M.Radomsky, InterPharm Press, Denver, (2000)

22.7 各工程の培地シミュレーション

1) 「晶出」工程のシミュレーション:

「晶出」工程は、除菌ろ過した後の、晶出母液を用いて、無菌試験（あるいは菌数限度試験）を行う。

試験量：3000 g 以上

同時に、工程を通さない陽性対象及び、陰性対象についても試験を行う。

2) 「乾燥」、「粉碎」、「混合」工程のシミュレーション〔特に真菌〕

放射線滅菌、あるいは、除菌ろ過凍結乾燥を行った無菌のダミー粉末（乳糖、マニトール、ポリエチレングリコールなど）を用いて、薬品粉末と同様の操作を行った後、無菌蒸留水に、浸透圧以下の濃度になるように溶解し、培養して指標菌の生育を確認しておかなければならない。（培地シミュレーション試験に先立って、培地あるいは、ダミー粉末の指標菌生育試験を行って、培地、ダミー粉末の適切性を調べておかなければならない。）

試験量：3000 g 以上

同時に、工程を通さない陽性対象及び、陰性対象についても試験を行う。

c) 凍結乾燥工程のシミュレーション

無菌粉末培地または放射線滅菌、あるいは、除菌ろ過凍結乾燥を行った無菌のダミー粉末（乳糖、マニトール、ポリエチレングリコールなど）を用いて、薬品粉末と同様の操作を行った後、無菌蒸留水に、浸透圧以下の濃度になるように溶解し、培養して指標菌の生育を確認しておかなければならない。（培地シミュレーション試験に先立って、培地あるいは、ダミー粉末の指標菌生育試験を行って、培地、ダミー粉末の適切性を調べておかなければならない。）ただし、凍結は行わず、ゼロ℃—1℃に冷却する。また、減圧度は弱減圧にとどめる。

試験量：3000 g 以上

同時に、工程を通さない陽性対象及び、陰性対象についても試験を行う。

22.8 培地充てん工程

日本薬局方参考情報、培地充てん試験法 「4.3 B 粉末製品」に記載に準じて行う。ただし、充てん本数は、5000本あるいは10000本について充てん操作を行った後、無菌蒸留水に、浸透圧以下の濃度になるように溶解し、培養して微生物の生育の有無を調べる。

22.9 培地充てん結果の判定

「01%、以下の汚染を95%の確率で保証する」場合でも、3000本、5000本、16000本

では、保証精度（合格確率）は充てん本数により異なる。

例：

- a) 3000 本で陽性ゼロの場合、0.1%、以下の汚染を 95%の確率で保証できる。(ただし、0.1%以下の汚染率でも不合格になることが有る。)
- b) 16,970 本中 10 本までの汚染は、統計的に（95%の確率で）0.1%以下の汚染であることが証明される。しかし、このうち、4 本—10 本の汚染では、信頼区間の下限はゼロ（「0 本」）ではなく、1 本—2 本となる。すなわち、0.1%以下ではあるが、「汚染はゼロ（無菌）でなく、数本の汚染があることも同時に証明されることとなる」。(16,970 本中 1-2 本以上の汚染が必ず（95%以上で）あることが証明される。）従来の「基準」では、「無菌でない」ことの証明結果は、無視して、「0.1%以下」であることのみに着目し、合格と判定することとしていた。

22.10 培地シミュレーション試験での判定：

「数値表現を行わない。」あるいは、「3000 本（ユニット）以上のシミュレーションを行い、ゼロ（無菌）と有意差のないことを証明する。」とする。(あるいは、第 2 法 による)
(K. Kawamura and H. Abe: PDA J.Pharm.Sci.Tech. Vol.56,No.5, pp.235 (2002)
川村、阿部：PDA J.GMP and Validation in Japan, Vol.4,No.2,2002)

22.11 粉末（固形）医薬品の判定（第一法）：

a) 5000—10000 ユニット相当量について、全量ろ過無菌試験を行い、微生物を認めないときには、合格とする。1 個の微生物を認めたときは、原因を精査し、再度繰り返し、サンプリング、ろ過、培養の操作を行い、判断する。

2 個以上認めたときは、原因究明、対策を必要とする。

b) 溶液注の培地充填試験は、同様に、5000—10000 ユニット相当量について、培地充填を行い、培養を行い、微生物を認めないときには、合格とする。1 個の微生物を認めたときは、原因を精査し、再度繰り返し、サンプリング、培養の操作を行い、判断する。

2 個以上認めたときは、原因究明、対策を必要とする。

(Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by aseptic Processing –
Current Good Manufacturing Practice (Draft Guidance), FDA pp.27, ll.935-944.
(Aug.22.2003)) .

23. 試験検査

23.1 エンドトキシン

23.1.1 一般要件

- 1) 注射製剤製造用の原料、容器、栓、製造用水ならびに製造設備はエンドトキシンについて適切な管理を行うこと。また、注射剤についてはその用法ならびに点眼剤につ

ても、エンドトキシン汚染によるリスクを考慮した適切な管理水準を考慮すること。

- 2) 注射製剤製造用の設備機器は、適切なバイオバーデンの管理を行い、エンドトキシンの負荷を少なくすること。特に、無菌ろ過の前後で製品に接触するすべての表面について十分な注意を払うこと。また、機器は容易に分解、組み付け、洗浄、滅菌または消毒できること。
- 3) 注射製剤製造用の原料と製造用水については、管理試験を適切に実施すること。製造プロセスに膜ろ過などのエンドトキシン除去プロセスのある注射製剤製造用の原料についても管理試験を適切に実施し、限度を定めて適切に管理を行うこと。
- 4) 注射製剤製造用設備機器や容器、栓の洗浄を精製水で行うときは、最終リンス水を蒸留法 WFI または膜ろ過法 WFI とし、十分なリンス水量を用いて反復リンスを行うこと。また、洗浄完了後から滅菌までの時間は微生物の増殖を防止するため、最小限にとどめるよう注意を払うこと。
- 5) エンドトキシン試験法は日局に準拠し、試験法の記述には、抑制および増強試験、非抑制濃度の測定と有効希釈濃度を明確にすること。
- 6) リムルス試験法によってエンドトキシン試験が実施できない製剤については、日局に準拠した、ウサギによる発熱性試験法を実施すること。

23.1.2 バリデーション

- 7) エンドトキシンの除去を洗浄、熱処理、膜ろ過、吸着などによって実施する場合は、予めエンドトキシンの負荷量を測定し、処理による除去効率を求め、処理後のエンドトキシン残存量が限度内であることをバリデーションで検証すること。バリデーションに際しては、ワーストケースを想定し、チャレンジテストを実施すること。除去率は少なくとも 99.9%、3Log 以上の減少であること。また、エンドトキシンの除去に関する定期的再バリデーションの手順を定めること。
- 8) エンドトキシン試験については、適切な試験バリデーションを実施し、試薬などの管理を適切に実施すること。

23.2 不溶性微粒子

23.2.1 一般要件

- 1) 注射剤用容器と栓の洗浄方法を確立し、容器と栓由来の微粒子を定量的に把握しておくこと。
- 2) 無菌ろ過工程以降の注射剤製造設備について、接薬部の洗浄方法を確立し、設備由来の微粒子を定量的に把握しておくこと。
- 3) 注射剤製造用原料、副原料、製造用水について、調製前ならびに調製液の無菌ろ過後の微粒子を定量的に把握しておくこと。
- 4) 凍結乾燥によって製造する注射剤については、真空乾燥時に凍結乾燥バルクに吸着す

る可能性のある揮発成分について十分な配慮をおこなうこと。

- 5) 容器および栓と薬液の相互作用、たん白など高分子成分の凝集などによって、製造後、経時的に発生する微粒子について十分な配慮をおこない、長期保存試験で確認を行うこと。
- 6) 日局に準拠した注射剤の不溶性微粒子試験法を実施すること。

23.2.2 バリデーション

- 7) 微粒子測定装置については、試験法バリデーションを実施し、日常のキャリブレーションと定期的なメーカー校正の方法を定めておくこと。

23.3 容器完全性

23.3.1 一般要件

- 1) 無菌製剤の容器は、日常の管理試験または全数検査によって、密封されており、使用に至るまで無菌性が保たれていることを保証すること。そのために有効期限の期間、完全性を保証できることを示す経時試験を行うこと。
- 2) 完全性試験の方法は、容器と栓に対応して適切に定められること。製造直後においては密封性が保たれているが、経時的に、あるいは保管温度の変動、包装や輸送時の振動、衝撃、および空輸時における気圧変動などで、クラックの成長あるいは勘合や締め付けに緩みが生じて、密封性が保たれない恐れがある場合は、あらかじめ検査によってそれらを除去する方法を講じておくこと。
- 3) 容器完全性試験については、感度を明確にしておくこと。

23.3.2 バリデーション

- 1) 採用した容器完全性試験についてバリデーションを実施すること。
- 2) 想定される保管温度の変動、包装や輸送時の振動、衝撃、および空輸時における気圧変動などに関するチャレンジテストを実施すること。

23.4 外観検査

23.4.1 一般要件

- 1) 外観検査により容器完全性不適合の製品を除いて無菌性を保証する場合は、外観と容器完全性の対応関係を適切に定め、日局に準拠し、以下に述べる検査標準を確立すること。
- 2) 外観検査の判定基準を、JIS、MIL などに従って、不良項目ごとに定めること。異物については、日局の基準に準拠すること。
 - 3) 外観検査の判定に使用される標準品サンプルを作成し、品質部門等の審議、承認を受けること。

- 4) 検査作業標準書・手順書、検査作業教育訓練標準書・手順書、検査能力バリデーション標準書・手順書などを整備すること。
- 5) 検査作業標準書・手順書に際しては、検査方法を設定すること。
人による目視検査では、例えば次のような条件を定める。
 - ・検査手順、検査ピッチ、タクトタイム、休憩のインタバル
 - ・検査台、検査ベルト、検査燈、検査の治工具（拡大鏡）、検査姿勢（椅子）
 - ・検査台の照度、検査室の照度、背景の色自動検査機による検査では、例えば次のような条件を定める。
 - ・検査機の機種、検査ピッチ、タクトタイム
 - ・開始、終了時、その他定期的な標準品サンプルによる検査機の検査能力の確認方法
 - ・キャリブレーション
- 6) 検査員の教育訓練は、必要な SOP を準備し、標準サンプルによって訓練を実施し、結果の評価をおこなうこと。
- 7) 例を見ない特異的な不良品が発見された場合の手順を定め、それらの評価と本質および発生原因をつきとめること。また、不良品の水準が異常に上昇した場合は、除去率の再評価を行うこと。

23.4.2 バリデーション

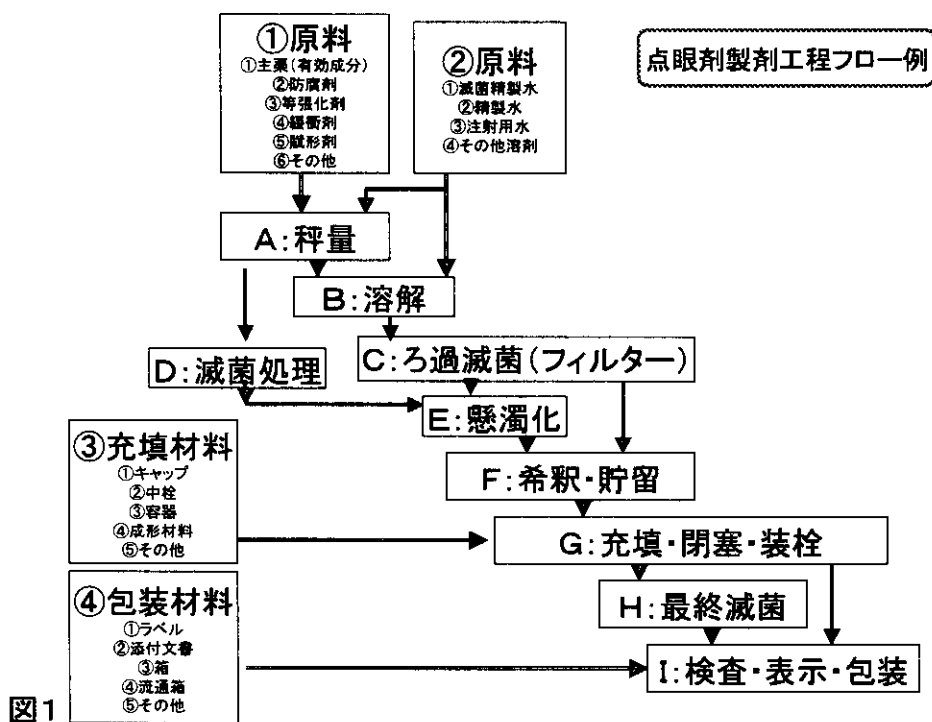
- 8) 人による検査では、標準サンプルによって、検査員が所定の検査能力に達していることを確認すること。この検査能力の確認は視力検査とともに定期的実施すること。
- 9) 検査機のバリデーションにおいては、標準サンプルによって、所定の検査、除去能力を有することを確認すること。

24. 点眼剤

24.1 点眼剤

点眼剤は無菌操作法や最終滅菌製造法による製造される無菌医薬品であり、医薬用語である結膜のう（眼瞼と眼球で構成する空間）に適用する薬剤で基本的に液剤である、液剤の種別には①完全水溶液剤、②懸濁剤、③用時溶解剤がある。

点眼剤製造フロー



ここに記載したものは基本例である。これ以外に追加される工程や工程内でも分割されるもの、および省略される工程もある。

①原料①：粉末状・液状の原料が主であり、①主薬（有効成分）②防腐剤③等張化剤④緩衝剤⑤賦形剤その他（pH調整剤など）がある。

②原料②：液状または溶解するための製造用原料水（以下製造用水）や溶剤などである。製造用水には精製水、滅菌精製水、注射用水がある。点眼剤は無菌製剤でその工程にろ過滅菌法を用いる場合、精製水による菌負荷増加による滅菌保証を考慮する必要がある。製造用水の製法で逆浸透法（RO）、超ろ過法（UF）、蒸留法、イオン交換法、およびこれらの複合がある。但し、イオン交換法のみでは微生物多量混入の危険性があり適切な微生物除去を考慮すべきである。

③充填材料：主に充填工程に投入する材料で直接容器となる。洗浄および滅菌された物あるいは、工程中に同等の工程を同時に行うなどがある。直接液に触れる材料であり、その規格や試験基準は適切に設定と管理を行う必要がある。

④包装材料：直接薬液に接触しないラベルや箱などの包装用の材料となる。但し、点眼剤はプラスチック容器が主であり、包装材料の仕様や規格により薬液の安定保存を考慮することも必要である。

A：秤量：原料①②を秤や測定器により調製バッチサイズの処方濃度分原料を計り取る行為を言う。

B：溶解（調剤や調製工程とも言う）：一般的に滅菌精製水を適切量投入されたタンクに、秤量済み原料を投入し、温度制御と攪拌装置により均一に溶解する行為を言う。

C：ろ過滅菌：一般に公称孔径 $0.2\mu\text{m}$ 以下のフィルターを用い、微生物を補足ろ過する工程である。フィルターはろ過後に完全性試験を行い正常にろ過工程が行われたことを保証しなければならない。

D：滅菌処理（原料）：溶解できない原料およびろ過滅菌できない原料はろ過滅菌工程以後に投入されるため、その原料を無菌化処理する工程である。無菌化工程は $\text{SAL} > 10^{-3}$ 以上をバリデーションにより保証する必要がある。

E：希釈・貯留：水溶性薬液の場合ろ過滅菌後の受け入れタンクとなる。懸濁製剤の場合、最終濃度に希釈・均一化するなどの工程も付加される。この工程はプロセス設計により不要とされる場合もある。

G：充填・閉塞・装栓：ろ過滅菌までの無菌薬液調製工程後に、設計された容量に小分け・分注する工程を充填と呼び、中栓やキャップの装着を打栓・装栓と呼ぶ。成型同時充填システム（ブローフィルシール）では閉塞を薬液充填とほぼ同時に閉塞・密閉を行う。

H：最終滅菌：充填工程で薬液や薬剤が外気と直接触れない状態（密閉された状態）にて滅菌処理を施すことを言う。

I：検査・印刷・包装：ラベル巻きやフィルム巻き、印字・印刷、箱詰め、添付文書挿入など包装と表示を行う工程である。検査は工程検査と品質管理試験の2種に大別される。各検査やサンプリングは必ずしも最終段階で行うものではない。

24.2 点眼剤工程要求仕様

工程要求仕様とは点眼剤を製造するにあたり、実施あるいは作業方法として設置や方法確立をしなければならない事柄を示す

- 1) 最終滅菌を有しない点眼剤の場合は無菌環境および無菌操作法により製造を行う必要がある。無菌原料を扱う工程と充填工程は環境管理や装置・器具の滅菌保証を適切なバリデーションと定期的および日常的モニタリングなどにより維持管理する必要がある。
- 2) 溶剤に用いる原料水は日本薬局方に記載される①精製水、②滅菌精製水、③注射用水を用いる。但し局方に記載されている各製造用水の精製法などは工業化された製造工程と合致しない部分があり、局方準拠するとはその試験基準に適合することとする。
- 3) 原料水の製造方法は物理ろ過や化学処理を行い、イオン交換処理あるいは超ろ過法や蒸留法による純度の高い精製水とする。精製前の水は常水または飲料水試験適合レベルの原水とする。
- 4) 最終滅菌法が適用できる製剤と工程での無菌保証レベルは $\text{SAL} < 10^{-6}$ とする。
- 5) 無菌操作法による製剤と工程での無菌保証レベルは $\text{SAL} < 10^{-3}$ とする。
- 6) 無菌操作法の場合、工程全体の無菌保証試験としてプロセスシュミレーション試験を製造開始前、および定期的実施する。

7) 本製剤は局方収載の製剤通則「点眼剤」に準拠する。

25. 眼軟膏

25.1 眼軟膏

眼軟膏は点眼剤同様、無菌操作法により製造される無菌医薬品である。点眼剤は基本的に液剤であるのに対し、本剤は油性基剤を使用しており半固形状で塗布による投薬ができる製剤である。(油性基剤に分散しているため加熱による最終滅菌は実施できない。放射線やその他の滅菌方法による最終滅菌法が考えられるが、製品を放射線滅菌することは現在では例がないため、今後の研究検討事項である。)

眼軟膏製造フロー

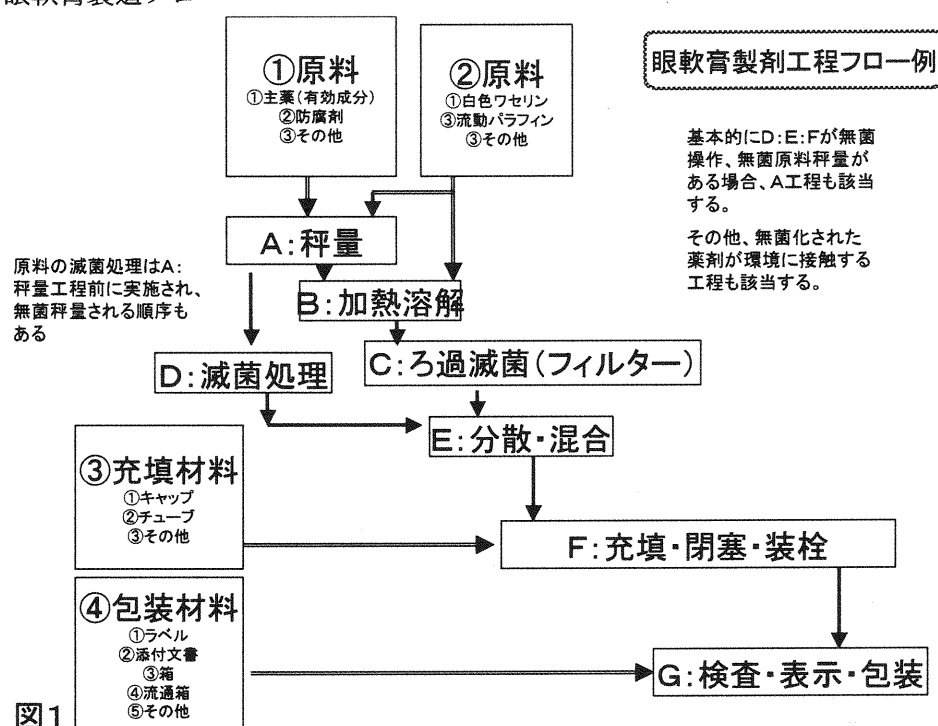


図1は製剤工程のフロー例であり、その製法は他にも存在する。ここに記載したものは基本例であり、これ以外に追加される工程や工程内でも分割されるもの、および省略、あるいは統合される工程フローも考えられる。

①原料：粉末状・液状の原料が主であり、①主薬（有効成分）②防腐剤、③その他（pH調整剤など）がある。

②原料：液状または溶解するための溶剤などである。

③充填材料：主に充填工程に投入する材料で直接容器となる。洗浄および滅菌された物を使用する場合、または、工程中に同等（洗浄や滅菌など）の処理を同時に行う方式がある。直接薬剤に触れる材料であり、その規格や試験基準は適切に設定と管理を行う必要がある。

④包装材料：直接薬剤に接触しないラベルや箱などの包装用の材料となる。但し、包装材料の仕様や規格により薬剤の安定保存を考慮することも必要である。

A：秤量：原料①②を秤や測定器により調製バッチサイズの処方濃度分原料を計り取る行為を言う。

B：加熱溶解（調剤や調製工程とも言う）：一般的に基剤を適量投入されたタンクに、秤量済み原料を投入し、温度制御と攪拌装置により均一に溶解する行為を言う。

C：ろ過滅菌：一般に公称孔径 $0.2\mu\text{m}$ 以下のフィルターを用い、微生物を補足ろ過する工程である。フィルターはろ過後に完全性試験を行い、正常にろ過工程が行われたことを保証しなければならない。

D：滅菌処理（原料）：溶解できない原料、および、ろ過滅菌できない原料はろ過滅菌工程以後に投入されるため、その原料を無菌化処理する工程である。無菌化工程は $\text{SAL} > 10^{-6}$ 以上をバリデーションにより保証する必要がある。

本工程は無菌操作により作業を行う場合、無菌操作要件に従うことが必要である。

E：分散・混合：一般的に眼軟膏は有効成分を分散混合させ均一化させることにより薬剤を製造する。本工程がその成分均質化分散工程である。必要に応じてこの後に貯留工程がある。無菌分散による均質化が不要なプロセス設計により、本工程が不要とされる場合も考えられる。

F：充填・閉塞・装栓：ろ過滅菌までの無菌薬剤調製工程後に、設計された容量に小分け・分注する工程を充填と呼び、キャップの装着を打栓・装栓、装着と呼ぶ。

本工程は無菌操作により作業を行う場合、無菌操作要件に従うことが必要である。

G：最終滅菌：充填工程で薬液や薬剤が外気と直接触れない状態（密閉された状態）にて滅菌処理を施すことを言うが、眼軟膏の最終滅菌事例は現在例がなく、今後の開発・研究によることとなる。

H：検査・表示・包装：ラベル巻きやフィルム巻き、タックラベル貼り付け、印字・印刷、箱詰め、添付文書挿入など包装と表示を行う工程である。検査は工程検査と品質管理試験の2種に大別される。各検査やサンプリングは必ずしも最終段階で行うものではない。

無菌操作工程は基本的にD：滅菌処理、E：分散・混合、F：充填・閉塞・装栓工程である。但し、無菌性を必要とする、例えば無菌原料秤量作業や滅菌された器具、薬剤を扱う作業は無菌操作や無菌環境が必要となる。

無菌原料を扱う工程と充填工程は環境管理や装置・器具の滅菌保証を適切なバリデーションと定期的および日常的モニタリングなどにより維持管理する必要がある。

25.2 工程要求仕様

工程要求仕様とは眼軟膏を製造するにあたり、実施あるいは作業方法として設置や方法

確立をしなければならない事柄を言う。

- 1) 眼軟膏製造の場合は、無菌環境および無菌操作法により製造を行う必要がある。
- 2) 溶剤に用いる油性基剤は日本薬局方に記載されている白色ワセリン、流動パラフィンが一般に使用される。
- 3) 原料はろ過滅菌又は加熱等の滅菌により無菌化する。
- 4) 最終滅菌法が適用できる製剤と工程での無菌保証レベルはSAL $<10^{-6}$ とする。
- 5) 無菌操作法による製剤と工程での無菌保証レベルはSAL $<10^{-3}$ とする。
- 6) 無菌操作法の場合、工程全体の無菌保証試験として無菌プロセスシュミレーション試験（培地充填試験など）を製造開始前、および定期的実施する。
- 7) 本製剤は局方収載の製剤通則「眼軟膏」に準拠する。

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

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

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：細菌迅速試験法を一般化するにあたり、蛍光活性染色法のプロトコールの標準化ならびに計数値の個人差を確認した。同時に蛍光活性染色法を生薬の衛生微生物管理に応用するために、ゴオウを試料として検討を行った。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。

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。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、環境微生物学分野を中心に広く用いられてきている。

今年度は微生物の迅速試験法の日局導入にあたり、以下を目的とした。

1. 迅速な細菌検出法である蛍光活性染色法（carboxyfluorescein diacetate [CFDA] - 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]二重染色法⁴⁾のプロトコールを標準化する。
2. CFDA-DAPI 二重染色試料の目視計数における測定者間の個人差を確認し、計数自動化への展開を図る。
3. CFDA-DAPI 二重染色法を生薬の衛生微生物管理に応用するための検討を行う。

4. 細菌の増殖能を指標とする新たな迅速定量法として、マイクロコロニー法⁵⁾を検討する。環境中の細菌には培地上で約 10~100 μm のマイクロコロニーを形成するものの、肉眼で見える大きさのコロニーを形成しないものが多く存在することが明らかとなってきている。マイクロコロニー法はフィルター上に捕集した細菌を培地上で培養し、マイクロコロニーを形成させ、計数する方法である。

B. 研究方法

1. CFDA-DAPI 二重染色法のプロトコールを標準化するにあたり、必要な試薬・装置、操作法、注意点をまとめた。
2. ナチュラルミネラルウォーター、医薬品製造用精製水、山間部で採取した河川水を用いて、CFDA-DAPI 二重染色試料の目視計数における測定者間の個人差を確認した。計数は顕微鏡操作に慣れた者および不慣れな者が行い、結果を比較した。

3. CFDA-DAPI 二重染色法を生薬の衛生微生物管理に応用するために、動物性生薬であるゴオウを対象として前処理法および染色条件を検討した。具体的には、0.2~0.5g の粉末ゴオウを 3~5mL の滅菌リン酸緩衝液に懸濁し、20 分間ボルテックス処理を行った。400 ×g で 10 分間遠心後、上清を孔径 3 μm のフィルターでろ過した。ろ液中の細菌を孔径 0.8 μm のポリカーボネートフィルター上に捕集し、NaOH 溶液 (pH 11) でフィルター表面を洗浄した。フィルター表面上の細菌を定法にしたがって CFDA および DAPI で二重染色し、蛍光顕微鏡下で計数した。対照として、SCD 培地を用いた寒天平板培養を 30°C で 1 週間行い、生じたコロニーを目視計数した。
4. マイクロコロニー法にあたっては、ナチュラ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°C で 3 日間行い、生じたコロニーを目視計数した。

C. 研究経過

1. CFDA-DAPI 二重染色法のプロトコルを作成した (添付資料)。
2. ナチュラルミネラルウォーター、医薬品製造用精製水、山間部で採取した河川水を用いて、CFDA-DAPI 二重染色

試料の目視計数における測定者間の個人差を確認した結果、いずれの試料においても DAPI で染まった細菌数 (全細菌数) よりも CFDA で染まった細菌数 (エステラーゼ活性を有する細菌数) に個人差が見られた (図 1)。

3. 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 3×10^6 cells/g であった (図 2)。
4. 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 (図 4)。また通常はマイクロコロニー形成菌数が CFDA 染色により求められるエステラーゼ活性を有する細菌数よりも少なかったが、ほぼ同じ値を示す試料もあった (図 5)。

D. 考察

1. CFDA-DAPI 二重染色において、DAPI 染色により求まる細菌数 (全細菌数) に比べ 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) に個人差が見られた原因として、CFDA 染色試料では蛍光強度にばらつきがあり、陽性・陰性の判定基準に個人差が生じるためであると考えられた。したがって、本手法を一般化するには計数の自動化が重要であると考えられた。
2. 動物性生薬であるゴオウ中には 1g あたり 10^8 を越える細菌が存在し、その 1% が生理活性を有していたこと、お

よびそれらが通常の培養法では検出できなかったことから、生薬の衛生微生物管理にも新手法が有効であることがわかった。

3. マイクロコロニー法の利点を以下にまとめた：

- ・従来使用している培地上での細菌の増殖能をもとに細菌数を測定できるので、従来法からの移行が容易である。
- ・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。
- ・細菌を個体レベルで計数する場合に比べ、マイクロコロニーはサイズが大

きく蛍光も強いので、目視計数時の個人差が小さい。また自動計数に適している。

E. 結論

今回の検討により、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がわかった。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、計数基準の個人差を解消し労力と時間を軽減するために、自動化が重要であることを確認した。

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., 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.
5. Kawai, M., N. Yamaguchi, and M. Nasu. Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. J. Appl. Microbiol., 86: 496-504.
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. 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, J. Microbiol. Methods, 53: 405-410, 2003.

添付資料

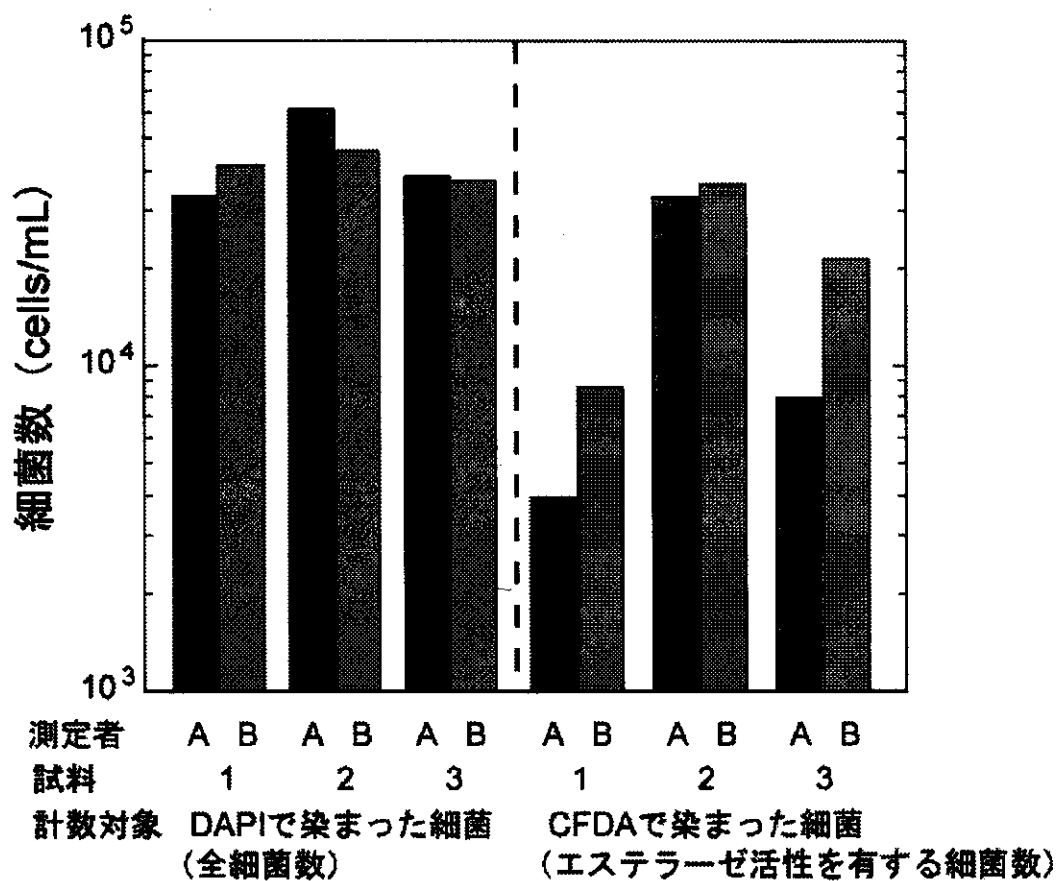


図 1. CFDA-DAPI 二重染色試料の目視計数における測定値の個人差.

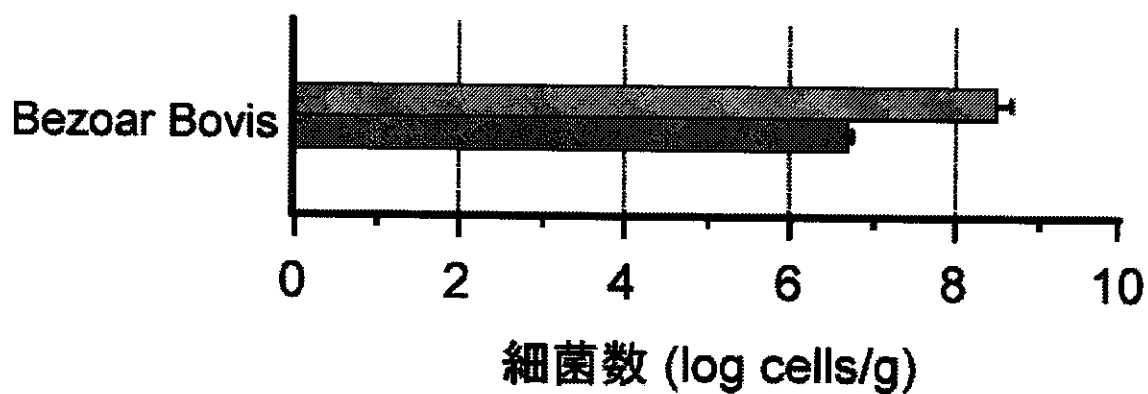


図 2. ゴオウ中の細菌数. ■: DAPI 染色により求めた全細菌数. ■: CFDA 染色により求めたエステラーゼ活性を有する細菌数. ■: SCD 寒天培地により求めたコロニー形成菌数.



図 3. ナチュラルミネラルウォーター中の細菌が形成したマイクロコロニー.
R2A 培地上で 25°C、24 時間培養.
サイズは約 30 μ m.