

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

棚元 憲一

平成17(2005)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16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	品質部門長

#### 協力研究者

浦山 由巳	千代田化工建設株式会社医薬品プロジェクト部
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
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
高橋 麻衣	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)
谷 壽一	シーアンドエス株式会社代表取締役
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  
水田 泰一 デンカ生研株式会社信頼性保証本部薬事コンプライアンス室  
宮下 美香 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)  
村上大吉郎 堀ガラス株式会社  
山口 進康 大阪大学大学院 薬学研究科  
吉野 千春 社団法人北里研究所 生物製剤研究所  
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 ..... 9  
川村邦夫、佐々木次雄
2. USP/EP 微生物試験法の評価研究，微生物の迅速検出法の日局導入 ..... 93  
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 ..... 101  
佐々木 学、佐々木次雄、五反田亨、服部信章、吉野千春、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 ..... 111  
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、監視指導・麻薬対策課に提出した。FDA ガイドラインや EU-GMP 同様、日本版無菌ガイドラインとして製薬企業や薬事監視の場で活用されることが期待される。無菌製造の一例としてインパルス光滅菌によるインフルエンザ HA ワクチンの無菌性保証及び有効性を検討した。細菌迅速試験法として、マイクロコロニー法を検討し、そのプロトコルの標準化を行った。さらに同法を用いた特定細菌の定量法についても検討を行った。また、日局指定菌株の特性と維持管理に関する研究として局方に収載されている 25 種 26 株のうち 16 細菌株について市販同定キットを用いた性状調査を行った。

#### 分担研究者

佐々木次雄	国立感染所研究所 細菌第二部室長
那須正夫	大阪大学大学院薬学研究科 衛生化学・教授
川村邦夫	大塚製薬（株）、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 研究員
佐々木学	社団法人北里研究所生物製剤 研究所 品質部門長

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・麻薬対策課を通して発行されることになっている。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 ワクチンを取り上げ、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検討を行う。

#### 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。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とから、従来の培養法ではなく、蛍光染色法のような新規技術を用いた、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。今年度はそのような目的でマイクロコロニー法の検討を行った。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。

## 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

ルミネラルウォーター中の細菌を孔径0.2 $\mu\text{m}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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：16細菌株について、各種炭素源からの酸の生成や、腸内細菌以外のグラム陰性桿菌同定キット、腸内細菌及び他のグラム陰性桿菌同定キット及びブドウ球菌・マイクロコッカス同定キットを用いた自動細菌検査装置による試験を行った。

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、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、5種の菌（*Bacillus Subtilis*, *Aspergillus niger*）を使用し、有効性の確認としては、力価試験（SRD法）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

前年度に引き続き第5回班会議で付属資料に回すものを決め、修正指針案を日本PDAの専門家グループで検討していただくことにした。第6回班会議で日本PDAから寄せられたコメントと新しく出たFDAガイドラインとの整合性を考慮に入れなが

ら修正を加えた上で監視指導麻薬対策課を通じて広くパブコメを求めた。第7回班会議でパブコメを反映した最終指針案に纏め上げ、監視指導麻薬対策課に研究班の成果物として提出した。

## 2. 微生物の迅速検出法の日局導入

河川水、ナチュラルミネラルウォーター、海水、にがり水中の細菌は、R2A培地上で短時間で観察可能な大きさのマイクロコロニーを形成することがわかった。このマイクロコロニー法と平板培養法を比較した結果、ナチュラルミネラルウォーターでSCD培地を用いた平板培養法で得られた生菌数は、マイクロコロニー法で得られた値の100分の1以下であり、河川水ではマイクロコロニー法と平板培養法で得られた生菌数に約5倍、海水では100倍以上の差が見られた。にがり水中の細菌は平板培養法では全くコロニーを生じず、マイクロコロニーのみを形成した。選択培地、蛍光抗体、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法等により、マイクロコロニー法で特定細菌の定量が出来ることを明らかにした。以上の結果をまとめ、マイクロコロニー法のプロトコールを作成した。

## 3. 日局指定菌株の特性と維持管理

性状に基づく同定結果は11株が種名まで一致し、用いた性状試験だけで同定できることが明らかとなったが、3株については属名が一致したが種名は一致せずまた属名も一致しない菌株が2つあった。

## 4. 防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究

パルス光照射による滅菌は、チャレンジ試験結果からも期待できる結果となった。

ただし、力価試験結果において、照射量に応じて力価試験結果は減少している。

## 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。以上の理由から、FDAガイドライン(Guideline for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing, 2002年)、EU-GMP、WHO-GMP等を参考にして、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た。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思われる。平成17年度は、外国に向けて英語版を作成する予定である。また、監視指導麻薬対策課からの要請により、引き続き「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」の作成も行う予定である。

「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、迅速・簡便、さらには高精度に定量する方法として、マイクロコロニー法の検討を行い、そのプロトコールの標準化を行った。マイクロコロニーはサイズが数十～100 μm であるため計数が容易であり、計数値の個人差は低くなった。また計数の省力化には市販の微生物自動計数システムの利用が有効であると思われる。さらにこの方法では、特定細菌の検出定量も可能であったが、対象とする細菌種に応じて、適切な培地を選択する必要性のあると思われる。

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、微生物問題に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。

今年度は保存菌株に対して市販同定キットを用いた性状調査を中心に検討を行ったが、正確な同定には 16s rRNA 塩基配列に基づく検証などとの連携が必要であると思われる。今後、さらに特定微生物試験、抗生物質力価試験を行い、各菌株の性状を明らかにすること及び、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予定である。

## 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) マイクロコロニー法を用いることにより、平板培養法よりも迅速かつ高精度に生菌数を測定できることがわかった。また一般生菌数に加えて、大腸菌等の特定細菌の定量も可能であることを示した。同法は、現局方で使用している培地上での細菌の増殖能を指標として細菌数を測定できるため、従来法からの移行が容易である。またその定量値は平板培養法に比較して利点が多いことから、非無菌水試料の衛生微生物管理には、マイクロコロニー法が有効であると思われる。
- 3) 菌株の性状データは、保存菌株が変異していないことや菌株の置き換わりがおきていないかを確認するための有用な情報であるが、今回の結果から生理・生化学的性状試験だけでは同定できないことが明らかと



なった。これらの菌株の同定には 16S rRNA 塩基配列データなどを含め総合的に判断して行う必要があると思われる。

4) パルス光照射による滅菌は有効であったが、照射量に応じて力価が減少した。従

って現段階で蛋白製剤に光パルス滅菌法を導入することは難しい。パルス光滅菌装置による滅菌は、光が透過する容器の材質に依ること、熱が発生することから耐熱性のあることが条件となる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K.. shock in press.
2. Hong C-C., Shimizu M., Muroi M. & Tanamoto K. Effects of endocrine disrupting chemicals on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- and nitric oxide production by mouse macrophages. Biol. Pharm. Bull. 27(7), 1136-1139, 2004
3. Hatao H., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M & Tanamoto K. Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. L. Leukocyte Biol. 2004
4. 佐々木次雄, 那須正夫, 坂根健, 城野久美子, 松原正利, 田中憲志, 梶原庸生, 棚元憲一: 製薬用水中の微生物評価培地“R2A 培地”に関する研究, 医薬品研究, 35 (12): 638-652, 2004.
5. Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2004; 4 (3): 217-240.
6. Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48 (12): 4624-4630.
7. Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y, Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. J. Bacteriol., 2004; 186 (20): 6944-6955.
8. 佐々木次雄:第14改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件,p.65-81, 技術情報協会編, 2004.
9. 佐々木次雄:第14改正日本薬局方無菌試験法, p.149-162, 技術情報協会編, 2004.
10. 佐々木次雄:日本薬局方15局へ向けての新しい考え方, PDA Journal of GMP and Validation in Japan, 6(1): 38-45, 2004.
11. 佐々木次雄:滅菌技術, パラメトリックリリースの動向を聞く, Pharm Tech Japan 20: 1999-2000, 2004.
12. 佐々木次雄:製薬用水の国際調和, 今後の展開について, Pharm Tech Japan 20: 2505-2510, 2004.
13. 上寺祐之, 重松宏, 馬場善三, 熊田直人, 佐々木次雄, 滅菌バリデーションのポイント, Infection Control 231-235, 2004.

14. Nakajima, K., K. Nonaka, K. Yamamoto, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Rapid monitoring of microbial contamination on herbal medicines by fluorescent staining method. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**: 128-132 (2005)
15. Kawai, M., J. Yamagishi, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 1123-1131 (2004)
16. Yamaguchi, N., C. Sakamoto, M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 1117-1121 (2005)
17. Kitaguchi, A., N. Yamaguchi, and M. Nasu: Enumeration of respiring milk spoilage bacteria within six hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
18. Kawamura K: A Novel Approach to the Statistical Evaluation of Media Fill Tests by the Difference from No Contamination Data, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Vol.58, No.6, Nov-Dec.2004
19. Yamaguchi O, Ichijo T, Ogawa M, Tani K and Nasu M. Automated digital image analysis software 'BACS II', for direct counting of bacteria by fluorescent microscopy with multiple excitation. *Bioimages*, **12**: 1-7 (2004)
20. Maruyama F, Yamaguchi N, Kenzaka T, Tani K and Nasu M. Simplified sample preparation using frame spotting method for direct counting of total bacteria by fluorescence microscopy. *J. Microbiol. Methods*, **59**: 427-431 (2004)
21. 荒賀昌幸, 山口進康, 那須正夫、蛍光活性染色法による注射用水製造工程の衛生微生物学的評価。防菌防黴, 印刷中。
22. Sakamoto C, Yamaguchi N, Nasu M. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, in press.
23. Ogawa M, Tani K, Ochiai A, Yamaguchi N and Nasu M. Multicolour digital image analysis system for identification of bacteria and concurrent assessment of their respiratory activity. *J. Appl. Microbiol.*, in press.
24. 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
25. 佐々木学、佐々木次雄、渡辺秀夫、長谷川和光、鈴木崇宣、小幡朗、伊藤浩三山本浩、高田光昭、鳥居宏明、我妻和夫：平成13年度、平成14年度厚生労働科学研究費（医薬安全総合研究事業）、医薬品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製造を例に）
26. Yukphan, P., Potachoen, W., Nakagawa, Y., Tantichoen, M. & 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., 50: 9-15 (2004).
27. Ngom, A., Nakagawa, Y., Sawada, H., Tsukahara, J., Wakabayashi, S., Uchiumi, T., Nuntagij, A., Kotepong, S., Suzuki, A., Higashi, S. & Abe, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. J. Gen. Appl. Microbiol., 50: 17-27 (2004).
28. Yukphan, P., Taweesak, M., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. J. Gen. Appl. Microbiol., 50: 189-195 (2004).
29. Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev., an acetic acid bacterium in the  $\gamma$ -*Proteobacteria*. J. Gen. Appl. Microbiol., 50: 235-242 (2004).

## 2. 学会発表

1. 室井正志、棚元憲一：Lipid IVa のアンタゴニスト作用発現に必要なヒト MD-2 分子領域の探索、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)
2. 杉山圭一、室井正志、棚元憲一：ヒトとマウスの誘導型 NO 合成酵素遺伝子のエンドトキシン応答性の解析、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)
3. 志水美文、室井正志、棚元憲一：内毒素によるマクロファージの一酸化窒素産生を抑制する 2 種の外因性内分泌かく乱化学物質の作用機序、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)
4. 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：Toll-like receptor 4 の情報伝達における可溶性 MD-2 の性状解析、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)
5. 畑尾史彦、室井正志、棚元憲一：Toll-like receptor 刺激による IRAK-1 および IRAK-4 の down regulation、第 77 回日本細菌学会総会、大阪 (2004, 4)
6. 畑尾史彦、比企直樹、小川利久、三村芳和、上西紀夫、棚元憲一、室井正志：エンドトキシン活性に及ぼす Toll like receptor 刺激薬による cross tolerance の効果、第 104 回日本外科学会定期学術集会 (2004, 4)
7. 畑尾史彦、室井正志、比企直樹、上西紀夫、三村芳和、棚元憲一：Toll-like receptor 刺激による IRAK-4 の down regulation、第 10 回日本エンドトキシン研究会、京都 (2004, 11)
8. Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K.: Differential regulation of human and murine iNOS expression in response to lipopolysaccharide. 8<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
9. Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.: Serum factor other than LBP is necessary for soluble MD-2 to gain its function as part of the LPS receptor. 8<sup>th</sup> Biennial Conference

- of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
10. Muroi M., Tanamoto K.: A region of human MD-2 required for the antagonistic activity of lipid IVA. 8<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
  11. Hatao F., Muroi M., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Kaminishi M., Tanamoto K.: Prolonged Toll-like receptor stimulation leads to down-regulation of IRAK-4 protein. 8<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Endotoxin Society, Kyoto (2004, 11)
  12. 中川恭好. Taxonomic studies of *Cytophaga*-like bacteria (平成 16 年度日本微生物資源学会奨励賞受賞講演), 日本微生物資源学会第 11 回大会, つくば, 2004 年 10 月.
  13. Takahashi, M., Nakagawa, Y., Yukphan, P., Yamada, Y., Suzuki, K. & Sakane, T. Analysis of the 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences of the genus *Gluconobacter*. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
  14. Miyashita, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K. & Sakane, T. Phylogenetic analysis to re-define the species in the genus *Myxococcus*. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
  15. Yukphan, P., Taweesak, M., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) regions. The 10th International Collection for Culture Collection, Tsukuba, Japan, October 2004.
  16. 藤田信之, 関川智洋, 中川恭好, 鈴木健一郎. NITE における有用微生物バイオリソースの整備, 第 27 回日本分子生物学会年会「特別企画, ナショナルバイオリソース」, 神戸, 2004 年 12 月.
  17. 中川恭好. 微生物の保存方法 —微生物管理の実際—, 日本防菌防黴学会「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第 20 回記念大会」, 東京, 2005 年 3 月.
  18. 宮下美香, 鈴木健一郎, 中川恭好. *Myxococcus* 属の 16S rDNA および 16S-23S ITS 塩基配列に基づく系統解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 2005 年 3 月.
  19. 高橋麻衣, 鈴木健一郎, 中川恭好. *Flavobacterium-Cytophaga* 類縁細菌群の 1 属, *Flammeovirga* 属の新種について. 日本農芸化学会 2005 年度大会, 札幌, 2005 年 3 月.

## 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 16 年 12 月に告示された改正省令 GMP には、新しい概念として「変更管理」や「逸脱管理」要件が導入され、無菌製造における留意事項も多く加わった。省令 GMP の無菌医薬品製造上の諸要件を補完する目的で「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、平成 16 年度には 3 回の研究会議を行い、指針案を纏め上げた。パブコメを反映させた最終指針案を平成 17 年 2 月 7 日、監視指導・麻薬対策課に提出した。本指針が、FDA ガイドラインや EU-GMP 同様、日本版無菌ガイドラインとして、製薬企業や薬事監視の場で活用されることが期待される。

#### 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, 2004 年）、EU-GMP、WHO-GMP 等を参考に、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

無菌医薬品の製造に関連する各分野（製薬、エンジニアリング、膜メーカー、等）の専門家 15 名を協力研究者に迎え、計 7 回の研究会議と頻繁なメール会議を開き指針案を作成した。作成した指針案を日本 PDA の

専門家グループに検討していただき、更に監視指導麻薬対策課を通じて広くパブコメを求めた。いただいた意見等を参考に議論の上、修正等を加えた最終案を 2 月 7 日、研究班の成果物として監視指導麻薬対策課に提出した。

#### C. 研究経過

平成 15 年度：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 GMP 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検討した。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：第 5 回研究会議で付属資料に回すものを決め、修正指針案を日本 PDA の専門家グループで検討していただくことにした。第 6 回研究会議で日本 PDA から寄せられたコメントと新しく出した FDA ガイドラインとの整合性を考慮に入れながら修正を加え、これを監視指導麻

薬対策課を通じて広くパブコメを求めた。  
第7回班会議でパブコメを反映した最終指針案に纏め上げ、監視指導麻薬対策課に研究班の成果物とし提出した。

#### 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17年度は、英語版を作成し、日本版無菌ガイドラインが外国人にも理解される形にする。また、監視指導麻薬対策課からの要請により、「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針案」の作成も行う予定である。

#### E. 結論

日本版無菌ガイドラインである「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針案」を作成し、監視指導麻薬対策課に提出した。

#### F. 研究発表

- 1) Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2004; 4 (3): 217-240.
- 2) Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4624-4630.
- 3) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y, Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine

the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.*, 2004; 186 (20): 6944-6955.

- 4) 佐々木次雄：第14改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件，p.65-81，技術情報協会編，2004.
- 5) 佐々木次雄：第14改正日本薬局方無菌試験法，p.149-162，技術情報協会編，2004.
- 6) 佐々木次雄：日本薬局方15局へ向けての新しい考え方，*PDA Journal of GMP and Validation in Japan*, 6(1): 38-45, 2004.
- 7) 佐々木次雄：滅菌技術，パラメトリックリリースの動向を聞く，*Pharm Tech Japan* 20: 1999-2000, 2004.
- 8) 佐々木次雄：製薬用水の国際調和，今後の展開について，*Pharm Tech Japan* 20: 2505-2510, 2004.
- 9) 上寺祐之，重松宏，馬場善三，熊田直人，佐々木次雄，滅菌バリデーションのポイント，*Infection Control* 231-235, 2004.
- 10) 佐々木次雄，那須正夫，坂根健，城野久美子，松原正利，田中憲志，梶原庸生，棚元憲一：製薬用水中の微生物評価培地“R2A 培地”に関する研究，*医薬品研究*, 35 (12): 638-652, 2004.

#### 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 16 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プロジェクト部:担当部長)  
小久保護 (澁谷工業株式会社微生物制御技術部:部長)  
小暮慶明 (デンカ生研株式会社ワクチン部:GMP 推進室マネージャー)  
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)  
白木澤治 (日揮株式会社 GMP 技術部:担当課長)  
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)  
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ァーマシューティカル事業本部:次長)  
水田泰一 (デンカ生研株式会社信頼性保証本部薬事コンプライアンス室:室長)  
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. 無菌医薬品の製造区域の防虫対策
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. 滅菌工程
  - 14.1 高圧蒸気滅菌
  - 14.2 乾熱滅菌
  - 14.3 電子線,  $\gamma$ 線滅菌
  - 14.4 高周波滅菌
15. 無菌製造設備の定置洗浄 (CIP)
16. 無菌製造設備の定置滅菌 (SIP)
17. 充てん工程
  - 17.1 液剤
  - 17.2 粉末
18. ろ過滅菌工程
  - 18.1 液剤
  - 18.2 空気・ガス
19. 凍結乾燥工程
20. その他の無菌製造設備
  - 20.1 アイソレータシステム
  - 20.2 ブローフィルシール
21. プロセスシミュレーション

### 附属資料A

- A1. 細胞培養／発酵により製造する原薬



- A2. 製薬用水
- A3. バイオハザード対策
- A4. ケミカルハザード対策
- A5. 試験・検査
  - A5.1. エンドトキシン
  - A5.2. 不溶性微粒子
  - A5.3. 容器完全性
  - A5.4. 外観検査

## 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員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、省令 GMP や規制当局からの通知等による要求事項以外は、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 処置基準値(action level)：測定対象物の数（微生物の場合は必要に応じて種）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、また封じ込め施設では気圧の低い区域から高い区域に病原体等が侵入しないようにするのが目的である。

2.4 警報基準値(alert level)：測定対象物の数（微生物の場合は必要に応じて種）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)：重要作業区域内で無菌医薬品を滅菌した容器に充てんから打栓または密封するまでの作業をいい、無菌操作法の一部である。

2.6 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医薬品の充てんやその他の作業を行うこと。

2.7 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直接支援区域に分けられる。

2.8 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、物理的に切り離すための障壁等をいう。

2.9 バッチ/ロット(batch/lot)：一製造期間内に一連の製造工程により均質性を有するように製造された製品の一群をいう。

2.10 バイオバーデン(bioburden)：中間製品及び原薬を含む非無菌医薬品や資材等に生存する微生物（細菌及び真菌）の数と種類をいう。

2.11 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評価システムで、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。

2.12 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）、記録機器、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適正な標準器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。

2.13 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。

2.14 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。

- 2.15 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評価システムで、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。
- 2.16 洗浄 (cleaning) : 水、洗剤などを用いて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。
- 2.17 清浄区域 (clean area) : 定義された微粒子と微生物学的清浄度基準を有し、異物汚染及び微生物汚染を防止している区域。本指針中では、「清浄区域」を「無菌医薬品製造区域」と同意語的に使っている。
- 2.18 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  $\mu\text{m}$  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。
- 2.19 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。
- 2.20 重要区域 (critical area) : 重要操作区域 (critical processing area) ともいう。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。
- 2.21 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。
- 2.22 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。
- 2.23 除染 (decontamination) : 再現性のある方法で生存微生物や微粒子を除去、または予め指定されたレベルまで減少させること。
- 2.24 設計時適格性評価 (DQ: design qualification) : 設備、装置又はシステム設計が目的とする用途に適切であることを確認し文書化すること。
- 2.25 直接支援区域 (direct support area) : 重要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、中間製品の微粒子及び微生物による汚染を特に厳しく管

理する必要が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。

2.26 消毒(disinfection)：消毒対象物の表面付着微生物を安全なレベルに減少又は除去すること。

2.27 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。

2.28' 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。

2.29 環境モニタリングプログラム(environmental monitoring 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。

2.30 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。

2.31 最終製品(finished product)：最終容器に充てんされ、包装され、ラベル貼付され、全製造工程を終えた製品。

2.32 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す。

2.33 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捕捉フィルターをいい、0.3  $\mu\text{m}$  以上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。

2.34 空調システム(HVAC system)：空気の温湿調整、換気を含む空気調節システムをいう。

2.35 その他の支援区域(indirect support areas)：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。

2.36 設備据付時適格性評価(IQ: installation qualification)：据付時又は改良した装