

表 2. メンブレンフィルタ法におけるモンテカルロ法を利用した誤差評価の結果

乱数	平均値	S.D.	S.D. (理論値)	S.D. (算出値)	初期設定値の 平均値	平均 視野数	95% C. I. 下限	95% C. I. 上限
一様	400.79	44065.82	—	41832.76	1047755.21	12.57	-88974.00	88748.00
対数	560.22	39349.87	—	37090.76	872662.65	13.32	-79402.82	80735.00

S.D.は Standard Deviance 標準偏差、C.I.は Confidence Interval 信頼区間である。

一列目：“一様”は、細菌数を下限から上限間を一様乱数として決定した場合、“対数”は下限と上限の対数値間を一様乱数として決定した場合を指す

四列目：“S.D. (理論値)”はズレが理論通り二項分布に従うとして求められる S.D.

五列目：“S.D. (算出値)”は七列目の“平均値”を用い、二項分布から求められる S.D.

六列目：“初期設定値の平均値”は細菌数の初期設定値の平均値

七列目：“平均視野数”は試行が停止するまでに計数された視野数の平均値

菌数の約 10%の大きさが最低限度の誤差として生じることは避けられないことが推測された。

D. 結 論

以下、今回の研究に関してまとめる。

1. 平板培養法および直接計数法における標本中の細菌数の推定における誤差を、乱数シミュレーション法であるモンテカルロ法により評価する系を作成した。
2. 実験誤差などを含まない理想的な条件においてその系を用いたところ、理論に沿った結果が得られ、その系の妥当性が保証された。
3. その理想的な条件において、細菌数の推定誤差はその大半(95%)が、標本中の細菌数の約 10%よりも小さいことがわかった。つまり平板培養法、直接計数法ともに、測定値には 10%程度の誤差が避けられないものであることが明らかになった。
4. 直接計数法に関して、理想的な系において安定した計数結果を期待するためには、1 2, 3 視野以上について測定

をすればよい。

今回の系は条件にも挙げたように実験誤差などを含まないものである。それらをシミュレーションに組み込むことで、より実際に即した計数からの推定時の誤差を評価することが可能となる。

E. 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. Yamaguchi, N. and M. Nasu. Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment. *J. Appl. Microbiol.*, **83**: 43-52 (1997)
3. 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 (1999)
4. Kawai, M., E. Matsutera, H. Kanda, N. Yamaguchi, K. Tani and M. Nasu. 16S

- ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 699-704 (2002)
5. 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)
 6. 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)
 7. Yamaguchi, N., C. Sakamoto, M. Nasu. Rapid and simple quantification of bacterial cells using a microfluidic device. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 1117-1121 (2005)
 8. 山口進康、那須正夫：蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出. *日本細菌学雑誌*, **61**: 251-260 (2006)
 9. 伊庭 幸人、種村 正美：計算統計2 マルコフ連鎖モンテカルロ法とその周辺. 岩波書店 (2005)
 10. Lu Yuing、伊藤徳夫、高木達也、岡本晃典、中西剛、田中慶一：PCR-DGGE法によるマウス腸内フローラ変動の解析. 第53回日本薬学会近畿支部大会、2003年11月、大阪
 11. 伊藤徳夫、Lu Yuing、高木達也、岡本晃典、中西剛、田中慶一：腸内細菌群集変動のPCR-DGGE法による解析. 日本食品化学会第10回学術大会、2004年6月、大阪

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

無菌医薬品製造ガイドラインの
フォローアップ研究

分担研究者 曲田純二 日本ミリポア(株)プロセス事業本部次長

研究要旨:平成 18 年 7 月に厚生労働省より「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」が事務連絡として発出され、一方同指針は必要要件を簡潔に記載した様式である。また医薬品業界のグローバル化の中で日米欧の同各ガイダンスとの整合性も重要である。今回無菌操作法の中でも重要工程である、ろ過滅菌に関し同指針の解説を行うとともに、欧米および ISO との比較を行った。

A. 研究目的

「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」の解説および欧米・ISO との整合性を確認する。

B. 研究方法

FDA "Aseptic Processing Guidance (2004)", EU "Annex 1(2003)" および ISO13408-2 Filtration(2003)の検証および欧米の規制当局者との意見交換を行った。

C. 研究経過

1. アイソレーターへ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、近年 FDA "Aseptic Processing Guidance (2004)", EU "Annex 1(2003)" および ISO13408-2 Filtration(2003)が欧米や国際規格として発行されている。
3. このようなガイドラインでは個別詳細の解説までは伴わないためその解釈に

業界および規制当局ともに差が生じることが有り得る。

4. 今回、ろ過滅菌工程における解説を行うとともに、無菌操作法の欧米との整合性について FDA/PDA Joint Conference(2006)を通じ意見交換を行った。

D. 考 察

1. ろ過滅菌工程におけるエアフィルターに関し、液体フィルターと異なり、工程ごとのバリデーションスタディを要求しない理由などについて解説を行った。
2. また液体ろ過フィルターに関し、ろ過前のバイオバーデンモニタリング要件について欧米との比較を含め解説した。
3. EU の無菌操作法のガイダンスである EU GMP Annex1 においては、環境モニタリング要件として「 $5\mu\text{m}$ 粒子」の測定があげられている。日米においては「 $0.5\mu\text{m}$ 粒子」のみが対象であるのに対し、EU では「 $5\mu\text{m}$ 粒子」が上乘せ要件とされている。EU の査察官である Dr. Joerg Neuhaus によると、「ヒト由来の場合、その粒子と微生物の存在の相

関性が高い。なぜならば 5 μ m 以上の皮膚片には微生物が付着している可能性が高い。したがって作業者によるクリーンルーム内の微生物汚染のリスク管理として 5 μ m 粒子のモニタリングは有用である。」ということであった。

4. また、欧米においては、ろ過滅菌フィルターを複数設置することを推奨する趣旨がそのガイダンスに記載されている。その主な理由は FDA CDER の Dr. Kurt Brorson によると「充填前タンクのバイオペーデン管理に不備が認められることから、微生物汚染リスク防止のため」ということがその理由であったが、そのタンクのエアベントフィルターなどが毎製造ロットに妥当に管理されていれば一段フィルターでも問題ないことを確認した。

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

E. 結 論

今回作成したろ過滅菌の解説含め、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」を業界および地方薬務課へ周知することは重要と思われる。一方、欧米の指針と整合性の取れない一部事項も確認されたため、今後日本においてそれらの考え方を導入すべきか今後検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 「無菌製造法に関する製造指針と品質管理：無菌製剤製造法の国際調和と GMP 指針への対応」：「18 章 ろ過滅菌工程」（2006 年 11 月 30 日発行 発行所（株）じほう）
2. 「最新薬事規制／三極申請に対応した不純物規格・試験法設定の具体的対応」：「第 5 章 5 節[3]生物薬品関連ガイドライン」（2006 年 7 月 31 日発行 発行所（株）技術情報協会）

18.1 液体ろ過滅菌工程

18.1.1 液体ろ過滅菌用フィルターの選定

液体ろ過滅菌用のフィルターについては、化学的特性及び物理的特性、生物学的安全性及び微生物捕捉性能に係るデータを考慮して選定し、その上で評価計画書又は評価手順書に従って、製品とフィルターとの適合性、必要な膜面積等の工程特性を評価すること。通例、選定される液体ろ過滅菌フィルターは、孔径 $0.2\mu\text{m}$ 以下又は $0.22\mu\text{m}$ 以下のものである。

解説)

18-1-1) まずフィルター供給者のバリデーションガイドなどに記載されている、耐薬品性、耐熱性、最大許容差圧などの情報を元に、製品や工程特性に合わせフィルターを選定する。またろ過滅菌用フィルターには品質保証書が添付されており、一般的にその品質保証項目には次が含まれる。

①完全性試験データ②エンドトキシン③バクテリアチャレンジ試験結果④酸化物質あるいは全有機炭素⑤粒子およびファイバー離脱性⑥抽出物試験⑦生物学的安全性⑧耐熱性・耐圧性⑨流量

上記情報に基づいた事前の選定後、文書化された評価計画書あるいは手順書に従って、製品とフィルターの適合性および工程特性を評価する。適合性評価には、抽出物、吸着性、完全性試験(製品ろ過前後)、流量などが含まれる。工程特性評価には、必要ろ過面積(サイジング)や前ろ過の必要性が含まれる。

関連規制要件)

18-1-1) ISO 13408-2の5. Selection of filter and filter assemblies based on filter manufacturer's dataおよび6. Fluid-specific criteria based on filter user's dataに同様の記載がされている。

18.1.2 液体ろ過滅菌の実施及び滅菌工程の管理

フィルター及び製品の特性に基づいてあらかじめ工程パラメータを確立すること。確立したパラメータに関してバリデーションを実施すること。

1) 洗浄操作

フィルター(二次側流路(ろ過後の配管、ホールディングタンク等)を含む。)について、抽出物、不溶性微粒子、酸化物質等を洗浄する工程を評価すること。

解説)

18-1-2-1) 分析手法としては、定量分析として、過マンガン酸還元試験、TOC 試験、不揮発性残留物試験などがあり、定性分析として、HPLC、FTIR、IR などがある。フィルター自体の評価に関しては、フィルター供給者が一般にその受託試験を請け負っている。

2) フィルター器具の滅菌操作

ろ過滅菌に係る一連の操作を確立すること。フィルターが確実に滅菌されることのほか、その滅

菌によってフィルターが損傷を受けないことを確認すること。多数回滅菌を実施する場合においては、適用する滅菌条件においての累積滅菌時間の許容限界を定めておくこと。フィルターの代表的な滅菌手法には、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌及び放射線滅菌がある。

解説)

18-1-2-2) オートクレーブ滅菌したフィルターや放射線などでの滅菌済みフィルターを使用する場合には、ろ過システムへの無菌接続に十分留意すること。フィルターの損傷の有無の確認には完全性試験を用いること。ろ過滅菌フィルターは通常1ロット製造ごとに廃棄されるが、洗浄の有効性など多数回使用の正当性が証明された場合、その累積滅菌時間やサイクルの許容限界をあらかじめ決定すること。

規制要件)

18-1-2-2) FDAの無菌操作法ガイダンスとISO 13408-2にもフィルターの多数回使用時の許容限度を規定する必要性が記載されている。

3) 完全性試験操作

日常の製造におけるフィルターの完全性試験は、フィルターの微生物捕捉性能データとの相関性の実証された非破壊試験によること。

解説)

18-1-2-3) 特定のろ過工程がバリデートされた後、その製造工程においても同じフィルターが使用されることの保証が重要であり、その主要な確認方法が完全性試験である。完全性試験にはバブルポイントおよび拡散流量(ディフュージョンあるいはフォワードフローともいう)試験がある。

規制要件)

18-1-2-3) 許容される完全性試験の手法について、FDAの無菌操作法ガイダンスでは、Forward flow and bubble point tests, when appropriately employed, are two integrity tests that can be used. EU GMP Annex1では、… an appropriate method such as a bubble point, diffusive flow or pressure hold test. と記載されている。

- ① 適切な湿潤液を選択する。フィルター供給者が推奨する湿潤液又は実際にろ過滅菌を行う製品によりフィルターを湿潤させる。

解説)

18-1-2-3)-① 水での湿潤が多用されるが、ろ過後フィルターに残留する製品の洗浄が困難で、水での完全性試験が安定しない場合などには、ろ過する実際の製品を湿潤液に選択する。その場合、あらかじめその特定の製品を用いたフィルターの完全性試験規格値をバリデートすること。

規制要件)

18-1-2-3)-① ISO 13408-2にも7. 1.3に同様に記載されている。

- ② 完全性試験のための手順書は、少なくとも以下の事項を含むものとする。

- ア) フィルター湿潤操作
- イ) 環境条件

- ウ) 工程確認
- エ) 不合格分析及びトラブルシューティング
- オ) 記録

解説)

18-1-2-3)-②-ア)およびイ) 拡散流量試験値は湿潤液の温度に影響されやすいため、特に高温でのろ過工程においてはその管理に留意すること。

規制要件)

18-1-2-3)-② ISO 13408-2には、Written integrity test procedures shall be established, including acceptance criteria and methods of failure investigation and conditions under which can be repeated. と記載されている。

4) ろ過滅菌工程条件

ろ過滅菌工程のバリデーションには、以下の事項を考慮に入れ、予想されるワーストケースの操作条件下において実施すること。

- ① 製品とフィルターとの適合性(耐薬品性等)
- ② 最大ろ過時間又は最大製品接触時間
- ③ 最大ろ過量
- ④ 最大流量
- ⑤ 温度
- ⑥ 最大差圧

解説)

18-1-2-4) フィルター供給者にフィルターの操作条件の最大許容値を確認し、その範囲内でフィルター使用者が想定するワーストケースでバリデーションを実施する。①にはスモールダウンモデルでの物理的適合性試験として、ろ過前後の完全性試験値・フィルターの重量・流量などの変化の確認なども必要に応じ検討すること。

18.1.3 製品固有の微生物捕捉性能のバリデーション

1) 微生物チャレンジテスト

製品に対するフィルターの微生物捕捉性能は、最大ろ過量、差圧等予測されうるワーストケースに係る条件下においてバリデートすること。

解説)

18-1-3-1) 製品およびろ過工程のワーストケースのパラメーターとしては、pH・粘性・イオン強度・浸透圧・活性成分の濃度・製品のバイオバーデン・最大ろ過時間/接触時間・最大ろ過量・最大流量・最大差圧・ろ過温度が上げられる。また微生物チャレンジテストに使用されるフィルターに対するワーストケース条件として、その完全性試験値が製造工程で実際に使用されるフィルターの規格値に近いフィルターであることが重要である。

規制要件)

18-1-3-1) 上記の微生物チャレンジテストに使用されるフィルターの規格値に関し、ISO 13408-2では、7.2.1.3において、…(typically within 10% of the limit)としている。

2) チャレンジ溶液及びチャレンジ微生物

① チャレンジ溶液

試験に用いる溶液は実際にろ過滅菌される製品の溶液であること。製品の溶液の抗菌性等のためにチャレンジテスト溶液を改変する場合においても、製品とフィルターとの適合性を確認するために、実際にろ過滅菌される製品溶液を用いて実工程をシミュレートしたろ過を実施し、その後改変した条件におけるチャレンジテストを実施すること。

規制要件)

18-1-3-2)-① チャレンジ溶液の改変に関して、FDA の無菌操作法ガイダンス IX.では、Direct inoculation into the drug formulation…(略) …processing should be justified. の中で、抗菌性を有した製品や油性製品に対して同様の記載がある。ISO13408-2 では改変の具体例として7.2.2.1において下記を上げている。

a) modifying the fluid to be filtered(e.g. reducing or eliminating the antimicrobial compound);
The simulation fluid shall mimic as closely as possible the formulation and the following fluid specific characteristics: pH, viscosity, ionic strength, osmolarity, surface activity/tension, and the effect of the fluid on the challenge organisms.

b) reducing fluid-organism exposure time

c) reducing the fluid temperature

d) using a diminutive organism that is resistant to the antimicrobial properties of the fluid or process

e) exposing the filter to the fluid with the anticipated fluid contact time, followed by a challenge in a modification of the fluid as in a) to d)

② チャレンジする微生物

Brevundimonas diminuta (ATCC 19146) 又はより科学的に妥当と思われるチャレンジ微生物を用い、無菌のろ液が得られることを確認すること。そのチャレンジレベルはろ過面の単位面積(cm^2)あたり最低 10^7 個以上であること。

解説)

18-1-3-2)-② ろ過面の単位面積(cm^2)あたり最低 10^7 個以上のチャレンジ菌数を要求しているのは、この条件によってフィルターろ過面全体が *B. diminuta* のモノレイヤーにより覆われるとされ、これによりフィルターすべての孔径の評価がされることが根拠となっている。また、チャレンジ微生物が十分に小さく培養・調製できたことの確認のために、チャレンジ試験に使用するろ過滅菌フィルターとは別に、コントロールフィルターとして一般に $0.45 \mu\text{m}$ フィルターを当該微生物が通過することを確認する。

規制要件)

18-1-3-2)-② FDA 無菌操作法ガイダンス、EU GMP Annex1 および ISO 13408-2 ともに同じ

要件である。*B. diminuta* 以外の微生物をチャレンジテストに使用するケースについて、FDA 無菌操作法ガイダンスでは、製品のバイオバーデン評価結果からその特定微生物がワーストケースと考えられる場合としている。ISO 13408-2 では、*B. diminuta* よりもフィルターを通過する微生物の存在が懸念されるケースとして下記を上げている。

- presence of biological material
- use of water from systems that are not operated under self-sanitizing conditions
- presence of microorganisms known to penetrate filters
- presence of pleomorphic organisms(e.g. L forms in penicillin, mycoplasma)

18.1.4 ろ過設備の設計

配管、バルブ、圧力計等の計器、ガasket、フィルターから構成されるろ過設備は、製品と接触する材質の化学的性質及び物理的性質に基づき、また微生物汚染を防止するために無菌的に接続しなければならない箇所が最も少なくなるように設計すること。蒸気滅菌時に空気や凝縮水によるコールドスポットが生じないようにフィルター及びハウジングを設置すること。

解説)

18-1-4 蒸気滅菌後のフィルター内部(2次側)の凝縮水がスムーズに排出されるよう、フィルターの設置方向およびドレインの位置に留意すること。ろ過システムを設置する環境条件はろ過前後の製品への生物汚染を防止するよう設計すること。ホールディングタンクのエアベントには適切なガスろ過滅菌フィルターを選定すること。

18.1.5 日常の手順

1) フィルター及びろ過設備の洗浄

ろ過設備を工程開発において確立された妥当な操作により洗浄すること。

2) ろ過システム設備の滅菌

ろ過設備の滅菌は、工程開発において確立された妥当な操作により、微生物の増殖を防止するために洗浄工程後速やかに行うこと。

解説)

18-1-5-2) 水分の存在が微生物増殖の原因になるため、洗浄と滅菌工程の間に時間を要する場合には洗浄後十分にろ過システム設備を乾燥する。

3) 完全性試験

バリデートされたフィルターの完全性試験は、フィルターアッセンブリーを分解せずに、ろ過(使用)後に実施すること。工程条件を勘案し可能であればフィルター滅菌後のろ過(使用)前にも実施すること。

解説)

18-1-5-3) フィルターアッセンブリーを分解せずに、すなわちフィルターをハウジングに装着した状態で完全性試験を行うことは、フィルターが正しく装着されていたかを確認するために重要で

ある。フィルターをはずし、他のハウジングなどに再装着した場合、フィルター自体の完全性は確認できるが、Oリングのよじれなどの装着不良を評価できない。さらに工程に装着した状態、すなわちインラインでの完全性試験がもっとも望ましい。

規制要件)

18-1-5-3) 使用前後の完全性試験の実施について、FDA 無菌操作法ガイダンスでは、Integrity testing of the filter can be performed prior to processing, and should be routinely performed post use. 、EU GMP Annex1 では、The integrity of the sterilized filter should be verified before use and should be confirmed immediately after use by…、ISO13408-2にも本文と同様に記載されており、使用後は必須であり、使用前の完全性試験の実施も推奨されている。

4) バイオバーデン管理

ろ過前の製品のバイオバーデンのレベルを確認すること。

解説)

18-1-5-4) 定期的なろ過前のバイオバーデン数を確認すること。可能であればバイオバーデンの定性も検討すること。

規制要件)

18-1-5-4) FDA 無菌操作法ガイダンスおよび EU GMP Annex1 では、バイオバーデンおよびエンドトキシン(パイロジェン)の、ろ過滅菌前のモニタリングと、調製とろ過滅菌までの時間制限を(最小にするよう)要求している。

VIII. Bioburden and endotoxin load should be assessed when establishing time limits for stages such as the formulation processing stage. (FDA)

51. The time between the start of the preparation of a solution and its sterilisation or filtration through a micro-organism-retaining filter should be minimised. (EU)

52. The bioburden should be monitored before sterilisation. There should be working limits on contamination immediately before sterilisation which are related to the efficiency of the method to be used. Where appropriate the absence of pyrogens should be monitored. (EU)

ISO 13408-2では、バイオバーデンが十分に低く管理されていることが実証されていない場合、製造ロットごとにその測定を求めている。

9.3 Pre-sterilization bioburden shall be determined for every batch, unless all aspects of aseptic manufacture are well controlled and previous test results have shown bioburden to be low and consistent. (ISO)

5) 維持管理及び変更管理

関連する試験検査設備を含め、フィルター及びろ過システム設備の維持管理手順を確立し実施すること。フィルターの使用及び維持管理手順の条件を変更しようとする場合における事前確認及び記録の手順をあらかじめ定めておくこと。

解説)

18-1-5-5) 変更管理に関し、膜面積あたりの最大流量、最大ろ過量、最大差圧などろ過滅菌工程においてバリデートされた条件以上の変更がある場合、チャレンジ試験の再バリデーションが必要となる。またフィルター素材やサポート材に変更があった場合、製品との適合性試験やチャレンジ試験の再バリデーションが必要かを検討すること。

6) 職員の訓練

製造工程においてろ過滅菌に係る作業に従事する職員の訓練を実施すること。訓練の内容には、完全性試験の操作法、完全性試験が不合格であったときの調査の手順及びその実施、フィルターの装着及び脱着操作、フィルターの滅菌及び洗浄等が含まれるものとする。

7) 製造記録

製造記録には少なくとも下記の事項を記載するものとする。

- ① ろ過滅菌の手順
- ② ろ過滅菌を行った製品の名称及びロット数
- ③ ろ過滅菌を行った職員の記名押印又は署名
- ④ フィルターの供給者、フィルターの種類及びフィルターのロット番号又はシリアル番号
- ⑤ フィルター及びろ過設備の滅菌及び洗浄の条件
- ⑥ ろ過滅菌工程の条件(差圧、一次側圧力及び二次側圧力、流量、操作温度、操作時間等)
- ⑦ フィルターの完全性試験及びその合否

18.2 空気その他ガス

18.2.1 ガスろ過滅菌用フィルターの選定

ガスろ過滅菌用のフィルターについては、疎水性素材でできたものを選択すること。また、個々のフィルターの化学的特性及び物理的特性、生物学的安全性、微生物捕捉性能等に係るデータを考慮の上選定し、工程の特性に応じて必要流量及び工程差圧から必要な膜面積を算出すること。通例、選定されるガスろ過滅菌フィルターは、孔径 $0.2\mu\text{m}$ 以下のものである。

解説)

18-2-1 一般にガスろ過滅菌フィルターに使用される疎水性素材において、その疎水性の強さの順には、PTFE、PVDF、PP となり、この順に、より水に濡れにくい素材である。ガスろ過滅菌フィルターの場合工程のワーストケースをシミュレートすることが困難であるため工程ごとの微生物捕捉性能のバリデーションは要求されないが、18.2.2.2)に述べるように、フィルター供給者が実施するフィルターのチャレンジ試験には、エアロゾル試験(バクテリアやバクテリオファージを含む蒸気をもってしてフィルターを通す試験)や液体試験(*B. diminuta* を含む水をもってしてフィルターを通す試験)、またそれらの試験の頻度など、品質保証規格に違いがあるため、用途・リスクに応じた適切なフィルターを選定すること。膜面積の選定は流量、差圧、配管系などから計算式によって算出し、フィルターを選定すること。

18.2.2 ガスろ過滅菌の実施及び滅菌工程の管理

1) 滅菌操作

ガスフィルターは一般に多数回使用するため、適用する滅菌条件における累積滅菌時間の許容限界を定めておくこと。フィルターの代表的な滅菌手法には、定置滅菌(SIP)又はオートクレーブによる蒸気滅菌、ガス滅菌及び放射線滅菌がある。

蒸気滅菌においては、フィルターに水が残存しろ過流量の低下が生じないよう十分な時間をかけてブローダウンを行う必要があるが、細菌の増殖を防ぐためブローダウンを短時間で済ませるような操作とすること。

規制要件)

18-2-2-1) FDA 無菌操作法ガイダンスでもガスフィルターの十分な乾燥に留意するよう要求している。Gas filters (including vent filters) should be dry. Condensate on a gas filter can cause blockage during use or allow for the growth of microorganisms. Use of hydrophobic filters, as well as application of heat to these filters where appropriate, prevents problematic moisture residues.

2) 完全性試験操作

フィルターの完全性試験は、使用フィルターの微生物捕捉性能を確認することができるような非破壊試験によること。

解説)

18-2-2-2) 疎水性フィルターには従来湿潤液としてアルコールなどを用いた非破壊完全性試験が実施されてきた。近年フィルターの疎水性と水との特性を利用しフィルターを濡らさない、水での完全性試験(ウォーター イントルージョンあるいはペネトレーション試験)が実用化されている。この技術により工程に設置した環境での完全性試験が可能になっている。

① ろ過したガスが直接滅菌製品に接触する工程

ろ過したガスが直接滅菌製品に接触する工程(無菌充填装置、滅菌バルクホールディングタンクのベントフィルター、凍結乾燥装置、オートクレーブのパキュウムブレイクフィルター等に係る工程)に使用するガスフィルターは、液体を用いた細菌チャレンジテスト(通例、フィルターの供給者が液体として水を用いて実施する。)の結果との相関性を持った完全性試験を実施すること。この試験法については、フィルター供給者に確認すること(18.1.3を参照)。

18-2-2-2)-① 疎水性フィルターの場合、親水性フィルターの大きさに基づく分子ふるい除去効果に加え、静電吸着除去効果など他の捕捉機能を持つためより有利な捕捉媒体である。逆にガスろ過滅菌フィルターが水で濡れた場合、主に分子ふるい効果に依存するためその状態がワーストケースである。したがって定期的な SIP 工程などにおいて乾燥不十分な場合、すなわち一部濡れた部分が生じて微生物が通過せず、滅菌製品を汚染しないことを実証したフィルターの使用が妥当である。

② ろ過したガスが直接滅菌製品に接触しない工程

ろ過したガスが直接滅菌製品に接触しない工程（中間体バルク工程及び発酵工程におけるエア供給等）に使用するガスフィルターは、上述①又はエアロゾル条件における細菌又はバクテリオファージチャレンジテストとの相関性を持った完全性試験を実施すること。この試験法については、フィルター供給者に確認すること（18.2.3 を参照）。

解説）

18-2-2-2)-② 発酵工程や中間バルク工程で使用するエア供給やベントなどにもガスろ過滅菌フィルターが適用されるべきで、少なくともエアロゾル試験以上の品質保証が必要である。それらの工程でもバイオ医薬品などのように汚染のリスクが高いあるいは製造コストの観点などから必要に応じ①の適用を検討すること。

3) ろ過滅菌工程条件

ガスフィルターは一般に多数回、長期間使用されるため特にその構成素材の酸化又は劣化を含む耐久性を確認すること。またろ過滅菌工程における下記パラメータを確立しておくこと（ガスフィルターについては、液体フィルターとは異なり、ワーストケースを考慮したパラメータの設定は現実的ではなく、したがって工程ごとの微生物補足性能のバリデーションを敢えて要求しない。他方、「ろ過したガスが直接滅菌製品に接触する工程」に使用するガスフィルターについては、細菌チャレンジテストと相関性をもった完全性試験を要求しているものである。）。

- ① 温度
- ② 最大差圧
- ③ ガス流方向
- ④ 使用期間
- ⑤ 滅菌回数

18.2.3 微生物捕捉性能の確認

ガスフィルターの微生物捕捉性能の試験法、捕捉性能評価結果について、フィルター供給者から提供される製品保証書、バリデーションサポート資料等により確認すること。

解説）

18-2-3 液体ろ過滅菌フィルターには製品ごとの微生物捕捉性能のバリデーションを要求しているのに対し、前述したようにガスろ過滅菌フィルターに対しては敢えて要求されない。

18.2.4 ろ過設備の設計

ろ過設備は、フィルター上に凝縮水が発生しろ過流量の低下や微生物の増殖が生じることを防止するために、凝縮水が速やかにハウジング及びフィルターの内部から排出されるよう適切に設計すること。WFI タンクのように凝縮水が発生するおそれのある場合においては、フィルターハウジングを加熱するなどしてその発生を防ぐこと。18.1.4 項を参照すること。

18.2.5 日常の手順及びバリデーション

ろ過したガスが直接滅菌製品に接触する工程といった、ガスフィルターから離脱した粒子又はファイバーが製品の品質に影響を及ぼす可能性がある場合においては、液体を用いてその離脱を評価することができる。一般的にはフィルター供給者のデータに基づき、製造業者としてのフィルター洗浄 (CIP や滅菌前の洗浄) のバリデーションの必要性を検討する。18.1.5 項を参照すること。

解説)

18-2-5 本文では日常の手順の中で完全性試験の頻度について、ガスろ過滅菌フィルターについて 18.1.5 を参照としており、これに基づく使用前すなわち設置時、および使用後としている。

規制要件)

18-2-5 FDA 無菌操作法ガイダンスの中でも使用前と使用終了時など定期的実施することとしている。Use of hydrophobic filters, as well as application of heat to these filters where appropriate, prevents problematic moisture residues. We recommend that filters that serve as sterile boundaries or supply sterile gases that can affect product be integrity tested upon installation and periodically thereafter (e.g., end of use). EU GMP Annex1 でも同様の趣旨が記載されている。

分担研究報告書

無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリースの適用に関する研究

分担研究者

渡辺恵市郎

日揮株式会社技術理事

研究要旨：本報告は「無菌操作法で製造する無菌医薬品へのパラメトリックリリースの適用に関する研究」について、分担研究班で今年度開催された「無菌操作法工程におけるリスク」の5回の会合を通して得られたものである。今年度の研究の主題は、「無菌操作法における工程でのパラメータとリスクは何か？」ということである。

第2回の会合では、ゲスト協力研究者として、ろ過滅菌について上久木田氏に講演を戴いた。これは、無菌操作法におけるパラメータの考え方に最も近い考えられたためである。この事例を参考に議論を重ねてきたが、最終回の第5回までの議論では、明確な形での研究班の結論の総括は行われなかったものの、今後の進むべき方針と後の項に示す結論に至ったと考えている。

協力研究者：

貝瀬昭夫	共和真空技術株式会社
木坂博和	武田薬品工業株式会社
小暮慶明	デンカ生研株式会社
高橋充博	アステラス富山株式会社
小林一幸	日本イーライリリー株式会社
浦山由巳	千代田化工建設株式会社
白木澤治	ファルマ・ソリューションズ株式会社
田原繁広	日揮株式会社
上久木田務	キュノ株式会社
曲田純二	日本ミリポア株式会社
川崎康司	株式会社エアレックス
小久保護	澁谷工業株式会社
出口統也	澁谷工業株式会社

A. 研究目的

本研究目的は、「新しい無菌医薬品製造技術の無菌評価に関する研究」の一分担研究として発足したものである。その目的は、
①各工程のリスク評価をベースに無菌操作法で製造する医薬品のパラメトリックリリース（以降、P R）運用の可能性を追求する。
②微生物学的に安全な凍結乾燥製剤（または粉末製剤）にP Rを適用することをモデ

ルにP R要件を追及し、パラメータの設定、管理方法などについて纏めることである。

B. 研究方法

今年度の研究の主題は、「無菌操作法で製造する医薬品のパラメトリックリリース（以降、P R）運用の可能性を追求する」のための第一歩として「無菌操作法における工程でのパラメータとリスクは何か？」ということであり、これについて議論し纏めるこ

とである。当該協力研究者会議は毎月 1 回行い、問題提起と議論を繰り返すものとした。また、適宜、当該テーマの第一人者を招聘し講義を受けて、議論の充実を図った。まず、無菌操作法(凍結乾燥製剤)による製剤の製造工程において P R に繋がるリスクの抽出を行なうために、凍結乾燥製剤の無菌性を支配する 5 つのシステムに分類した。

- (1) 薬液の無菌ろ過システム
- (2) 重要区域への空気供給システム
- (3) 製造環境システム
- (4) 移送システム
- (5) 凍結乾燥システム

上記、5 つのシステムの内、既に一種の P R である（ろ過液の無菌性とフィルターのパラメータが議論し尽くされ、実用されている）薬液の無菌ろ過システムに関する考え方を上久木田氏に講義していただき、他の 4 つのシステムを同様な方法で展開することを試みた。

表 1 に、過去 5 回の活動内容を示す。

C. 研究経過

C-1：重要区域への空気供給に関するリスク分析

(a)基本要件のまとめ

本章では、無菌操作法製剤の無菌性を確保するために、重要区域に H E P A フィルターを介して空気を供給するシステムを「重要区域への空気供給システム」（または単に「空気供給システム」）と呼ぶ。

重要区域への空気供給システムは、単に空調機及びダクト、H E P A フィルター等の設備構成（ハード）に留まらず、設備によ

って供給される空気品質、環境並びに設備のモニタリングプログラム、設備のメンテナンスプログラムを含むトータルシステムとして定義される。

重要区域への空気供給システムに関する基本要件は以下の 4 点である。

① 清浄空気の供給

温湿度を調整され、また、良好で健全に設置された H E P A フィルターを介した十分に清浄な空気（無菌空気）が供給されること。

② 一方向気流の確保

重要区域に供給された空気は、供給時点において均一で十分な風速を持ち、重要区域内で発生した微粒子を速やかに系外に排出すること。また、原則的に渦流、逆流、巻き上げ、巻き込み流を持たず、重要区域内のクリティカルエリアを清浄に維持するよう一方向気流となって流れること。

③ 隣接区域からの汚染空気混入防止

重要区域と隣接区域の境界に於いては、隣接区域からの逆流や巻き込み流がないこと。

④ 系内の滅菌・除染

重要区域については、系内を適切な方法によって滅菌・除染出来ること。

(b)空気供給システムへの影響要因評価

空気供給システムへの影響度要因評価に関しては、添付資料 C. 1「各工程における無菌化と無菌維持のリスク分析（重要区域への空気供給）」を参照頂きたい。

(c)空気供給システムに関する考察

影響要因評価に関する議論の中で最もクローズアップされたのは、H E P A フィルターを介した空気の高菌性に関する評価であった。以下に、H E P A フィルターを介した空気の高菌性に関するこれまでの検討内容を纏めた。

H E P A フィルターの捕集効率は粒径 0.3 μm の微粒子に対して 99.97%以上とされているが、実際のフィルター 1 次側の微粒子負荷は、リークテストで行われているような 100 万個/ m^3 と比べて遙かに小さいものであり、2 次側への微粒子の漏洩は現実的には殆ど発生していないと考えられる。

しかしながら、その事実をリアルタイムに示すことは次項にも述べるように、日常的なモニタリング方法の検出能力に限界があるため非常に困難である。

また、H E P A フィルターの微粒子除去機能は、種々の現象の相乗効果に依るものであり^(注1)、長期間連続的に使用する状態に対して、微粒子の実際の除去率を log reduction のような形式で表現することも難しい。

(注1) 粒子の捕集機構は以下の原理からなる。

・フィルターを構成する繊維による粒子流線のさえぎり

・粒子が慣性によって流線からはずれ、繊維に接触

・重力による粒子の沈降

・粒子のブラウン運動

・粒子が静電気力を受けて繊維に引かれる

微粒子や微生物のモニタリングで品質を評価している空気は、重要区域に供給される空気全体から見て、容積的にも時間的にも極一

部でしかない。特に、充てん部など、製品の高菌性を確保するために最も重要なポイントからは、測定による気流の乱れや逆汚染のリスクを避けるため、サンプリングが困難であるため、モニタリング結果と製品の高菌性保証の直接的な関連性は、一層薄くなる。

H E P A フィルターの健全性に関しては、ろ材の問題（ピンホールの有無）だけでなく、取付状態も重要な要因となる。何れの場合も定期的なリーク検査でリスクを見つけることは可能であるが、日常の微生物や微粒子モニタリングで検出できないレベルの不具合については、リアルタイムで検出することは不可能である。

H E P A フィルターの一次側、及び H E P A フィルター本体で微生物が増殖すると、2 次側へ漏れ出てくるリスクが増大すると考えられる。このリスクは供給空気の高度と湿度を管理することで排除することができる。この場合、水分活性が一つの評価軸となり、水分活性を 60%以下に保つことで微生物の増殖をほぼ完全に抑制することが出来る。

H E P A フィルターの負荷を下げるために、適切なプレフィルターを設置することが望ましい。

微粒子数と、微生物数の相関をどのように評価できるかを考えなければならない。N A S A の研究論文などを参考に、議論を深める必要がある。

直接支援区域(Grade B)、重要区域(Grade A)、コアエリアに適用される設備や運用の大きな基準については、表 2 のように整理される。(検討中)

C-2 製造環境に関するリスク分析

(a)基本要件のまとめ

無菌操作法製剤の無菌性を確保するために必要な製造環境の確保に関して考察する。なお、製造環境は大きく、作業環境管理と、作業員の微生物学的管理の2点に分けられる。

① 作業環境管理

無菌製剤が製造されるエリアの清浄度に関しては、「無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」に規定されているが、規定に従った清浄度の確保とその維持。特に重要区域及び直接支援区域に対しては十分な管理が必要となる。

② 作業員管理

無菌操作法における無菌製剤の製造に当たっては、無菌操作法を実施する作業員からの菌汚染が大きなリスクとなる。作業員から発生する塵埃(微生物の媒体)を最小限にするための更衣システムの管理及び、製品及び直接容器を作業員の発生する塵埃から保護するための、作業管理が重要となる。製造環境に関するリスク分析に当たって、「重要区域」とは別にコアエリアという概念が重要となる。コアエリアについては以下のように定義する。

コアエリア：当該エリアで発生した塵埃が、製造環境に暴露された薬物と直接接触する一次容器面、薬物及びそれらと直接接触する機器表面に対して直接気流によって汚染を及ぼす可能性のあるエリア。本エリアは固定のエリアではなく、作業によって移動するものである。

(b)製造環境の影響要因評価

製造環境に関する影響度要因評価に関して

は、添付資料 C. 2「各工程における無菌化と無菌維持のリスク分析(製造環境)」参照

(c)製造環境に関する考察

- ① 作業環境の評価で行われる項目(空中浮遊微粒子、空中浮遊菌、表面汚染菌)はいずれも部分サンプリングであり、製品の無菌性を直接担保できるものではない。傾向評価による異常の有無の評価に使用することが適切である。
- ② 生産中のコアエリアでの測定に関しては、いずれの項目においても測定作業自身がリスクを増大する行為であり、現在の技術では実現は難しい。
- ③ 無菌室における最大の菌の汚染源は作業員である。如何に管理された更衣システム下においても、コアエリアにおける作業員の存在は大きなリスクである。作業員のコアエリアへのアクセス方法や動作をSOPで定めてもいつも同じであることを保証し、後で検証できるようにすることが重要なポイントとなる。
- ④ コアエリアは、製造環境、設備、作業によって影響されるもので画一的に決められるものではない。各作業所において、気流調査、培地充填などで適切に決定する必要がある。

C-3 無菌操作法による製造での移送の無菌性リスク

(a)「移送」の定義

この報告書における「移送」とは、無菌操作法による無菌医薬品の製造工程において、無菌性を担保しなければならない物品をあるモジュール(注2)から、次のモジュールに移動する過程と定義する。

(注2)： この報告書において、モジュール(module)とは、例えば蒸気滅菌機、バイアル洗浄乾燥機といった一つのまとまりのある機能単位を意味で使用する。moduleの持つ意味は、“one of several separate parts that can be combined to form a larger object, such as a machine or building”とされている。

(b) 「移送」を構成するステップ

移送の対象となる物品は、製造用器具（例えばろ過装置、充てん用器具）、製造を行っている医薬品、あるいは直接資材と様々であるが、移送を機能面から分解とする次の3つのステップから構成される。

(1) 取出し：あるモジュールより対象となる物品を取出し、必要な場合は保護的措置をおこなって次のモジュールへの移動するための準備するステップ。

(2) 移動：取出した物品を、次のモジュールに移動するステップ

(3) 取付け：移動した物品を次のモジュールにインプットするステップ

(c) 各ステップのリスクとハードの関連性
移送における無菌性に関するリスクは、無菌操作法の他の工程と同じく、ハードウェアに大きく依存する。様々な移送の工程のうち「ヒトが関与する」操作がある場合は、無菌性を確実に担保出来る方法がなく、加えて実質的な評価手段が存在していない。ヒトが関与する操作での最大のリスクは、ヒトの行動様式とその活動の大きさ依存し、それは主としてヒトが動作を行う過程で発生する。ヒトが関与する無菌操作法におい

て、無菌性保証で遭遇する最も困難な点は、ヒトの行動が予想された範囲内で行われたことの担保が困難という点である。

換言すれば、ヒトが関与する無菌操作法の工程の全てにおいて、無菌性を担保が出来ないのではない。ヒトが関与する無菌操作法の工程の無菌性保証は、ヒトの行動が予め想定された範囲内（すなわち無菌性を危うくしない行動様式とそれに必要なハード的対応の範囲内）に収まっていることを担保することが必要となる。

例えばバイアルは洗浄乾燥滅菌機で処理されて、それが出口部分にある搬送ベルトにより移送され充てん機に供給される。この搬送ベルト部分は通常状態ではヒトの介在はない。しかし搬送途中でバイアルの転倒が生じた場合は、これを取り除くためにはヒトの介在(intervention)が生じる。ヒトの介在を無くすためには、ロボットなどの使用が必要になろう。

この場合、例えば無菌のピンセットなどを使用して、かつヒトの影響がない操作方法で転倒バイアルを排除した場合は、無菌性への影響がないとの判断がなされる。またヒトが手を入れて倒立したバイアルを排除した場合は、予め定められた一定本数のバイアルを排除することで、ヒトの影響が取り除かれる。これらは「予め想定された行動の範囲内」であれば、逸脱としての取扱いが行われず、通常の生産行為の一部であるとの位置付けがされる。

また、充てん器具を装置にセッティングするコンベンショナルな方法は、充てん針と

それに接続する配管ライン（充てん器具と略記する）を、滅菌用の容器に収納して蒸気滅菌が行い、この充てん器具をヒトが充てん機にセッティングするというものである。蒸気滅菌中は、充てん器具の薬液接触面は蒸気に暴露される状態となっている。滅菌機からの取出し時に、充てん器具が汚染を受けないように、例えば充てん器具の収納容器の外側にあるスリットを閉めるなどして、微生物汚染を受けないような保護をした後に移送を行う。移送中はそれを収納した容器の外表面に微生物が付着するリスクは存在するが、収納容器内に空中浮遊微生物が侵入する可能性は少ない。この充てん器具を充てん機に取り付ける場合は、充てん器具を薬液配管に無菌操作法により接続することが必要となる。ヒトが配管を無菌的に接続することは、かなり高いリスクを伴うものであろう。しかし、これら一連の操作は、充てんラインを SIP で行うことにより、ほぼ完全にヒトの介在要素を取り除くことが出来る。また、これら SIP の滅菌工程が成立していることは、滅菌に伴う物理的なパラメーター（一般的に温度、時間）で確認することが出来る。

以下で取上げる3つのステップにおけるリスクは、ヒトの介在する操作を伴う場合についての議論である。

（1） 取出し時のリスク：

代表的な事例は、蒸気滅菌機からの物品の取出しであろう。充てん器具、ゴム栓といった器具や部品類の蒸気滅菌では、蒸気が物品表面と直接に接することが必要である。多くの場合、それは蒸気透過性のある微生物学的バリアー（例えばタイベック TM のような包装材）で包まれ、さらに二次的な容器（「滅菌缶」と略記する）の中に収納されている。しかしゴム栓滅菌機の一部のものでは、ゴム栓の薬液接触面が暴露されている状態で、滅菌機の缶体から直接的に無菌容器に収納される場合もある。

一般的に、作業員との接触により表面付着菌がそれら滅菌器材に付着する可能性は少ない。しかし、滅菌缶外側に菌が付着する可能性が高い。この場合は、作業員の手袋からの伝播よりも、作業員から発散される空中浮遊菌が沈着するリスクの方が大きいと考えられる。

従って、取出し時の微生物汚染リスクは、その部位における気流方向との関わりあいの中で、作業員と移送対象物品の位置関係が大きな要素を占めると思われる。

（2） 移動時のリスク：

移動は、気流方向が異なる領域を無菌とした物品が通過することが一般的であろう。作業員から発散した微生物を含む気流が、移動している物品に流れないように位置関係を保つことが重要であるが、これはかなり不確定要素が存在する。作業員が手で物品を持って移動することは、移動物品と作業員の物理的な距離が近接するために汚染リスクが増大すると考えられるので、このような移動方法は避けるべきであると考えられる。すなわち、空中浮遊菌の沈着の確率が増大するのみならず、作業員の手あるいは作業着の一部が接触することに起因する表面付着菌の伝播のリスクも高くなるか