

A1.3 ユーティリティ

- 1) 電源の安定性を確保すること
- 2) 冷却装置の管理
- 3) オゾンガスなど処理装置
- 4) コバルトを水封する場合の水供給維持設備

A1.4 日常管理

- 1) 日常管理として被滅菌物にはC Iの反応チェック（全梱包）や照射測定フィルムなどを適宜検査し、照射が正しく全てに行われているかを管理する。照射測定機器は適切な校正プログラムを構築し実施する。照射量を測定する機器は3ヶ月から長くても1年以内に再校正を行う
- 2) 工程の中断などが行われた場合の処理記録
- 3) 被滅菌物の積載パターン、時間、照射量などの文書化と記録
- 4) 被滅菌物が仕様（梱包材含む）に基づくものから逸脱していないことの監視

A1.5 パラメトリックリリース（ドジメトリックリリース）

放射線滅菌を行った無菌医薬品を、運転パラメータ管理のみでのパラメトリックリリースすることは困難である。湿熱滅菌のように実質的にオーバーキルの許容安全に余力が得られる滅菌法とは違い、放射線滅菌の場合は個々の包装状態での単体滅菌作用となる、そのため対象滅菌物が、確実に目的の滅菌レベルに達することを保証する照射量を線量測定器やインジケータなどで測定し、その判定にてリリースを行うことが求められる。

A1.5.1 パラメトリックリリースの適用条件

放射滅菌でのパラメトリックリリース適用には、医薬品の分解など放射線での品質劣化は当然保証されるものとし、滅菌の適用条件として記載する。

- ① バリデーシヨンの確立：被対象物のバイオバーデンを把握できる手法が確立され、そのバイオバーデンの量および分布を把握し、滅菌照射量と包装（容器含む）などの状況が、 $SAL \leq 10^{-6}$ を個々の包装形態や滅菌工程単位毎（ダンボール1箱毎に一回照射など）に保証できること。
- ② バリデーシヨンで確立された照射量が得られていることの保証として、個々の被滅菌包装単位での、照射量を適切な管理単位で、線量測定機やインジケータによる照射量の測定と判定を行うこと
- ③ 被滅菌医薬品の無菌対象個体（薬液や容器など）が、一定のバイオバーデン範囲を保証すること

以上の3つが満足することによりパラメトリックリリースが可能と判断される。

A1.5.2 パラメトリックリリースの適用時の留意点

放射線滅菌における重要因子は、バイオバーデンの確認と滅菌線量の設定とその測定である。この内、線量は照射源のみならず、搬送装置の速度や制御システムなどにより変化するため、それらの安定的状態での運転されていることを常に留意する必要がある。また、梱包材質や容器などにより照射状態が変化するため、被滅菌物の包装形態の変化にも留意する必要がある。これらの変化が確実に捉えることが出来る標準操作手順書を作成し、遵守する必要がある。

また、照射設備や施設が医薬品製造設備と異なる製造所となる場合、照射会社への管理遵守も重要となる。

A1.5.3 微生物試験法

放射線滅菌では、その個々の非滅菌物のバイオバーデンが適切に管理制御され、かつバリデーションによる保証が十分確保できる照射状態であれば、抵抗性試験を必ずしも行わなくても良いと考えられるが、初期の段階および、照射工程や照射までの非滅菌物の保存条件によりバイオバーデンの管理制御がバリデートできない不安がある場合は、やはり微生物抵抗性試験などを用いることが有効である。

放射線滅菌における微生物の滅菌抵抗性を測定するには、被滅菌物に含まれるバイオバーデン検出菌を多数採取同定し、その菌を適切に $10^7 \sim 10^8$ cfu/mL に培養したものを被滅菌物とし、照射量を変え、D値を算出することが望ましいが、全てのバイオバーデンを同定することは困難である。よってバイオバーデン検出菌数種と放射線抵抗性が強いとされる菌を選定し、用いる放射線滅菌工程での滅菌抵抗性を評価する。放射線滅菌抵抗性の強い菌としては、リニアに残存数が減少（指数関数的）する菌ではなく、一定照射量を超えることでD値が変化する菌を選定する。また、菌は芽胞形成と非芽胞形成の2種類は最低評価すべきである。

A1.6 保守管理

- 1) コバルト 60 の放射源は日々減衰するものであり、そのライフサイクルを管理し、適切に交換しなければならない。
- 2) コンベアーなどの装置による移動速度、反転装置の稼働状態と被滅菌梱包の挙動を定期的にチェックする。
- 3) バイオバーデンを定期的に測定し、滅菌耐性の強い菌や負荷増加を適宜再バリデーションプログラムを構築し実施する
- 4) 外部の滅菌施設や企業に依頼を行っている場合は品質協定を設定し、適宜オーディットを行う。
- 5) 電子線滅菌ではチタン箔や劣化部品のメンテナンス計画を構築し実施する。
- 6) 安全性確認のため、漏れ線量や遮蔽設備（鉛板やコンクリート）の亀裂劣化などを定期的に確認する。

A1.7 職員

- 1) 放射線滅菌施設は作業者に害をおよぼす放射線を扱う施設であり、安全面の十分な教育を行う
- 2) 必要な有資格者を有すること

A 2. 高周波滅菌

高周波滅菌は、無菌医薬品の最終滅菌手段の一つである。高周波滅菌は、被滅菌物に高周波を照射することより発生する熱によって微生物を殺滅する方法である。高周波滅菌は高圧蒸気滅菌のように外部からの熱伝導による加熱ではなく、誘電体分子が高周波の照射を受けることによって互いに衝突、摩擦しあって熱を発生する内部加熱である。また、薬液の中に食塩などの電気伝導に寄与する電子やイオンをもった物質が混在している場合には、伝導電流による電力損失によっても発熱する。高周波による加熱は、高速加熱、高い熱効率及び高速応答性に優れ、高温短時間滅菌を連続処理できることが特徴である。一方、被滅菌物の性質（導電率、粘性など）をよく理解した上で使用しないと均一加熱が難しいため、滅菌条件の設定にあたっては注意が必要である。また、高周波滅菌の使用に当たっては、高周波の照射により加熱可能な液体又は水分含量の多い製品であり、加熱による内圧の上昇に耐えられる容器に充てんされていることが被滅菌物の条件となる。以上のように高周波滅菌の滅菌原理は熱によるものであり、滅菌工程の確立、パラメトリックリリースについては、高圧蒸気滅菌と同じ手法を取り入れる。本項では、高周波滅菌に特徴的な点について記載する。

A2.1 滅菌工程の確立（バリデーション）

高周波滅菌法の重要管理パラメーターとして、高周波出力、加熱時間（コンベアー速度）、被滅菌物温度、滅菌工程を支援するヒーター温度、冷却水温度等がある。バリデーションについては、高圧蒸気滅菌に従うが、真空に関する項目、蒸気および圧力に関しては除く。一方、高周波滅菌の場合、被滅菌物の液性によって温度プロフィールが異なるため製品のグルーピングによる評価は原則として適用できない。高周波滅菌法に特有のバリデーション項目は以下の通りである。

- ・ 設備据付時適格性評価に高周波発振装置の仕様と特性を含む。
- ・ 高周波以外の加熱方法を併用する場合は、その検証も含めトータルで考慮したバリデーション計画を立案し実施する。
- ・ 製品容器ごとに温度を測定、記録し滅菌の良否を判定し、あらかじめ設定した温度条件を満足できない場合は系外排出することを検証する。
- ・ 高周波の漏れがあらかじめ設定した基準内であることを確認する。

チャレンジ試験の方法については、11章1項に従うこと。

A2.2 滅菌装置

マグネトロンを高周波発振装置とする照射部に、被滅菌物を連続運搬式で密閉閉そくされた製品に高周波の暴露状態を作り、発生する熱により微生物を死滅させることで無菌保証レベルを達成するものである。ここで、被滅菌物は高周波を吸収し発熱するが、このとき被滅菌物の液性、容量、容器の材質や形状、温度をはじめ、実際の発熱には変動要因は多い。そのため、毎回同じ高周波出力で同じ温度が得られるわけではない。また、すべての変動要因をパラメータとして測定し温度制御することはきわめて困難である。したがって、滅菌機の仕様として、被滅菌物の温度を常時測定し、そのデータを高周波出力の制御装置にフィードバックすることによって出力制御することが必要である。また、被滅菌物に高周波では加熱できない部分があり、他の加熱方法を併用する場合は、採用する滅菌方法に応じて別途、重要パラメータを設定する。

A2.3 ユーティリティー

- 1) 通信用以外の目的で使用できる周波数であること。通例、 $2,450 \pm 50$ MHz である。
- 2) 高周波の使用に当たっては、事前に許可を得ておくこと。
- 3) 高周波滅菌において発生する電波漏洩については、人体や通信などに影響のない規定されたレベルにしなければならない。
- 4) 高周波の出力（変動する場合には、その最大、最小出力）を規定すること。
- 5) 装置の一貫性のある運転を確保するため、電力、圧縮空気、冷却水、加圧空気などのユーティリティーが安定して供給されること。

A2.4 日常管理

日常管理の基本原則、一般要件および方法については、3章および11章4項に従うこと。工程パラメータの達成を立証するためのデータとして、滅菌サイクル中の滅菌機の高周波出力、被滅菌物の温度、コンベアー速度、滅菌工程を支援するヒーター温度等を含むこと。

A2.5 パラメトリックリリース

A2.5.1 パラメトリックリリースの適用条件

原則として高圧蒸気滅菌の11章5項で示した要件に従うこと。

A2.5.2 パラメトリックリリースの適用時の留意点

パラメトリックリリース適用時の留意点に関しては、3章および11章5項で示した要件に従うこと。加えて、高周波滅菌工程に特有の事項としては、日常管理において、温度、高周波出力、コンベアー速度等、滅菌サイクルに影響を及ぼす重要パラメータを定め、そ

の許容変動幅を定め文書化すること。また、滅菌工程及び滅菌工程を支援するシステム（赤外線ヒーター、水等）の維持管理に関する記録を取り、管理すること。

A2.5.3 微生物試験法

原則として高圧蒸気滅菌の11章5項で示した試験法に従うこと。

A2.6 保守管理

日常的にモニターされる変動要因の中で、工程管理の定期照査として定期的に検証する項目の例として、高周波出力、コンベアーなどの装置による移動速度、滅菌工程を支援するヒーター温度等がある。メンテナンスとして、高周波を発振するマグネトロンは使用時間を記録、管理し、保守計画に反映する。また、安全性確認のため、高周波漏れ量や電磁波吸収パネルの劣化などを定期的に確認する。

A2.7 職員

人体が高周波を吸収した場合、滅菌の原理と同様に人体の組織の加熱による損傷とそれに伴う機能障害が起こるとされている。高周波滅菌については、高周波に関する知識を教育した上で作業に従事させること。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療技術研究事業）

分担研究報告書

偽陰性の発生を抑えたサンプリング方法の推計学的検討

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 高木達也 大阪大学大学院薬学研究科（微生物動態学）
岡本晃典 大阪大学大学院薬学研究科（微生物動態学）
山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）

研究要旨：医薬品の微生物試験においては、結果が得られるまでの迅速さとともに、検査の高い精度が保たれることが重要である。一般的に細菌検査においては、検体の一部を分取し、その結果をもとに全細菌数を推測する。したがって、細菌の検出においては、サンプリング方法から生じる偽陰性を抑えることが重要となる。

そこで、「検体となる医薬品を一定時間保管（培養）後、サンプリングを行い、菌が検出されるかどうか」を一回の試行とするシミュレーションを行い、偽陰性の発生を一定以下に抑えるために必要となる保管（培養）時間を算出した。その結果、一般的な菌（lag time：24時間、doubling time：1時間）の場合、約1.5～2日の保管（培養）時間を設ければ、99.99%以上の検出確率を保つ、つまり偽陰性が0.01%以下に抑えられると算出された。

A. 研究目的

医薬品などの微生物試験において、結果を得るまでの時間の短縮は重要であり、使用期限のある製剤などでは特に重要である。ただし細菌の検出にかかる時間と検出の確率は基本的に対の関係となっているため、検出に必要な時間を短縮することにより、検出の確率が低下する、つまり偽陰性が増えることとなる。一般に蛍光染色法による菌の直接計測は培養にかかる時間を短縮できるため、迅速な検出法として、環境微生物学分野では広く用いられている¹⁻⁴⁾。その一方でサンプリングの際には検体の一部を抽出しその結果から全菌数を推定するため、サンプリング方法は偽陰性の発生に影響す

る。したがって、偽陰性の発生確率を十分低く抑えたサンプリング方法を検討することが必要である。このような評価・検討に際しては、人為的な誤差などを考慮しない理想的な系における評価を行うことで、その結果をもとに、(人為的な)誤差の影響や試験法の条件による変動などを加味して検討することが可能となる。そこで本研究では、サンプリング手法により発生する偽陰性の確率と検出までの必要時間との関連を、サンプリング方法の条件に基づいたモンテカルロ・シミュレーション⁵⁻¹¹⁾を行うことで、推計学的に評価・検討することを目的とした。

今回のシミュレーションを理想的な系に

おける評価とするために、一回の計算の試行において、検体全量中に必ず菌が 1 cell 入っているものとして、また菌の特徴（分裂開始までの lag time と doubling time）、直接計測が可能となるために必要な菌数といったパラメータを固定し、検体からのサンプリングのみを確率的な事象とした。その上で、菌を検出可能な確率を 99.99% 以上に保持できる、つまり偽陰性の発生が 0.01% 以下に抑えられる試料の保管（培養）時間を、条件に応じて算出される理論値と乱数シミュレーション計算による計算値として得たので、以下報告する。

B. 研究方法

1) 使用したハードウェア

計算には、CPU に AMD Athlon 64X2 を用いた WindowsXP Home Edition マシン、ならびに大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターの共同利用計算機システム中の富士通 PRIMEPOWER1500、UNIX マシンを利用した。

2) 使用したソフトウェア

計算に使用したソフトウェアは、主に Fortran 言語によりプログラムを作成し、Fujitsu Fortran&C package に収録されている Fortran90 のコンパイラを使用し、計算を行った。その結果は MS Excel 2003 for Windows でグラフ化した。

3) アルゴリズム

医薬品を検体（全量 200 mL）とし、これを一定時間保管し、（菌が混入しているなら）菌を繁殖させる。その後一定量を

サンプリングし、菌の検出を直接計測により行い、製剤内に菌が入っていたかどうかを判定する（図 1）。本研究ではこの一連の操作を、乱数を利用したシミュレーションとして構築し、検体より菌が検出されたか否かを一回のシミュレーションの結果とした。この計算を、十分な回数反復させ、検体からの菌の検出確率を求めるモンテカルロ・シミュレーションを行った。

本研究でのシミュレーションにおいて確率事象とした箇所は、検体全量中での菌の分布を考慮したサンプリングである。その他、検体中に菌が入っていたのかどうか、菌の繁殖などは、確率事象としてではなく、固定的なパラメータとして取り扱い、計算を行った。各設定パラメータは以下の通りである。

・固定項目

- ① 検体の全量は 200 mL とする。
- ② 検体からのサンプリング量は 1, 5, 10 mL の 3 パターンとする。
- ③ 検体全量中には必ず菌が 1 cell が入っているものとする。
- ④ 菌の lag time (hr) は 6, 24, 50 の 3 パターンとする。
- ⑤ 菌の doubling time (hr) は 0.25, 1, 2.4 の 3 パターンとする。
- ⑥ 上記の lag time と doubling time はそれぞれを組み合わせ、9 パターンとする。

・変動項目

- ① 保管（培養）時間を変化させる。

- ② 検体中での保管（培養）後の菌の分布を考慮する（本研究では均一に散らばっているとす）。
- ③ 直接計測にて菌を検出するために必要な最低限度個数（閾値）として、10, 100, 1000, 10000 cells の4パターンを考慮する。

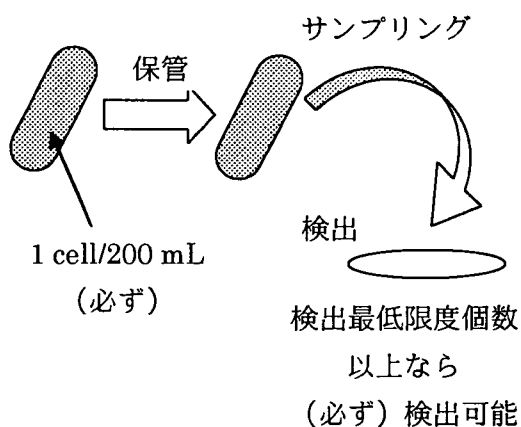


図1. 菌の計測手順の概略図

実際の計算では、以上の条件の下で、保管（培養）時間の変化に対し、菌の検出される（サンプル中に菌が検出の最低限度個数[閾値]以上存在する）確率を算出するものとした。

但し、当初は1 cellしか存在しないと設定しているため、また菌の特徴（lag time、doubling time）は全組合せのパターンを順次、固定して用いるため、計算過程に両者の値が変動することはない。したがって、lag time + doubling time × k (hr) の培養時間により菌数が当初の 2^k 倍となるのは、どの特徴の組み合わせパターンにおいても同一である。そこで doubling time を単位時間として、それが何単位進めばどれだけの確率になるかを

考えることとして、計算を行った。

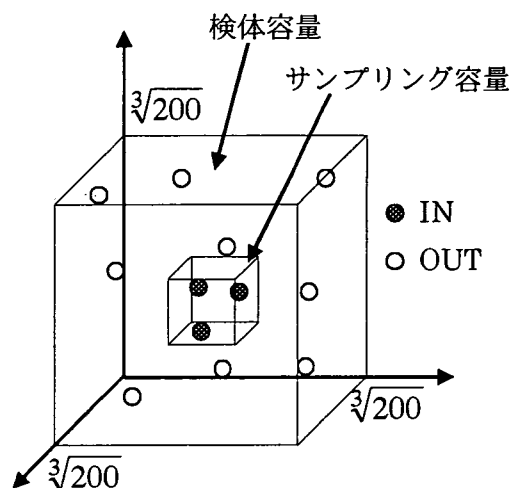


図2. サンプリングの乱数シミュレーションの模式図

＜確率事象の取り扱い—モンテカルロ・シミュレーション—＞

乱数シミュレーション（モンテカルロ・シミュレーション）を行う箇所は、前述のように検体からのサンプリングの段階とした。本研究では検体の全量中に均一に分布していることを前提とするため、検体の全量を 200 mL (200 cm³) の立方体と仮定し、サンプルも同様に、量にあう立方体でサンプリングするものとした。

計算の手順は以下の通りである（図2）。

- i. まず一様乱数により三次元座標を決めることでサンプリング位置を決定する。
- ii. 次に、シミュレーション中の時間に応じて検体内の全菌数を決定し、それらの位置をサンプリング位置と同様に一様乱数により決定する。
- iii. 最後に、サンプリング位置に入った

菌数が、検出の最低限度個数（閾値）以上かどうかにより、菌が検出されたかどうかを結果とする。

これら一連の操作を十分回、反復する。それら反復の中で検出された結果が占める割合が、保管（培養）時間に応じたサンプル中に菌が検出される確率として算出される。

今回は菌の検出確率として 99.99%、つまり偽陰性の発生確率として 0.01%を評価の基準としており、一万分の一回（0.0001）を評価することが必要となるため、999,999回（1,000,000回 - 1回）、試行を反復することとした。1回引くのは、反復計算の結果から区間の計算を行う際に、結果が区切り位置に相当することで、区間を（区切り+1）個にすることができ、切りのよい計算になるからである。

<確率事象の理論からの算出>

検体の中での菌の分布の状態が均一である場合、菌がサンプリングされるかどうかは一定の確率（サンプリング容量／

検体容量）に従うため、サンプリングされる菌数は、平均 np 、分散 npq の二項分布に従う。但し、検体中の全菌数を n 、サンプリングの確率を p 、 $q=1-p$ とする。二項分布に従うことから、0.01パーセントイル値の理論値の算出を行った。

C. 研究結果および考察

99.99%の検出確率、つまり 0.01%、一万分の一の検出エラー（偽陰性）を計るために、今回の反復回数はおよそ 1,000,000 回とし、 $1,000,000 \times 0.01 \times 0.01 = 100$ 回前後で偽陰性を評価できるようにした。その結果、偽陰性が 0.01%以下に抑えられるのは、菌の検出に必要な最低限度個数（閾値）が 10 cells と高感度の時、1 mL から順に 13, 11, 10 単位時間となった（表 1, 図 3）。5 および 10 mL の順にそれぞれ、10、9 単位時間において四捨五入した際には 0.01%以下を実現できるが、目的から考えると必ず 0.01%以下に抑えることが必要であると考え、それぞれ 11、10 単位時間とした（表 1）。理論

表 1. 理論値とモンテカルロ・シミュレーション（計算値）の結果
（閾値：10 cells）

時間	全菌数	1 mL		5 mL		10 mL	
		理論値	計算値	理論値	計算値	理論値	計算値
5	32	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
6	64	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00124	0.00121
7	128	0.00000	0.00000	0.00149	0.00155	0.10867	0.10857
8	256	0.00000	0.00000	0.11148	0.11128	0.82737	0.82748
9	512	0.00032	0.00033	0.82394	0.82344	0.99989	0.99988
10	1024	0.03601	0.03610	0.99987	0.99988	1.00000	1.00000
11	2048	0.57209	0.57197	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
12	4096	0.99629	0.99626	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000
13	8192	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000

値は勿論、実際のモンテカルロ・シミュレーションの結果である計算値においても、10、9 単位時間においては 99.99%以上の検出確率を確保すること、つまり 0.01%以下に偽陰性の発生確率を抑えることができていなかった (表 1)。

この結果に lag time および doubling time を合わせると、1 mL サンプルングの際は、最短 6 (lag time) + 0.25 (doubling time) × 13 (単位時間) = 9.25 (hr)、最長 50 + 2.4 × 13 = 81.2 (hr)となる。5 および 10mL の順に、最短 8.75(hr)、最長 76.4(hr)、および最短 8.5(hr)、最長 74(hr)となる。また一般的な菌 (lag time : 24 hr、doubling time : 1 hr) では、およそ 1 日半 (34 から 37 hr) の時間が必要であると算出された。他はそれぞれ表 2 に示す通りである。

菌の最低検出限度個数 (閾値) をそれぞれ変えた際の計算結果が表 3 である。またその結果を図示したものが図 4 のグラフとなる。

これらの結果より、以下のことが判った。

1. 菌のもつ特性 (lag time や doubling time) は、時間に配慮した上で偽陰性を一定以下に抑えるためには、非常に重要な要因である。
2. サンプルングの容量や菌検出に必要な菌数 (閾値) は、菌の特性に比較すると、偽陰性の発生に対し大きな影響を持たない。

以上のことから、lag time や doubling time といった特徴が既知である菌の検出において、偽陰性の発生する確率を十分に低くするために必要な時間は推測し易いと考えられる。さらに、菌検出に必要な菌数が大きく変化 (10~10,000) しても (測定手法の感度が大きく変化しても)、十分に偽陰性を抑えた検出を行う上で必要な時間としては大きな差にはならない可能性が示唆された。また、一般的な菌 (lag time : 24 hr、

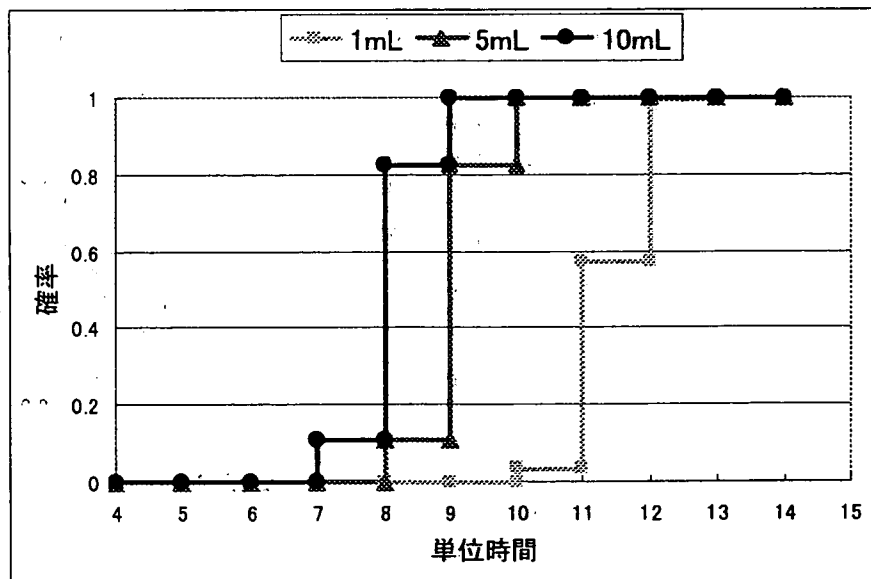


図 3. モンテカルロ・シミュレーションの結果 (検出限度個数 (閾値) : 10 cell の場合)

表 2. lag time および doubling time と計算結果に基づく必要時間数 (hr) (検出限度個数 (閾値) : 10 cell の場合)

lag time	doubling time	1 mL	5 mL	10 mL
6	0.25	9.25	8.75	8.50
	1	19.00	17.00	16.00
	2.4	37.20	32.40	30.00
24	0.25	27.25	26.75	26.50
	1	37.00	35.00	34.00
	2.4	55.20	50.40	48.00
50	0.25	53.25	52.75	52.50
	1	63.00	61.00	60.00
	2.4	81.20	76.40	74.00

表 3. 計算結果のまとめ

		検出最低限度値 (閾値)			
		10	100	1,000	10,000
必要な 単位時間*	1 mL	13	15	18	21
	5 mL	11	13	16	19
	10 mL	10	12	15	18
最短～ 最長時間 (hr)	1 mL	9.25~81.20	9.75~86.00	10.50~93.20	11.25~100.40
	5 mL	8.75~76.40	9.25~81.20	10.00~88.40	10.75~95.60
	10 mL	8.50~74.00	9.00~78.80	9.75~86.00	10.50~93.20
一般的な菌 (lag time : 24hr doubling time : 1hr)	1 mL	37	39	42	45
	5 mL	35	37	40	43
	10 mL	34	36	39	42

doubling time : 1 hr) であれば、2 日の保管 (培養) 時間を設けることができれば、偽陰性の発生を 0.01%以下に抑えることが可能となることがわかった。

D. 結 論

以下、今回の研究に関してまとめる。

1. 菌検出の閾値に応じて、一定確率 (99.99%) 以上の検出確率を保つため、つまり偽陰性の発生を一定 (0.01%) 以下に抑えるために必要となる時間を、モンテカルロ・シミュレーションにより評価する系を作成した。

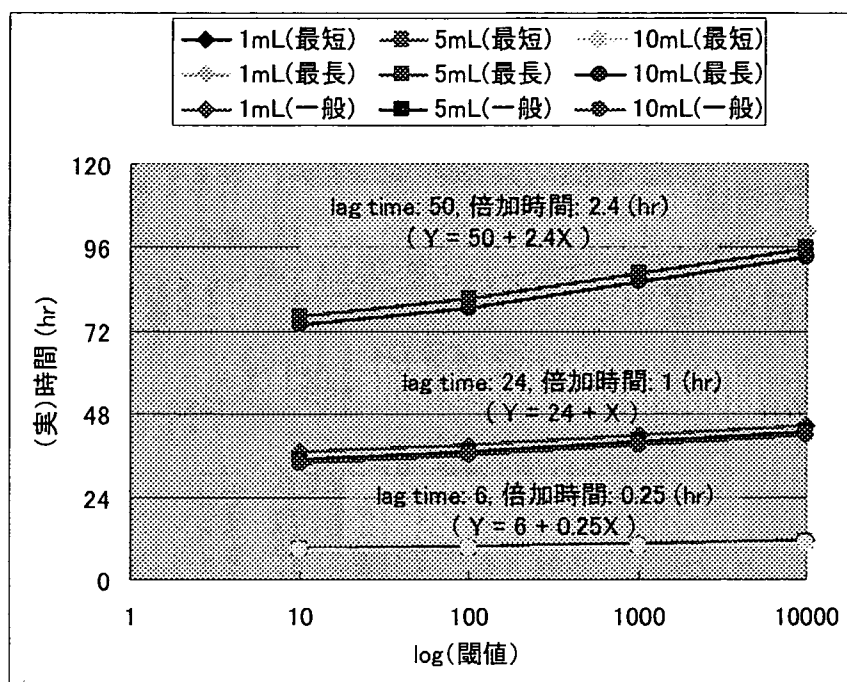


図 4. 計算結果 (最短、最長時間および一般的な菌) のグラフ

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、一般的な菌 (lag time : 24 hr, doubling time : 1 hr) の場合、約 2 日(34~45 時間)の保管(培養)時間を設ければ、偽陰性が 0.01% 以下に抑えられると算出された。

今回の系は条件にも挙げたように、菌の分布が均一に広がっているという、理論的に考慮し易い分布を持たせたシミュレーションを行い、理論と同等の結果を得た。検体中の菌の分布や人為的な誤差なども表現し、シミュレーションに組み込むことができれば、より実際に即した評価を行うことも可能となる。

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

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：昨年度の研究では、ヒトの介在による無菌性への影響の大きさは、物理的パラメータとして数値化することが極めて困難であるため、リスク評価を客観的に行えないという決定的な弱点を有していること、このヒトの介在の客観的評価が、無菌操作法により製造した医薬品のパラメトリックリリースを行う上での主要な課題の一つであることを明確にした。今年度の研究は、医薬品の無菌性に直接的な影響を与える「最重要区域 (SA 空間)」という概念を提示し、SA 空間は「Sterile/Aseptic」の何れか状態が必要条件であるという結論を導き出した。この概念は無菌製品全体に対して普遍化が可能であり、如何なる複雑な製造システムであっても、この SA 空間の構成要素が製品の無菌性 (Sterile/Aseptic) に影響を与えることが、今年度の研究を通じて明らかとなった。

この構成要素の無菌 (Sterile/Aseptic) 状態を客観的に評価出来る手法を開発すれば、無菌医薬品全体に対する論理的な無菌性の議論の展開が可能となると予想される。換言すれば、この概念は無菌操作法と最終滅菌法という2つに区分される製造方法を区分する概念上の壁を取り除くものであり、無菌操作法も最終滅菌法も、同一の評価軸上で評価出来ることを示唆している。

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

A. 研究目的

本研究は「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各無

菌製造工程におけるリスク評価をベースに無菌操作法で製造する医薬品へのPR適用の可能性を追求する。②凍結乾燥製剤(又は粉末製剤)にPR(パラメトリックリリース)を

適用することをモデルにPR要件を追及し、パラメータの設定、管理方法等についてまとめることである。これらの目的に対して、リスクに応じた柔軟性のある管理概念、実用性のある運営方法の提案を目指している。

B. 研究方法

本年度の研究は分担研究班で昨年度実施した「無菌操作法工程におけるリスク」に引き続き、今年度も7回の協力研究者会議での議論を通して得られた。

今年度の研究は、医薬品の無菌性に直接的な影響を与える「最重要区域(SA 区域)」という概念検討から始まった。その後の議論を経て、SA 区域は「Sterile/Aseptic」の何れか状態が必要条件であるという結論が導き出された。この概念は無菌製品全体に対して普遍化が可能である。すなわち、如何なる複雑な製造システムであっても、この SA 区域は最大でも3つの要素が製品の無菌性(Sterile/Aseptic)に影響を与えることが、今年度の研究を通じて明らかとなった。

- SA区域を限るバリアー(空力学的なバリアーを含む)内面の微生物学的状態(*)
- SA区域内の気体の微生物学的状態
- (無菌の)製品/半製品の気流方向の上流(気流の無い場合は、重力と反対方向)に存在する固体表面の微生物学的状態

(*:例えば下記の事例が挙げられる。;密封容器の内側、滅菌バックの内側、タンクの内面、アイソレータの内側、S/Aを囲む一方向気流。)

この3つの要素の無菌(Sterile/Aseptic)状態を客観的に評価出来る手法が開発されれば、無菌医薬品全体に対する論理的な無菌性の議論の展開が可能となると予想される。

換言すれば、この概念は無菌操作法と最終滅菌法という2つに区分される製造方法を区分する概念上の壁を取り除くものであり、無菌操作法も最終滅菌法も、同一の評価軸上で評価出来ることを示唆している。つまり、昨年提案した「最重要区域」の概念は、今年度の研究を通じて、同じ評価軸上で全ての無菌製品について、その無菌レベルの評価を行うことを可能とするツールとして有用なことが立証された。

なお、「最重要区域」概念の普遍化を行ったため、タンク、配管、アンプルあるいはバイアルの内部をも、その「最重要区域」の概念範囲に組み入れることとなった。そのため、タンク内や配管内を「区域」という用語を適用するのは不適切であり、この用語を「区域」から「空間」とのいう名称に改め、「最重要空間」(SA 空間あるいは Sterile/Aseptic Space)と定義することも検討中である。

無菌性保証は、単にその状態を論理性に検証するだけでは不十分である。そこで、無菌操作法での無菌医薬品の製造におけるヒトの介在に対する堅牢性という視点を組み込むため、ヒトの介在に対する堅牢性を定義し、前記の無菌レベルと組み合わせることにより、許容できる無菌性レベルを提案することとした。

また、この無菌性レベルを決定する手順は、客観的でなければならない。そこで、“Rule Book”なる補助概念を導入した。これは、無菌性評価にあたっての約束事を定めたものであり、このルールから導かれる結論を決定樹(Decision Tree)の形で提案した。以上より、今回研究した状態分析手法を「無菌性状態分析(Sterile/Aseptic Status Analysis;SA 状態分析法)」と仮称している。

SA 状態分析法は、ある製造技術間の優劣比較、異なった製造ラインの無菌リスク評価ある製造方法が論理的に到達できる無菌

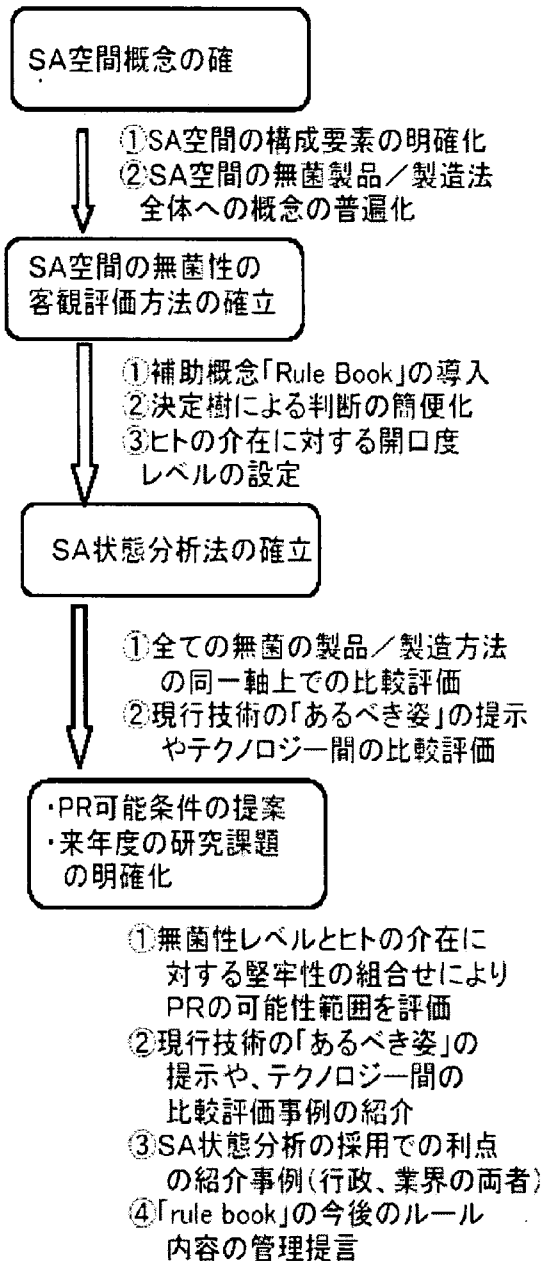


図1 今年度の研究の概要

性レベルの決定など、幅広い応用が期待される。

このSA状態分析法は無菌性の状態を客観的に評価し、それをランク付け(R-0から

R-4の5段階評価)する手法であるが、実際の無菌の製品の製造では、時間的な広がりを持っており、その全体にわたって無菌性が保持されていなければならない。そこで、この無菌性の状態保持の堅牢性に対して、物理的障壁の状態評価という概念を採用した。具体的にはヒトの介在に対する堅牢性を考え、SA空間を囲む境界面の開口度合い(A-0～A-4の5段階)で評価を行うものである。この無菌性のランクと開口度の組合せを検討して、ある組合せ以上は、無菌製品の高い無菌性が担保されていると評価する手法を開発中である。

以上の今年度研究の概要を図1に示す。なお、無菌操作法製品の「パラメトリック」「パラメトリックリリース」との名称は、それが適切であるか否かは、次年度の検討課題である。

C. 研究経過

C-1 研究経緯の概要

本年度の研究は7回の協力研究者会議での問題提起と議論を繰り返すことによって実施された。

第1回会議(2007年8月7日)は、昨年の研究成果の再確認および、今年度の研究の方向性について議論を行った。しかし、無菌操作法により製造した医薬品をどの様な基準でパラメトリックリリースを行えるかについては、結論は出なかった。

第2回会議(9月13日)では、アイソレータグループ(ヒトの介在しない無菌製造技術の無菌性評価に関する研究)との意見交流を行った。この時点では今年度の研究の方向性が見えず、同グループの方々よりかなり厳

しいご意見を戴いた。その後の会合でも無菌操作法による無菌製品の無菌性を客観的に評価する良いアイデアが得られずに、議論は壁に突き当たった状態であった。

議論の大きな進展を見たのは第4回会合(11月20日)であった。この会合では「最重要区域(空間)は常に“sterile”か“aseptic”の何れかの状態でなければならない」という点が明確となった。それに加えて「最重要区域(空間)は、最大でも3つの要素により構成され、その要素の無菌的な状態を評価することで無菌製品の無菌性レベルが決定出来る」ことが、明らかにされた。この概念の導入は、全ての無菌製品/全ての工程(容器内を含む)を、同じ尺度を用いて評価することを可能にするものであった。

この概念は、その後の会合でブラッシュアップが行われた。第5回会合(12月18日)では、評価尺度の客観性を高める方法として決定樹(Decision Tree)が導入された。しかし、それでもなお決定樹の幾つかのノード(node)は、その選択肢の決定に際して議論が生じることがあり、主観的要素がまだかなり残っていることが推測された。これを防ぐために、各ノード(node)に補助説明を加えることが提案された。この補助説明は、後日の“Rule Book”の補助概念の基となった。

第6回会合(2008年1月15日)および第7回会合で、最重要空間に関する議論が深められた。「全てのことに対して科学的論拠を与えることは困難である」であるため、評価対象に対して「それが適正に管理されていることを前提として、一定の無菌性レベルを与えるものである」という「約束事」を設定すること

とした。この様な「約束事」を“Rule Book”として整備することで、無菌性レベルを判断することに極めて高い客観性を与えることが可能となった。すなわち、この“Rule Book”の記載事項を基にした決定樹の作成は、極めて論理的な意思決定(Decision-making)を可能にすると考えられる。“Rule Book”に記載するルールは、その時代において普遍化した技術的常識を付け加えることにより、あるいは普遍化した技術的常識に基づきルールを改定することにより、当該分析方法の陳腐化を避けることが出来る。

最重要空間についての最終的議論は、第7回会合(2008年2月19日)で行われ、これまでの議論の内容の整理が行われた。

C-2 昨年度研究成果の確認(本年度研究の位置付けを明確にするために)

1. 現状無菌操作法の評価

無菌操作法による無菌医薬品の製造を無菌の視点から整理すると次の基本機能から構成されている。

- 使用する設備・直接容器を滅菌し、
- 使用する薬物を無菌化、または既に無菌化した薬物を使用し、
- 無菌的に充填・密封する。
- そして、上記操作中、無菌状態を維持する。

これらの基本機能のうち、滅菌操作やろ過による無菌化(ろ過滅菌)は確立された技術であり、その操作対象物の無菌性保証は操作上のパラメータ管理で実施可能と判断される。

「無菌的に」および「無菌状態の維持」は図2に示すように3つのシステムから構成されており、これに凍結乾燥機を加えた4システムが評価の対象となり、その結果は以下のよう
にまとめることができた。

(1) 空気供給システム

ここでは、無菌操作法での無菌性を確保するために、重要区域にHEPAフィルタを介して空気を提供するシステムを「空気供給システム」と称している。空気供給システムは、単に空調機及びダクト、HEPAフィルタ等の設備構成(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。

<無菌性確保のための基本要件>

空気供給システムにおける無菌性確保の基本要件は以下の4点である。

- ① 清浄空気(無菌空気)の供給
温湿度を調整され、また、良好で健全に設置されたHEPAフィルタ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

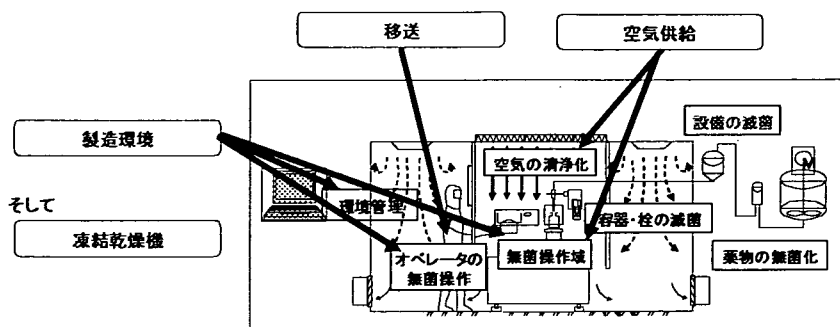


図2. 無菌操作法評価の検討対象絞込み

重要区域と隣接区域の境界に於いては、隣接区域から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。

<評価結果>

上述基本要件の中でのポイントとなるのは、HEPA フィルタを介した空気の無菌性に関する評価であるが、HEPA フィルタが有する大きな負荷対応の捕集能力を損なわない管理実施が無菌性確保の評価につながると言える。つまり一次側空気の負荷低減、温度、湿度、水分活性等の管理とHEPAろ材、取り付け状態の健全性確保である。

<評価のまとめ>

以上より、重要区域に無菌空気を供給するシステムは、実際に必要であろう微粒子(および微生物)の捕集能力よりも大きな能力を持っている。しかし、それが作り出す環境のモニタリングには限界があるため、無菌性の直接評価は困難であるが、構成要因の間接的評価の組み合わせ評価(防護性能の確実性評価)は、可能と言える。

(2) 製造環境システム

無菌操作法での無菌性を確保するために、対象となる薬物、薬物と直接接触する容器および機器表面が暴露する環境を製造環境システムと称している。

<無菌性確保のための基本要件>

製造環境システムにおける無菌性確保の基本要件は以下の2点である。

① 作業環境管理

重要区域及び直接支援区域に対しては十分な管理が重要であるが、製造環境に関するリスク分析に当たって、「重要区域」とは別に新しい管理区域概念が必要となる。

② 作業員管理

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。

<評価結果>

上述基本要件の中でポイントとなるのは、従来の「重要区域」とは別に新しい管理区域概念を設定することである。これを『最重要区域』と称して、以下のように定義する。『最重要区域とは、製造環境に暴露された「薬物と直接接触する容器面」及び「薬物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区域。本区域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。また、この最重要区域は構成設備、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く、各作業特性に応じて適切に決定される必要がある。』

<評価のまとめ>

以上より、製造環境における無菌性の確保

は、作業環境の管理と作業員の管理の2点が重要管理ポイントである。作業環境の管理においては製品の無菌性を直接支配する『最重要区域』と称する新しい管理区域概念が有効である。また、最大汚染源である作業員に関しては、更衣を含めた作業員の最重要区域へのアクセスや動作をSOPで定める必要がある。ただし、作業員の行動結果を含む防御性能の担保方法が課題である。

(3) 移送システム

無菌操作法での無菌性を確保するための、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(モジュールとは、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している)から、次ぎのモジュールに移動する過程を「移送システム」と称している。

<無菌性確保のための基本要件>

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図3に示すように次のステップから構成される。

- ・ 取り出し: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
- ・ 移動:取出した物品を、次ぎのモジュールに移動するステップ
- ・ 取り付け:移動した物品を次ぎのモジュールにインプットするステップ

<評価結果>

移送における無菌性に関するリスクは、構成されるハードウェア(モジュール構成)に大きく依存する。つまり、各ステップにて発生する作業そのものが新たに提案している新

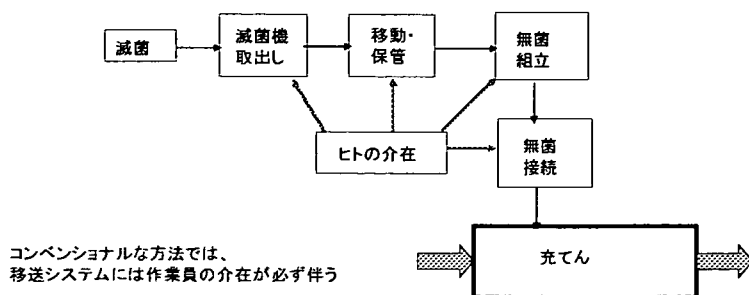


図3. 移送システムの構成

<無菌性確保のための基本要件>

ここでは、自動化された入出庫システムを持つ凍結乾燥システムでのリスクを検討した。手動による入出庫作業のリスクは、製造環境システムの検討、移

管理区域概念である『最重要区域』での作業となる。つまり、移送システムでのポイントは対象モジュール構成毎での『最重要区域』での作業員が関わる作業の管理方法と言える。

<評価のまとめ>

以上より、無菌操作法において、取り出し→移送→取り付けというパターン化された操作が必要であるが、この操作に伴って新規管理区域概念である『最重要区域』が移動し、各操作ステップに作業員の介在が伴う。作業者の行動が予め設定された範囲内(無菌性を危うくしない行動様式)に収まっていることを評価・担保する方法が存在すれば、防護性能の保証につながるといえる。

(4)凍結乾燥システム

本研究は凍結乾燥製剤をモデルに検討を進めているため、凍結乾燥システムそのものの検討も必要であり、凍結乾燥工程(CIP/SIP、ローディング、凍結乾燥(凍結、一次乾燥、二次乾燥、復圧、打栓)、アンローディング、巻き締め)における各操作を凍結乾燥システムと称して、無菌性の確保(無菌性の確保で重要なリーク、復圧、逆流)の観点でリスク分析を行った。

送システムの検討と同様だからである。そのため、自動化された凍結乾燥システムにおける一連の工程の内、真空時のリーク、復圧時の微生物の巻き上げ、逆流によるシステムの汚染に対する検討が無菌性確保のための基本要因に絞られる。

<評価結果>

真空時のリーク量と製品への汚染との相関を規定することは出来ないが、今までの実績より、リーク量の管理値を決め、定期的に管理・モニタリングすることにより凍結乾燥工程の無菌保持ができると推定される。

また、リーク口から進入した塵埃(微生物の媒体)は、真空下では空気による浮力がないため直ちに落下する。従って、微生物が半打栓した容器に直接進入する確率は極めて少ないと言える。また、落下した塵埃(微生物の媒体)が復圧時に巻き上がらないように、復圧制御することも可能である。

逆流については、真空ポンプライン、ドレンラインからの逆流が想定される。真空ポンプラインからは適切な運転操作の実施。ドレンラインからはリーク量を管理する事で汚染のリスクを少なくする事が可能である。