

200838006 A

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

新しい無菌医薬品製造技術の
無菌性評価に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者
棚元 憲一

平成 21 (2009) 年 4 月

新しい無菌医薬品製造技術の無菌性評価に関する研究

平成20年度 研究組織

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

研究分担者

佐々木次雄	医薬品医療機器総合機構	品質管理部	GMP エキスパート
那須 正夫	大阪大学大学院	薬学研究科	教授
渡辺恵市郎	日揮株式会社	産業プロジェクト統轄本部	技術理事・副本部長
小久保 護	澁谷工業株式会社	微生物制御技術部	部長
曲田 純二	日本ミリポア株式会社	バイオプロセス事業本部	次長

研究協力者

馬場 貴志	大阪大学大学院薬学研究科 (衛生化学)
山口 進康	大阪大学大学院薬学研究科 (衛生化学)
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	東和薬品株式会社
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	レターレアソシエイツ合同会社
上野 誠二	中外製薬株式会社
片山 博仁	アステラス製薬株式会社
河田 正人	財団法人 阪大微生物病研究会 観音寺研究所
川崎 康司	株式会社 エアレックス
北 智仁	中外製薬株式会社
小牧 正人	ニプロファーマ株式会社
佐々木 裕子	国立感染症研究所
鈴木 正彦	第一三共株式会社
須藤 浩孝	アステラス製薬株式会社
竹内 正人	第一三共株式会社
出口 統也	澁谷工業株式会社
平井 武徳	財団法人 化学及血清療法研究所
三根 朗彦	財団法人 化学及血清療法研究所

目 次

I	総括研究報告	
	新しい無菌医薬品製造技術の無菌性評価に関する研究	1
	棚元憲一	
II	分担研究報告	
	1. 日本における最新無菌操作法技術の海外紹介	11
	佐々木次雄	
	2. RO水製造システムにおける細菌の動態	33
	那須正夫	
	3. 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	41
	渡辺恵市郎	
	4. 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	83
	小久保護	
	5. 無菌医薬品製造ガイドラインのフォローアップ研究	93
	曲田純二	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	149

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等規制・エッセンス総合研究事業）
総括研究報告書

新しい無菌医薬品製造技術の無菌性評価に関する研究

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長

研究要旨：ISO TC198/WG9に参加し、ヘルスケア製品の無菌操作法の最終国際規格案の作成に係わった。この成果は当研究班で作成した無菌操作法の指針の見直し作業にも反映されることになる。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では、無菌医薬品製造方法に拘わらず、高い客観性を持ち、同じ評価軸上で評価できるSA状態分析法を開発し、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を提案した。アイソレータの無菌性維持に関する潜在的なリスク対策を検討し、客観的に評価できないいくつかのリスクについて「推奨される対応」等を採用することにより、 10^{-6} に限りなく近い無菌保証レベルが維持できることを示した。また、日本における最新の無菌操作法技術を紹介した。RO水製造システムにおける細菌の動態解析として、蛍光活性化染色法およびマイクロコロニー法による細菌数の変化の迅速モニタリング、PCR-DGGE法による細菌群集構造の変化および優占種の推定、さらにはSEM-ISH法によるバイオフィリングを起こす細菌の可視化により、RO水製造システムの適切な維持管理が可能となることを示した。

研究分担者

佐々木次雄 医薬品医療機器総合機構
品質管理部 GMPエキスパート
那須正夫 大阪大学大学院薬学研究科
衛生化学・教授
曲田純二 日本ミリポア株式会社
プロセス事業本部次長
小久保 護 澁谷工業株式会社
微生物制御技術部長
渡辺恵市郎 日揮株式会社産業プロジェクト統括本部技術理事

求められている。

わが国においても平成17年度の改正薬事法の全面施行に合わせて改正された省令GMPにおいても無菌性に関する要求事項が一段と多くなった。平成15-17年度の当厚労科学研究班活動として、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」と「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」の二つの指針を作成した。無菌操作法指針は、FDAガイドライン（2004年）、EU-GMP、WHO-GMP、ISO 13408 シリーズ内容を吟味の上、国際的に許容される要求事項を提示したもので、監視指導・麻薬対策課が発行する「医薬品GMP解説事例集」の中におさめられた。本研究では、1）作成した2つの指針のフォローアップ研究、2）ヒトの介在しない無

A. 研究目的

国内外とも無菌医薬品の製造に関しては一段と厳しいバリデーションと日常管理が

菌製造技術の無菌性評価に関する研究、3) 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適用に関する研究、4) 超ろ過法で製造する製薬用水の膜 (RO/UF 膜) の微生物学的堅牢性を保証するための微生物の迅速モニタリングシステムの開発や微生物の迅速計測法の日局導入に関する研究を展開する。

B. 研究方法

無菌医薬品製造に関する2つの指針のフォローアップ研究では、ヘルスケア製品の無菌操作法の作成作業班である ISO TC198/WG9 の国際会議や E-mail を通じた意見交換により、ドイツ、アメリカ、フランス、イギリス、カナダなどのメンバーと同国際規格を作成した。メンバーは主に製薬会社、エンジニアリング会社、公的機関から構成された。

PR の適用に向けての研究班では、研究分担者と過去 2 年間と同じ研究協力者メンバー 8 名が 8 回開催した研究協力者会議での問題提起と議論を繰り返すことによって研究を進めた。議論は、現状無菌操作法の評価対象として絞り込んだ新しい管理概念である『最重要区域』の構成要素について検討し、最重要区域を構成する構造設備を中心とした静的な特性を評価する方法として、無菌性の達成状態を評価する状態評価と最重要区域を限る境界 (バリアー) の外乱に対する堅牢性を評価する堅牢性評価によって対象物質の無菌性保持レベルを評価する SA 状態分析法について検討した。

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では、アイソレータ方式を採用した場合、製造される医薬品の無菌

性に直接影響を及ぼすアイソレータ内部の無菌性が、いかなる場合に損なわれるのかについて調査・検討した。また、アイソレータ内部の除染が正しく行なわれるかどうかについてのリスク評価についても検討した。評価の結果リスクが高いと評価された項目について、推奨される対応策についての検討を実施し、対応後の影響度、発生頻度及びリスク優先度について再評価を行った。

日本で誕生した新しい無菌操作技術として、凍結乾燥無菌バルクの製造、アンブル製剤に対する凍結乾燥装置と異物検出機を紹介する。

水質の低下が見られた RO 水製造システムにおいて、原水、マイクロフィルターろ過後の水、RO 供給水、RO 濃縮水および RO 水を採取した。これらの水試料について、蛍光活性染色法、マイクロコロニー法、平板培養法により全細菌数、エステラーゼ活性をもつ細菌数、マイクロコロニー形成細菌数およびコロニー形成細菌数を測定し、RO 水製造過程における細菌数の変化を明らかにした。また 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE 法により、RO 水製造過程における細菌群集構造の変化を見た。優占種の推定にあたっては、DGGE ゲルから特徴的なバンドを切り出し、そのシーケンスを解析することにより、細菌種を決定した。さらに、遺伝子情報をもとに特定細菌を検出できる ISH 法と、高倍率で固体表面を観察できる SEM を併用した Scanning Electron Microscopic-in situ hybridization (SEM-ISH) 法を用いて、RO 膜上の細菌を可視化した。

C. 研究経過

無菌操作法による無菌医薬品の製造ガイドライン関連として、2008年1月までに、日本を含めたISO TC198/WG9を中心にヘルスケア製品の無菌操作法の最終国際規格案が作成され、日米欧29カ国で承認された。その後2008年6月の同国際会議でその最終国際規格案の精査が日本を含めた主要メンバーで実施され、同年7月に国際規格として29カ国に発効された。その内容は各国の指針や薬局方に影響を及ぼすものと思われる。

パラメトリックリリースの適用に向けての研究においては、新しい管理概念である『最重要区域』の構成要素のうち、構成する構造設備を中心とした静的な特性を評価する方法として、無菌性の達成状態を評価する状態評価と最重要区域を限る境界(バリアー)の外乱に対する堅牢性を評価する堅牢性評価によって対象物質の無菌性保持レベルを評価するSA状態分析法を検討した。

状態評価は4つにランク分け、堅牢性評価も5つにランク分けし、その評価結果を2つの要素が構成する平面(マトリックス)上に、最重要区域の位置付けを行うSA状態分析法のマッピング法を提案し、大きく3つの領域(SA-1、SA-2、SA-3)に分けることを提案した。この提案するマッピング法を、無菌製剤の製造工程に適用した結果、全ての操作を分類、説明できることが判明し、提案するSA状態分析法の有用性を明確にするとともに、実際の適用事例を示した。その結果、評価する工程の大きさを適切に設定することにより、製造所(製造ライン)の評価、バリデーション・工程管理試験の実施根拠、プロセス改善(優先付けおよび改善効果の比較)、変更管

理時の影響評価、工程逸脱発生時の調査等の用途に対応することが出来ることを事例を示しながら、紹介した。

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においては、第1回目の班会議ではそれぞれの使用経験からどのようなリスクが存在するのか、あるいはアイソレータ設備について査察を受けた企業から査察時の指摘事項からどのようなことがリスクと考えられているかについて報告を受け、リスクについての基本的な考え方を一致させた。その後、研究協力者は分担された項目についてリスクを抽出・評価を行い、併せてリスクを低減させる対応を検討して、対応後のリスク評価も行なった。第2回目の会議ではそれぞれが、分担したクリティカルポイントのリスク評価結果を発表し、分析内容について討議を行なった。その結果、メーカーによって除染方式が異なる過酸化水素除染については、各社のパラメータを考慮したものについて行なうことになった。また、発生頻度のランキングはどうしても個人の判断となってしまうため、判定基準を定めた。第3回目の班会議ではPR研究班の研究協力者が参加し、重要空間について人が介在しなければ、除染レベルは別としてアイソレータとコンベンショナルクリーンルームで違いは無いと考えて検討を進めているとの報告を受けた。この報告を受け、アイソレータのリスク評価について再度ディスカッションを行って評価表を完成したが、過酸化水素除染の評価項目については再度協議して整理することとした。

RO 水製造システムにおける細菌の動態に関する研究：今回対象とした RO 水製造

システムで原水として用いられているのは、高度処理された排水であるため、全細菌数が 10^7 cells/ml と高かった。またマイクロフィルターろ過後の水および RO 供給水に比べて、RO 濃縮水中の細菌数は高い傾向にあった。RO 水には、ほとんど細菌が検出されなかった。このように、全細菌数ならびに生理活性をもつ細菌数が、ろ過や UV 処理によって大きく変化していることがわかった。PCR-DGGE 法を用いて RO 水製造システムにおける細菌群集構造の変化を解析した結果、処理工程が進むにつれて優占種が一般的な水環境中に広く生息する β -proteobacteria や有機物の多い環境に生息する γ -proteobacteria から、貧栄養環境に生息する α -proteobacteria へと変化していることが明らかとなった。SEM-ISH 法による RO 膜表面の観察の結果、二次電子像と反射電子像を重ねることにより、遺伝子を標的として細菌を可視化し検出できた。

D. 考察

わが国製薬業界の過去 30 年間の変貌は目を見張るものがある。GMP や Validation の考えは欧米から導入したシステムではあるが、今では欧米諸国と遜色のないものになっている。1990 年代からは ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) メンバ一国として、新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の品質・有効性・安全性にかかわるデータ収集などについてガイドライン作成に貢献してきた。また、PDG (Pharmaceutical Discussion Group) メンバ一として薬局方

の国際調和にも貢献してきた。外資系製薬企業の日本進出や日本の製薬企業との合併等により、無菌操作法に関わる技術においても欧米の製薬企業と遜色のないレベル、又はそれらを上回るレベルに達している。

ヘルスケア製品の無菌操作法の最終国際規格案の特徴は、無菌操作法による無菌医薬品の製造時に、必要とされる重要要件を整理されたところにある。必要とされるドキュメンテーションも網羅されている。また、ICHQ9 も鑑みたリスクマネジメントにも言及し、具体的なリスク事例とその対処方法の事例も示され、新規に製造ラインを構築する際、また既存ラインのリスクマネジメントには非常に有用な情報と言える。

PR の適用に関する研究では、提案する「SA 状態分析法」は、対象とする無菌の物品の置かれている重要区域の無菌性のリスクを、構造設備面から評価する手法であり、HACCP や FMEA などの従来のリスク分析手法で評価しにくい構造設備面について、その考察を可能にするものである。換言すれば従来のリスク分析とこの SA 状態分析を組み合わせることで、無菌製品の無菌性リスクをより正確に評価できる。当該 SA 状態分析法の優れた特性は 2 つある。一つは高い客観性であり、いま一つは最終滅菌法か無菌操作法かと言った無菌医薬品製造方法の違いを乗り越えて、同じ評価軸上に対象となる製造方法の位置付けが可能なことである。これらの特性により、行政当局および品質保証部門に寄与する製造設備の無菌性リスクの事前評価を可能とし、高い客観性から派生する第三者への説得力(「見える化」)による簡単な評価を可能とし、そして新技術や新規設備の評価も可能であると考えている。

アイソレータにおいて、予め定められたレベルまで除染できない要因として除染時の負荷の増加があげられる。ほとんどの要因は対応処置によってリスク優先度(RPR)がLとなったが、グローブやハーフスーツの皺については、客観的に判定できる検出方法がないため、Mのままであった。しかし、除染時にグローブを一定形状にホールドするための治具の使用や皺になりやすい部分のアルコールで消毒等により、除染が不十分となることを防止できる。除染時の気密性に関して、グローブのピンホールからのリークが懸念されるが、ピンホール程度のリークが除染に及ぼす影響はほとんどないと考えた。製造作業中にアイソレータ内部の無菌性を損なう可能性のあるトラブルとしては、ハーフスーツ動作、グローブ操作及びその他オペレーターのマニュアル操作に伴う気流方向の乱れが指摘された。現状で気流を検出する適切な方法がないためRPRはMとなったが、アイソレータの内部は一定のレベルまで除染されていることから、実質的に製造環境の汚染、製品汚染の原因とはならないものと考えた。また、試験を実施することによる汚染の可能性や製造プロセス中にグローブ操作を伴っている場合にはグローブの破損というリスクが常に存在する。現在の技術では小さなピンホールを検出することができないがダブルグローブで作業を行なうことでほぼ汚染を回避できると考えられる。

RO水の製造工程において、タンク貯留により細菌数が増加していたことから、タンクにおける微生物管理の重要性が示された。RO水製造過程に見られた細菌群集構造の変化は、様々な処理により水に含まれる有

機物等が除去され、それにより細菌数や活性、優占種が変化したことによるものと考えられる。SEM-ISH法で得られた結果をもとに、RO膜上の細菌数を算出すると、 $10^6 \sim 10^7$ cells/cm²の細菌が存在することになる。RO膜を利用した水処理システム内は貧栄養な水環境であるが、多くの細菌がRO膜上に濃縮され、付着していると考えられる。SEM-ISH法は細菌だけでなく、膜などの表面構造を詳細に観察できることから、水処理システム内の細菌モニタリングに応用することにより、システム内のどこに細菌が付着しやすいのか、あるいは増殖しやすいのかを明らかにすることができると考えられ、システムの衛生微生物学的な管理に大きく貢献できると考えられる。今後、様々な施設においてこれらの手法を用いた解析を行うことにより、RO水製造工程における安全管理が可能となり、より安心・安全な医薬品製造用水を確保することができるものと考えられる。

E. 結論

今年度は以下の成果を得た。

- 1) 日本において2006年に作成された無菌操作法の指針については、今回の研究成果を含めて今後見直し作業が行われるものと思われる。この国際規格や2008年2月に発効されたEU GMP Annex1はその改定作業時には有用な情報である。
- 2) 高い客観性を持ち、無菌医薬品製造方法の違いを乗り越えて同じ評価軸上で評価できるSA状態分析法を開発することが出来、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を提案出来た。
- 3) アイソレータの無菌性維持に関する

潜在的なリスクに対する対応策を検討した。その結果、グローブブリークあるいは気流の乱れに関する検出方法が確立されていないなど、客観的に評価できないいくつかの項目が残ったため、 10^{-6} の無菌保証レベルが維持できることを証明するには至らなかった。しかし、それぞれのリスクについて示した「推奨される対応」等を採用することにより、 10^{-6} に限りなく近い無菌保証レベルが維持できるものと考えた。

4) 日本における最新の無菌操作法技術を紹介した。

5) RO水製造システムにおける細菌の動態解析にあたっては、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法により細菌数の変化の迅速モニタリングが可能であり、PCR-DGGE法により細菌群集構造の変化および優占種の推定が可能である。また、バイオフィアリングを起こす細菌の可視化には、SEM-ISH法が有効である。これらの方法を活用することにより、RO水製造システムの適切な維持管理が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M. & Tanamoto K. Differential involvement of TRAF6 in MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. *J. Leukocyte Biol.* 83, 702-707, 2008
- 2) Sugimoto N, Tada A, Kuroyanagi M, Yoneda Y, Yun YS, Kunugi A, Sato K, Yamazaki T, Tanamoto K. Survey of

synthetic disinfectants in grapefruit seed extract and its compounded products. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 49, 56-62, 2008

- 3) Hatao F, Yamamoto M., Muroi M., Kaminishi M. & Tanamoto K. MyD88-induced downregulation of IRAK-4 and its structural requirements. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 260-264, 2008
- 4) Kikuchi Y, Kakeya T, Nakajima O, Sakai A, Ikeda K, Yamaguchi N, Yamazaki T, Tanamoto KI, Matsuda H, Sawada JI, Takatori K. Hypoxia induces expression of a GPI-anchorless splice variant of the prion protein. *FEBS J.* 275, 2965-2976, 2008
- 5) Kawamura Y, Yamaguchi M, Mutsuga M, Sonobe H, Miyamoto S, Tanamoto K. : Analysis of antimony and lead in peptereares. *JJFC*, 15, 1-5, 2008.
- 6) Mutsuga M, Kawamura Y, Tanamoto K. : Semicarbazide in the sealing gasket of bottled food. *JJFC.* 15, 23-27, 2008.
- 7) 棚元憲一、室井正志、中川恭好、島圭介、市村克彦：日本薬局法指定菌株の特性と保存管理法に関する研究、医薬品研究、39, 309-312, 2008
- 8) Mutsuga M, Kawamura Y. & Tanamoto K. Migration of lactic acid, lactide and oligomers from polylactide. *Food Addit Contam.* 27, 1-8, 2008
- 9) Sugiyama K., Muroi M. & Tanamoto K. A novel TLR4-binding peptide that inhibits LPS-induced activation of

- NF-kappaB and in vivo toxicity. Eur. J Pharmacol. 594, 152-156, 2008.
- 10) Mutsuga M, Yamaguchi M, Kawamura Y, Tanamoto K : Study on semicarbazide in the glass bottled foods JJFC.15, 67-72, 2008.
- 11) Tatebe C., Kawasaki H., Sugimoto N., Sato K. & Tanamoto K. Quantitative analysis of polysorbates using liquid chromatography-mass spectrometry. Lpn. J. Food Chem. 15, 129-134, 2008
- 12) Kawasaki H., Tatebe C., Takagi S., Kawasaki Y., Hara T., Iizuka T., Sugimoto N., Sato K. & Tanamoto K. Analysis of polysorbates in foods. Jpn. J. Food Chem. 15, 122-128, 2008
- 13) Kubota T., Matsuoka M., Chang T-H., Tailor P., Sasaki T., Tashiro M., Kato A., and Ozato K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type I infection gene expression. J. Biol. Chem., 37: 2560-2570, 2008.
- 14) Kenri T., Okazaki N., Yamazaki T., Narita M., Izumikawa K., Matsuoka M., Suzuki S., Horino A., and Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. J. Med. Microbiology, 57:469-475, 2008.
- 15) Kimura N., Someya T., Yamagiwa Y., Kokubo M., and Sasaki T. Japanese Perspective on Biological Indicators. Biological Indicators for Sterilization Processes, DHI Publishing, LLC, p.195-210. 2009.
- 16) 佐々木次雄, 岩田浩明, 栃木公太, 久保田真由美: 医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点、医薬品研究、39:299-309, 2008.
- 17) 佐々木次雄: 無菌製造法の留意点、Pharm Tech Japan 24:2419-2425, 2008.
- 18) Tomoaki Ichijo, Nobuyasu Yamaguchi, Katsuji Tani and Masao Nasu. 16S rRNA sequence-based rapid and sensitive detection of aquatic bacteria by on-chip hybridization following multiplex PCR. J. Health Sci., 54: 123-128 (2008)
- 19) 山口進康, 馬場貴志, 多胡靖宏, 那須正夫. 迅速・高精度な細菌モニタリング. 第24回宇宙利用シンポジウム 発表論文集, 347-350 (2008)
- 20) Nobuyasu Yamaguchi, Takashi Baba, Yasuhiro Tako and Masao Nasu. Microbial monitoring for safety management of water in closed experimental systems. Proceeding of International Symposium on Application of a Closed Experimental System to Modeling of ¹⁴C Transfer in the Environment, 163-167 (2008)
- 21) Fumito Maruyama, Katsuji Tani, Takehiko Kenzaka, Nobuyasu Yamaguchi and Masao Nasu. Application of real-time long and short polymerase chain reaction for sensitive monitoring of the fate of extracellular plasmid DNA introduced into river waters. Microb. Environ.,

- 23: 229-236 (2008)
- 22) Nobuyasu Yamaguchi, Yasuo Motoyama, Mami Matsumoto, Noboru Kagami, Yoshihiko Tani, Masahiro Satake and Masao Nasu. Rapid and sensitive detection of viable bacteria in contaminated platelet concentrates using a newly developed bio-imaging system *Transfusion*, 48: 2364-2369 (2008)
- 23) 馬場貴志, 山口進康, 篠原正典, 多胡靖宏, 那須正夫. 閉鎖型生態系実験施設 (CEEF) の水環境における細菌の動態. *生態工学会誌*, 20: 11-17 (2008)
- 24) 見坂武彦, 馬場貴志, 山口進康, 那須正夫. マイクロコロニー法による食材中の生菌数の迅速測定. *日本食品微生物学会雑誌*, 25: 148-152 (2008)
- 25) 岡本晃典, 山口進康, 馬場貴志, 高木達也, 那須正夫. 細菌数測定法における誤差分布の推定. *医薬品研究*, 40: 1-8 (2009)
2. 学会発表
- 1) 塩入利一, 室井正志, 畑尾史彦, 西田正人, 小川利久, 三村芳和, 棚元憲一, 上西紀夫: エンドトキシンによる血管内皮細胞のアポトーシス誘導および可溶性 CD14, MD-2 の効果について, 日本外科代謝栄養学会 第 45 回学術集会 (2008, 7)
- 2) 西田正人, 畑尾史彦, 比企直樹, 小川利久, 三村芳和, 塩入利一, 室井正志, 棚元憲一, 上西紀夫: TLR4/MD-2/CD14 定常発現細胞を用いた TLR4 刺激能測定による, グラム陰性菌への抗生剤投与後の LPS 生物活性の評価, 日本外科代謝栄養学会 第 45 回学術集会 (2008, 7)
- 3) Masashi Muroi, Takahiro Ohnishi and Ken-ichi Tanamoto: TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 4) Takahiro Ohnishi, Masashi Muroi, Ken-ichi Tanamoto: Dimerization of intracellular domain of TLR4 is not required for the activation of MyD88-independent signaling pathway. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 5) Kei-ichi Sugiyama, Masashi Muroi, Ken-ichi Tanamoto, Motohiro Nishijima, Yoshiko Sugita-Konishi: Effect of deoxynivalenol and nivalenol on LPS-induced nitric oxide production by mouse macrophages. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (2008, 7)
- 6) Nishida M., Hatao F., Hiki N., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y. Muroi M., and Tanamoto K.: New assay for biologically active of lipopolysaccharide using NF- κ B activity in Toll-like receptor (TLR) 4/MD-2/CD14-transfected HEK293 cells. 10th Biennial Meeting of the International Endotoxin and Innate

- Immunity Society (2008, 7)
- 7) 杉山圭一、室井正志、葉袋裕二、棚元憲一、芳賀 実、小西良子：デオキシニバレノールの Toll-like receptor シグナル伝達系に対する作用機構の解析、第 15 回日本免疫毒性学会学術大会 (2008, 9)
- 8) 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 との相互作用による TRAF6 の proteasome 依存性の分解、第 82 回日本細菌学会総会 (2009, 3)
- 9) 大西貴弘、室井正志、棚元憲一：LPS 刺激は TRIF を TLR4 から解離させる、第 82 回日本細菌学会総会 (2009, 3)
- H. 知的財産の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

日本における最新無菌操作法技術の海外紹介

研究分担者 佐々木次雄 (医薬品医療機器総合機構)

研究要旨

3年間にわたった本研究事業において、第1年度は日米欧薬局方間で国際調和を推進してきた「微生物試験法」のアジア地域における現状把握を目的に、ベトナム薬局方の「微生物試験法」について調査を行った。第2年度は「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」を作成し、平成19年6月4日付で監視指導麻薬対策課より発出した。第3年度は、「日本における最新の無菌操作法技術」を海外に紹介することを目的に論文を作成した。

A. 研究目的

本研究事業においてこれまで、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」及び「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」を作成し、監視指導・麻薬対策課より地方庁に事務連絡されてきた。最終年度は数ある無菌操作技術の中でも日本で開発された技術を世界に紹介することに重点を置いて、「日本における最新の無菌操作法技術」を作成し、海外に紹介することにした。

B. 研究方法

国立衛生研究所を退官し、(独立行政法人) 医薬品医療機器総合機構に勤務したため、実験的研究はできなくなった。そこで、無菌医薬品の無菌性の変化として昭和23年より国家検定として実施してきた生物学的製剤に対する無菌試験成績(不合格率、再試験率)をまとめ、また培地充てん試験に対する許容値の歴史を紹介し、無菌医薬品に対する無菌性保証水準が著しく向上していることを示すと同時に、日本で誕生した新しい無菌操作技術として、凍結乾燥無

菌バルクの製造、アンプル製剤に対する凍結乾燥装置と異物検出機を紹介することにした。

C. 研究経過

検定制度が発足した1948年には10%の製剤が無菌試験で不合格になっていた(添付資料 Fig. 1)。当時の無菌医薬品は添加した防腐剤の効果に依存するものであったが、2000年以降では再試験も出なくなり、国家検定から「無菌試験」が削除された。培地充てん試験の許容値も導入当時(1970年代)は最少充てん本数が1,000容器で、許容値も0.3%であったが、現在では充てん本数に関わらず原則ゼロになっている(Table 1)。無菌操作法で製造される医薬品の無菌性を高度に保証するためには、人の介在を極力少なくすることが重要である(Fig. 2)。その長たる装置としてアイソレータがある。ISPEの報告によると、日本における製造用アイソレータの導入は年に1~3件である(Fig. 3)。アイソレータの設置環境はグレードCが最も多く、次いでグ

レードBであった (Fig. 4)。

凍結乾燥機：無菌バルクの製造では、凍結乾燥技術を活用する機会が多い。従来であれば、除菌された薬剤を一旦トレイに充填し、それを棚式凍結乾燥機で凍結真空乾燥し、トレイ上の乾燥粉体を回収し、その後乾燥粉体を粉碎して滅菌済み容器に収納するといった製造方法が採用されてきた。こうした一連の工程では、除菌された薬液や凍結乾燥粉体が開放状態で取り扱われることになり、人手による操作も必要となり、環境や人間からの汚染リスクも高くなる。そのため、こうした一連の工程を密閉系内で実施可能な凍結乾燥装置が開発されている (Fig. 6)。その基本となる技術は、アイスライニング技術である。熱媒 (伝熱面) と薬液の間にアイスライニング層を形成させることにより、凍結乾燥された薬剤乾燥体を伝熱面に固着させることなく剥離させ回収する技術である (Fig. 7, 8)。この技術により、トレイなどの容器を使う必要がなくなり、除菌された薬剤の凍結乾燥・粉碎・回収を密閉系内で実施することが可能となった。密閉系内は CIP/SIP も可能であり、無菌バルクへの環境や人間からの汚染リスクが大幅に低減される。さらに、従来の凍結乾燥工程の場合に必要な無菌充填室、充填機、トレイを必要としないためランニングコストの大幅な軽減をはかることが出来る。

アンプル凍結乾燥製剤の凍結乾燥庫への自動入出庫は、高い自動化技術を必要とする。又、高速 (400 本/分@1 mL) で充填されたアンプルをトレイに自動的に集積することは困難とされてきたが、日本国内では、そうした製造ラインが稼動している。充填

機より排出されるアンプルをトレイに整列させるには、アンプルの連続的な流れを間欠的な流れに変える必要がある。整列させる動作自体が間欠動作となるからである。そのために、搬送距離を可変させる搬送装置 (コンベヤー) が開発され、安定したトレイ集積操作の自動化が実現している (Fig. 9)。さらには、複数サイズの充填済みアンプルやバイアルを、同じ自動入出庫装置でハンドリングする製造ラインも稼動している。そうしたラインは、容器やサイズ毎に異なるサイズのトレイを使用したのでは効率的な製造が出来ない。そのための工夫として、バネ付き仕切り板を装備したトレイが開発されている (Fig. 10)。このトレイのハンドリングを自動化し、複数種のアンプルやバイアルを一つの装置でハンドリングする製造ラインが稼動している。

無菌操作アイソレータ内でアンプル/バイアルのトレイ集積操作を自動化する場合に、トレイを反転させる機構をアイソレータ内に内蔵する必要がある。こうした動作を多関節ロボットでおこなう方法もあるが、それでは無駄な空間をアイソレータ内に設けてしまうため、回転駆動をアイソレータ外に装備し、アイソレータ内の部材を間接的に動かすことでアイソレータ内に駆動装置を内蔵しない装置が実用化されている

(Fig. 11)。こうした技術を適用して、アイソレータを装備したアンプル充填・バイアル充填・アンプル熔閉・バイアル巻縮の個々のラインと 5 台の凍結乾燥庫の間をアンプルやバイアルが集積されたトレイが無菌管理域内を無人搬送台車で搬送されるマルチ製造ラインも稼動している (Fig. 12)。

異物検出機：消費者は医薬品への異物混入には厳しい目を持っている。そのため、医薬品製造における異物検出には相当のエネルギーを費やす。そこでエーザイが 1976 年に開発した SD 方式による検査方式による最新の異物検出装置について紹介することにした (Fig. 13, 14)。SD 方式による異物検出原理は、容器にスピンを与えて瞬時に停止させると内容液だけが惰性で回転し、この時側面から容器に光を照射し、その透過光をセンサで検知し、内容液中に異物があつた場合にはその異物も内容液とともに回転しているため、その異物の影がセンサを横切る時に光量に変化し、この光量変化を電気的に処理して異物の有無を調べようとする方法である (Fig. 15, 16)。この SD 方式は、容器の傷や汚れ、液質、また容器表面の印刷や凹凸があつても影響されることなく検査できるため、検知率が高く信頼性の高い検査方式としてこれまで世界 48 カ国で 800 台以上が稼動している。

D. 考 察

ワクチン・抗毒素製剤に始まった医薬品の無菌製造法は抗生物質製造によって大発展を遂げたと言える。1940 年に報告されたペニシリン G は、感染症治療という観点から、医者及び患者に多大な光明をもたらしたと同時に近代製薬企業の発展にも重要な役割を果たしてきた。ペニシリンに続くストレプトマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシンなどの発見は、微生物から発酵法により医薬品を作ることになり、更にはろ過滅菌、凍結乾燥工程も加わり、“無菌製造法”の基盤が整備された感がある。無菌医薬品の無菌性保証水準が時代とともに向上したことは、生物学的製剤に対する国

家検定「無菌試験」の成績でも分かる。

わが国製薬業界の過去 30 年間の変貌は目を見張るものがある。GMP や Validation の考えは欧米から導入したシステムではあるが、今では欧米諸国と遜色のないものになっている。1990 年代からは ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) メンバー国として、新薬承認審査の基準を国際的に統一し、医薬品の品質・有効性・安全性にかかわるデータ収集などについてガイドライン作成に貢献してきた。また、PDG (Pharmaceutical Discussion Group) メンバーとして薬局方の国際調和にも貢献してきた。外資系製薬企業の日本進出や日本の製薬企業との合併等により、無菌操作法に関わる技術においても欧米の製薬企業と遜色のないレベル、又はそれらを上回るレベルにある。

E. 結 論

品質リスクマネジメントに関する ICH/Q9 ガイドラインが発行されてから、わが国の製薬企業においても医薬品の無菌性保証に関して様々な角度からリスク分析がなされており、その一端が、本研究班研究分担者である渡辺恵一郎氏の研究成果に詳述されている。要は人の介在しない作業環境をいかに作り出すかが重要である。高い無菌性保証水準の医薬品を恒常的に製造するにはソフト面の管理では限界があり、どうしてもハード面での管理が必要である。我が国で開発された無菌製造技術の代表例として、凍結乾燥技術と異物の検出機を中心に海外に紹介するための論文を作成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

1. Kubota T., Matsuoka M., Chang T.H., Taylor P., Sasaki T., Tashiro M., Kato A., and Ozato K. Virus infection triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, leading to the negative regulation of type 1 infection gene expression. *J. Biol. Chem.*, 37: 2560-2570, 2008.
2. Kenri T., Okazaki N., Yamazaki T., Narita M., Izumikawa K., Matsuoka M., Suzuki S., Horino A., and Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *J. Med. Microbiology*, 57:469-475, 2008.
3. Kimura N., Someya T., Yamagiwa Y., Kokubo M., and Sasaki T. Japanese Perspective on Biological Indicators. *Biological Indicators for Sterilization Processes*, DHI Publishing, LLC, p.195-210. 2009.
4. 佐々木次雄:微生物利用に関わる安全性や知財権への取組み、3.1 バイオテロリズム、微生物の辞典、朝倉書店、p.693-695、2008.
5. 佐々木次雄: I S O 関連分野の状況、医療現場の滅菌、へるす出版 p.175-195、2008.
6. 佐々木次雄、岩田浩明、栃木公太、久保田真由美:医薬品製造用細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験法の問題点、医薬品研究、39:299-309、2008.
7. 佐々木次雄: 病原体の輸送、新 GMP 微生物試験法、じほう p.71-77、2008.
8. 佐々木次雄: 遺伝子解析による微生物の同定法、細菌、新 GMP 微生物試験法、じほう p.128-137、2008.
9. 佐々木次雄: 無菌試験法、細菌・真菌、新 GMP 微生物試験法、じほう p.159-171、2008.
10. 佐々木次雄: 無菌試験法、マイコプラズマ試験法、新 GMP 微生物試験法、じほう p.171-186、2008.
11. 佐々木次雄: 培地充てん試験法、新 GMP 微生物試験法、じほう p.385-396、2008.
12. 佐々木次雄: 無菌製造法の留意点、*Pharm Tech Japan* 24:2419-2425、2008.
2. 学会発表
なし

Advanced Aseptic Processing Technologies in Japan

Tsuguo SASAKI¹⁾ and Morihiko TAKEDA²⁾

- 1) Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan
- 2) Pharma Solutions Co.Ltd., 3-22-5 Shinyokohama, Kouhoku Yokohama, Kanagawa 222-0033, Japan

From history books on Japan we learn that the society has actively imported, adopted, and promoted new and advanced cultures, political systems, scientific technologies, and other knowledge and inventions from the most esteemed foreign countries at the time. Over the 200-year period from 630 A.D., Japan achieved epoch-making growth during a time at which Chinese culture and Buddhism were introduced from the Tang dynasty, one of the most sophisticated civilizations at the time. The Meiji era, starting in 1868, brought about the end of Samurai history and opened the doors for the New Government to start modernizing Japan. The adaptation was broad and diverse, transfiguring Japan into a modern country, the first Western-style nation in Asia. The ensuing years after World War II was a time of recovery from devastation and of advancement to a country capable of manufacturing world-class industrial products based on science and technology. The Japanese people have long adored, respected, and studied the civilizations, cultures, and scientific achievements of advanced countries. Japan, through sending out its own human resources to other countries and inviting highly skilled specialists from abroad, has effectively utilized the knowledge acquired toward the growth of the nation. The country has long been accused of being skillful at imitating foreign ideas; however, the Japanese have demonstrated a high sense of ingenuity and curiosity, and great enthusiasm to take on new civilizations and cultures, and adapt them in their own way. They also have shown the necessary motivation and talent to further advance imported ideas to make them fit their own styles.

The drastic changes made in manufacturing technologies in the Japanese pharmaceutical industry over the past 30 years have been remarkable. Although the fundamentals of GMP and validation were imported from Western nations, current manufacturing systems are in no way inferior to those of the West. With the entry of foreign pharmaceutical companies into the Japanese market together with mergers

with Japanese pharmaceutical companies, aseptic manufacturing processing has been enhanced to a level comparable to that in the West. This chapter briefly covers aseptic processing technologies currently available in Japan.

1. Changes in sterility assurance level of aseptically manufactured products

The global view of pharmaceutical product manufacturing seems to indicate that aseptic manufacturing methods starting with the production of vaccines and antitoxins has made great advancements with the production of antibiotics as a turning point. Penicillin G reported in 1942 not only provided immense benefits to both physicians and patients from the view point of infection treatment but also has contributed to the development of the modern pharmaceutical industry. The discovery of streptomycin, tetracycline, and erythromycin following penicillin led to the development of a new drug manufacturing process. The introduction of sterile filtration, freeze-drying, and other new technologies appear to have set the foundation for aseptic manufacturing methods. The improvements in sterility assurance level (SAL) for sterile products over time can be seen with results of the sterility test for biological products carried out as a national control test to date (Fig. 1). When HEPA and/or membrane filters were not available after World War II, the sterility of products was dependent on the effect of antiseptic agents formulated but eventually many lots of products were rejected by the sterility test. The rejection rate was as high as 10% despite very low detection sensitivity level (SAL approximately 10^{-1}), permitting speculation that almost all products were contaminated. The recent permissible contamination limit in the medial fill test has approached zero despite the increased number of units used in the test, a stark contrast from the 0.3% in 1973 (Table 1), evidencing drastic improvement in aseptic manufacturing technologies.

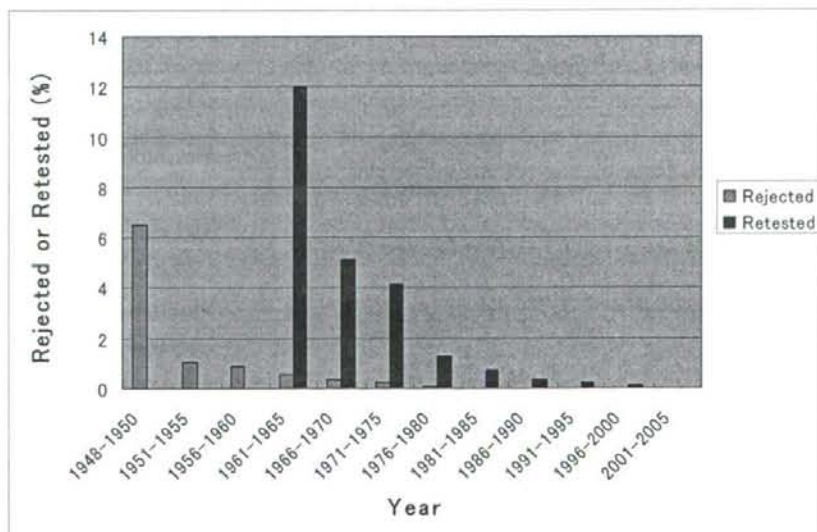


Fig. 1 Summary of sterility test for biological products carried out as a national control assay in Japan (1948 – 2005).

2. Prerequisites for achieving high sterility assurance level in aseptic manufacturing

Sterile drug products are manufactured by aseptically handling sterilized parts of the products (e.g., containers, stoppers) using sterilized manufacturing equipment. Attempts for aseptic processing are challenged by various factors of contamination such as operators and manufacturing environment. In addition, manufacturing processing creates the possibility for microbial contamination, and the major source of contamination is humans. Sterilization itself is a technically well-established process. Practical approaches to contamination containment may be focused on the aseptic filling of pharmaceutical solution into containers and maintenance of aseptic conditions throughout processing. These process operations pose the question, "which areas of manufacturing facility are critical in maintaining the sterility of drug products." Example of critical areas for contamination prevention may be transfer ports of an autoclave, interior of a HEPA cart during product transfer, and chambers for carrying sterile stoppers into a stoppering machine (Fig. 2), since these areas require the intervention of human operators or exposing products/materials to the environment. The assurance of sterility during aseptic processing can be implemented by a hardware and/or software approach. The software approach is heavily dependent on human operators; however, it is not possible to control the entire movement of humans by software applications. One of the basic approaches is to minimize the involvement of operators in controlled aseptic manufacturing to increase the sterility assurance level.

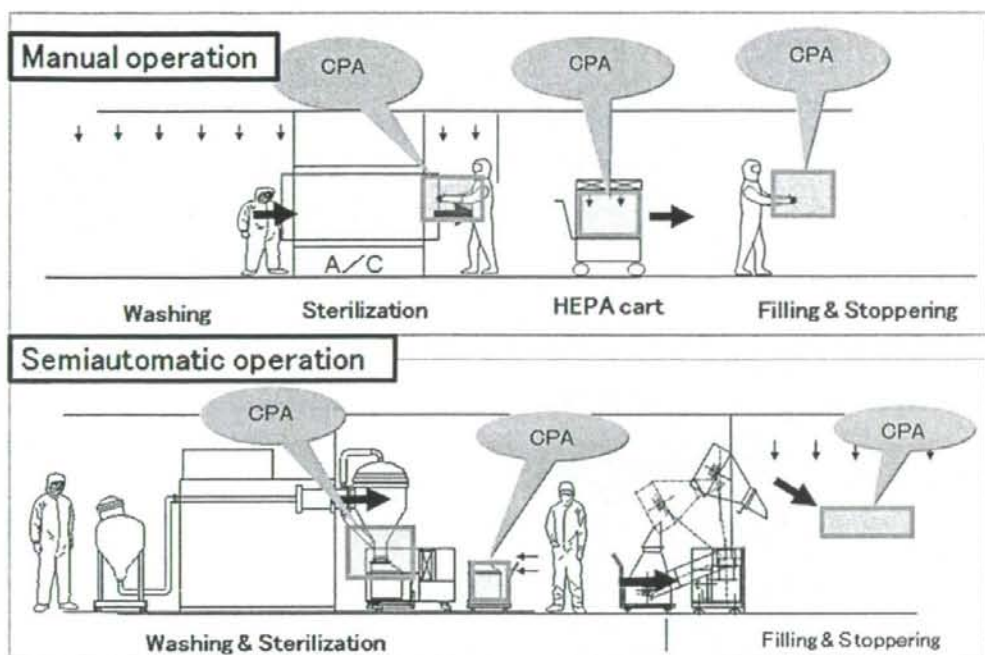


Fig. 2 Example of critical processing area (CPA) showing human intervention
 This figure illustrates washing, sterilization and transferring of rubber stoppers to the filling machine. CPA means “critical processing area”.

3. Sterile manufacturing equipment

The innovation of technologies for realizing manufacturing with a good balance of stable quality and high product output as best illustrated by Toyota's just-in-time system is the heart of the Japanese industry. Aseptic manufacture of drug products is also supported by this traditional concept of well-balanced quality and performance. The elimination of the major contamination source, humans, from an aseptic manufacturing process has been tried by developing closed processing systems and process automation system. Technologies thus developed are briefly summarized below.

3.1 Isolator technologies

A high level of sterility assurance for drug products manufactured in an aseptic process essentially requires the minimization of human intervention in the process. One of the current best fits for this purpose is the isolator. One to 3 new isolators are introduced for drug production annually in Japan (Fig. 3). The grade of the environment surrounding the isolator is C in most cases, followed by B (Fig. 4).