

図4 MALDI spectra に与える培地の影響 (N: Nutrient broth; S: SCD)

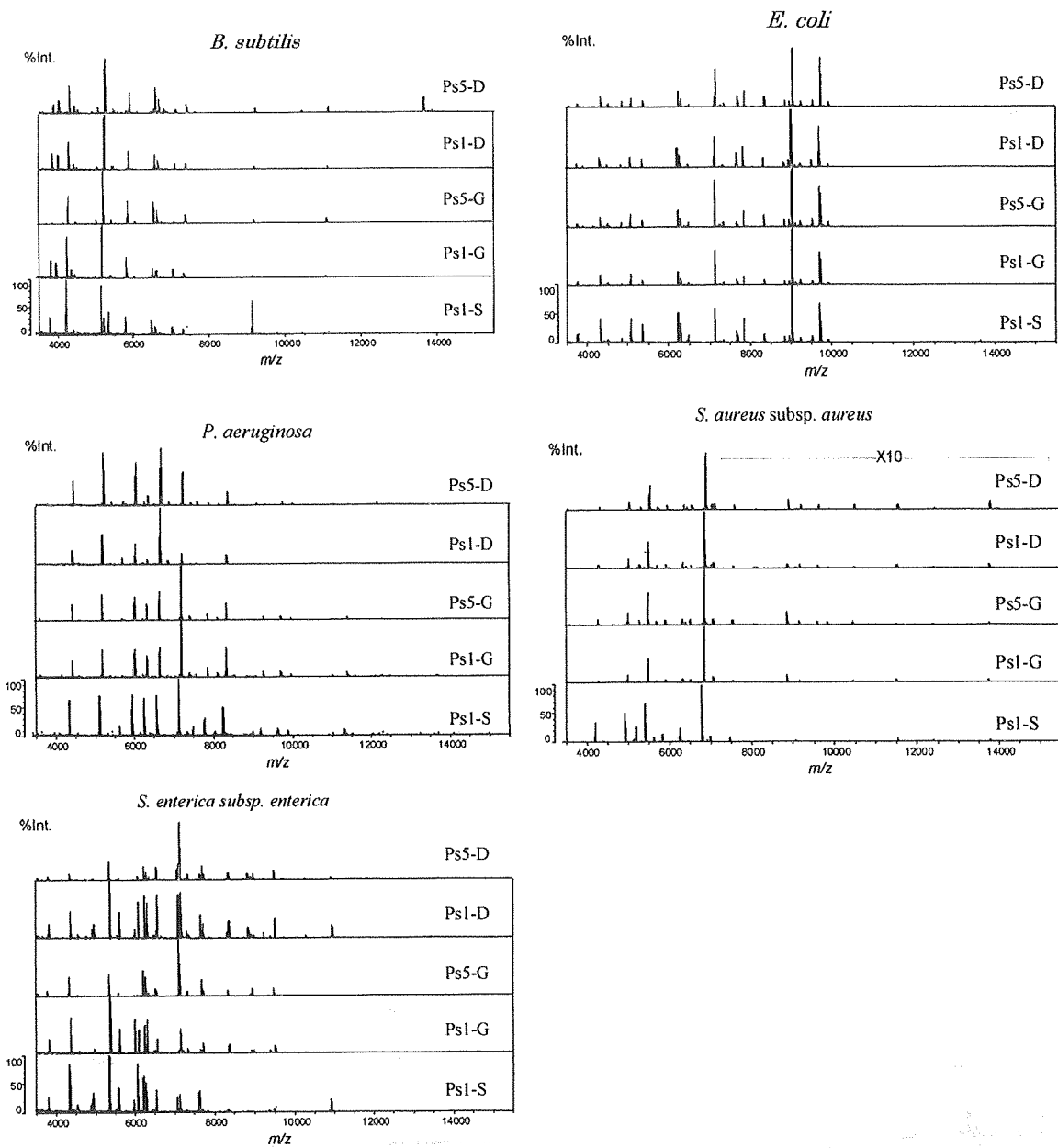


図5 MALDI spectra に与える保存法の影響

SCD 液体培地+12% glycerol (G)または SCD 液体培地+8% DMSO (D)を用いて凍結保存した1継代目 (Ps1) と5継代目 (Ps5) を融解し、それぞれ SCD 培地で培養した

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器・インフォマティクス総合研究事業）
分担研究報告書

画像による簡便な細菌数測定法の検討

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 山口進康 大阪大学大学院薬学研究科（衛生化学）
川井真好 姫路獨協大学薬学部（衛生・微生物学）

研究要旨：第十五改正日本薬局方第二追補に参考情報として収載された蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法を、医薬品の微生物学的品質保証に活用するためには、そのプロトコールの簡便化が重要となる。現在、蛍光染色法における細菌の検出および計数には、蛍光顕微鏡による目視計数が一般的に用いられている。しかしながら、目視計数においては時間と労力を要することが、本手法を一般化するための課題となっている。そこで、試料中の細菌数を、蛍光顕微鏡下で目視計数することなく大まかに把握するための方法（画像判断法）を検討した。

A. 研究目的

環境微生物学分野における多くの研究により、自然環境中の微生物の大部分は通常の方法では培養困難であることが、明らかとなってきた。これにともない、微生物を培養することなく、迅速・簡便、さらには高精度に定量するための手法が検討されている¹⁻⁸⁾。医薬品製造用水や生薬等においても、生息する細菌を精度よく検出することは難しく、このような細菌の計数では、個々の細菌を蛍光試薬で染色し、直接観察する方法が有効である。

これらの方法のうち、蛍光活性染色法は微生物細胞内のエステラーゼ活性を指標として、生菌を検出できる方法である。また、マイクロコロニー法は、フィルター上に捕集した細菌を培地上で短時間培養することにより、マイクロコロニーを形成させ、増

殖能をもつ細菌を計数する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が容易であり、かつ短時間で結果を得ることが可能であることが挙げられる。通常、蛍光染色の操作は試料に染色液を添加するのみであり、蛍光活性染色法の染色時間は約30分である。またコロニー形成の初期段階で蛍光染色し、測定するマイクロコロニー法であっても、24時間以内に測定結果を得ることができる。したがって、細菌の検出に数日を要する培養法と比較して、短時間のうちに結果を得ることができる。

このような特長から、蛍光活性染色法およびマイクロコロニー法が、第十五改正日本薬局方第二追補に、参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」として収載され、その活用が期待されている。

現在、蛍光染色法における細菌の検出

および計数には、蛍光顕微鏡による目視計数が一般的に用いられている。しかしながら、目視計数においては労力を要することが、本手法を一般化するための課題となっている。また、自動計数装置も種々開発されているが、価格や精度が普及における課題となっている。そこで、試料中の細菌数を、蛍光顕微鏡下で目視計数することなく数枚の画像をもとに大まかに把握するための方法（画像判断法）を検討した。

B. 研究方法

1) 試料

標準菌株試料として、大腸菌 K12を前培養した後、集菌、洗浄し、無菌水に添加した。その試料をさらに無菌水で様々な菌量となるように希釈した。環境水試料は、市販のナチュラルミネラルウォーターを用いた。

2) 蛍光染色

全細菌数の測定には DAPI（4', 6-diamidino-2-phenylindole ; ナカライテスク社）を用いた。試料中の細菌をポリカーボネートフィルター（直径 25 mm、孔径 0.2 μm ; アドバンテック東洋社）上に捕集し、DAPI 溶液（10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水溶液）を終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、約 3 分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡（ECLIPSE-50i ; ニコン社）の紫外線励起光下で全細菌を計数した。計数にあたっては、20 視野を計数し、細菌数の平均値が 2 以下、または細菌数の平均値が 0 となった視野数が 5 視野以上の場合に検出限界以下

とした。

3) 蛍光顕微鏡画像の撮り込み

蛍光染色した細菌の蛍光顕微鏡像を、冷却 CCD（Penguin 150CL ; ピクセラ社）を用いて撮り込んだ。

C. 研究結果および考察

1) 画像面積の確認

まず蛍光顕微鏡下での目視観察面積と CCD による画像の撮影範囲を、接眼マイクロメーターおよび対物マイクロメーターを用いて確認した。その結果、菌数計測における接眼レンズの視野は $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ であるのに対し、画像面積は $0.07 \times 0.09 \text{ mm}^2$ （目視観察時の 63%）であることがわかった。

2) 標準菌株を用いた画像判断法の検討

目視による鏡検面積 0.01 mm^2 あたりの細菌数が約 5、25、50、75、100、150 となるように調整し、細菌数を目視により測定するとともに、平均的な画像を複数枚観察した（図 1）。その結果、画像における細菌数と試料のろ過量をもとに、計数することなく、細菌数を大まかに把握できることがわかった。

3) 環境水試料を用いた画像判断法の検討

環境中に生息する細菌は、培養した細菌より大きさも小さく、蛍光強度も弱い。そこで、ナチュラルミネラルウォーター中の細菌を対象として、画像により細菌数の大まかな把握が可能かを確認した（図 2）。その結果、目視による鏡検面積 0.01 mm^2 あたりの細菌数が約 10、30、50、75、100、150 である試料について、計数することなく、

細菌数を把握できることがわかった。例えば、蛍光画像1枚当たりの細菌数が20であり、試料のろ過量が100 mLである場合は、細菌数が 6×10^3 cells/mLであると推定できる。

D. 結論

蛍光染色法による細菌数測定において、計数操作の簡便化のために、目視による画像の判断により測定が可能であるかを確認した。まず、大腸菌を用いて、各菌量に調整した試料の細菌数を計測したところ、通常の計数操作のように数十の視野を数えることなく、細菌数を把握できることがわかった。また、水環境中に生息する細菌についても同様の結果が得られた。本方法は迅速・簡便であり、多検体の処理も可能である。

今回の研究では、蛍光顕微鏡画像を CCD で撮り込み、その画像について目視による観察・計数を行ったが、実際の適用にあたっては、画像を撮り込むことなく、ディスプレイ上での測定が可能である。また、蛍光顕微鏡よりも簡便かつ安価な蛍光粒子観察システムでの細菌モニタリングが可能となる。したがって、本方法は医薬品の細菌数の把握あるいは試料の希釈倍率の決定に有効である。医薬品製造用水の場合、約 200 mL ろ過して、5 画像程度を観察し、菌が検出されなければ、1 mL あたりの細菌数が 100 以下である可能性が高いと考えられる。今回検討を行った画像判断法（画像による大まかな細菌数の把握）は日常の微生物管理に役立つと考えられる。

E. 参考論文

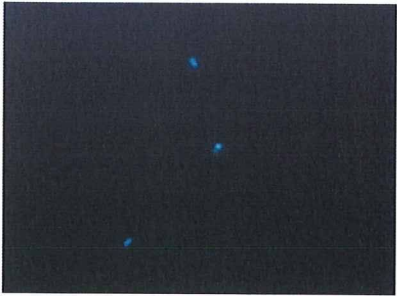
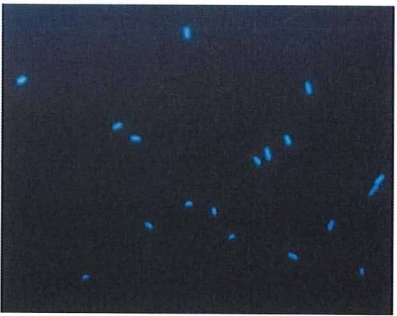
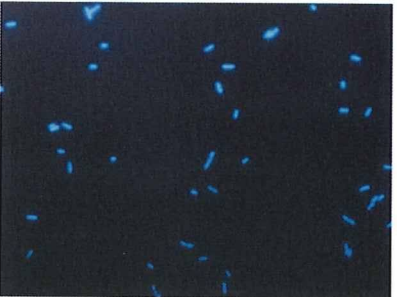
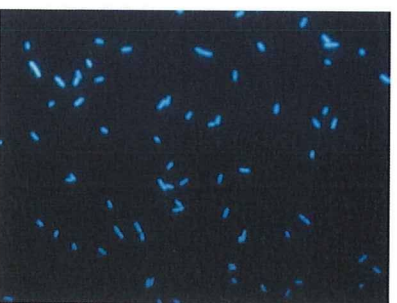
1. 岡本晃典, 山口進康, 馬場貴志, 高木達也, 那須正夫. : 細菌数測定法における誤差分布の推定.、医薬品研究, 40: 1-8 (2009)
2. 山口進康, 一條知昭, 永瀬裕康, 馬場貴志, 那須正夫. : 閉鎖生態系生命維持システム (CELSS) における水の衛生微生物学的安全性評価システムの開発.、Space Utiliz, Res., 25: 86-89 (2009)
3. Takashi Baba, Nobuyasu Yamaguchi, Rie Matsumoto and Masao Nasu.: Bacterial population dynamics in a reverse-osmosis water purification system determined by fluorescent staining and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis., Microbes Environ., 24: 163-167 (2009)
4. Nobuyasu Yamaguchi, Yasuo Motoyama, Mami Matsumoto, Tomoaki Ichijo, Hideto, Nagumo, Noboru Kagami, Yoshihiko Tani, Masahiro Satake and Masao Nasu: *Staphylococcus epidermidis* forms floating micro-colonies in platelet concentrates at the early stage of contamination., J. Health Sci., 55: 726-731 (2009)
5. Nobuyasu Yamaguchi, Masafumi Ikeda and Masao Nasu: Rapid on-chip flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk., J. Health Sci., 55: 851-856 (2009)
6. Nobuyasu Yamaguchi, Makoto Sasada and Masao Nasu.: Rapid detection of starved *Escherichia coli* with respiratory activity in potable water by signal-amplified in situ hybridization following formazan

reduction. *Microbes Environ.*, 24:
286-290 (2009)

7. Nobuyasu Yamaguchi, Hatsuki Hieda and
Masao Nasu.: Simple and reliable

swabbing procedure for monitoring
microbes in the international space station.
Eco-Engineering, 22: 27-30 (2010)

添付資料

画像	計数值 (0.1×0.1mm ² あたり)	ろ過量 (mL)	細菌数 (cells/mL)
	4.95	1 10 100 200 500 1000	1.03×10^5 1.03×10^4 1.03×10^3 5.20×10^2 2.10×10^2 1.03×10^2
	25.8	1 10 100 200 500 1000	5.42×10^5 5.42×10^4 5.42×10^3 2.71×10^3 1.08×10^3 5.42×10^2
	55.1	1 10 100 200 500 1000	1.16×10^6 1.16×10^5 1.16×10^4 5.30×10^3 2.32×10^3 1.16×10^3
	76.2	1 10 100 200 500 1000	1.60×10^6 1.60×10^5 1.60×10^4 8.00×10^3 3.20×10^3 1.60×10^3

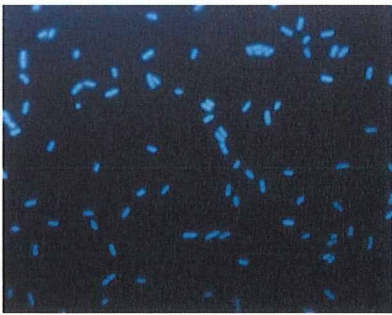
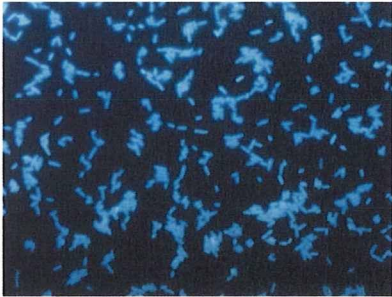


	109.0	1	2.29×10^6
		10	2.29×10^5
		100	2.29×10^4
		200	1.15×10^4
		500	4.58×10^3
		1000	2.29×10^3
	162.9	1	3.42×10^6
		10	3.42×10^5
		100	3.42×10^4
		200	1.71×10^4
		500	6.84×10^3
		1000	3.42×10^3

図1. 標準菌株（大腸菌）を用いた蛍光顕微鏡目視計数値と画像中の細菌数の関係。

画像	計数値 ($0.1 \times 0.1 \text{mm}^2$ あたり)	ろ過量	細菌数 (cells/ml)
	9.8	1	2.06×10^5
		10	2.06×10^4
		100	2.06×10^3
		200	1.03×10^3
		500	4.12×10^2
		1000	2.06×10^2
	29.5	1	6.20×10^5
		10	6.20×10^4
		100	6.20×10^3
		200	3.10×10^3
		500	1.24×10^3
		1000	6.20×10^2



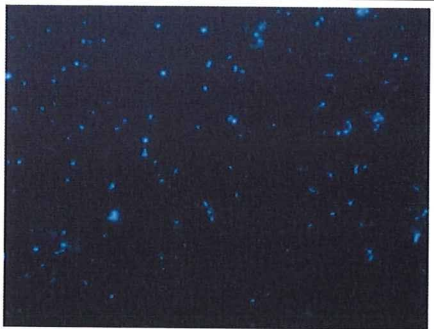

	48.2	1 10 100 200 500 1000	1.01×10^6 1.01×10^5 1.01×10^4 5.05×10^3 2.02×10^3 1.01×10^3
	75.3	1 10 100 200 500 1000	1.58×10^6 1.58×10^5 1.58×10^4 7.90×10^3 3.16×10^3 1.58×10^3
	112.0	1 10 100 200 500 1000	2.35×10^6 2.35×10^5 2.35×10^4 1.18×10^4 4.70×10^3 2.35×10^3
	169.0	1 10 100 200 500 1000	3.54×10^6 3.54×10^5 3.54×10^4 1.17×10^4 7.08×10^3 3.54×10^3

図2. 水環境中の細菌を用いた蛍光顕微鏡目視計数値と画像中の細菌数の関係.

厚生労働科学研究費補助金
(厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

日本版「無菌操作法指針」の改正

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）

研究協力者：

浦山由巳	千代田化工建設（株）
片山博仁	バイエル製薬（株）
加藤博史	医薬品医療機器総合機構、品質管理部
小久保 護	渋谷工業（株）
小暮慶明	東和薬品（株）
小林一幸	日本イーライリリー(株)
佐々木裕子	国立感染症研究所
白木澤 治	ファルマ・ソリューションズ（株）
鈴木 祥悟	医薬品医療機器総合機構、品質管理部
高橋充博	アステラス富山(株)高岡工場
立石伸男	中外製薬（株）
谷 壽一	シーアンドエス（株）
内藤 貴博	塩野義製薬（株）
鳴瀬諒子	医薬品医療機器総合機構、品質管理部
西畑利明	参天製薬（株）
原 芳明	ザルトリウス・ステディム・ジャパン株
原田敏和	参天製薬（株）
樋本 勉	参天製薬（株）
平嶋直樹	武田薬品工業（株）
曲田純二	日本ミリポア（株）
村上大吉郎	（株）大気社

研究要旨：平成15年度厚生労働科学研究（医薬品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」班で、“無菌操作法による無菌医薬品の製造指針”を作成した。本指針は平成18年7月4日、監視指導・麻薬対策課より事務連絡として発出された。本指針は無菌医薬品製造所においてGMPを補完するものとして、また規制当局によってはGMP調査時の参考資料として活用されてきた。無菌操作法に関する国際規格（ISO 13408-1: Aseptic processing of health care products - General requirements）や欧米の基準（EU-GMP Annex 1, FDA Guidance for Industry, Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-cGMP）との更なる整合性を目指し、平成18年版の改正作業に着手した。

A. 研究目的

日本と欧州共同体は、2001年4月に「相互承認に関する日本国と欧州共同体との間の協定（日欧MRA）」に署名し、同協定は2002年1月に発効した。医薬品のGMPに関するMRAには無菌医薬品、バイオ医薬品、原薬は含まれなかった。無菌医薬品が含まれなかった理由の一つとして、当時の日本には無菌医薬品製造に関する指針の無いことがあげられた。そこで、監視指導・麻薬対策課（以下、「監麻」という。）からの要請もあり、「無菌操作法」と「最終滅菌法」に関する指針を作成した。両指針ともに監麻から事務連絡として発出され、無菌医薬品製造所ではGMPを補完する情報として、また規制当局はGMP調査時の参考資料として活用されている。無菌医薬品製造に関する国際規格や欧米の基準が一部改正されたこともあり、改正事項との整合性を考慮に入れつつ、全体的な見直しを行うことにした。また、監麻から発出された“事務連絡”の位置づけが曖昧なこともあり、今回の改訂版を医薬品医療機器総合機構（品質管理部）のホームページにも掲載し、国内外に日本の規範指針であることを示すことも検討している。

B. 研究方法

研究協力者は、GMP調査官である医薬品医療機器総合機構から3名、生物学的製剤の無菌性保証を担当している国立感染症研究所から1名、民間企業から17名で構成されている。21名中11名は、平成18年版「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」作成にも従事した。平成18年版指針をベースに各章毎に見直し担当者を決め、更に見直し担当者を4グループに分けてグループ内で検討の上、コンセンサスの得られた改正案を班会議で検討することによって、作業の効率化を図っている。平成21年度には、3回の班会議を開催した。

C. 研究結果

現行指針の各項目について、国内基準としては省令GMP及び薬局等構造設備規則、国外基準としてはISO 13408-1（2008）、WHO-GMP（2009改正案）、EU-GMP Annex 1（2009）、FDA無菌操作法ガイダンス（2004）と比較し、これらと相違がある場合には追加もしくは修正案を提案していただき、それをベースにグループ内で検討した上で、班会議で議論した。最終的文言の整理は完了していないが、班会議に提出された改正

案の一部（第7章／無菌医薬品に係る製品の作業所、第10章／原料並びに容器及び栓の管理）を資料1～2に示す。

D. 考察

無菌医薬品は、大別すると「無菌操作法」又は「最終滅菌法」と称する方法で製造される。3年間の研究班活動でこれら2つの指針を見直す予定である。平成21～22年度は「無菌操作法」指針の改正を行い、改正ドラフトについてはパブコメを求めた後に公開したい。公開は英訳版を付けて監麻からの事務連絡の他に医薬品医療機器総合機構（品質管理部）のホームページにも掲載する予定である。本来、無菌医薬品の製造指針は世界共通であることが望ましいが、GMPに対する各国の考え方の違いや文化的背景の違い等により、要求事項の細部は必ずしも共通ではない。1993年に培地充てん試験がWHOに導入された頃は、1000容器以上に充てんし0.3%の汚染までは許容されていたが、現在では5000容器以上に充てんし、許容汚染はゼロである。このように時代とともに無菌医薬品に対する無菌性保証水準は高まり、現在では液剤、乾燥製剤の別を問わず、超高度な無菌性が求められている。そのため、本指針の改正作業においても高度な無菌性保証の観点から見直しを図ってきた。

E. 結論

初版指針をベースに各章毎に見直し担当者を決め、各担当者がまとめた改正案をグル

ープ毎に検討し、その上で班会議に提案するやり方で作業のスピードアップ化を図ってきた。これまで3回の班会議を開催し、約2/3の見直しを完了した。残り1/3には難しい見直し案件も残っているが、今後2回くらいの班会議でまとめ上げたい。その後、パブコメを求め、英訳版の作成まで行い、平成22年度中には発出したい。EUとのMRA締結の方向性は見えないが、指針が整備されていると無菌医薬品に対するMRA締結もスムーズに進むものと期待される。

F. 研究発表

1. Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N., and Sasaki T. Identification of a site-specific tyrosine recombinase that mediates promoter inversion of phase-variable *mpl* lipoprotein genes in *Mycoplasma penetrans*. *Microbiology* 155: 1241-1249, 2009.
2. 神谷茂、蔵田訓、佐々木次雄、柳田修、跡見裕: *Helicobacter pylori* とマイコプラズマの重複感染、*Helicobacter Research* 14: 33-38, 2010.
3. 佐々木次雄: 国際調和を踏まえた無菌試験法の改正、*医薬品研究* 40: 432-441, 2009.

G. 知的所有権の取得状況

なし

【資料 1】第7章 無菌医薬品に係る製品の作業所

追加箇所は下線で、削除箇所は削除線で示している。

原案	改定案	根拠など
<p>7. 1 清浄度レベルによる作業所の分類</p> <p>無菌医薬品に係る製品の作業所は、浮遊微粒子及び微生物による汚染の程度が定められた限度内に維持されるよう管理された清浄区域であり、その作業内容により、重要区域、直接支援区域、その他の支援区域に分類される。</p> <p>一般的に各区域の清浄度レベルは、環境空気の単位体積あたりに含まれる粒径0.5μm以上の浮遊微粒子数によって表される。粒径5μm以上の浮遊微粒子の数については、必要に応じて管理項目に加えること。各区域に要求される空気の清浄度レベルを表1に示す。</p>	<p>7. 1 清浄度レベルによる作業所の分類</p> <p>無菌医薬品に係る製品の作業所は、浮遊微粒子及び微生物による汚染の程度が定められた限度内に維持されるよう管理された清浄区域であり、その作業内容により、重要区域、直接支援区域、その他の支援区域に分類される。</p> <p>一般的に各区域の清浄度レベルは、環境空気の単位体積あたりに含まれる粒径0.5μm以上の浮遊微粒子数によって表される。<u>また、粒径5μm以上の浮遊微粒子数は、定期的に測定し、傾向分析を行うことにより、環境条件の劣化を早期に発見するための有効な管理項目となる。</u>各区域に要求される空気の清浄度レベルを表1に示す。</p>	<p>EU-GMP A1 13. In Grade A and B zones、 the monitoring of the $\geq 5.0 \mu\text{m}$ particle concentration count takes on a particular significance as it is an important diagnostic tool for early detection of failure. The occasional indication of $\geq 5.0 \mu\text{m}$ particle counts may be false counts due to electronic noise、 stray light、 coincidence、 etc. However consecutive or regular counting of low levels is an indicator of a possible contamination event and should be investigated. Such events may indicate early failure of the HVAC system、 filling equipment failure or may also be diagnostic of poor practices during machine set-up and routine operation.</p>
<p>表 1</p>	<p>変更点無し</p>	
<p>7.1.1 重要区域(グレードA)</p> <p>1) 重要区域は、滅菌された製品等及び資材並びにこれらと直接接する面が環境に暴露される製造作業</p>	<p>変更点無し</p>	

原案	改定案	根拠など
<p>を行う区域である。以下の製造作業は、重要区域内において行うこと。</p>		
<p>① ろ過滅菌から一連の無菌操作法により製造される無菌医薬品に係る製品の製造作業については、無菌ろ過後、閉そくまでの全ての無菌操作</p>	<p>変更点無し</p>	
<p>② 原料段階から一連の無菌操作法により製造される無菌医薬品に係る製品の製造作業については、原料の取扱いから閉そくまでの全ての無菌操作</p>	<p>変更点無し</p>	
<p>2) 重要区域は、作業時及び非作業時ともに、空気1m³あたりに含まれる粒径0.5 μm以上の浮遊微粒子が3、520個以下であること。この空気の品質は、汎用されている現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードA、クラス100又はISO 5と称されている。</p>	<p>2) 重要区域は、作業時及び非作業時ともに、空気1m³あたりに含まれる粒径0.5 μm以上の浮遊微粒子数が3、520個以下であること。この空気の品質は、汎用されている現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードA、クラス100又はISO 5と称される<u>区分</u>に相当する。</p>	<p>表現の見直し</p>
<p>3) 重要区域への職員の介入は、最小限のものとする。</p>	<p>3) 重要区域への職員の介入は、<u>最小限</u>とすること。</p>	<p>表現の見直し</p>
<p>4) 製品の無菌性を確保する上で特に重要な箇所については、浮遊微粒子数</p>	<p>4) 製品の無菌性を確保する上で特に重要な箇所については、浮遊微粒子数</p>	<p>EU-GMP A1:9. For Grade A zones、particle monitoring</p>

原案	改定案	根拠など
<p>及び微生物について適切な方法及び頻度により監視測定を行うこと。</p>	<p>及び微生物について適切な方法及び頻度により監視測定を行うこと。 <u>浮遊微粒子数は、滅菌した接液パーツの組立て作業など重要な準備作業を含め無菌操作を行っている時間を通して連続的に測定することが望ましい。</u> <u>また、作業域にできるだけ近い位置(30cm以内が望ましい。)</u>で、測定を行うこと。 <u>微生物モニタリングの頻度と方法については、その行為自体が製品の無菌性を損なうことが無いように注意すること。</u></p>	<p>should be undertaken for the full duration of critical processing、including equipment assembly (後略) FDA無菌ガイダンス: Air in the immediate proximity of exposed sterilized containers/closures and filling/closing operations would be of appropriate particle quality when it has a per-cubic-meter particle count of no more than 3520 in a size range of 0.5 μm and larger when counted at representative locations normally not more than 1 foot away from the work site、within the airflow、and during filling/closing operations. の要件を追加。</p>
<p>5) 粉末を扱う製造作業においては、稼働時に浮遊微粒子数の規定を満足することができない場合がある。そのような場合においては、空気のサンプリング箇所を工夫する、粉末がない状態で測定を行う等の方法により、実際に汚染の原因となる微粒子のレベルを把握し、目的とする空気の品質が維持さ</p>	<p>変更点無し</p>	

原案	改定案	根拠など
<p>れていることを確認すること。</p>		
<p>7.1.2 直接支援区域(グレードB)</p> <p>1) 直接支援区域は、重要区域のバックグラウンドとして定義される。重要区域内の運転操作及び運転監視を行う職員の作業区域となる。重要区域に滅菌後の製品等及び資材を搬入する、又は重要区域から無菌製品を搬出する経路としても使用される。後者の場合においては、滅菌後の物が環境に直接暴露されることのないように適切な防護策を講じること。</p>	<p>7.1.2 直接支援区域(グレードB)</p> <p>1) 直接支援区域は、<u>クリーンルーム内に設置した開放系クリーンブースやRABSを用いて従来型の無菌操作を行う場合</u>、重要区域のバックグラウンドとして定義される。重要区域内の運転操作及び運転監視を行う職員の作業区域となる。重要区域に滅菌後の製品等及び資材を搬入する、又は重要区域から無菌製品を搬出する経路としても使用される。後者の場合においては、滅菌後の物が環境に直接暴露されることのないように適切な防護策を講じること。</p>	<p>アイソレーターや RABS の普及を踏まえた要件の明確化</p>
<p>2) 直接支援区域においては、作業時で空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の浮遊微粒子が352,000個以下、非作業時において3,520個以下であること。この空気の品質は、汎用されている現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードB、</p>	<p>2) 直接支援区域においては、作業時で空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の浮遊微粒子数が352,000個以下、非作業時において3,520個以下であること。この空気の品質は、汎用されている現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードB、</p>	<p>表現の明確化</p>

原案	改定案	根拠など
クラス10,000又はISO 7 (作業時の基準)と称されている。	クラス10,000又はISO 7 (作業時の基準)と称される <u>区分に相当する。</u>	
3) 直接支援区域においては浮遊微粒子数及び微生物について定期的に監視測定を行うこと。	3) 直接支援区域においては浮遊微粒子数及び微生物について定期的に監視測定を行うこと。 <u>その頻度と方法については、重要区域内の製品に対する汚染リスクを評価し、適切に定めること。</u>	WHO-GMP 4.7 (a) Clean rooms and clean air devices should be routinely monitored in operation and the monitoring locations based on a formal risk analysis study and the results obtained during the classification of rooms and/or clean air devices.を踏まえ、直接支援区域に限定してモニタリングに関するリスクアセスメントを要件化した。
7.1.3 その他の支援区域(グレードC及びグレードD) 1) その他の支援区域は、滅菌前の製品等及び資材が、環境に暴露される製造作業を行う区域である。無菌操作に使用する装置、器具等を洗浄する区域等からなる。	7.1.3 その他の支援区域(グレードC及びグレードD) 1) その他の支援区域は、滅菌前の製品等及び資材が、環境に暴露される製造作業を行う区域である。 <u>滅菌前の薬液の調製を行う区域や、無菌操作に使用する装置、器具等を洗浄する区域等</u> からなる。	表現の見直し
2) その他の支援区域には、そこで実施される製造作業に要求される汚染管理の程度及び当該作業の内容を勘案して適切な浮遊微粒子数の規定を設けること。	変更点無し	

原案	改定案	根拠など
<p>3) その他の支援区域に対して一般的に適用されている空気の清浄度レベルには、2つのグレードがある。一つは空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の微粒子が作業時において3、520、000個以下、非作業時において352、000個以下であることとするもので、現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードC、クラス100、000又はISO 8(作業時の基準)と称されている。もう一つは、非作業時において、空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の微粒子が3、520、000個以下であることとしたもので、グレードDと称されている。</p>	<p>3) その他の支援区域に対して一般的に適用されている空気の清浄度レベルには、2つのグレードがある。一つは空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の微粒子数が作業時において3、520、000個以下、非作業時において352、000個以下とする<u>もの</u>で、現行の国内及び国際的な空気の品質に関する基準においてグレードC、クラス100、000又はISO 8(作業時の基準)と称される<u>区分</u>に相当する。もう一つは、非作業時において、空気1m³あたりに含まれる粒径0.5μm以上の微粒子数が3、520、000個以下とする<u>もので</u>、グレードDと称される<u>区分</u>に相当する。</p>	<p>表現の明確化</p>

原案	改定案	根拠など
<p>7. 2 空調システム</p> <p>清浄区域においては、適切な空気環境状態を維持するために、適切な空調システムの設計及び管理が必要である。空調システムは、扉の開閉、製造設備の運転等製造作業に由来する短期的な変動に対してのみならず、外気条件の季節変動、設備の経年変化等の長期的な変動に対しても、常に適切に稼働する状態にあるよう維持されなければならない。</p> <p>空調システム及びその管理プログラムの基本要素には、温度、相対湿度、清浄度レベル、風量、換気回数、一方向気流、室間差圧、HEPAフィルターの完全性等が含まれる。</p>	<p>7. 2 空調システム</p> <p>清浄区域においては、適切な空気環境状態を維持するために、適切な空調システムの設計及び管理が必要である。空調システムは、扉の開閉、製造設備の運転等製造作業に由来する短期的な変動に対してのみならず、外気条件の季節変動、設備の経年変化等の長期的な変動に対しても、常に適切に稼働する状態にあるよう維持されなければならない。</p> <p>空調システム及びその管理プログラムの基本要素には、温度、相対湿度、<u>浮遊微粒子数</u>、風量、換気回数、一方向気流、室間差圧、HEPAフィルターの完全性、<u>微生物</u>等が含まれる。</p>	<p>根拠など</p> <p>清浄度レベルを浮遊微粒子数と微生物に分けて表現した。</p>
<p>7.2.1 温度及び相対湿度</p> <p>温度及び相対湿度は、作業所における職員の快適性及び微生物汚染の潜在的危険性に直接影響を及ぼすため、そのレベルを適切に設定し、管理、維持及び監視測定を行うこと。</p>	<p>7.2.1 温度及び相対湿度</p> <p>温度及び相対湿度は、作業所における職員の快適性及び微生物汚染の潜在的危険性に直接的な影響を及ぼすため、そのレベルを適切に設定し、<u>維持、管理</u>及び監視測定を行うこと。</p>	<p>表現見直し</p>
<p>7.2.2 空気</p> <p>各清浄区域の環境を維持するためには、清浄度レベルの高い区域から、隣接する清浄度レベルの低い区域へ流れる適切な気流を確保することが重要である。</p>	<p>変更点無し</p>	
<p>1) 無菌操作区域とその他の</p>	<p>変更点無し</p>	

原案	改定案	根拠など
<p>支援区域との間の室間差圧を設定し、管理及び監視を行うこと。</p>		
<p>2) 無菌操作区域とその他の支援区域との間には、室間差圧及び気流の逆転が起きないように、十分な差圧を設けること。10～15Pa又はそれ以上の差圧を維持することが望ましい。同様に、その他の支援区域内の空気の清浄度レベルの異なる区域間においても適切な差圧を設けること。</p>	<p>2) 無菌操作区域とその他の支援区域との間には、室間差圧及び気流の逆転が起きないように、十分な差圧を設けること。<u>扉を閉じた状態で</u>10～15Pa又はそれ以上の差圧を維持することが望ましい。<u>扉を開けた状態においても、無菌操作区域から外へ向かう気流が維持されることを設備の適格性確認により検証すること。</u>その他の支援区域内においても空気の清浄度レベルの異なる区域の間には、適切な差圧を設けること。</p>	<p>以下の条文を踏まえた要件の明確化。 FDA 無菌ガイダンス : IV C For example, a positive pressure differential of at least 10-15 Pascals (Pa)⁴ should be maintained between adjacent rooms of differing classification (with doors closed). When doors are open, outward airflow should be sufficient to minimize ingress of contamination, and it is critical that the time a door can remain ajar be strictly controlled (Ref. 4).</p>
<p>3) 製品の無菌性を確保する上で特に重要と考えられる差圧については、監視測定を常時行うこと。さらに、異常時に備えて警報システムを備えることが望ましい。</p>	<p>変更点無し</p>	
<p>4) 重要区域(グレードA)の気流は、一方向気流とし、浮遊微粒子を区域外へ速やかに排出できるような流速及び均一性を有すること。また、近接する直接支援区域(グレード</p>	<p>4) 重要区域(グレードA)の気流は、一方向気流とし、浮遊微粒子を区域外へ速やかに排出できるような流速及び均一性を有すること。また、近接する直接支援区域(グレード</p>	<p>各ガイダンスが推奨値を具体的に出しているの で、それらに倣った。 「特殊な適用事例」 HEPA カートや無菌 AGV を念頭に置いたものである。</p>