

が大いに期待される。

E. 結論

MALDI-TOF MS を利用した微生物の迅速同定法の確立を目的に、実験室レベルで作成した 1 剤あるいは多剤耐性菌株の識別能を検討した。その結果、MALDI-TOF MS はこれらの薬剤耐性菌を識別できる能力を有するだけではなく、ある種の薬剤に対する異なるレベルの耐性を獲得した菌株の識別も可能である可能性を見出し、この手法が日本薬局方標準菌株の品質管理に有用な方法であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 12) Muroi M, Tanamoto K.: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 255-263 (2012)
- 13) 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、エンドトキシン・自然免疫研究 **14**, pp7-10、医学図書出版 (2011)
- 14) Nakamura K, Ohtsuki T, Mori, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K, Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Res.* **94**, 89-97 (2012)

2. 学会発表

- 1) 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一：光散乱エンドトキシン測定法分析法バリデーション、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8)

- 2) 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8)
- 3) Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9)
- 4) Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (2011, 10)
- 5) 北島孝明、室井正志、山下直美、棚元憲一：ダニアレルゲンの自然免疫応答に及ぼす影響、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3)
- 6) 林原 紀明、田村 直樹、渡辺 恵、室井 正志、畑尾史彦 瀬戸泰之 棚元憲一：ミクログリア細胞における Toll-like receptor の発現及び炎症性応答、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

添付資料2

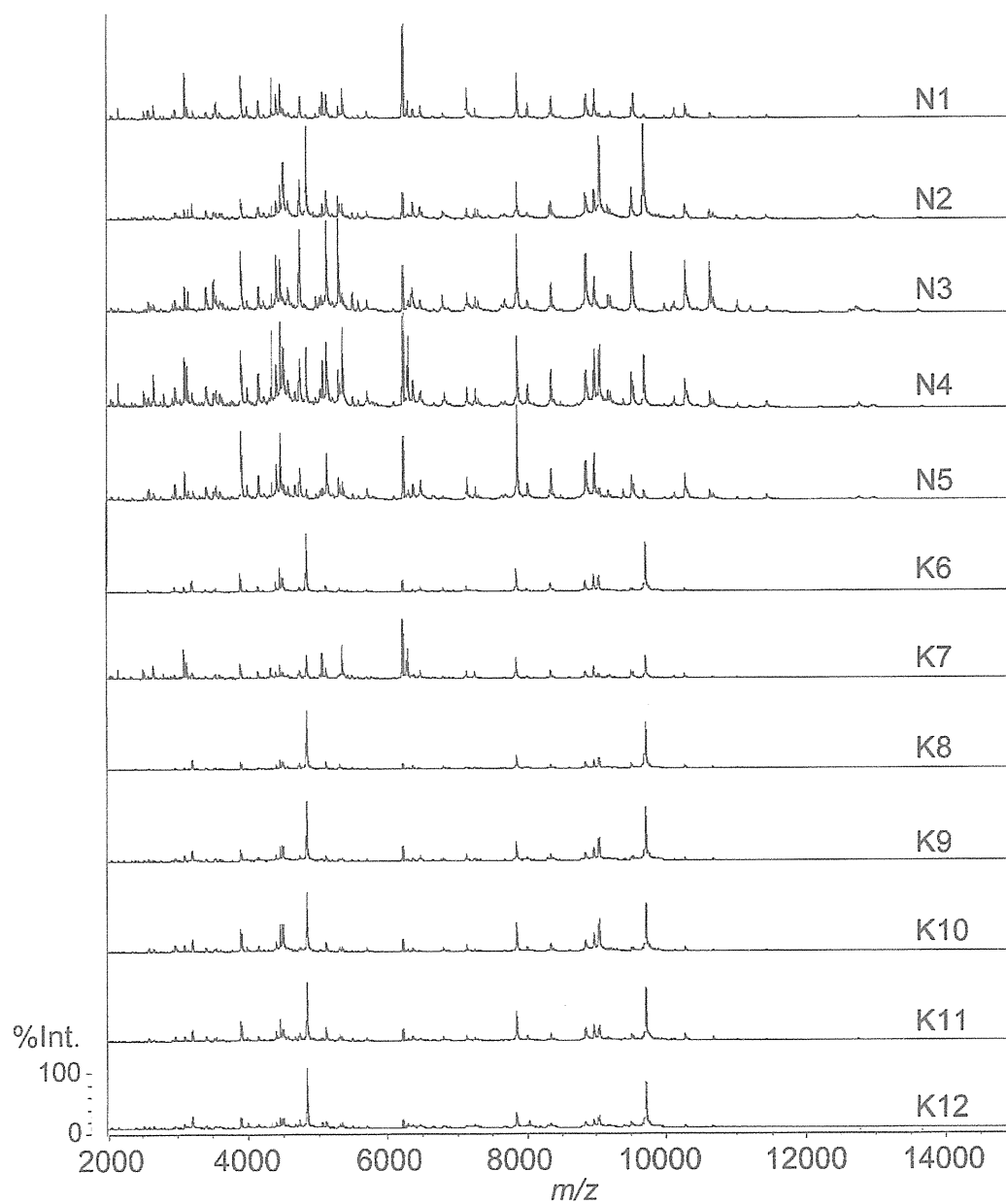


図1 *Escherichia coli* NIHJ 株 (N1) またはこれから作成した薬剤耐性株 (N2-N5) および *Escherichia coli* K-12 株 (K6) またはこれから作成した薬剤耐性株 (K7-K12) から得られた MALDI spectra。

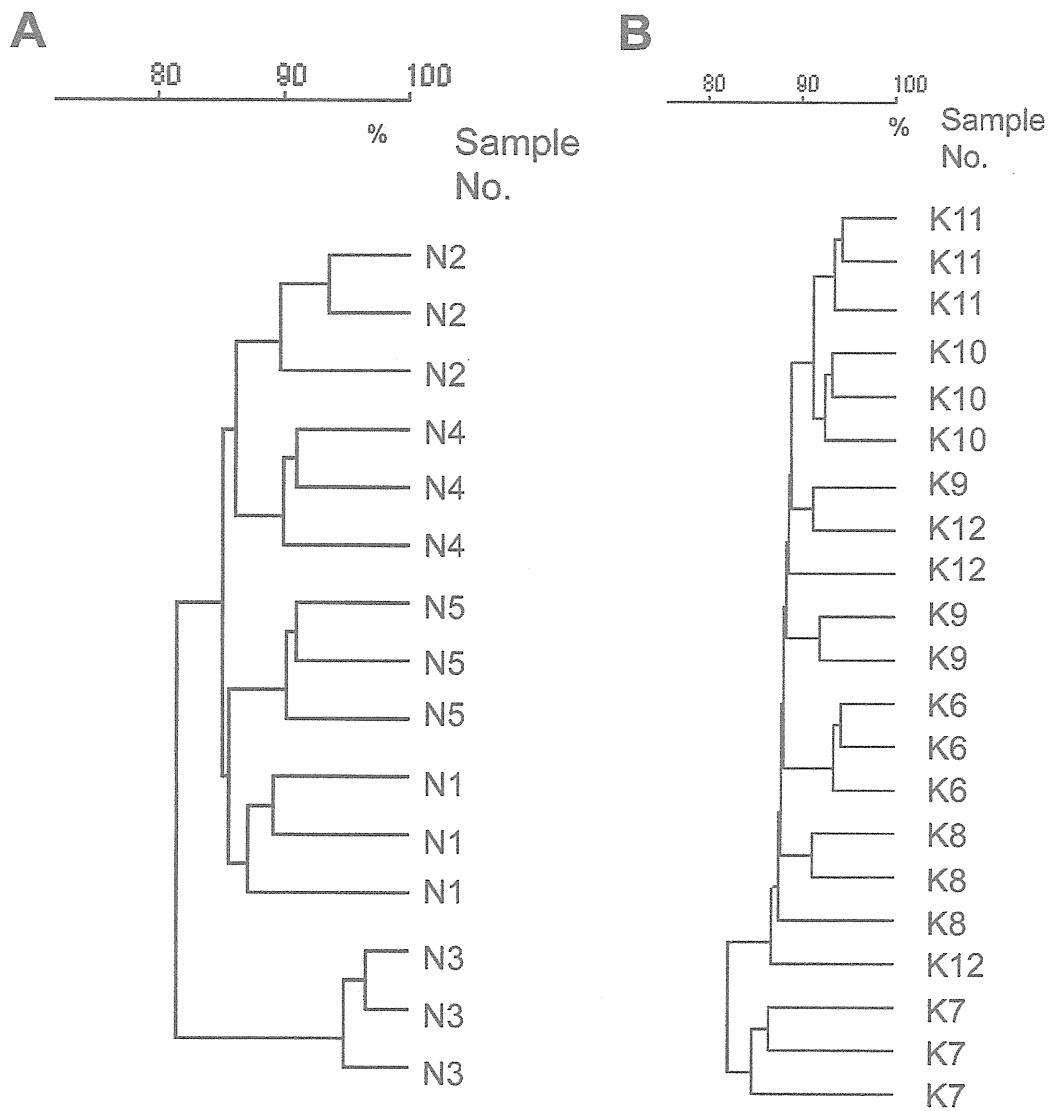


図2 *Escherichia coli* NIHJ 株 (N1) またはこれから作成した薬剤耐性株 (N2-N5) および *Escherichia coli* K-12 株 (K6) またはこれから作成した薬剤耐性株 (K7-K12) から得られた MALDI spectra の系統樹解析。

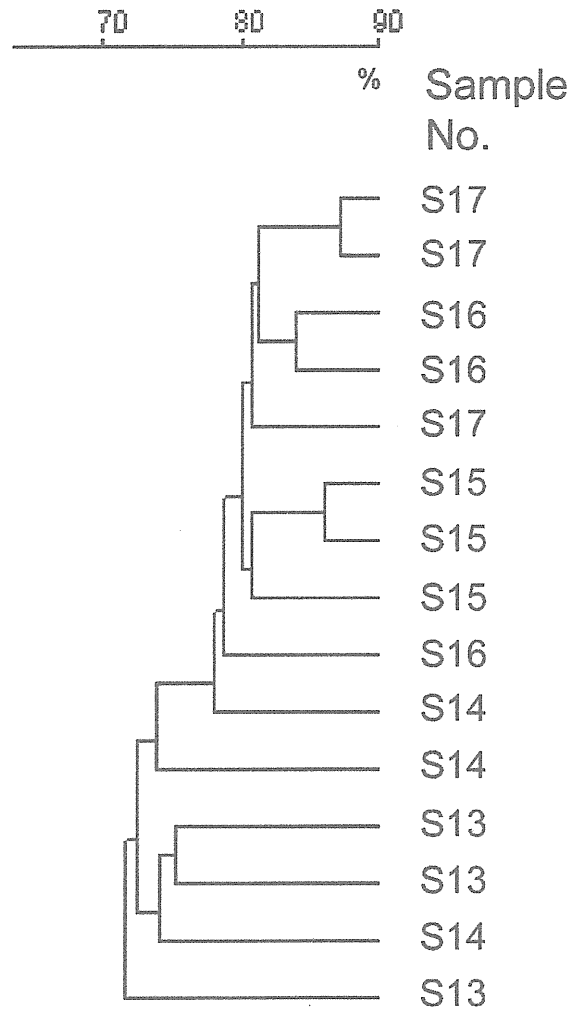


図3 *Staphylococcus aureus* Smith 株 (S13) またはこれから作成した薬剤耐性株 (S14-S17) から得られた MALDI spectra の系統樹解析。

表 1

Table 1 Antibiotic-resistant bacterial strains used in this study

Straine No.	Bacteria	Original Strain	Resistance
N1	<i>E. coli</i>	NIHJ	
N2	<i>E. coli</i>	NIHJ	Streptothricin
N3	<i>E. coli</i>	NIHJ	Tetracycline
N4	<i>E. coli</i>	NIHJ	Streptomycin
N5	<i>E. coli</i>	NIHJ	Kanamycin
K6	<i>E. coli</i>	K-12	
K7	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid
K8	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid , SM,KM,NM,SA
K9	<i>E. coli</i>	K-12	CP,TC,SM,KM,SA
K10	<i>E. coli</i>	K-12	Nalidixic acid , CP,SM,KM,NM,SA
K11	<i>E. coli</i>	K-12	Kanamycin
K12	<i>E. coli</i>	K-12	Trimethoprim
S13	<i>S. aureus</i>	Smith	
S14	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 3.12 μ g/ml
S15	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 12.5 μ g/ml
S16	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 25 μ g/ml
S17	<i>S. aureus</i>	Smith	Novobiocin 50 μ g/ml

SM: Streptomycin, KM: Kanamycin, NM: Neomycin, SA: sulfa drug, CP: Chloramphenicol, TC: Tetracycline
 *NBRC: NITE Biological Resource Center; MCRF: Microbial Chemistry Research Foundation

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュレーションサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究
－微生物の迅速検出法の確立－

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

研究要旨：第十六改正日本薬局方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、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などに対するプロトコルの確立が重要となる。そこで、非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコルの作成のために、不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物（滑沢剤）に対する染色法を検討した。

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^{1,2)}。医薬品製造用水や生薬等においても培養困難な細菌の存在が報告されてきており³⁻⁶⁾、このような細菌の計数においては、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^{7,8)}。

培養に依存しない細菌数測定法のうち、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、生菌数を測定できる方法である。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し、マイクロコロニーを形成させることにより、増殖能をもつ細菌数を測定する方法である。

これらの方法の利点としては、操作が比

較的容易であり、かつ短時間で結果を得ることができる点が挙げられる。蛍光活性染色法の染色時間は数分から約 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十六改正日本薬局方に参考情報「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。

非無菌医薬品の微生物管理として、原料、原薬、医薬品添加物、製剤などの細菌数測定および製造環境モニタリングが重要である。医薬品原料や医薬品添加物等に対しては、適切な前処理を行うことにより、蛍光活性染色法やマイクロコロニー法による生菌数測定が可能となる。

前年度は、水溶性の医薬品添加物（賦形剤）に対するプロトコールの検討を行った。今年度は前年度の成果をふまえ、非脂溶性かつ不溶性の医薬品添加物である滑沢剤に混入した細菌数を迅速測定するためのプロトコールを検討した。

B. 研究方法

1) 試料

滑沢剤として、タルクおよびステアリン酸マグネシウムを用いた。各滑沢剤をろ過滅菌水に懸濁した。

標準菌株として、*Escherichia coli* NBRC 3972 に加えて、日本薬局方の微生物限度試験の生菌数試験に用いられている指標細菌 *Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Bacillus subtilis* NBRC 3134、*Staphylococcus aureus* subsp. NBRC 13276 を用いた。各菌株を SCD 液体培地を用いて 30℃で一晩培養した。菌液をマイクロチューブにとり、遠心分離により菌体を回収した後、ろ過滅菌水で洗浄した。適当な菌量になるようにろ過滅菌水に懸濁したものを、菌懸濁液とした。この菌懸濁液を前述の滑沢剤懸濁液に添加し、試料とした。後述の前処理を行った後、蛍光染色法により添加した細菌の検出率を求め、各前処理法の有用性を評価した。

2) 蛍光染色

CFDA-DAPI 二重染色は局方収載の方法により行い、蛍光顕微鏡を用いて細菌数を測定した。試料を今回検討した各条件で前処理した後、細菌をポリカーボネートフィルター（黒色、直径 25 mm、孔径 0.2 μm）上に捕集し、蛍光染色剤を添加後、約 3 分間染色を行った。蛍光顕微鏡の紫外線励起光下で DAPI により染色された細菌数、青

色励起光下で CFDA により染色された細菌数を測定した。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 視野以上の場合には、ろ過量を増やして試料を再調製した。

C. 研究結果および考察

不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物として、まずタルクに対する蛍光活性染色法（CFDA-DAPI 二重染色法）のプロトコールを検討した。タルクは鉱物であるため、微生物が付着していることもあり、微生物汚染の問題を起こすことが多い。タルクは水のみならず、グリセリン、アルコール、酸やアルカリなどにも溶解しない脂質に富んだ微粉末である。そこで、プレろ過と洗浄による前処理法を検討した。

日本薬局方の微生物限度試験では、試料調製の初期量として試料 10 g を 100 mL の溶解・希釈液に加え、その 10 mL を試験に用いることが記されている。このため、1 g のタルクを 10 mL のろ過滅菌水に懸濁して試料液とした。しかしながら、タルクは脂質に富む微粉末であるため、水に対してぬれが悪かった。タルクと親和性が高く菌体に影響を及ぼさない溶剤として、グリセロールやジメチルスルホキシド（DMSO）が挙げられる。そこで、1% DMSO を用いてタルクの懸濁性を向上させた。すなわち、タルク 1 g を量りとり、0.1 mL の DMSO を加えろ過滅菌水 10 mL に懸濁した。懸濁液に菌液を加えて、孔径 1 μm のセルロース混合フィルターでプレろ過し、そのろ液およびフィルターの洗浄液を無菌的に回収した。洗浄は 10 mL の 1% DMSO を用いて 3 回行った。回収液（ろ液+フィルターの洗

浄液) 全量中の細菌数を DNA 結合性の蛍光染色剤 DAPI を用いた蛍光染色法により測定した。大腸菌を指標として検討した結果、表 1 に示した通り検出率は約 8% となった。また、洗浄液の組成を変えても検出率の向上は見られなかった。

表 1 1% DMSO を用いた前処理法の効果

接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
1.1×10^5	8.4×10^3	7.6

そこで次に、試料を 1/10 濃度にして (タルク 0.1 g をろ過滅菌水 10 mL に懸濁)、検討を行った。本検討にあたり、DMSO は大腸菌に対する CFDA の染色性には影響を与えないが、枯草菌やブドウ球菌に対しては CFDA の染色性を下げる傾向が認められたため、DMSO は使わないこととした。タルク 0.1 g を量りとり、ろ過滅菌水 10 mL に懸濁した後、大腸菌の菌液を加え、孔径 1 μm のセルロース混合フィルターでプレろ過し、そのろ液および洗浄液を無菌的に回収した。回収液全量中の細菌数を蛍光染色剤 DAPI を用いて測定した。洗浄液として、水、1% DMSO、0.1% ポリソルベート 80、0.1% ポリソルベート 20 を選び、その効果を評価した。なお、ポリソルベートは黒色ポリカーボネートフィルターの色素を落とすため、濃度を 0.1% で検討することとした。その結果、図 1 に示したように、0.1% ポリソルベート 20 を用いて 3 回洗浄することにより、添加した大腸菌に対して 85% 以上の良好な検出率が得られた。

回収率 (%)

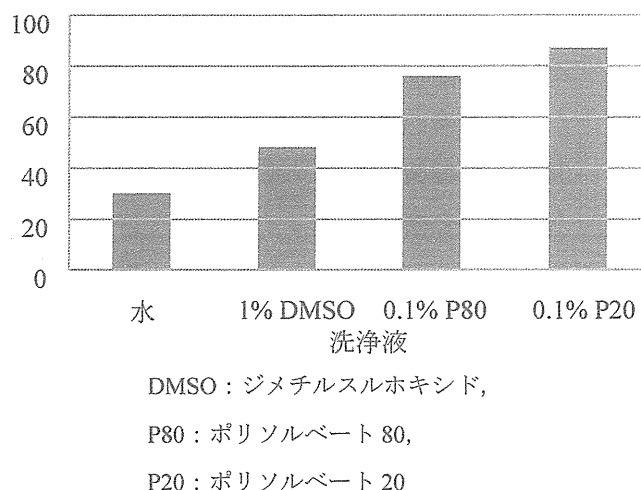


図 1. 洗浄液の検討

表 2 ポリソルベート 20 を用いた前処理法の効果 (指標菌 : 大腸菌)

ポリソルベート 20 の濃度 (%)	接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
0.01	1.2×10^6	6.5×10^5	54
0.05	1.2×10^6	1.3×10^6	108
0.1	1.2×10^6	8.6×10^5	72

次に、洗浄液としてポリソルベート 20 の濃度を決定するため、大腸菌を指標菌とし、CFDA-DAPI 二重染色法により細菌数の測定を行った (表 2)。前述のとおり、ポリソルベート 20 は黒色ポリカーボネートフィルターの色素を溶かすため、蛍光顕微鏡での観察時にバックグラウンドが高くなる。このため、ろ過に用いたフィルターをスライドガラス上に置く際に、新しい黒色フィルターを下に重ねて置くことで、顕微鏡観察時のバックグラウンドを抑えることができた。この方法を用いて、フィルターの洗浄液におけるポリソルベート 20 の濃度を

0.01%、0.05%、0.1%としてCFDA-DAPI二重染色による検出率を求めたところ、表2に示したとおり0.05%で良好な検出率が得られた。

この結果から、蛍光活性染色法によるタルク中の生菌数測定法を以下のように決定した：「タルク1gをろ過滅菌水100mLに懸濁し、その10mLを1µmのセルロース混合フィルターを用いてろ過し、フィルター上に残存するタルクを10mLの0.05%ポリソルベート20で3回洗浄する。回収したろ液および洗浄液について、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定する。」

次に、日本薬局方の微生物限度試験法に記載されている指標菌3種を用いて、決定した方法での指標菌の検出率を求めた(表3)。その結果、いずれの細菌においても86%以上の良好な検出率が得られた。

表3 0.05%ポリソルベート20を用いた前処理法の効果(指標菌：日本薬局方の微生物限度試験法に記載されている標準株)

指標菌	接種菌数 (cells)	検出菌数 (cells)	検出率 (%)
黄色ブドウ球菌	1.4x10 ⁶	1.2x10 ⁶	86
緑膿菌	2.1x10 ⁵	2.5x10 ⁵	119
枯草菌	9.8x10 ⁵	8.6x10 ⁵	88

さらに、他の不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物であるステアリン酸マグネシウムについても検討したところ、同様のプロトコールにより、混入した細菌数を測定可能であることがわかった。

また、軟膏基剤である白色ワセリンについても検討したところ、ミリスチン酸イソ

プロピルの添加により、ろ過が可能となることがわかった。

D. 結論

今回の研究では、不溶性かつ非脂溶性の医薬品添加物として、滑沢剤であるタルクおよびステアリン酸マグネシウムを選び、混入した細菌数を蛍光活性染色法(CFDA-DAPI二重染色法)により迅速に測定するためのプロトコールを決定した。

なお、今回の研究では、十六改正日本薬局方に参考情報「蛍光染色による細菌数の迅速測定法」として記載された手法のうち、蛍光活性染色法について、検討を行った。本研究で検討した前処理法は、蛍光活性染色法だけではなく、マイクロコロニー法にも応用可能であると考えられる。

本研究の成果をもとに、今後、同様の検討を様々な医薬品原料や原薬、医薬品添加物、製剤に対して行うことにより、医薬品に対する迅速かつ高精度な生菌数測定が可能になり、ヨーロッパ薬局方、米国薬局方に対して、日本からの新たな微生物試験法に関する情報発信を行うことが可能になるものと考えられる。

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. 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)
8. 佐々木次雄、棚元憲一、川村邦夫編：新 GMP 微生物試験法。 *じほう* (2008)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュレーションサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

日本版「最終滅菌法指針」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：秋元 雅裕 東レ株式会社
岩間 孝樹 ニプロファーマ株式会社
宇田川剛志 テルモ株式会社
浦山由巳 千代田化工建設株式会社
太田正人 澁谷工業株式会社
佐々木公一 エーザイ株式会社
佐藤良成 ラジエ工業株式会社
白木澤治 ファルマ・ソリューションズ株式会社
須藤 浩孝 アステラス製薬株式会社
染谷 拓 スリーエムヘルスケア株式会社
原 芳明 ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社
藤古 真人 株式会社大塚製薬工場
高井克也 味の素製薬株式会社
西岡吾朗 扶桑薬品工業株式会社
葭原 鶴二 塩野義製薬株式会社

（医薬品医療機器総合機構）

齊藤幸夫，櫻井信豪，鈴木 祥悟，鷺見裕，鳴瀬諒子，川中真奈

研究要旨：平成19年6月4日、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」班で作成した、“最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針”が監視指導・麻薬対策課より地方庁に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、また規制当局にとってはGMP調査時の参考資料として活用されてきた。今回、本指針の改正作業を行った。日本はPIC/S加盟を目指していることもあり、PIC/SのAnnex 1 (Manufacture of sterile medicinal products)との整合性を図りながら改訂作業にあたってきた。また、JIS化された滅菌法関連ISO規格も参考にし、可能な限り、国際的整合性を図りつつ改正した。計6回の班会議における議論と、日薬連品質委員会を通じ、日薬連傘下団体からいただいたコメントについて検討を加え研究班案を作成した。今回の改正作業にあたって、一番の議論は輸液製剤（低Fo滅菌医薬品）の取扱いであった。監視指導麻薬対策課の指導もあり、輸液製剤に対する滅菌要件を更に詰めてから事務連絡として発出することになった。そのため、研究班活動は平成23年度で終了したが、更に数ヶ月をかけて業界の合意を得ることになった。

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、「監麻課」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。両指針ともに監麻課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してきた。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、PIC/S加

盟を目指していることもあり、今回の改訂版を医薬品医療機器総合機構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したい。

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6名、民間企業から15名で構成されている。民間企業関係者15名中、3名はISO/TC 198（ヘルスケア製品の滅菌及び無菌性保証）に関する国際規格作成（乾熱滅菌、照射滅菌、バイオリジカルインジケータ）の日本代表委員であり、6名は輸液製剤メーカーからの代表委員である。また3名とPMDA職員6名は、平成23年4月20日に監麻課より事務連絡として発出された「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22年11月19日に第1回班会議を開催し、平成23年12月9日の第6回班会議まで計6回の班会議を開

催した。またパブコメを日薬連品質委員会に求め、日薬連傘下団体から 185 の有意義なコメントをいただいた。コメントの多くを反映させ、研究班としての最終案とした。

C. 研究結果

監麻課より平成 19 年 6 月 4 日付けで事務連絡として発出された初版「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針」は、本体 1 1 章に付属資料として、放射線滅菌と高周波滅菌があったが、今回の改正版では本体 1 2 章に参考資料として、パラメトリックリリース、低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証、バイオバーデン試験、滅菌条件設計法を組み入れた。特に「低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証」は、121℃で滅菌のできない輸液製剤の滅菌及び無菌性保証を示しており、欧米の規制とは異なるため、多くの議論がなされた。欧米では、 $Fo < 8$ の滅菌を認めていないが、日本では 80%の輸液製剤が $Fo < 2$ で製造されている。日本の PIC/S 加盟申請もあり、 $Fo < 2$ の滅菌条件についての議論に多くの時間を費やした。その結果、製造環境の清浄度及びバイオバーデン管理を厳しくすることができた。

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年間の研究班活動の第1年度～2年度で「無菌操作法指針」の見直し、第2年度～3年度で「最終滅菌法指針」の見直しを行った。「無菌操作法指針」は、監麻課からの発出後、医薬品医療機器総合機構のホームページに英訳版と併せて掲載している。研究班活動が終了した平成 24 年度に入ってから、監麻課からの指導により、「低 Fo 最終滅菌製

剤の無菌性保証」の業界合意のための作業が続いている。平成 24 年 4 月より 3～6 ヶ月間で業界意見を取り纏め、再度、日薬連品質委員会を通じ、日薬連傘下団体の意見を伺った上で、監麻課に提出予定である。

E. 結論

今回の「最終滅菌法指針」の改正は、「パラメトリックリリース」や「低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証」など、わが国としては革新的な内容を含んでいる。とりわけ、オーバーキル滅菌医薬品に対しては、医療機器同様（滅菌バリデーション基準、平成 23 年 3 月 30 日、薬食監麻発）、パラメトリックリリースを半ば強制化しなければならないと考える。そのための方策を今後検討すべきである。本研究成果により、作成された指針が発出された後には、既承認医薬品の低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証については、本指針を参考に GMP 調査で確認できるし、新規に最終滅菌法を適用する医薬品の滅菌条件については審査部門が判断できる基準を提供することができると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shigeo Kojima, Satoshi Okada, Tsuguo Sasaki, Tetsuya Oba, Akihiko Fujise, Kumiko Kusuyama: Reliability Study for Membrane-Processed Water for Injection (WFI). PDA J. of GMP and Validation in Japan, 13, 47-55 (2011)
- 2) 佐々木次雄：第3節ワクチン製造所における微生物管理試験、ワクチンの市場動向と開発・製造実務集、pp1-32、技術情報協会 (2012)

- 3) 佐々木次雄：第4節ワクチン製造所への
GMP 査察、ワクチンの市場動向と開発・
製造実務集、pp1-25、技術情報協会（2012）

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成23年度厚生労働科学研究(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) 医薬品の微生物学的品質確保のための新規試験法導入に関する研究

主任研究者: 室井正志(武蔵野大学薬学部, 環境衛生学)

最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針(案)

● 「最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針」作成班 ●

分担研究者:

佐々木次雄 (医薬品医療機器総合機構)

協力研究者:

秋元 雅裕 (東レ株式会社)
岩間 孝樹 (ニプロファーマ株式会社)
宇田川剛志 (テルモ株式会社)
浦山由巳 (千代田化工建設株式会社)
太田正人 (澁谷工業株式会社)
佐々木公一 (エーザイ株式会社)
佐藤良成 (ラジエ工業株式会社)
白木澤治 (ファルマ・ソリューションズ株式会社)
須藤 浩孝 (アステラス製薬株式会社)
染谷 拓 (スリーエムヘルスケア株式会社)
原 芳明 (ザルトリウス・ステディム・ジャパン株式会社)
藤古 真人 (株式会社大塚製薬工場)
高井克也 (味の素製薬株式会社)
西岡吾朗 (扶桑薬品工業株式会社)
葭原 鶴二 (塩野義製薬株式会社)

(医薬品医療機器総合機構, 品質管理部)

齊藤幸夫, 櫻井信豪, 鈴木 祥悟, 鷺見裕, 鳴瀬諒子, 川中真奈

目 次

1. 序論.....	35
2. 用語定義又は説明.....	35
3. 品質システム.....	40
4. 職員.....	43
5. 建物及び施設.....	46
6. 最終滅菌法による医薬品の製造区域.....	48
7. 無菌医薬品製造区域の清掃及び消毒.....	50
8. 環境モニタリング.....	52
9. 原料並びに容器及び栓の管理.....	56
10. ろ過, 充てん・閉そく工程.....	57
11. 湿熱滅菌工程.....	58
12. 放射線滅菌 (ガンマ線, 電子線).....	66

参考情報

A 1. パラメトリックリリース.....	70
A 2. 低 Fo 最終滅菌製剤の無菌性保証.....	74
A 3. バイオバーデン試験.....	76
A 4. 滅菌条件設計法	

1. 序論

本指針は、無菌医薬品に係る製品の製造業者及び薬事監視員に最終滅菌法で製造される無菌医薬品の無菌性保証に関する基本的な考え方及び製造管理のあり方を示し、無菌医薬品の品質を確保することを目的とする。

本指針の要件は原則として注射剤を対象として記述したものであるが、他の最終滅菌製剤にも適用できる多くの共通事項を含んでいる。なお、医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令(平成16年厚生労働省令第179号)(以下、「GMP 省令」という)、規制当局からの通知等による要求事項以外は、本指針と同等以上の、又は合理的な根拠に基づく他の方法により製品の品質が確保される場合においては、一律に本指針に示す方法の適用を求めるものではない。

2. 用語定義又は説明

2.1 運転サイクル(operating cycle): 自動制御装置によって規制された順序に従って実施されるプロセスの完全な組み合わせ。

2.2 運転時適格性評価(OQ: operational qualification): 据付け又は改良した設備、システム又は装置が、予期した運転範囲で意図したように作動することを確認し文書化すること。

2.3 エンドトキシン(endotoxin): グラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖であり、発熱活性をはじめ多彩な生物活性を有する。

2.4 オーバーキル滅菌(overkill sterilization): 滅菌対象物上に存在するバイオバーデンや検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条件において滅菌を行うことをいう。通例、D値が1.0以上のバイオロジカルインジケータを用い、指標菌を10の12乗以上減少させるに等しい滅菌条件をいう。

2.5 稼働性能適格性評価(PQ: performance qualification): 相互に関連する設備、システム又は装置が、承認された製造方法及び規格に基づき、効果的かつ再現性よく機能し得ることを確認し文書化すること。

2.6 環境モニタリングプログラム(environmental monitoring program): 作業所の環境の悪化を事前に把握することにより製品の品質に悪影響が及ぶことを防止すること、及び適切な清浄度レベルの管理により高度に無菌性が保証された無菌医薬品に係る製品の製造を行うことを目的として、製造空間又は設備及び作業衣類等の表面を要求される清浄度レベルに保持するために必要なあらゆる事項について計画を策定し、実施することをいう。

- 2.7 空気の清浄度レベル(cleanliness level):作業所の空気の品質を 1m^3 あたりに含まれる粒径 $0.5\ \mu\text{m}$ 以上の微粒子数の最大許容値によって規定したものをいう。グレードAからグレードDまでの4段階からなる。
- 2.8 警報基準値(alert level):モニタリング対象物の数(微生物の場合は必要に応じて種)に対して設定した基準で、予知される問題点を早期に警告する値をいう。
- 2.9 ケミカルインジケータ(CI: chemical indicator):滅菌工程の管理に、又はその指標として使用されるものであって、滅菌工程に曝露することにより生じる化学的又は物理的な変化を利用して、あらかじめ定められた一つ又は複数の滅菌工程に係るパラメータの変化を評価するものをいう。
- 2.10 校正(calibration):一定の条件下で、機器あるいは測定システム(特に秤量においては)、記録機器、及び制御器により示される値あるいは測定で得られた値とそれに対応する適正な標準器の既知の値との相関を確立する一連の操作をいう。予め測定結果の許容範囲を定めておくこと。
- 2.11 工程パラメータ(process parameter):工程の変動要因を特定する数値をいう。
- 2.12 最終滅菌法(terminal sterilization):滅菌される物が最終容器又は包装に収められた状態において行い、当該滅菌後の微生物の死滅を定量的に測定又は推測できるような滅菌をいう。通例、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条件において行う。
- 2.13 参照負荷(dummy load or reference load):滅菌の達成を確認するために製品の代わりに滅菌工程に供される試験用の模倣品。
- 2.14 システム(system):行動と技術の両者が相互に協調して一つの組織体となったものをいう。
- 2.15 充てん・閉そく区域(filling and closure area):充てん・閉そく工程において、容器、原料、中間製品などが、環境に曝露される製造作業区域である。この操作には製品容器へのパーツの組み立て、接続も含む。充てん・閉そく区域は、さらに重要区域と直接支援区域とに分けられる。
- 2.16 重要区域(critical area):重要操作区域(critical processing area)ともいう。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曝露される製造作業を行う限定された区

域をいう。空気の清浄度レベルは、適用する滅菌条件によりグレードAまたはC以上とする。ただし、最終滅菌法を適用する場合には、必ずしも滅菌された製品や資材等を使用しないこともある。

2.17 重要パラメータ(critical parameters):本指針においては、適用される滅菌工程に必須であるパラメータを意味し、モニタリングが要求される。

2.18 仕様(specification):詳細な要求事項を規定する承認された文書。

2.19 処置基準値(action level):測定対象物の数(測定対象が微生物である場合においては必要に応じてその種)に対して設定した基準値であって、この値に達した場合においては直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置を採るべきものをいう。

2.20 消毒(disinfection):対象物に付着した微生物を安全なレベルまで減少させ又は除去すること。

2.21 清浄区域(clean area):あらかじめ定められた微粒子及び微生物に係る清浄度レベルの基準を有し、異物汚染及び微生物汚染の防止が図られている区域をいう。本指針においては、「清浄区域」を「無菌医薬品に係る製品の作業所」と同意語的に使っている。

2.22 製造(manufacture):原材料の調達から加工、包装を経て最終製品として完了するまでの、医薬品の製造に係る全ての作業をいう。

2.23 製造業者(manufacturer):製造工程のうちの一工程でも実施する組織をいう。

2.24 製造区域(processing area):培養、抽出・精製、原料秤量、容器・栓等の洗浄・乾燥、滅菌、薬剤の調製・充てん作業、閉そく、包装等の作業を行う場所、及び更衣を行う場所をいう。

2.25 製品(product):原料、中間製品、最終製品を含む医薬品の総称。

2.26 載荷形態(loading pattern):滅菌に供する製品の滅菌槽内での架台、数、型、配置、方向について規定した組み合わせ。

2.27 設計時適格性評価(DQ: design qualification):設備、システム又は装置の設計が、目的とする用途に適切であることを確認し文書化すること。

- 2.28 設備据付時適格性評価(IQ: installation qualification):据付け又は改良した設備, システム又は装置が, 承認を受けた設計及び製造業者の推奨と整合することを確認し文書化すること.
- 2.29 設備据付時適格性評価(IQ: installation qualification):据付け又は改良した設備, システム又は装置が, 承認を受けた設計及び製造業者の推奨と整合することを確認し文書化すること.
- 2.30 洗浄(cleaning):水, 洗剤などを用いて次の工程あるいは意図する使用に必要な程度まで対象物から汚染を除去すること.
- 2.31 線量計(dosimeter):与えられた物質中の吸収線量を測定するための機器で, 放射線に応答し, 測定可能で再現性のある機器.
- 2.32 線量測定システム(dosimetry system):線量計, 測定機器及びそれらに関連する参照標準並びにシステムの仕様手順からなる吸収線量を決定するためのシステム.
- 2.33 線量分布(dose mapping):選定された条件下で照射された物質中の線量の分布及び変動を測定すること.
- 2.34 その他の支援区域(indirect support areas):滅菌前の製品等及び資材が環境に曝露される製造作業を行う区域をいう. 製造に使用する器具, 装置等を洗浄する区域等からなる.
- 2.35 直接支援区域 (direct support area):重要区域に隣接又は取り囲む区域をいう. 空気の清浄度レベルは, グレード B(重要区域をグレードAで管理する場合)またはCが適用される.
- 2.36 ドジメトリックリリース(dosimetric release):パラメトリックリリースの一種で放射線滅菌における線量計の測定結果のみに基づいて製品の無菌性を保証し出荷判定を行うこと.
- 2.37 バイオバーデン(bioburden):滅菌前の原料及び資材等に生存する微生物の数と種類をいう.
- 2.38 バイオロジカルインジケータ(BI: biological indicator):滅菌工程の管理に, 又はその指標として使用されるものであって, 一定の条件下において, 特定の滅菌工程に対して既知の抵抗性を示すものをいう.