

表 1-6-6 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	医薬品注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
51	注射用セフェピム塩酸塩	50 mg/mL	0.06 EU/mg(力価)	8	16	4	32	8	
				480	600	480	600	384	
52	セフォゾプラン塩酸塩		0.05 EU/mg(力価)						入手不可
53	注射用セフォゾプラン塩酸塩	100 mg/mL	0.05 EU/mg(力価)	16	64	8	128	16	
				800	1000	800	1000	640	
54	注射用セフォチアム塩酸塩	83.3 mg/mL	0.125 EU/mg	16	16	8	64	32	
				1667	2083	1667	2083	1333	
55	注射用セフタジジム	200 mg/mL	0.067 EU/mg(力価)	32	64	8	64	16	
				2144	2680	2144	2680	1715	
56	セフピロム硫酸塩	50 mg/mL	0.10 EU/mg	16	32	8	32	8	
				800	1000	800	1000	640	
57	注射用セフメタゾールナトリウム	400 mg/mL	0.06 EU/mg	32	32	64	64	64	
				3840	4800	3840	4800	3072	
58	セルモロイキン (遺伝子組換え)	40 万単位/mL	100 EU/mL	1	2*	1	64	2	
				16000	20000	16000	20000	12800	
59	タゾバクタム ^{a)}	450 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	128	128	64	64	128	
				2880	3600	2880	3600	2304	
60	炭酸水素ナトリウム注射液	0.7 mg/mL	5.0 EU/mEq	4	4	4	8	8	
				560	700	560	700	448	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) 参考：注射用タゾバクタムナトリウム・ピペラシリンナトリウム

表 I-6-7 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
61	注射用チアミラールナトリウム	25 mg/mL	1.0 EU/mg	32	16	16	16	16	
				4000	5000	4000	5000	3200	
62	チアミン塩化物塩酸塩注射液	50 mg/mL	6.0 EU/mg	8	16*	4	128	32	
				48000	60000	48000	60000	38400	
63	注射用チオペンタールナトリウム	25 mg/mL	0.30 EU/mg	32	16	16	128	32	
				1200	1500	1200	1500	960	
64	チオ硫酸ナトリウム水和物	100 mg/mL	0.01 EU/mg	8	16	2	32	4	
				160	200	160	200	128	
65	テイコプラニン注射用	66.7 mg/mL	0.75 EU/mg(力価)	512	1024*	512	512	256	
				8000	10000	8000	10000	6400	
66	デキストラン 40	0.1 g/mL	2.5 EU/g	1	2	1	4	4	
				40	50	40	50	32	
67	デキストラン 40 注射液 ^{a)}	100 mg/mL	0.50 EU/mL	1	1	1	64	4	
				80	100	80	100	64	
68	デスラノシド注射液	0.2 mg/mL	500 EU/mg	4	8	4	2	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
69	テセロイキン(遺伝子組換え)		5 EU/たん白質 1mg						入手不可
70	注射用テセロイキン(遺伝子組換え)	35 万単位/mL	5 EU/35 万単位	2	2	2	8	2	
				28000	35000	28000	35000	22400	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) 低分子デキストラン加乳酸リンゲル液

表 1-6-8 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
71	デヒドロコール酸注射液	100 mg/mL	0.30 EU/mg	64	64	32	32	64	
				4800	6000	4800	6000	3840	
72	注射用ドキシソルピシン塩酸塩	10 mg/mL	2.50 EU/mg(力価)	256	128*	32	32	64	
				4000	5000	4000	5000	3200	
73	ドパミン塩酸塩注射液	20 mg/mL	4.2 EU/mg	8	4	2	4	4	
				13440	16800	13440	16800	10752	
74	トブラマイシン注射液	60 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	32	32*	4	512	8	
				4800	6000	4800	6000	3840	
75	トラネキサム酸注射液	50 mg/mL	0.12 EU/mg	2	4	2	2	2	
				960	1200	960	1200	768	
76	ニカルジピン塩酸塩注射液	1 mg/mL	8.33 EU/mg	16	16	16	8	8	
				1333	1666	1333	1666	1066	
77	ニコチン酸注射液	50 mg/mL	3.0 EU/mg	8	8	8	16	16	
				24000	30000	24000	30000	19200	
78	ネオスチグミンメチル硫酸塩注射液	0.5 mg/mL	5 EU/mg	1	1	1	2	1	
				400	500	400	500	320	
79	ノルアドレナリン注射液	1 mg/mL	300 EU/mg	2	2	2	4	4	
				48000	60000	48000	60000	38400	
80	精製白糖	100 mg/mL	0.25 EU/mg	2	1	8 ^{a)}	1	1	
				4000	5000	4000	5000	3200	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

a) サンプルが Et 汚染されていたため、検量範囲内測定が可能となるまで希釈 (実際の NID より大きい)

表 1-6-9 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
81	バソプレシン注射液	20 単位/mL	15 EU/バソプレシン	4	32	4	32	4	
				48000	60000	48000	60000	38400	
82	パニペネム	25 mg/mL	0.15 EU/mg(力価)	16	16	8	8	8	
				600	750	600	750	480	
83	パパベリン塩酸塩注射液	40 mg/mL	6.0 EU/mg	256	1024	64	128	64	
				38400	48000	38400	48000	30720	
84	注射用バンコマイシン塩酸塩	100 mg/mL	0.25 EU/mg	128	512	64	128	128	
				4000	5000	4000	5000	3200	
85	注射用ヒドララジン塩酸塩	20 mg/mL	5.0 EU/mg	16	16*	8	32	16	
				16000	20000	16000	20000	12800	
86	ピペラシリン水和物		0.07 EU/mg(力価)						入手不可
87	注射用ピペラシリンナトリウム	200 mg/mL	0.04 EU/mg(力価)	64	128	64	32	64	
				1280	1600	1280	1600	1024	
88	ピリドキシン塩酸塩注射液	10 mg/mL	3.0 EU/mg	4	8	2	128	16	
				4800	6000	4800	6000	3840	
89	注射用ビンブラスチン硫酸塩	2 mg/mL	10 EU/mg	16	32	8	8	2	
				3200	4000	3200	4000	2560	
90	ファモチジン注射液	10 mg/mL	15 EU/mg	8	16*	8	16	16	
				24000	30000	24000	30000	19200	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-10 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
91	注射用ファモチジン	10 mg/mL	15 EU/mg	4	8	2	16	8	
				24000	30000	24000	30000	19200	
92	フェノールスルホンフタレイン注射液	6 mg/mL	7.5 EU/mg	16	128*	16	64	64	
				80	100	80	100	64	
93	ブドウ糖注射液	50 %	0.50 EU/mL	16	16	8	32	4	
				80	100	80	100	64	
94	注射用プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム	10 mg/mL	2.4 EU/プレドニゾロン 1mg 対応量	16	16	16	8	32	
				3840	4800	3840	4800	3072	
95	プロカイン塩酸塩注射液	20 mg/mL	0.02 EU/mg	8	32	4	16	8	
				64	80	64	80	51	
96	プロカインアミド塩酸塩注射液	100 mg/mL	0.30 EU/mg	32	64	16	32	32	
				4800	6000	4800	6000	3840	
97	フロセミド注射液	10 mg/mL	1.25 EU/mg	4	4	8	8	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
98	プロタミン硫酸塩注射液	10 mg/mL	6.0 EU/mg	256	1024	4	4096	8	
				9600	12000	9600	12000	7680	
99	注射用フロモキシセフナトリウム	250 mg/mL	0.025 EU/mg(力価)	32	64	16	32	32	
				1000	1250	1000	1250	800	
100	ベチジン塩酸塩注射液	50 mg/mL	6.0 EU/mg	16	32*	32	64	32	
				48000	60000	48000	60000	38400	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-11 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
101	ヘパリンカルシウム	25000 単位/mL	0.003 EU/ヘパリン単位	2000	8000	32	10000	64	
				12000	15000	12000	15000	9600	
102	ヘパリンナトリウム注射液	1000 単位/mL	0.0030 EU/単位	64	128*	2	1000	2	
				480	600	480	600	384	
103	注射用ペプロマイシン硫酸塩	1 mg/mL	1.5 EU/mg(力価)	2	2	4	1	4	
				240	300	240	300	192	
104	注射用ベンジルペニシリンカリウム	100000 単位/mL	0.000125 EU/単位	8	16	8	4	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
105	注射用ホスホマイシンナトリウム	100 mg/mL	0.025 EU/mg(力価)	1	2	2	32	2	
				400	500	400	500	320	
106	注射用マイトマイシン C	2 mg/mL	10 EU/mg(力価)	2	4	2	8	2	
				3200	4000	3200	4000	2520	
107	D-マンニトール注射液	20 %	0.50 EU/mL	1	2	1	1	2	
				80	100	80	100	64	
108	注射用ミノサイクリン塩酸塩	50 mg/mL	1.25 EU/mg(力価)	2000	8000	512	2048	128	
				10000	12500	10000	12500	8000	
109	メピバカイン塩酸塩注射液	20 mg/mL	0.6 EU/mg	8	32	4	8	8	
				1920	2400	1920	2400	1536	
110	注射用メロペネム	50 mg/mL	0.12 EU/mg(力価)	16	16	8	8	16	
				960	1200	960	1200	768	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-12 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
111	モルヒネ塩酸塩注射液	10 mg/mL	1.5 EU/mg	2	4	8*	16	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
112	リドカイン注射液	20 mg/mL	1.0 EU/mg	8	32	4	8	4	
				3200	4000	3200	4000	2560	
113	リボフラビンリン酸エステルナトリウム注射液	10 mg/mL	10 EU/mg	16	8	16	32	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
114	硫酸マグネシウム注射液	60.2 mg/mL	0.09 EU/mg	8	32	1	16	2	
				867	1084	867	1084	694	
115	リンゲル液	-----	0.50 EU/mL	1	1	1	2	1	
				80	100	80	100	64	
116	リンコマイシン塩酸塩注射液	300 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	32	128	32	64	32	
				24000	30000	24000	30000	19200	
117	レバロルファン酒石酸塩注射液	1 mg/mL	150 EU/mg	2	8	2	16	2	
				24000	30000	24000	30000	19200	
118	注射用ロキサチジン酢酸エステル塩酸塩	15 mg/mL	4.0 EU/mg	4	32	2	16	4	
				9600	12000	9600	12000	7680	

109 品目を測定 (うち、ID59, 67 の 2 品目は代替品)

注射用水 (製造用水) を含む 網掛けの 8 品目は購入 (入手) 不可であったため、実施しなかった

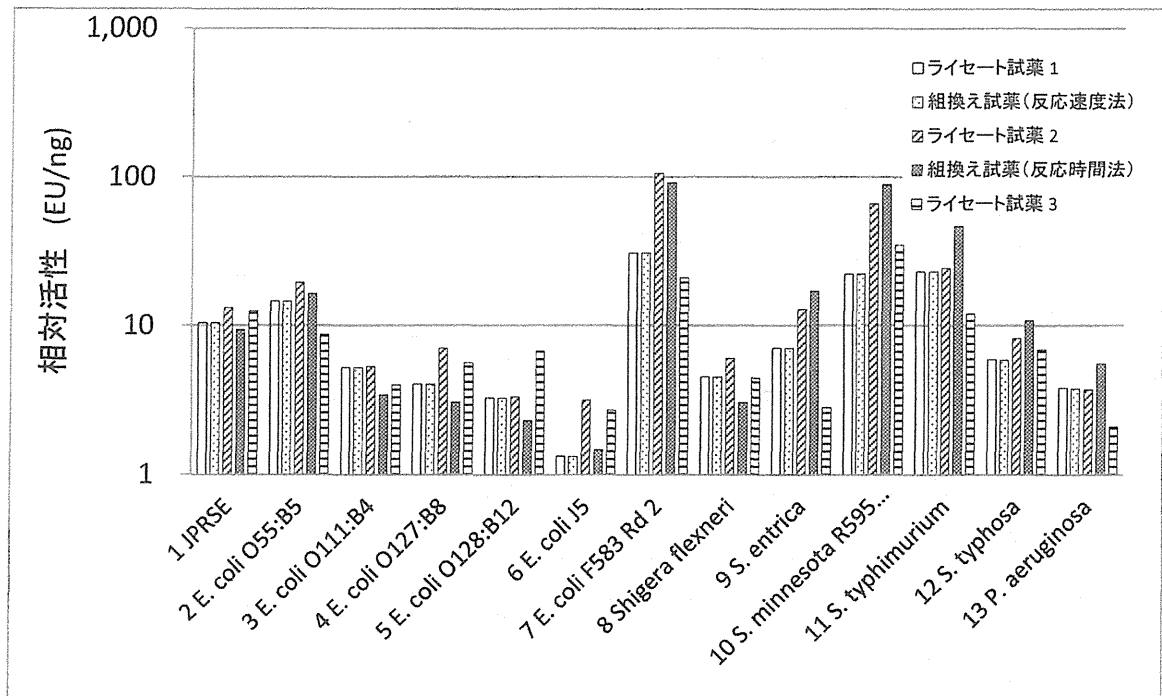


図 I-5 各種 Et の USPRSE に対する相対活性

表 I-7 組換え試薬とライセート試薬の各種 Et 相対活性の回帰分析結果

組合 わせ	x 軸	y 軸	傾き			y 切片			相関 係数
			傾き	95%信頼限界		y 切片	95%信頼限界		
				下限	上限		下限	上限	
A	L1	組換え試薬 反応 速度法	0.958	0.717	1.199	0.153	-0.046	0.353	0.935
B	L2		0.768	0.570	0.965	0.057	-0.168	0.283	0.932
C	L3		0.895	0.470	1.321	0.113	-0.272	0.498	0.813
D	L1	組換え試薬 反応 時間法	1.433	1.044	1.822	0.150	-0.395	0.248	0.926
E	L2		1.177	0.912	1.443	-0.297	-0.552	0.056	0.947
F	L3		1.259	0.537	1.981	0.384	-0.719	0.586	0.757
G	L1	L2	1.202	0.985	1.418	0.161	-0.019	0.339	0.965
H	L1	L3	0.852	0.604	1.100	0.206	0.000	0.411	0.916
I	L2	L3	0.626	0.355	0.897	0.180	-0.130	0.490	0.837

ライセート試薬を L と表記する。

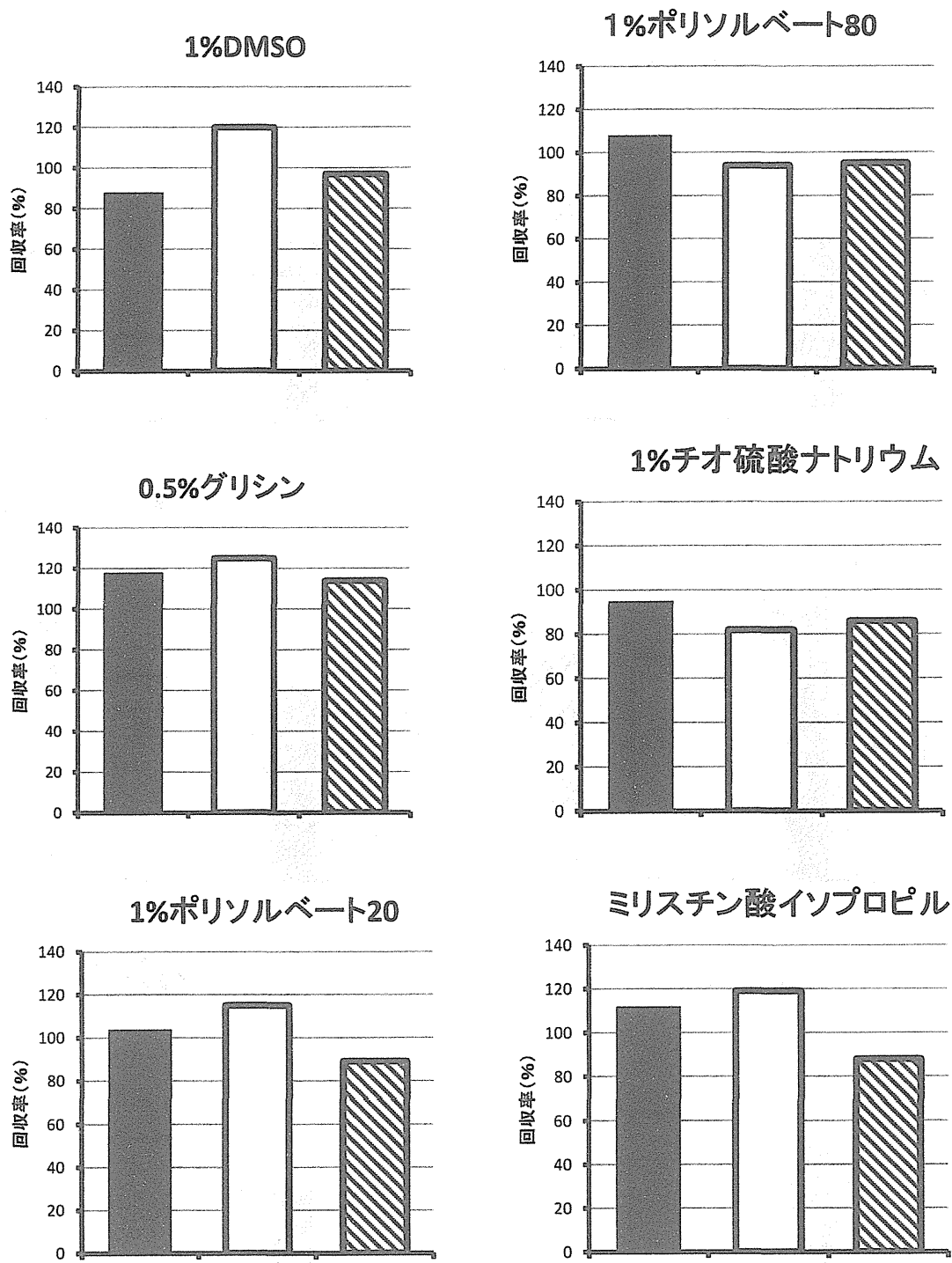


図 II-1 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 DAPI の染色性への影響

■ *S. aureus* □ *B. subtilis* ▨ *E. coli*

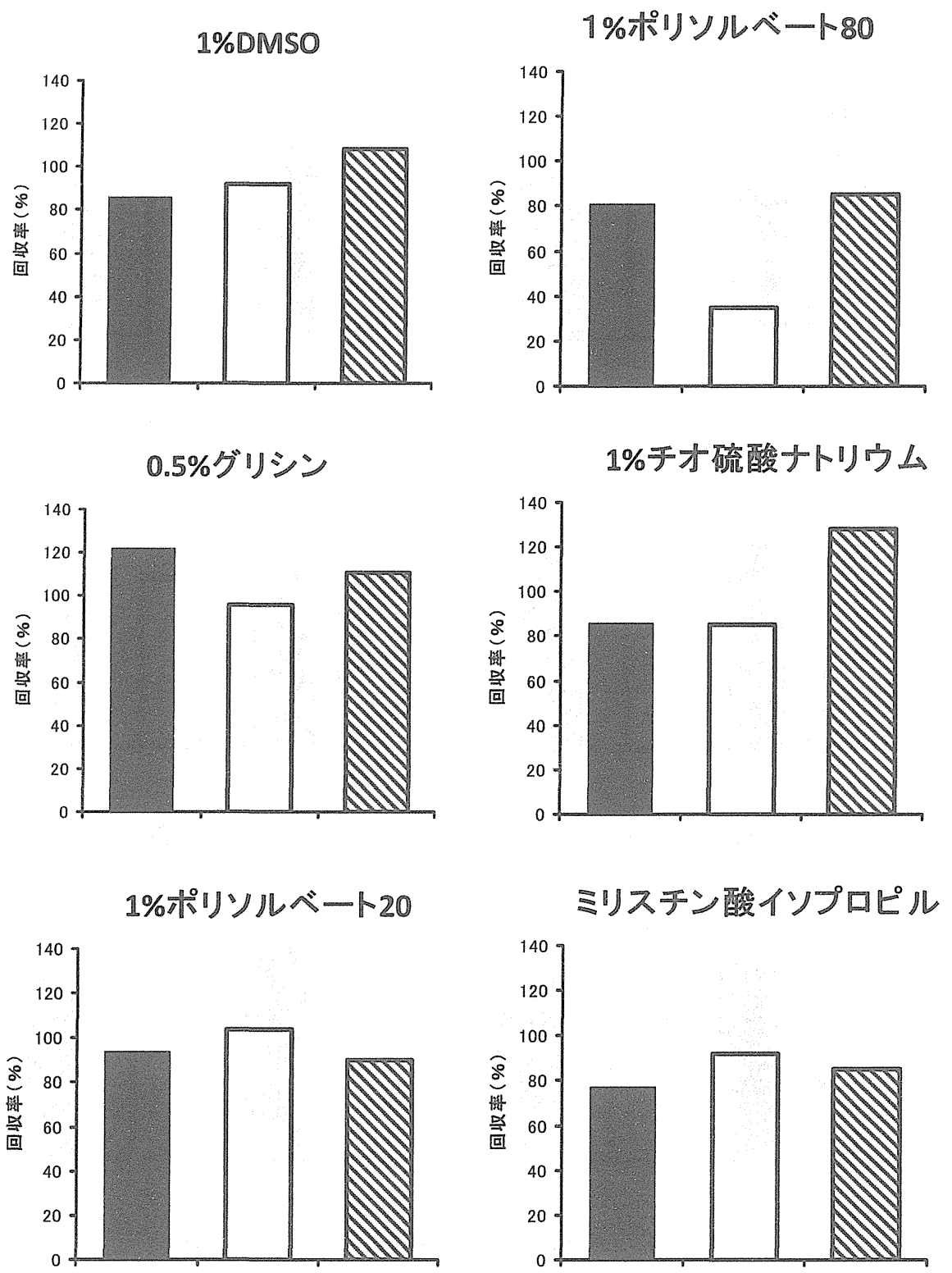


図 II-2 各溶解剤や中和剤の蛍光染色剤 CFDA の染色性への影響

■ *S. aureus* □ *B. subtilis* ▨ *E. coli*

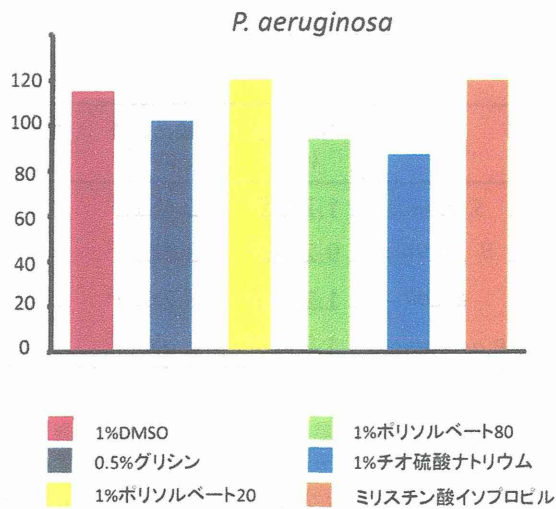


図 II-3. 各中和剤・溶解剤が DAPI 染色に与える影響

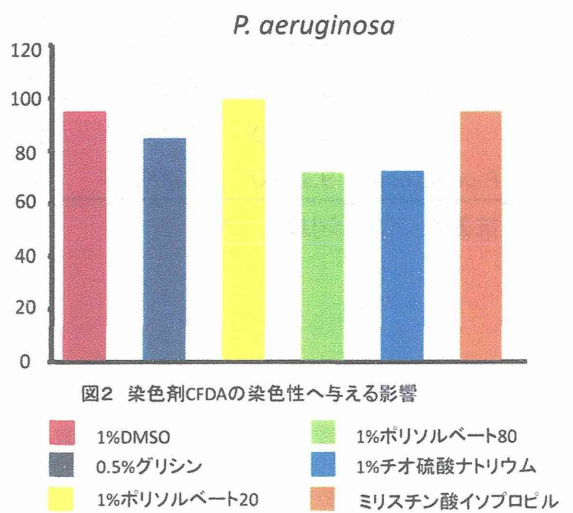


図2 染色剤CFDAの染色性へ与える影響

図 II-4. 各中和剤・溶解剤が CFDA 染色に与える影響

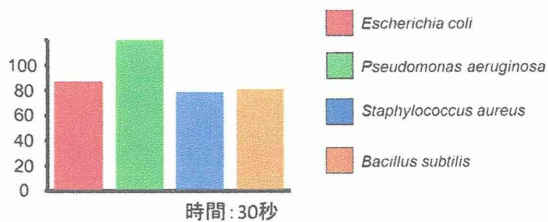


図 II-5. CFDA 染色に n-オクタ ンが与える影響

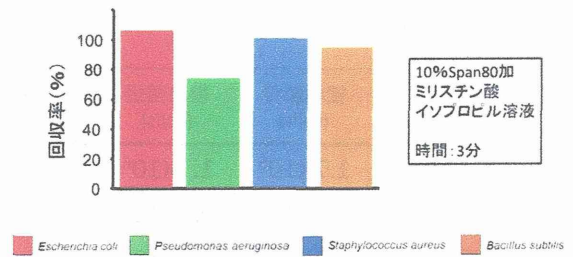
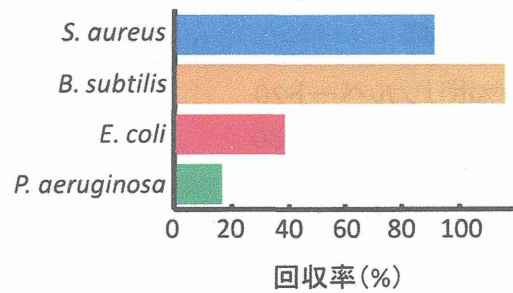


図 II-6. CFDA 染色に n-オクタ ンが与える影響

A) 水



B) 1% チオ硫酸ナトリウム

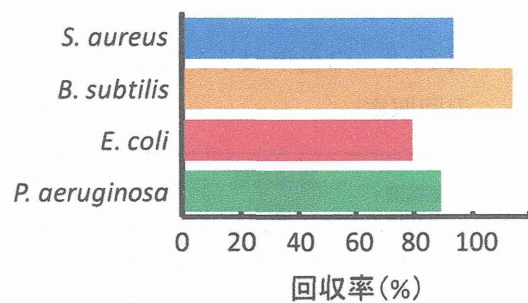


図 II-7. 色素中に添加した細菌の 蛍光染色法による検出

表 II-1. マクロゴールに添加した細菌の回収率

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.7X10 ⁶	1.7X10 ⁶	100
<i>B. subtilis</i>	1.1X10 ⁶	9.7X10 ⁵	88
<i>E. coli</i>	1.6X10 ⁶	7.7X10 ⁶	106
<i>P. aeruginosa</i>	1.1X10 ⁶	1.1X10 ⁶	100

表 II-2. 白色ワセリンを溶解するための溶媒の検討

溶媒	溶解性
1%ポリソルベート20	×
1%ポリソルベート80	×
1%DMSO	×
ミリスチン酸イソプロピル	○
n-オクタン	○

表 II-3. 白色ワセリンに添加した細菌の回収率

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	2.0X10 ⁶	1.8X10 ⁶	90
<i>B. subtilis</i>	7.9X10 ⁵	5.1X10 ⁴	6
<i>E. coli</i>	1.2X10 ⁶	2.1X10 ⁶	75
<i>P. aeruginosa</i>	3.5X10 ⁶	2.5X10 ⁶	71
<i>C. sporogenes</i>	1.4X10 ⁶	6.8X10 ⁶	49

表 II-4. 吸水軟膏に添加した細菌の回収率

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.7X10 ⁶	1.4X10 ⁶	82
<i>B. subtilis</i>	9.2X10 ⁵	3.8X10 ⁴	4
<i>E. coli</i>	1.2X10 ⁶	8.2X10 ⁵	68
<i>P. aeruginosa</i>	1.2X10 ⁶	1.5X10 ⁶	125

表 II-5. 抗菌剤に添加した細菌の回収率

指標菌	接種菌量 (cells)	検出菌量 (cells)	回収率 (%)
<i>S. aureus</i>	1.0X10 ⁶	1.2X10 ⁶	110
<i>B. subtilis</i>	5.3X10 ⁵	6.0X10 ⁵	112
<i>E. coli</i>	4.8X10 ⁵	5.7X10 ⁵	118
<i>P. aeruginosa</i>	9.1X10 ⁵	5.4X10 ⁴	76

抗菌薬: アンピシリン

表 II-6. 非無菌製剤の賦形剤の生菌数の測定

① 水溶性固形原料(乳糖)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性細菌	真菌
9L10A	4.4×10^3	<2.5	<2.5
A3A29	3.8×10^3	<2.5	<2.5

②-1 不溶性固形原料(タルク)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
8H07A	3.4×10^6	375	<25
45071	1.1×10^4	275	25

②-2 不溶性固形原料(ステアリン酸マグネシウム)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
1B6009	7.3×10^5	<25	<25
2014G6090	1.1×10^4	50	<25

③ 色素(黄色5号)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	真菌
X73FFI	1.0×10^4	<500	<500

④-1 軟膏基剤(マクロゴール)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
864805	3.4×10^3	0.67	<0.33
864930	2.7×10^4	0.33	<0.33

④-2 軟膏基剤(白色ワセリン)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
P1D12	5.1×10^5	<2.5	<2.5
P4I65	6.9×10^5	<2.5	<2.5
P4I66	5.6×10^5	2.5	<2.5

④-3 軟膏基剤(吸水軟膏)

Lot No.	蛍光染色法 (cells/g)	平板培養法(CFU/g)	
		好気性微生物	嫌気性微生物
044711	5.3×10^5	<2.5	<2.5
044924	5.4×10^7	<2.5	<2.5

表 III-1. 医薬品製造施設で汎用されている消毒剤とその濃度

消毒剤	使用濃度
過酸化水素	3%
過酢酸	0.2 ~ 0.3%
次亜塩素酸ナトリウム	0.02 ~ 0.05%
イソプロパノール	50 ~ 70%
エタノール	70%
ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%
アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%
クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%

表 III-2 構造設備の材質

材質	適用例
ステンレス	作業台, タンク, 機器類
ガラス	窓, 遮蔽板
ポリカーボネート	遮蔽板, 容器
化粧ケイ酸カルシウム (化粧材質: ポリエステル樹脂, ウレタン樹脂等)	壁, 天井
エポキシ樹脂コート	床
塩化ビニル	床, カーテン, ビニル袋
硬質ウレタンゴム	床
ニトリルゴム	手袋

表 III-3. 試験菌

試験菌	状態
<i>Escherichia coli</i>	新鮮培養菌
<i>Staphylococcus aureus</i>	新鮮培養菌
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	新鮮培養菌
<i>Bacillus subtilis</i>	芽胞液
<i>Candida albicans</i>	新鮮培養菌
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	孢子懸濁液

表 III-4 回収液の組成 (1000mL 中)

成分	最終濃度	秤取量
大豆レシチン	0.50%	5.0 g
ポリソルベート 80	4.00%	40.0 g
チオ硫酸ナトリウム 5 水和物	0.50%	5.0 g
L-ヒスチジン	0.20%	2.0 g
リン酸二水素カリウム	(15 mM)	2.0 g
カタラーゼ ^{※1}	4.8 w/v	50 mL
水	-	950 mL

※1 : カタラーゼは熱により分解するため、ろ過による無菌化を行った上で使用した。

添付資料 I-1

無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法

参考情報 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法を次のように改める。

本法は、無菌医薬品製造区域の清浄度評価方法及び許容基準を示す。本法の主な目的は、①無菌医薬品製造区域がそれぞれ設計された清浄度、微生物制御を達成し、維持していることを確認すること、及び②無菌医薬品製造環境中の微粒子数、微生物数が適切に制御されていることを確認することである。

本法に示す評価方法及び許容基準を参考に、製造設備ごとにリスクアセスメントを実施し、リスクに応じた基準値を設定すること。また測定方法については、合理的な根拠に基づき代替法を用いることができる。

1. 用語の定義

本法で用いる用語の定義は、次のとおりである。

- (i) 処置基準(アクションレベル)：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をいい、この値に達した場合には直ちに調査を行い、その結果に基づいて是正措置をとる。
- (ii) 警報基準(アラートレベル)：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、予知される問題を早期に警告する値をいう。
- (iii) 無菌操作法：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び職員を規制している管理された環境下で行われる無菌医薬品の充填やその他の作業を指す。
- (iv) 無菌操作区域：微生物及び微粒子を許容レベルに制御するために、供給する空気、原料、装置及び職員を規制している高度に管理された環境をいう。無菌操作区域は、更にグレードAとグレードBに分けられる。
- (v) 微生物：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称。ただし、本法では細菌及び真菌を指す。
- (vi) 作業シフト：同じ職員又はグループによってなされる一定の作業又は作業時間をいう。
- (vii) リスクアセスメント：ICH Q9の品質リスクマネジメントに従って危害を引き起こすハザードを特定し、分析し、評価する一連のプロセスをいう。本法において危害とは、製品又は製造区域を汚染させることを指す。ハザードとは、これらの危害を引き起こすヒト、環境、作業内容の要因をいう。リスクは危害の発生確率とそれが顕在化した場合の重大性の組み合わせで表現される。
- (viii) 校正(キャリブレーション)：標準器、標準試料などを用いて計測器の表示値と真の値との関係を求め適切に使用できる状態にすること。
- (ix) 非作業時：製造設備を据え付けて稼働させているが、これらを用いる職員がいない状態のことをいう。
- (x) 作業時：据え付けた設備が所定の稼働条件で機能し、規定された人数の職員が作業している状態のことをいう。

2. 製造区域

製造区域とは、培養、抽出・精製、容器等の洗浄・乾燥、原料秤量、薬剤の調製、滅菌、充填、閉塞、包装表示等の作業を行う場所、及び更衣を行う場所等をいう。

無菌医薬品の製造区域は、取り扱う容器、原料及び中間製品

が微生物及び微粒子に汚染されることを防止するように維持・管理された区域である。

これらの製造区域で作業に従事する職員は、衛生管理、微生物学、製造技術、更衣手順などについて必要な教育訓練を受けること。

2.1. 製造区域の分類

- (i) グレードA：製品への汚染リスクを高いレベルで防ぐ必要のある作業を行う局所的な区域である。無菌操作法で製造される医薬品の場合は、無菌の医薬品、容器、栓などが暴露される環境において、無菌性が保持できるように設計された区域をいう。この区域においては充填前の無菌作業(無菌接続、無菌原料の添加など)、無菌充填、容器閉塞などを行う。
- (ii) グレードB：製品への汚染リスクを比較的高いレベルで防ぐ必要のある作業を行う多目的な区域である。無菌操作法で製造される無菌医薬品の場合は、無菌を維持できるように収納された滅菌後の容器、原料及び中間製品の搬入、無菌操作区域に直接介入するヒト、器具、装置などが所在する区域である。一般的な無菌室では、グレードAの周辺環境となる。なお、アイソレーターなどのヒトの介在や暴露の程度が小さい場合など環境由来の微生物汚染リスクが低い場合においては、周辺環境はグレードBである必要はない。
- (iii) グレードC、D：製品への汚染リスクを比較的低いレベルで防ぐ区域である。滅菌前の容器、原料及び中間製品が、環境に暴露される製造作業を行う区域、無菌操作に使用する器具、装置などを洗浄する区域等をいう。なお、アイソレーターなどのヒトの介在や暴露の程度が小さい場合など環境由来の微生物汚染リスクが低い場合においては、周辺環境として使用できる。

2.2. 製造区域ごとの環境管理基準値

医薬品製造環境の空中浮遊微粒子は、空調システムの稼働状況を把握する重要な指標の一つとなる。物理的には製品に混入して不溶性微粒子の原因の一つになり、また生物学的には微生物の担体となり得る。

そこで医薬品製造環境中では微生物数と同様に空中浮遊微粒子数についても一定の基準以下に制御されていることを保証しなければならない。そのために、風量、気流パターン、換気回数、ヒト・物の動線などを適切に設計することにより、空中浮遊微粒子を効果的に排出すること。

製造区域ごとに要求される空気の清浄度及び環境微生物の許容基準を表1及び表2に示す。

微粒子測定によるそれぞれのグレード分類をISO/DIS 14644-1 (2010)のクラス分類と比較するとグレードAの作業時の基準はISO 5、グレードBの作業時の基準はISO 7、グレードCの作業時の基準はISO 8にほぼ等しい。

製造区域ごとの清浄度区分の定義に従い、製造区域の清浄度区分を検証する場合のサンプリングポイント数は、表3を参考にできる。対象区域の面積に応じて規定されたサンプリングポイント数を対象区域全体に均等に分布させ、作業活動の高さを考慮してサンプリングポイントを設定する。また、リスクに応じて測定ポイントを追加することも有用である。

ISO/DIS 14644-1 (2010)に掲載されているサンプリングポイント数を表3に示す。

グレードA設計時における確認では、微粒子測定1回当たり最小限1 m³のサンプリングを行う。

5.0 µm以上の空中浮遊微粒子測定、落下菌数測定は、必要

に応じて行う。

表1 空気 の 清 浄 度

グレード	許容空中浮遊微粒子数(個/m ³)			
	非作業時 ^{※1}		作業時	
大きさ	0.5 μm 以上	5.0 μm 以上	0.5 μm 以上	5.0 μm 以上
A	3520	20	3520	20
B	3520	29	352000	2900
C	352000	2900	3520000	29000
D	3520000	29000

※1 非作業時の値は、作業終了後、一般に15~20分後に達成されるべき値である。

※2 この区域の許容微粒子数は、作業形態により異なる。

表2 環境微生物の許容基準(作業時)^{※1}

グレード	空中微生物		表面付着微生物	
	浮遊菌 (CFU/m ³)	落下菌 ^{※2} (CFU/プレート)	コンタクトプレート	手袋
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	...
D	200	100	50	...

※1 許容基準は平均値評価とする。

※2 プレート1枚あたりの測定時間は、最大4時間までとし、作業時間を通して測定を行う。

表3 クリーンルームの面積に対応した最少サンプリング数

クリーンルームの面積(m ²) ^{※1}	最少ポイント数
1	1
2	1
4	2
6	3
8	4
10	5
24	6
28	7
32	8
36	9
52	10
56	11
64	12
68	13
72	14
76	15
104	16
108	17
116	18
148	19
156	20
192	21
232	22
276	23
352	24
436	25
500	26

※1 面積は、表示された数値未満又は等しい値である。

3. 環境モニタリングプログラム

無菌医薬品の製造においては、製造環境の悪化を事前に予知し、製品品質への悪影響を未然に防止しなければならない。そのため、環境モニタリングプログラムには、製造区域に要求されている清浄度が日常的に保持されていることを検証できるように、必要なすべての事項を含むこと。環境モニタリングプログラムに含まれる項目は、3.1~3.6項を参考に決定する。環境モニタリングプログラムは施設ごとに作成すること。環境モニ

タリングを実施する職員は、衛生管理、微生物学、測定原理、測定手順、更衣手順などについて十分な教育訓練を受けること。

3.1. 適用範囲

モニタリング対象は、微生物と空中浮遊微粒子とする。微生物測定の対象は、細菌及び真菌とし、微粒子測定は0.5 μm以上の空中浮遊微粒子を対象とする。

3.2. モニタリング頻度

無菌医薬品の製造区域では、空中浮遊微粒子及び微生物のモニタリングが必要であり、無菌医薬品が環境空気と直接接するグレードAにおいては、作業シフトごとに適切な頻度でモニタリングを行う。作業時のモニタリング参考頻度を表4に示す。ここで示した参考頻度は、従来型の一般的な無菌操作法を行う場合を想定しているが、個別の事例においては、リスクアセスメント結果に従い、適切なモニタリング頻度を定めるべきである。特にグレードA及びグレードBの空中微生物については、製品への汚染リスクを考慮して、その影響を評価できるモニタリング頻度を設定すること。例えば、製品の環境への暴露時間が長い場合、又はグレードAへ介入する作業回数が多い場合など、製品への汚染リスクが高いと想定される場合は、より高いモニタリング頻度を設定する必要がある。

これに対してアイソレーターやRABS (Restricted Access Barrier System)、ブローフィルシールなどを用いた製造作業では、ヒトや環境から製品への汚染リスクが低いため、モニタリング頻度も低減させることができる。

表4 モニタリングの参考頻度

グレード	空中浮遊 微粒子	空中微生物	表面付着微生物	
		装置、壁など	手袋	作業衣
A	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後
B	作業中	作業シフトごと	作業終了後	作業終了後
C, D	製品や容器が 環境に暴露される区域	製品や容器が 環境に暴露される区域	週2回	週2回
		その他の区域	週1回	週1回

※ 製品を暴露しない場合などリスクが低い場合は測定頻度を適宜減らすことができる。

3.3. モニタリングポイント

モニタリング対象には、製造区域の空気、床、壁、設備表面、手袋、作業衣などがある。モニタリングポイントの選定にあたっては、重要作業箇所、汚染されやすい箇所、製造区域の清浄度を代表する箇所などを考慮する。

日常的な製造区域のモニタリングポイントは、製品が環境に暴露される近傍(例えば、30 cm以内)、ヒトの介入や往来が多い、又は低グレードエリアの影響を受けて汚染源となりやすい位置、気流解析の結果からワーストポイントと考えられる位置など、リスクアセスメントの結果や製造区域の清浄度区分の検証で得られた結果を参考に決定する。

3.4. モニタリング方法

モニタリング対象物に応じた方法を選択する。また、サンプリング作業に伴うヒトの介入や、サンプリングによる気流の乱れなどにより製品への汚染リスクを高める可能性があることに十分留意する。

モニタリングの測定対象物が空中に浮遊している微生物の場合は、能動的なサンプリング方法と受動的なサンプリング方法

がある。また、検出しようとする微生物の種類によって、使用する培地の種類や培養方法が異なる。詳細については5. 微生物測定を参考にする。

3.5. 環境管理基準

各モニタリング対象物については警報基準値を設定することにより設備性能の低下を早期に見つけることが可能であり、管理しやすくなる。環境モニタリングにおいて重要なことは、モニタリング対象物が一定の基準を常時維持していることを評価することである。

環境モニタリングにより得られた数値は、平均値として評価を行うが、平均化により汚染リスクを過小評価しないようにする。グレードAで微生物を検出した場合は、製品への影響を評価する。重要な作業の後には作業者などの表面付着微生物についてモニタリングをしなければならない。

グレードA及びグレードBにおける5.0 μm 以上の空中浮遊微粒子の測定は、環境の異常を早期に検出する上で有用である。5.0 μm 以上の空中浮遊微粒子が連続的、又は頻繁に検出されるようであれば、その数が少なくても、環境に影響を及ぼす異常が発生している可能性を考慮し、調査することが望ましい。

3.6. データの評価と基準を超えた場合の処置

環境モニタリングデータは、短期的な評価及び長期的な評価を行う。評価には、以下の項目を含める。

- (i) 一定期間を通じての微生物数、空中浮遊微粒子数の増減
- (ii) 検出された微生物の菌種の変動
- (iii) モニタリングポイントの増減
- (iv) 警報基準/処置基準の妥当性の確認
- (v) 職員ごとの検出頻度の確認
- (vi) 当該期間中の環境モニタリング結果に影響を及ぼす変更

環境モニタリングデータの傾向分析を行うことによって、製造環境の悪化を事前に把握し、環境悪化の原因を推定することができる。そのために場所、採取日時、製造品目、ロット、職員などといった環境に影響する情報も重要となる。

環境モニタリングデータに逸脱があった場合、逸脱があった時間の作業内容、製品との位置、逸脱の大きさなどを考慮し、製品の処置、衛生環境復旧の方法を決定する。

4. 微粒子測定

微粒子数の測定には、粒径別に計測できるパーティクルカウンター(微粒子計測器)を用いる。パーティクルカウンターは、空気を吸引するポンプとレーザー光の反射を粒子径に変換するセンサー及び変換部で構成される。サンプリングポイントと計測器が離れている場合には、サンプリングチューブを介して測定する。粒子分布を正確に測定するためには、原則としてサンプリングプローブの吸引口と気流の流れを平行とし、その気流と等速で吸引する。

測定には、校正済装置を用い、装置本体だけでなく、サンプリングチューブの長さ、直径及び曲がり部分の直径などを考慮する必要がある。測定装置の校正項目としては、流量、計数効率、偽計数、計数損失などがある。

微粒子モニタリング方式には、個々のモニタリングポイントごとに独立したパーティクルカウンターを設置して測定する方式と、複数のモニタリングポイントをマニホールドシステムにより1台のパーティクルカウンターに接続して測定する方式又はこれらの組合せ方式がある。いずれの測定方式でも、測定対象とする清浄度環境において決められた粒径範囲の粒子濃度を

適切に計測し、これらを表示又は記録できるものとする。なお、5.0 μm 以上の微粒子計測においては、大サイズ微粒子が比較的速く落下するので、長いチューブ使用は避ける。また、微粒子モニタリングに当たっては、測定箇所起因する測定作業者の健康リスク(例えば高感作物質、病原菌や放射性医薬品など)を考慮する必要がある場合もある。

グレードA区域は、連続モニタリングが推奨される。サンプリング量は1 m^3 あたりに正確に換算できる量であること。

5. 微生物測定

環境モニタリングに用いられる微生物測定法には、浮遊菌数測定法、表面付着菌数測定法、落下菌数測定法などがある。浮遊菌又は表面付着菌の捕集や測定に関しては、種々のサンプリング装置及び方法がある。モニタリングの目的及び対象物によって、適切なサンプリング装置及び方法を選定する。

5.1. 培養による測定

5.1.1. 浮遊菌数測定

一定量の空気を吸引する方法で、サンプリングした空気の容量あたりの菌数を測定する。サンプリング方法によって衝突型サンプリング装置及びろ過型サンプリング装置がある。

いずれの方法にも長所と短所があり、使用するにあたり空気をモニターする装置の能力(吸引量、微生物の捕集能力など)を確認しておくこと。また、グレードAで使用するにあたり、サンプリングが効率的であること、除染又は滅菌が容易であること、一方向気流を乱さないことを予め確認する。

浮遊菌数測定のサンプリング量は、モニタリング対象区域の清浄度やモニタリング頻度などの総合的な根拠考察により、適切なサンプリング量とする。グレードAでは、浮遊菌の1回のサンプリング量は1 m^3 とする。

(i) 衝突型サンプリング方法：衝突型サンプリングに用いる装置の選択及び使用に当たっては、捕集される空気の培地への衝突速度が捕集された微生物粒子に悪影響を及ぼさず、かつ微生物を捕集するのに十分な速度であること。また、空気の吸引量は、培地の物理的・化学的特性を大きく変えるものであってはならない。

一般的に使用される衝突型サンプリング浮遊菌数測定装置には、①スリットサンプラー、②アンダーセンサンプラー、③ピンホールサンプラー、④遠心型サンプラーがある。スリットサンプラーは、回転するカンテン培地に一定サイズのスリットを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、培地の回転速度及びスリットと培地表面との距離を調節して測定し、最大1時間まで時系列的に微生物の推移を把握することができる。アンダーセンサンプラーは、多孔板とカンテン培地を数段組み合わせ、培地に多孔板を通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、空気中の微生物の分布を測定するのに適している。ピンホールサンプラーは、スリットサンプラーのスリット部分がピンホールになった装置で、回転するカンテン培地に数個のピンホールを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する。遠心型サンプラーは、回転羽根を回転し、一定流量で吸引した空気を周囲に固定したカンテン培地のストリップに吹きつけて微生物を捕集する装置で、機器の持ち運びが容易で局所の測定に適している。

(ii) ろ過型サンプリング方法：ろ過型サンプリングに用いる装置は、吸引力及びフィルターサイズを適切に変えることによって、希望する空気量を捕集することができるが、フィルター

を無菌的にホルダーに取り付けたり、取り出すときに注意を要する。フィルターには、ゼラチンフィルターなどを用いたウェットタイプ及びメンブランフィルターを用いたドライタイプのものがある。ドライタイプのフィルターは、静電気の影響により微生物が付着した粒子をフィルター上に定量的に捕集できないことがある。

5.1.2. 表面付着菌数測定

付着微生物のサンプリング面積は採取する対象物の形状や状態により適量選定する。

(i) コンタクトプレート法：平滑であり、十分な面積を有した適切な接触表面を有するコンタクトプレートを使用する。原則として機器や器具表面からの採取面積は24~30 cm²とする。

サンプリング箇所は、コンタクトプレート全体を均等に致秒間接触させる。この際、回転させたり直線的に動かしてはならない。接触後、プレートにふたをし、できるだけ速やかに適切な培養条件で培養する。なお、コンタクトプレート使用後は、接触箇所に着した培地成分を無菌的に抜き取ること。

(ii) スワブ法：微生物を回収しやすく、異物が発生しにくい無菌材質のスワブを適切にリン酸液に浸し、あらかじめ規定された表面積を方向を変えながら、ゆっくりと回転、又は平行線状に拭き取ることによってサンプリングを行う。サンプリング後、スワブを適切な一定量のリン酸液に入れて攪拌後、微生物培養試験法(4.05)を参考にしながら適切な方法で微生物数を測定する。

(iii) 粘着菌法：粘着剤を塗布したサンプリングシートを検査対象物に均等に貼付し、剥がす。この操作を同一箇所について、複数回繰り返す。粘着面に粘着した微生物は、適切な方法で測定する。なお、超音波処理などにより、粘着面から微生物を液中に回収することも可能である。

5.1.3. 落下菌数測定

測定場所でカンテン培地を入れた一定の大きさのペトリ皿(皿別、直径9 cm)のふたをとり、一定時間放置後、表面に落下した微生物を培養し、菌落数を計数する方法である。本法は、静置した培地の表面に落下しなかった微生物を抽出できないこと、微生物凝集物の落下速度は気流の影響を受けることから、一定体積中の微生物の総数を定量的にモニタリングするには有効でない。本法は、得られる結果が定性又は半定量的であるが、製品又は装置が空中に浮遊する微生物によって汚染される可能性を、長時間モニタリングできる利点がある。

使用時の注意点として長時間の暴露条件で、培地が乾燥して菌の発育を阻害することがないことを確認する。落下菌数測定で得たデータは、これ以外の浮遊菌数測定の結果と組み合わせて考えることが有用である。

5.1.4. 培養

観察モニタリングでは、微生物を再現性よく抽出する培養条件を線用する。使用する培地は、製造バッチごとに培地性能試験を実施する。また、培地には、モニタリング箇所で使用されるための不活化剤を加えてもよい。

培地とその培養条件は、目的とした微生物によって異なる。表5にその一例を示す。表に示した培地はカンテン培地を例としたが、測定方法に応じて、液体培地を用いることもできる。

なお、培地や抽出液は適切な方法で滅菌されたものを使用する。

培養日数については、5日間以上と示したが、信頼性の高い菌落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養5日間以前の計測値を採用してもよい。

また、嫌気性細菌を対象とする場合には、嫌気培養とする。

表5 培地の種類 例示

検出対象微生物	培地	温度と日数
好気性細菌、酵母及びかび	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 SCDLPカンテン培地 SCDLカンテン培地	25~30℃ 5日間以上
好気性細菌	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 SCDLPカンテン培地 SCDLカンテン培地	30~35℃ 5日間以上
酵母及びかび	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 SCDLPカンテン培地 SCDLカンテン培地 サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ポテト・デキストロースカンテン培地 グルコースペプトンカンテン培地	20~25℃ 5日間以上
嫌気性細菌	強化クロストリジアカンテン培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30~35℃ 5日以上 (嫌気培養を行う)
抽出液	生理食塩液 リン酸緩衝生理食塩液 リン酸緩衝液, pH 7.2 ペプトン食塩緩衝液, pH 7.0 ペプトン生理食塩液 ペプトン水	

(i) SCDLPカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイス製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
レンチン	1.0 g
ポリソルベート80	7.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で7.1~7.5になるようにpHを調整する。
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(ii) SCDLカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイス製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
レンチン	1.0 g
カンテン	15 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25℃で7.1~7.5になるようにpHを調整する。
確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(iii) グルコースペプトンカンテン培地

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
ブドウ糖	20.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
リン酸二水素カリウム	1.0 g

カンテン 15.0 g
 水 1000 mL
 滅菌後のpHが25℃で5.6～5.8になるようにpHを調整する。
 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(iv) 強化クロストリジアカンテン培地

牛肉エキス 10.0 g
 ペプトン 10.0 g
 酵母エキス 3.0 g
 溶性デンプン 1.0 g
 ブドウ糖一水和物 5.0 g
 システイン塩酸塩 0.5 g
 塩化ナトリウム 5.0 g
 酢酸ナトリウム 3.0 g
 カンテン 15.0 g
 水 1000 mL
 滅菌後のpHが25℃で6.6～7.0になるようにpHを調整する。
 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

(v) リン酸緩衝生理食塩液

リン酸二水素カリウム 0.0425 g
 塩化ナトリウム 8.5 g
 水 1000 mL

(vi) ペプトン生理食塩液

ペプトン 1.0 g
 塩化ナトリウム 8.5 g
 水 1000 mL

(vii) ペプトン水

ペプトン 10.0 g
 塩化ナトリウム 5.0 g
 水 1000 mL

5.1.5. 同定

グレードA及びBから検出された菌は、種レベルまで同定するのが望ましい。遺伝子を調べる方法は、これまでの生化学や表現型の手法に比べて正確であり、精度も高い。これら同定結果は、無菌試験又はプロセスシミュレーションで汚染が生じた際の原因調査に利用できる。遺伝子解析を用いた同定の方法については、参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法」を参照する。

5.2. 迅速法による微生物測定

迅速法においては多くの場合、従来の培養法と比較して短時間のうちに測定結果を得ることが可能である。

一般に以下の3つの観点から科学的に検証された装置を使用する。

- (i) 捕集法(ろ過、衝突、粘着、空気吸引など)
- (ii) 検出シグナル(蛍光、発光など)
- (iii) 検出装置

なお、迅速法においては従来の培養法よりも、多くの場合、得られる微生物の測定値は高くなることから、使用に際しては、機器の適格性評価、校正方法についても十分に検討すること。また、培養法とは測定原理が異なるため、許容基準に関しては科学的論拠を基にそれぞれ設定する必要がある。その際、結果として従来法と比較して、同等以上の微生物管理ができるよう

に設定すること。

6. 参考資料

- 1) PIC/S GUIDE TO GOOD MANUFACTURING PRACTICE FOR MEDICINAL PRODUCTS ANNEXES: Annex 1 · Manufacture of sterile medicinal products (September 2009)
- 2) ISO/DIS 14644-1 (2010): Cleanrooms and associated controlled environments · Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration

添付資料 I-2

