

厚生労働行政推進調査事業費（厚生労働科学特別研究事業）
造血幹細胞移植に用いる臍帯血の品質管理に資する研究
分担研究報告書

「 微粒子測定器によるクリーンルーム内の常時汚染状況モニタリング 」

研究分担者 荒木 延夫 兵庫さい帯血バンク 品質管理部門責任者

研究協力者 甲斐 俊朗 兵庫さい帯血バンク 管理監督技術者
川岸 万佑子 兵庫さい帯血バンク 調製保存部門責任者
峯元 睦子 関東甲信越さい帯血バンク 製剤三課長
松山 宣樹 近畿さい帯血バンク 製剤三課長
宮本 彰 九州さい帯血バンク 製剤三課長

研究要旨

現状Dさい帯血バンクのみで実施されている、微粒子測定器設置によるクリーンルーム内の常時汚染状況モニタリングとモニタリング結果に応じた臍帯血調製状況をAさい帯血バンク、Bさい帯血バンク、Cさい帯血バンクにおいて検証した。

研究分担者が作成した厚労行政推進調査研究にかかるパーティクルカウントプロトコール、及び微粒子測定器 KC52 ハンドヘルドパーティクルカウンタ（リオン株式会社）を各バンクに送付し、安全キャビネット、クリーンルーム内を1日4時間、1分間（体積2.83L）ずつ $\geq 0.5\mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子測定を1ヵ月間実施した。なお、安全キャビネット内への微粒子測定器の直接的な設置は機器汚染の可能性を考慮してサンプリングチューブ（タイゴンチューブ）を微粒子測定器に取り付け、安全キャビネット内にサンプリングチューブを設置し測定した。なお、最大許容微粒子数は「第十七改正日本薬局方、無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」に従い、1日の平均値（作業時、非作業時）で評価したが、平均化により汚染リスクを過少評価しないようにした。

Aさい帯血バンク：クリーンルーム2室に安全キャビネットが2台ずつ配置され、それぞれに各1台ずつ微粒子測定器を設置し、2025年1月25日～2月24日まで測定した。結果はクリーンルーム2室、安全キャビネット4台の計6台すべて作業時、非作業時共に $\geq 0.5\mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子数（以下個/ m^3 ）は概ね最大許容微粒子数以下であった。

Bさい帯血バンク：クリーンルーム2室に安全キャビネットが2台ずつ配置され、それぞれに各1台ずつ微粒子測定器を設置し、2025年1月9日～2月7日まで測定した。結果はクリーンルーム2室、安全キャビネット4台の計6台中、安全キャビネット1台が異様に許容範囲を超えていた。他5台は作業時、非作業時共に $\geq 0.5\mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子数は概ね最大許容微粒子数以下であったが、安全キャビネット2台に特定の日に逸脱が認められた。

安全キャビネット 1 台が異様に許容範囲を超えていた原因及び安全キャビネット 2 台に特定の日に逸脱が認められた原因として、安全キャビネットの電源を入れずに、微粒子測定器の電源を入れたため、かなりの数の微粒子がカウントされていた。おそらく微粒子測定器が空気を吸い込む際に、安全キャビネット内に安全キャビネット外の空気を吸い込んでいるのではないかと考えられた。対して、別のクリーンルームに設置している安全キャビネット 2 台については、逸脱のあった特定の日の除いて非作業時においても安全キャビネットと微粒子測定器の電源を入れていた職員がいたので、安全キャビネットで結果の差異が生じ、当該安全キャビネットの現象が現れたと考えられる。

C さい帯血バンク：クリーンルーム 1 室に安全キャビネットが 2 台配置され、それぞれに各 1 台ずつ微粒子測定器を設置し、2025 年 1 月 9 日～2 月 6 日まで測定した。結果はクリーンルーム 1 室、安全キャビネット 2 台の計 3 台すべて作業時、非作業時共に $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0 \mu\text{m}$ 微粒子数は概ね最大許容微粒子数以下であった。

D さい帯血バンク：クリーンルーム 2 室に安全キャビネットが 2 台ずつ配置され、それぞれに微粒子測定器として多点監視用パーティクルセンサ KA-02（九州リオン株式会社）が設置され常時汚染状況モニタリングを $\geq 0.3 \mu\text{m}$ 及び $\geq 0.5 \mu\text{m}$ について実施しており、2025 年 1 月 9 日～2 月 6 日までの測定記録を検証した。なお、D さい帯血バンクは FDA 無菌ガイダンスによる分類で実施している。結果はクリーンルーム 2 室、安全キャビネット 4 台の計 6 台すべての作業時、非作業時の $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 微粒子数は全日すべて最大許容微粒子数以下であった（清掃時間帯のデータは除外）。

よって製造区域ごとの環境管理は一定の基準以下に制御されており、臍帯血調製状況に問題なかったことが検証された。なお、D さい帯血バンクにおいては、多点監視用パーティクルセンサに温度センサ、湿度センサも付加して常時モニタリングを実施していることにより、クリーンルーム、安全キャビネットの異常を察知でき、製造区域ごとの環境管理は一定の基準以下に制御されていることが保証されるメリットがある。

A. 研究目的

本研究では、臍帯血調製環境中の浮遊菌・落下菌検査が陽性となる原因の細菌や真菌のキャリア（運び屋）である微粒子の常時汚染状況モニタリングをクリーンルーム、安全キャビネットにおいて実施する。

そしてモニタリング結果に応じた臍帯血調製状況を検証する。

B. 研究方法

研究分担者が作成した厚労行政推進調査研究にかかるパーティクルカウントプロトコール、及び校正証明書付き微粒子測定器 KC52 ハンドヘルドパーティクルカウンタ（リオン株式会社）を A さい帯血バンク、B さい帯血バンク、C さい帯血バンクの各バンクに送付し、グレード A（ISO 5）の安全キャビネット、グレード B（ISO 7）のクリーンルーム内を 1 日 4 時間、1 分間（体積 2.83 L）ずつ微粒子測定を $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 、 $\geq 5.0 \mu\text{m}$ について 1 ヶ月間実施した。なお、安全キャビネット内への微粒子測定器の直接的な設置は機器汚染の可能性を考慮してサンプリングチューブ（タイゴンチューブ：内径 6mm 外径 9mm）を微粒子測定器に取り付け、安全キャビネット内にサンプリングチューブを設置し測定した。調製作業終了後は安全キャビネットからサンプリングチューブを取り出すため、その後はクリーンルーム内を測定することとなる。よって、安全キャビネット内の微粒子測定データは調製開始時から調製終了時までを作業時として解析した。また、クリーンルーム内の非作業時については、作業終了後 20 分後からのデータを解析した。

最大許容微粒子数（個/ m^3 ）は「第十七

改正日本薬局方、無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」に従い、クリーンルームは $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 、 $\geq 5.0 \mu\text{m}$ が非作業時は 3,520、29、作業時は 352,000、2,900、また安全キャビネットは $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 、 $\geq 5.0 \mu\text{m}$ が非作業時、作業時共に 3,520、20 として 1 日の平均値（作業時、非作業時別）で評価したが、最大許容微粒子数の逸脱が無い場合は実測値で評価した。なお、平均化により汚染リスクを過少評価しないようにした。

一般的に各区域の清浄度レベルは、環境区域の単位体積当たりに含まれる $0.5 \mu\text{m}$ 以上の浮遊微粒子数によって表され、 $5.0 \mu\text{m}$ 以上の浮遊微粒子数は、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であるが、 $5.0 \mu\text{m}$ 以上の浮遊微粒子数については、逸脱数値が連続的、または頻繁に検出されなければ概ね適合と評価した。

D さい帯血バンクについては、安全キャビネット、クリーンルームそれぞれに微粒子測定器として校正証明書付き多点監視用パーティクルセンサ KA-02（九州リオン株式会社）が設置され、パーティクルセンサに温度センサ、湿度センサを付加し、 $\geq 0.3 \mu\text{m}$ 、 $\geq 0.5 \mu\text{m}$ について常時モニタリングを FDA 無菌ガイダンス { $0.5 \mu\text{m}$ 以上の粒子が 1 cf（立方フィート：約 28.3 L）中に 100 個を上限とするクリーンルームをクラス 100 とするによる分類} で実施している。加えて、クリーンルーム、安全キャビネット以外のグレード B（ISO5）の三次更衣室、グレード C（ISO8）の脱衣室（2 室）、前室、二次更衣室についても常時モニタリングを実施しているが、本研究では、安全キャビネット、クリーンルームについて 1 ヶ月間の測定記録を FDA 無菌ガイダンスによる分類で検証した。

C. 研究結果

A さい帯血バンク：クリーンルーム 2 室（クリーンルーム 1、クリーンルーム 2）に安全キャビネットが 2 台ずつ配置され（クリーンルーム 1 に安全キャビネット 0 号機、1 号機、クリーンルーム 2 に安全キャビネット 2 号機、3 号機）、各 1 台ずつに微粒子測定器を設置し、2025 年 1 月 25 日～2 月 24 日まで測定した（図 1-a、b、c、d、e、f）。なお、安全キャビネット 2 号機、3 号機については分担研究者の国立感染研究所・安全管理研究センター伊木繁雄主任研究官（以下、伊木分担研究者）からの指摘を受けて 2 月 19 日からチューブの位置を少しでも微粒子検出の可能性が高いところとしてサンプリングチューブ吸引口を安全キャビネット奥側のグリル中央付近に移動した。

結果はクリーンルーム 2 室、安全キャビネット 2 号機、3 号機の 1 日の平均値（作業時、非作業時）、安全キャビネット 0 号機、1 号機は実測値で評価したところ、計 4 台の作業時の $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0 \mu\text{m}$ 微粒子数は最大許容微粒子数以下であり適合であった（図 1-a'、d'）。クリーンルーム 2 室の非作業時は、 $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0 \mu\text{m}$ 微粒子が最大許容微粒子数を越える日があったが、調製作業なしの日については最大許容微粒子数以下であったため、概ね適合と評価した（図 1-a''、図 1-d''）。

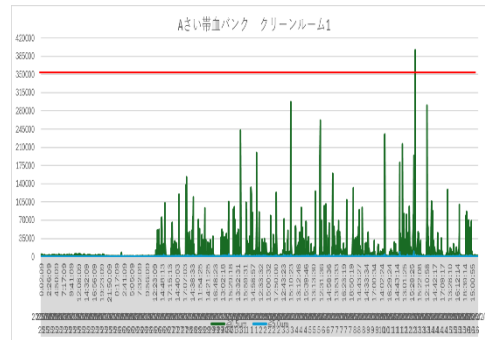


図 1-a クリーンルーム 1

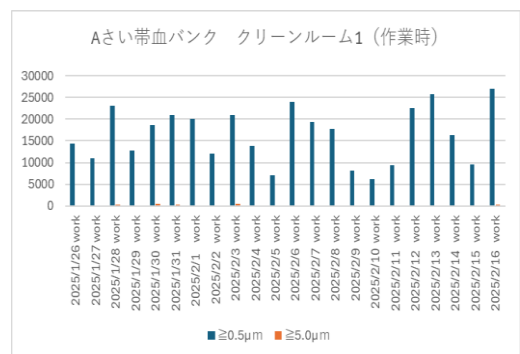


図 1-a' クリーンルーム 1（作業時）

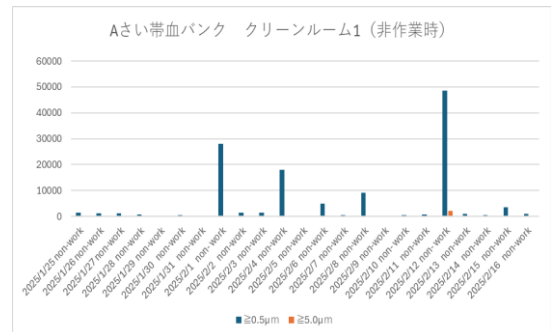


図 1-a'' クリーンルーム 1（非作業時）

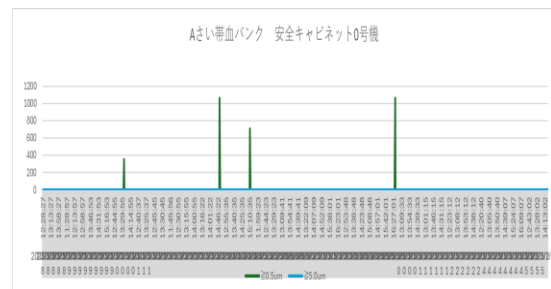


図 1-b 安全キャビネット 0 号機

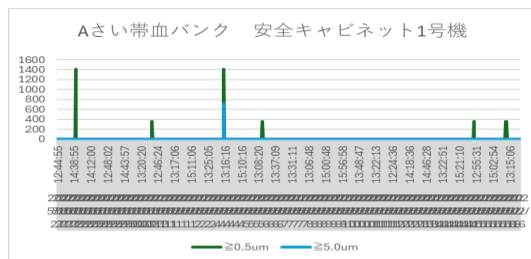


図 1-c 安全キャビネット 1 号機

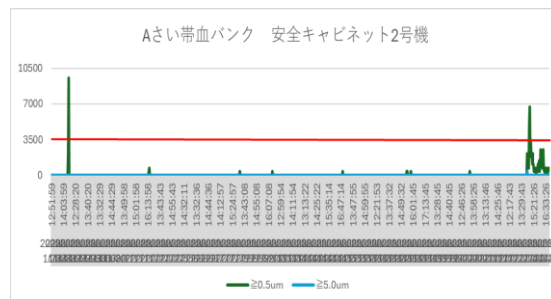


図 1-e 安全キャビネット 2 号機

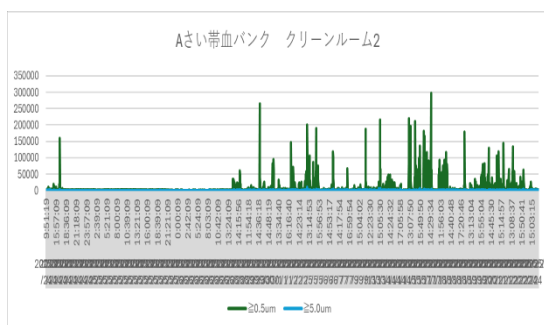


図 1-d クリーンルーム 2

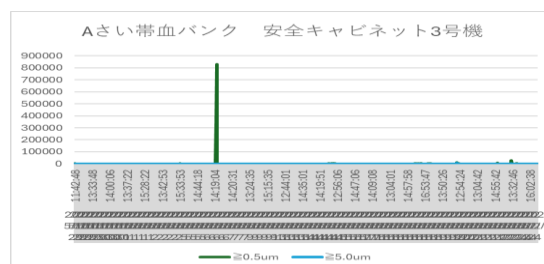


図 1-f 安全キャビネット 3 号機

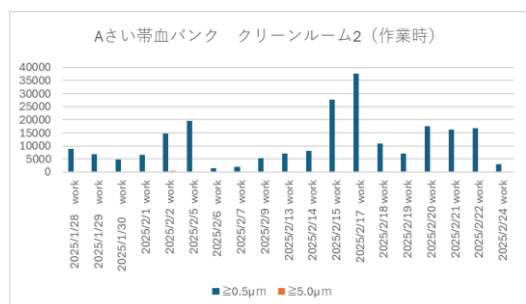


図 1-d' クリーンルーム 2 (作業時)

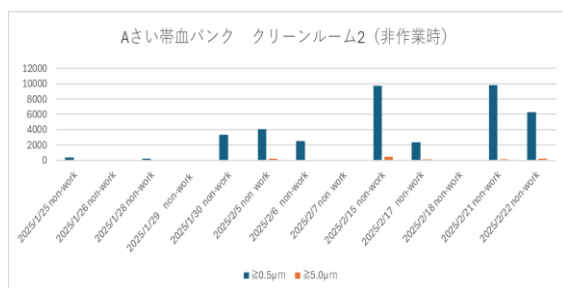


図 1-d'' クリーンルーム 2 (非作業時)

B さい帯血バンク：クリーンルーム 2 室（クリーンルーム 1、クリーンルーム 2）に安全キャビネットが 2 台ずつ配置され（クリーンルーム 1 に安全キャビネット 1 号機、2 号機、クリーンルーム 2 に安全キャビネット 3 号機、4 号機）、各 1 台ずつに微粒子測定器を設置し、2025 年 1 月 9 日～2 月 7 日まで測定した（図 2-a、b、c、d、e、f）。なお、1 月 9 日～1 月 23 日までは、安全キャビネット内の測定はサンプリングチューブを安全キャビネット前面・上部に垂らして測定したが、伊木分担研究者の指摘を受けて、1 月 24 日以降はサンプリングチューブを安全キャビネット中央・下部に変更した。

結果はクリーンルーム 2 室、安全キャビネット 2 台の計 4 台中、図 2-c に示す安全キャビネット 2 号機が 1 月 15 日、23 日測定時は適合していたが、1 月 29 日以降、異様に許容範囲を超えており、321 測定ポイント

ト中 $\geq 0.5\mu\text{m}$ の227ポイントが3,533～5,909,187、 $\geq 5.0\mu\text{m}$ の153ポイントが353～3,533を示した。安全キャビネット2号機が異様に許容範囲を超えていた原因として、安全キャビネットの電源を入れずに、微粒子測定器の電源を入れたため、かなりの数の微粒子がカウントされていた。おそらく微粒子測定器が空気を吸い込む際に、安全キャビネット内に安全キャビネット外の空気を吸い込んでいるのではないかと考えられた。対して、クリーンルーム2に設置している安全キャビネット2台については、非作業時においても安全キャビネットと微粒子測定器の電源を入れていた職員がいたので、安全キャビネットで結果の差異が生じ、当該安全キャビネットの現象が現れたと考えられる。

安全キャビネット2号機を除く、クリーンルーム2室、安全キャビネット3台を1日の平均値（作業時、非作業時）で評価したところ、クリーンルーム2室、安全キャビネット1号機の作業時は $\geq 0.5\mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子数は最大許容微粒子数以下であり適合であった（図2-a'、d'）。クリーンルーム2室の非作業時は、 $\geq 0.5\mu\text{m}$ または $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子が最大許容微粒子数を越えた日が1日だけあったが、概ね適合と評価した（図2-a''、図2-d''）。また、安全キャビネット3号機が1月14日、1月21日、1月24日、1月30日、2月5日、安全キャビネット4号機が1月17日について逸脱が認められた日があったが、その原因として安全キャビネット2号機同様、安全キャビネットの電源を入れずに、微粒子測定器の電源を入れたことが原因であると考えられた。

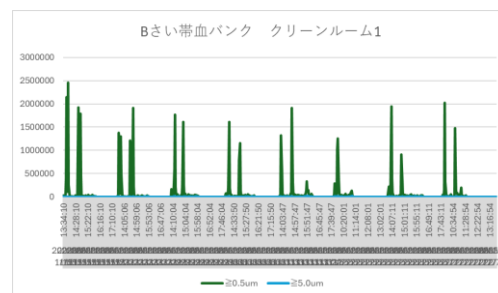


図 2-a クリーンルーム 1

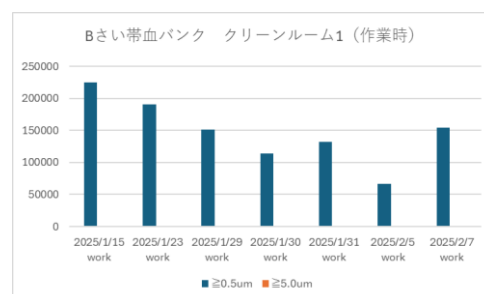


図 2-a' クリーンルーム 1（作業時）

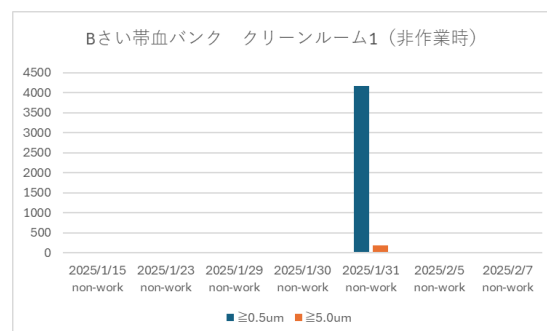


図 2-a'' クリーンルーム 1（非作業時）

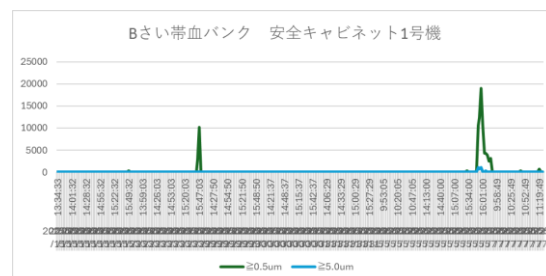


図 2-b 安全キャビネット 1 号機

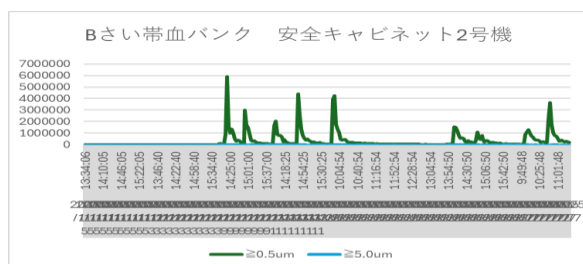


図 2-c 安全キャビネット 2 号機

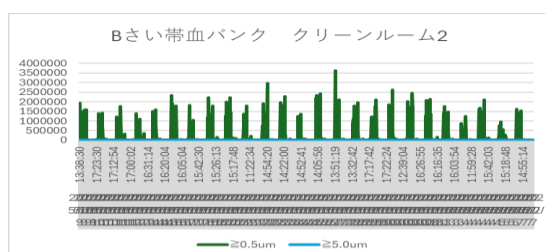


図 2-d クリーンルーム 2

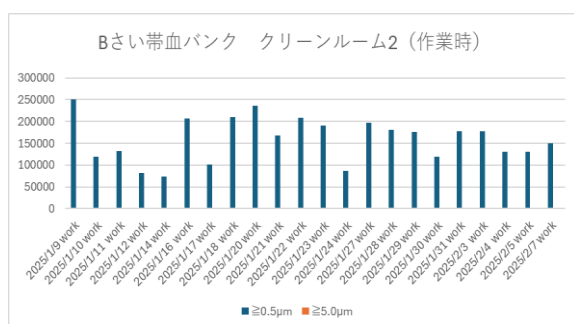


図 2-d' クリーンルーム 2 (作業時)

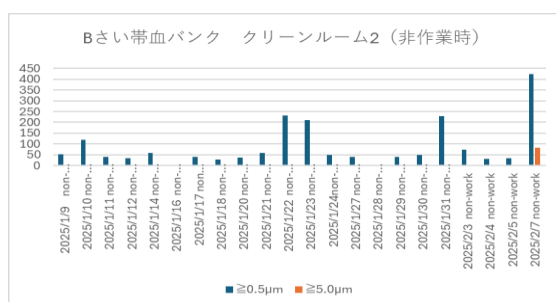


図 2-d'' クリーンルーム 2 (非作業時)

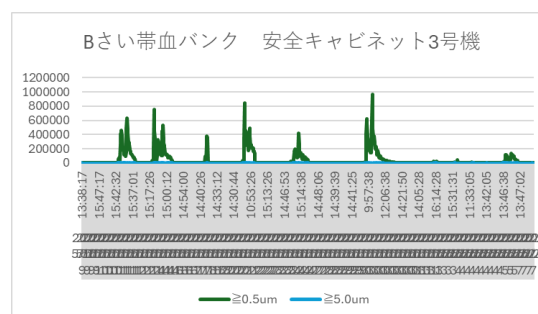


図 2-e 安全キャビネット 3 号機

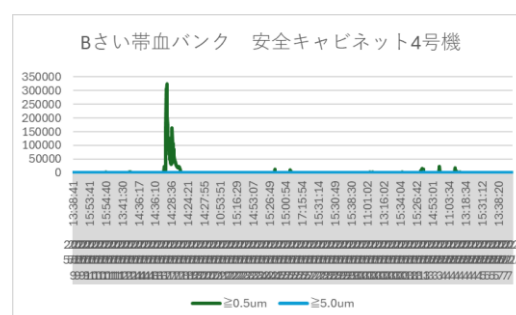


図 2-f 安全キャビネット 4 号機

C さい帯血バンク：クリーンルーム 1 室に安全キャビネットが 2 台（安全キャビネット 3 号機、4 号機）配置され、各 1 台ずつに微粒子測定器を設置し、2025 年 1 月 9 日～2 月 6 日まで測定した（図 3-a、b、c）。なお、1 月 9 日～2 月 1 日はサンプリグチューブの吸引口を安全キャビネットの端（3 号機は左側、4 号機は右側）の作業台から 20cm 程度上部に設置していたが、伊木分担研究者の指摘を受けて 2 月 5 日に吸引口を作業台の中央に変更、2 月 6 日に吸引口を作業台の手前中央に変更した。

結果はクリーンルーム、安全キャビネット 3 号機、4 号機の 1 日の平均値（作業時、非作業時）で評価したところ、クリーンルームの作業時が、最大許容微粒子数を越えた

日が1日だけあったが、概ね適合と評価した(図3-a')。また、クリーンルーム(非作業時)及び安全キャビネット2台はすべて作業時、非作業時共に $\geq 0.5\mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0\mu\text{m}$ 微粒子数は最大許容微粒子数以下であった(図3-a'')。

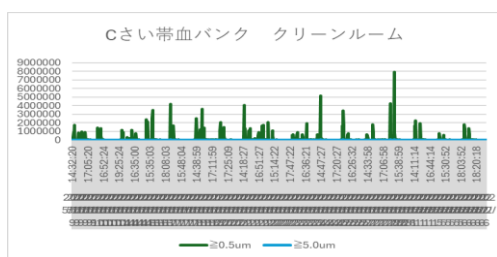


図3-a クリーンルーム

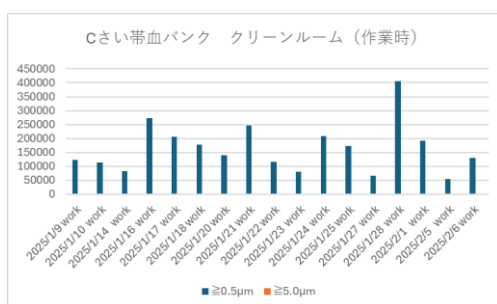


図3-a' クリーンルーム(作業時)

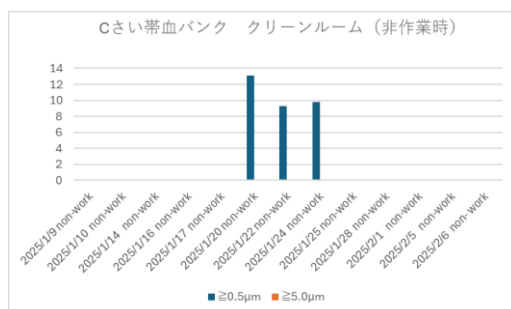


図3-a'' クリーンルーム(非作業時)

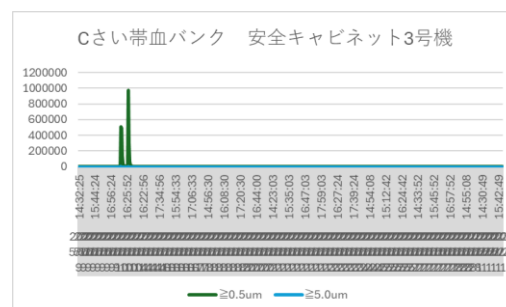


図3-b 安全キャビネット3号機

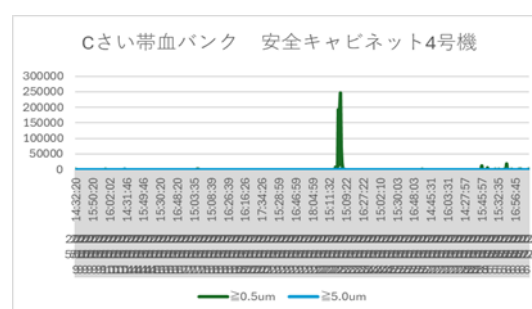


図3-c 安全キャビネット4号機

D さい帯血バンク：クリーンルーム2室に安全キャビネットが2台ずつ配置され(クリーンルーム1に安全キャビネット1号機、2号機、クリーンルーム2に安全キャビネット3号機、4号機)、本研究では、2025年1月9日～2月6日までの測定記録をFDA無菌ガイダンスによる分類で検証した(図4-a、b、c、d、e、f)。なお、2025年1月17日に伊木分担研究者からは安全キャビネット内のパーティクルセンサの吸引口の位置が安全キャビネット右側側面の吸引ポートとなっている。その位置では、安全キャビネットの気流の特性を考えると作業エリアから遠すぎるので微粒子検出の可能性が低いとの指摘を受けた。但し、設置運転前専門業者と相談の上、場所的に取れないので選択的にその箇所に設置した経緯がある。

結果は、クリーンルーム 2 室、安全キャビネット 4 台の計 6 台すべての $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 微粒子数は清掃時間帯を除外すると全日すべて最大許容微粒子数以下であった。なお、清掃時は安全キャビネットの電源を off にし、それ以外の期間は安全キャビネットの電源を常時入れており、図 2-c に示す B さい帯血バンク安全キャビネット 2 号機の異様な事例は確認されなかった。

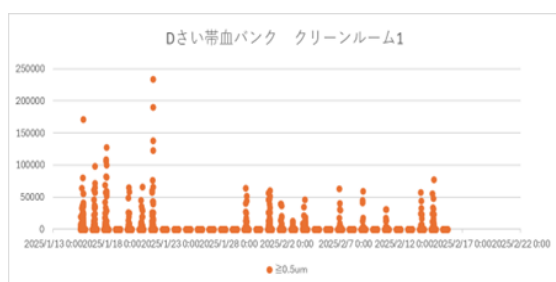


図 4-a クリーンルーム 1

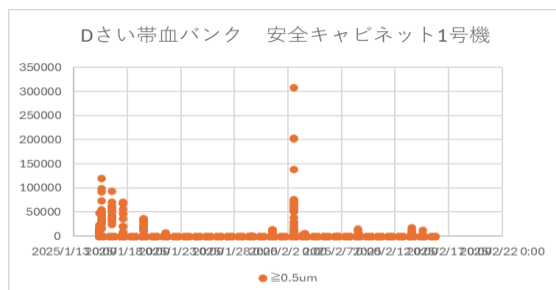


図 4-b 安全キャビネット 1 号機

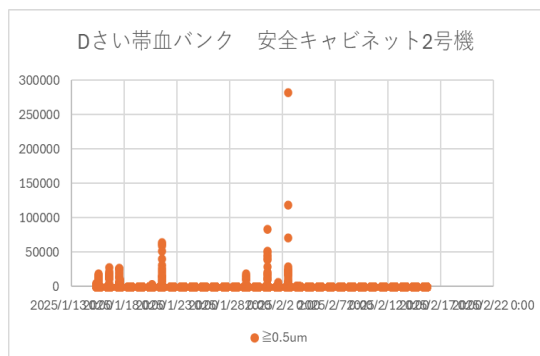


図 4-c 安全キャビネット 2 号機

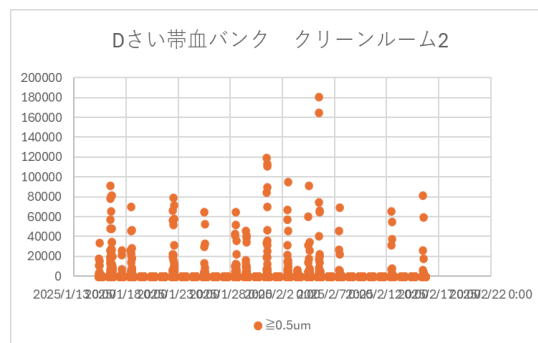


図 4-d クリーンルーム 2

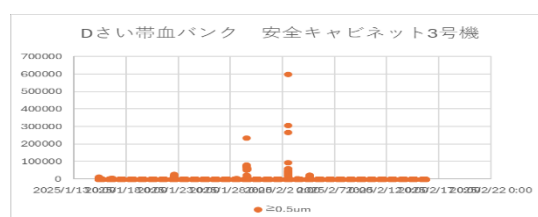


図 4-e 安全キャビネット 3 号機

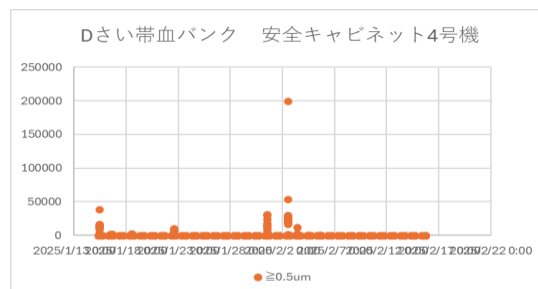


図 4-f 安全キャビネット 4 号機

D. 考察

今回、微粒子測定器による常時モニタリングを 1 ヶ月間検討した 3 バンクについて、現在、安全キャビネットは 1 回以上/月（作業時、非作業時）、クリーンルームは 1 回以上/3 ヶ月（作業時）で 1 分間 3 回にて $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 微粒子測定が実施されている。今回の検証で A さい帯血バンク、B さい帯血バンク、C さい帯血バンクは作業時、非作業時共に $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 及び $\geq 5.0 \mu\text{m}$ 微粒子数は概ね最大許容微粒子数以下であり、製造区域

ごとの環境管理は一定の基準以下に制御されており、臍帯血調製状況に問題なかったことが検証された。

また、D さい帯血バンクにおいては、多点監視用パーティクルセンサを固定した場所に設置し、温度センサ、湿度センサを付加して $\geq 0.5 \mu\text{m}$ 微粒子数の常時モニタリングを実施しており、クリーンルーム、安全キャビネット内の微粒子測定数は清掃時間帯を除いて最大許容微粒子数以下であり、製造区域ごとの環境管理は一定の基準以下に制御されており、臍帯血調製状況に問題なかったことが検証された。

以上のことから常時モニタリングを実施することは、環境条件の異常を察知でき、製造区域ごとの環境管理は一定の基準以下に制御されていることが保証されるメリットがある。

E. 結論

今回、微粒子測定器による常時モニタリングを設置し、1 ヶ月間検討した 3 バンクについても、製造区域ごとの環境管理は概ね一定の基準以下に制御されていることが検証された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 兵庫さい帯血バンクにおける抗 HLA 抗体陽性移植予定患者の DSA の取り組み 川岸万佑子、佐藤

匠、吉富壮平、坪内まりな、坂井那江、俵瑠、谷浦未季、柏木駿吾、谷原知香、荒木延夫、甲斐俊朗、第 47 回日本造血・免疫細胞療法学会総会、大阪国際会議場、大阪市、2025 年 2 月 27 日～3 月 1 日

2) 在胎週数別における臍帯血の CD34 陽性細胞分化能の解析、川岸万佑子、佐藤匠、吉富壮平、坪内まりな、坂井那江、俵瑠、谷浦未季、柏木駿吾、谷原知香、荒木延夫、甲斐俊朗第 47 回日本造血・免疫細胞療法学会総会、大阪国際会議場、大阪市、2025 年 2 月 27 日～3 月 1 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし