

第十七改正日本薬局方無菌試験法の実施環境に則した国立医薬品食品衛生研究所における運用体制の整備

菊池裕[#], 林克彦, 工藤由起子

The background and preparations for the sterility tests according to the Japanese Pharmacopoeia 17th Edition at National Institute of Health Sciences, Japan.

Yutaka Kikuchi[#], Katsuhiko Hayashi, and Yukiko Hara-Kudo

Warranting the quality, safety, and efficacy of pharmaceutical products, Sterility Test is harmonized and implemented based on the agreements of the Pharmacopoeial Discussion Group. Sterility Test <4.06> in the General Tests of the Japanese Pharmacopoeia 17th Edition (JP17) requires to be operated under aseptic condition assessed with the appropriate implementation of the environmental monitoring and bacterial pollution control. The Sterility Test should be conducted in Grade A clean area defined in the Pharmaceutical Inspection Convention and Co-operation Scheme (PIC/S) Good Manufacturing Practice (GMP) guideline. The clean areas are essentially set up with High Efficiency Particulate Air (HEPA) filter to meet PIC/S standards: airborne particles and microorganisms. The isolator technology is suitable for the Sterility Test, as the Grade A area can be achieved by the equipped HEPA filters, the particle monitoring, and the sterilization with gas phase hydrogen peroxide. In particular, a containment-type isolator is useful to use the micro-organisms of biosafety level 2 for the Sterility Test.

Sterility Test <4.06> consists of four tests: the preparation of test micro-organisms, the growth promotion test, the method suitability test and the sterility test. JP17 listed two sterility test methods, the membrane filtration and the direct inoculation of the medium culture, one of which is selected according to the characteristics of the test product. However, the sensitivity of the sterility test is generally too low to detect contaminated micro-organisms from the sterile preparation produced in the condition where the sterility assurance level (SAL) of 10^{-6} or less is ensured. Even if the sterility test were operated with appropriate number of samples, the sterility test can guarantee the SAL at 10^{-1} . A detection of micro-organisms from a sterility test alerts some abnormalities in the aseptic manufacturing process.

The National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan, has been moved to King Skyfront in Kawasaki in Kanagawa prefecture on March in 2018. A containment-type isolator was installed in an aseptic room of Grade D in the new facility. We also created a standard operation procedure to manage the aseptic room and the isolator for the Sterility Test of the statutory sampling inspection.

In the future, we would like to utilize the aseptic room and the isolator for verification of next generation's sterility tests and remanufactured single-use medical devices, and environmental surveys of artificially closed spaces such as Grade A areas or the space station.

Keyword: Sterility Test, aseptic room, isolator, the Japanese the Pharmacopoeia

[#]To whom correspondence should be addressed:

Yutaka Kikuchi; Division of Microbiology National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan; Tel; +81-44-6573-2200 ext.2121; Fax: +81-44-6573-2200; E-mail: kikuchi@nihs.go.jp

1. はじめに

国立医薬品食品衛生研究所は平成30年3月に東京都世田谷区用賀より神奈川県川崎市に設置されたキングスカイフロント内へ移転した¹⁾。衛生微生物部では新たに高度無菌室を設置し、アイソレーターによる無菌試験法を実施する環境を整えた。

衛生微生物部では、医薬品、医療機器、医薬部外品、化粧品、食品及び環境等に由来する微生物や微生物産生毒素による健康被害の防止のため、試験業務、基礎的研究及び試験法の検証と開発を行っている。対象となる微生物には細菌、真菌及び寄生虫があるが、衛生微生物部第一室では細菌学的な合理性と知見に基づいて医薬品、医療機器、再生医療等製品、放射性医薬品等の安全性を確保するため、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験及び無菌試験法を業務として行っている。また、これらの試験業務と新たな微生物迅速法の開発を通じて、日局の改訂に資する知見を得ることを目的としている。

日本薬局方、欧州薬局方 (EP) 及び米国薬局方 (USP) の三薬局方での調和合意と近年では世界保健機関 (WHO) の作成した薬局方作成指針²⁾に基づき世界における試験手法が確立されつつある。無菌試験法は第十五改正第二追補から第十七改正日本薬局方 (日局17) の一般試験法³⁾に記載された試験法と同一になった。本稿では、無菌試験法の実施環境、無菌試験法の背景と詳細、国立医薬品食品衛生研究所の高度無菌室の詳細・運用体制及び今後の展開・展望について述べる。

2. 無菌試験法を実施する試験環境

2.1. 無菌試験法の試験環境に関わる基準

日局17では無菌試験法は“無菌であることが求められている原薬又は製剤に適用される”として、無菌条件下での試験の実施、作業区域の適切な環境モニタリング及び適切な汚染防止措置の実施を求めている³⁾。無菌試験の環境について述べる前に無菌医薬品の製造工程で求められる環境基準についてまとめておく。無菌製剤の製法に関しては、製剤通則 (8) で最終滅菌法と無菌操作法の2手法に言及があり⁴⁾、無菌操作法では使用器具の滅菌及び環境微生物と微粒子が適切に管理された清浄区域内での操作を通じて一定の無菌性保証を求めている。日局17参考情報 無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法⁵⁾に記載の清浄度評価方法と許容基準を参考にすることで、製造工程にふさわしい環境基準を満たせる。無菌医薬品の製造工程ではGood Manufacturing Practice (GMP) を通じた実施が求められ^{6,7)}、無菌試験法の実施においてもGMPに準拠するのが適当と考えられる。日局17第二追補で、参考情報から無菌医薬品製造区域の環

境基準に関する「最終滅菌医薬品のパラメトリックリリース」、「培地充填試験 (プロセスシミュレーション)」及び「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法」が削除されたが、2019年7月以降は無菌医薬品の製造等における参考に供するものとされている。

GMPでは日本は2014年7月から医薬品査定協定及び医薬品査察共同スキーム (The Pharmaceutical Inspection Convention and Co-operation Scheme : PIC/S) に加盟した⁸⁾ことから、Revision of PIC/S GMP Guide (PE 009-14)⁹⁾の規定が適用される。微生物の混入リスクを最小限にするための施設・設備に関する基準として利用できるAnnex 1 - Manufacture of sterile medicinal products (2018年7月更新) がPIC/S基準に導入予定である。この設備の基準と性能に関しては、日本においては2001年に廃止された米国連邦規格 (FED-STD-209E) を用いることがあることから、PIC/S規格 (EU GMP規格)、国際規格ISO14644-1:2015及び米国連邦規格との比較をTable 1 にまとめた。PIC/S基準では、防塵室及び防塵設備は空気中微粒子数を性能評価基準として空気清浄度が高い方からGrade AからGrade Dまでに分類され、同等の基準が日局17参考情報 無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法⁵⁾で定められている。

2.2. 防塵施設の構成と設備

防塵に必要な不可欠な高性能フィルター (High Efficiency Particulate Air Filter : HEPA) は密度の高いガラス繊維であり、核兵器開発において放射性エアロゾルの拡散防止のために開発された¹⁰⁾。防塵室ではHEPAフィルターで清浄化した空気が一方向流として流され、その方向により垂直層流型及び水平層流型に分類される¹¹⁾。水平層流型では一方の壁面からもう一方の壁面へ気流が流れ、垂直層流型では天井からの気流が床に到達して壁面の床側から出て行く。水平層流型は効果的だがHEPAフィルターの面積から経済的ではないため、床面での乱流や机等の攪乱因子に弱い垂直層流型が選択されることが多い。気流は0.45 m/s程度あれば十分な清浄度回復力があるとされる。

上位の清浄区域の設定には周辺環境が求められる⁹⁾。Grade A区域であればクリーンベンチ又は安全キャビネットをGrade B周辺環境に設置することで達成される。清浄度の高い環境は陽圧を保つことで空気中粒子の侵入を阻止することから、清浄区域間は気圧差を維持するためにエアロックの設置が望ましい⁹⁾。アイソレーターをGrade A区域の設定に用いる場合には、その機能性から、周辺環境としてGrade D以上であれば良い。内部が陽圧のクリーンベンチに対して内部が陰圧の安全キャビネットは清浄空間を維持する能力は劣るが、無菌

Table 1. Comparison of the criteria among PIC/S EU GMP, ISO14644- 1 and FS 209E

ISO* ²	FS 209E* ³	EU GMP* ¹	Maximum permitted number of particles/m ³ for tabulated size at rest* ⁴					
			0.1 μm	0.2 μm	0.3 μm	0.5 μm	1.0 μm	5.0 μm
1	—* ⁵	—	10	2	—	—	—	—
2	—	—	100	24	10	4	—	—
3	1	—	1,000	237	102	35	8	—
4	10	—	10,000	2,370	1,020	352	83	—
4.8	—	A	—	—	—	3,520	—	20
			(—)	(—)	(—)	(3,520)* ⁶	(—)	(20)* ⁵
5	100	B	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
			(—)	(—)	(—)	(352,000)* ⁶	(—)	(2,900)* ⁵
6	1,000	—	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
7	10,000	C	—	—	—	352,000	83,200	2,930
			(—)	(—)	(—)	(3,520,000)* ⁶	(—)	(29,300)* ⁵
8	100,000	D	—	—	—	3,520,000	832,000	29,300
9	—	—	—	—	—	35,200,000	8,320,000	293,000

*¹ PIC/S PE009-14 (Annexes), 2018 July.*² ISO14644-1:2015.*³ Federal Standard 209E Cancellation on November 29 in 2001.*⁴ The particles are equal to or greater than the tabulated size.*⁵ Not assigned.*⁶ Parentheses indicate the numbers in operation.

試験ではバイオセーフティーレベル (Biosafety Level : BSL) 2 の微生物を使用することから、拡散防止のため安全キャビネット内における物理的封じ込めレベル 2 (Physical containment level 2 : P2) での操作が求められる¹²⁾。アイソレーターも通常は漏洩対策がされていないが、封じ込めタイプのアイソレーターはP2レベルとしての性能を備えていれば拡散防止に資する。

高毒性物質から作業者を保護する目的で開発されたアイソレーターは、1970年代末から防塵設備として導入が進み無菌医薬品製造ラインの標準的な設備となった¹³⁾。アイソレーターでは気相過酸化水素又は過酸化水素低温ガスプラズマにより使用器具及び検体容器表面の滅菌を行うことで、製品の無菌性保証水準 (SAL) が 10^{-6} より小さくなり、日局17の最終滅菌法³⁾と同程度まで汚染リスクが低減する。気相による過酸化水素を用いた滅菌では表面のみが滅菌され内部及び接触面は滅菌されない¹⁴⁾。そのため、滅菌前の器具、培地及び検体を入れた容器の配置が重要となり、器具を吊り下げ、培地や検体は接触面積を最小化するために金網の上に置くなどの工夫が必要となる。セルロース系の機材は、材質が過酸化水素を吸着することから滅菌が難しいことが知られている¹⁵⁾。また、アイソレーターの設置環境は、空気中の水

蒸気により滅菌効率が悪化することを念頭に置いておく必要がある¹³⁾。アイソレーターは、比較的容易にGrade A区域を作り出せるが、その構成を理解した上で日常的・定期的な整備が必要である。例えばグローブのピンホールはアイソレーターの自動点検機能によって検出されないことがあることから、定期的に専用の装置で調べる必要がある。

2.3. 清浄区域内の空气中微粒子及び微生物学的モニタリング

清浄区域内では空气中粒子及び微生物のモニタリングが求められ、少なくとも待機時と作業時に0.5 μmと5 μmの粒子数を測定する必要がある (Table 1)。器具、用具及び検体の受け渡しはパスボックスで行い、無駄な出入りを抑制して清浄環境を保つ。清浄区域内では繊維が拡散する可能性のある紙・布などの使用を控え、使い捨ての化学繊維の不織布を使用し、着衣も無塵衣にするなどの工夫が求められる。特に、作業員から発生する粒子を抑制するため、空気清浄度の違いによって適した無塵衣を選択する。

微生物モニタリングでは区域内の浮遊菌数測定及び設備の表面付着菌を測定する⁵⁾。微生物学的モニタリング

Table 2. Recommended limits for the microbial contamination in PIC/S EU GMP

PIC/S EU GMP	Air Sample (CFU/m ³)	Settle plates ^{*1} (CFU/plate)	Contact plates ^{*2} (CFU/plate)	Glove print ^{*3} (CFU/plate)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	— ^{*4}
D	200	100	50	—

^{*1} Diameter is 90 mm.

^{*2} Diameter is 55 mm.

^{*3} 5 fingers are stamped on a plate.

^{*4} Not assigned.

の基準をTable 2にまとめた。浮遊菌数測定は受動的な方法及び能動的な方法の二つに分類される。受動的な方法では、落下菌の測定があるが、防塵室の気流に強く影響される。能動的な方法では、1 m³の空気をエアースンプラーで寒天培地に吹き付けたり、適当な液体や0.45 µmフィルターを通したりして、集菌・培養して検出する。表面付着菌数測定は、表面の材質及び形状から回収率が異なることを考慮して、コンタクトプレート法、拭き取り法又は粘着集菌法によって実施される。日局17参考情報⁵⁾、PIC/S基準⁹⁾、USP42<1116>を参照すると、いずれも測定した平均菌数が基準を下回ることを求めているが、この基準は統計学的に意味がないことから、USP42<1116>ではGrade Aでは1 CFU (Colony Forming Unit) でも汚染原因を追究することを勧めている。

最も大きな微生物の混入リスクは搬入する機材や検体ではなく、作業員に由来することが知られている。例えばアイソレーターに準じる設備として無菌操作に作業員の直接介在が生じるRestricted Access Barrier Systems (RABS) では、待機時における10⁻⁶程度の汚染リスクが、作業時では最大10⁻³程度まで上昇することがリスク解析により判明している¹⁶⁾。

アイソレーターは製造者によって滅菌能力のバリデーションが行われており、外から粒子が侵入しなければ無菌が保たれることから、微生物のモニタリングの頻度を落とすことができる⁵⁾。USP42<1116>及びUSP42<1208>ではこの前提から、アイソレーター内部における空気中粒子数の連続モニタリングを重視しており、運用中の粒子数の増加を微生物学的汚染として、アイソレーターの故障として捉えることができる。補助的に、ワーストケースを想定した表面付着菌数測定を通じた微生物学的なリスクファクターの把握から微生物の混入への対処を具体化できる。

無菌試験法が保証するSALは10⁻¹程度と比較的大き

な値で、その検出力は低い¹⁷⁾。Grade A区域での無菌操作法では人が介入する操作において汚染リスクが10⁻³程度と見積もられ¹⁶⁾、汚染率が0.1%というワーストケースでも検体10個からは検出率1%程度、20個からは検出率2%程度と、無菌試験で検出される確率は低い。環境モニタリングが適切に実施されたGrade A区域では、試験による菌の混入リスクは非常に小さくなり、信頼性のある無菌試験法を実施できる。これ以下のSALを保証するには、SALが10⁻³～10⁻⁶では日局17参考情報 培地充填試験 (プロセスシミュレーション)¹⁸⁾で、SALが10⁻⁶以下では日局17参考情報 最終滅菌医薬品のパラメトリックリリース¹⁹⁾から、物理的及び微生物学的手法に基づいた滅菌工程のバリデーションを実施する。管理された製造工程では、無菌試験法が陽性の時には、その手順又は製造工程に何らかの異常が起きていることを意味している。

3. 第十七改正に準拠した無菌試験法

3.1. 無菌試験法の概要

無菌試験法は、日局17一般試験法4.06無菌試験法³⁾に従い行われ、試験用菌株の調製、培地性能試験、手法の適合性試験及び無菌試験の4つから構成されている。日局17に収載の試験用菌種をTable 3にまとめた。好気性細菌、嫌気性細菌、真菌の6菌種を調製して培地性能試験及び手法の適合性試験に用いる。培地には液体チオグリコール酸培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCD培地) を使用する。無菌試験にはメンブランフィルター法及び直接法の二法が収載されている。いずれの方法でも微生物の増殖阻害活性が無いこと又は除去されたことを手法の適合性試験で確認することが求められる。どちらの方法を使うかは剤型に対応して選択する。例えば、注射剤のうち懸濁注はメンブランフィルター法に非適応の場合があり、また生物学的製剤基準に収載されるワクチン等では無菌試験法の方法が指定されていることがある。

Table 3. The test micro-organisms indicated as suitable strains in JP17 for the growth promotion test and the method suitability test

Test Micro-organisms	Suitable strains
Aerobic bacteria	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NBRC 13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118
Anaerobic bacterium	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 or ATCC 11437, NBRC 14293
Fungi	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NBRC 1594, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, NBRC 9455, IP 1431.83, IMI 149007

3.2. 無菌試験法の試験用菌株の調製と手法の適合性試験

Table 3 の試験用菌種は菌名のみが指定され、適した菌株が日局17表4.06-1.に収載されている。これらの菌株は*Bacillus subtilis*を除き全てがBSL 2に該当し、無菌医薬品の製造工程においては汚染源となりうるため、慎重に取り扱うことが求められる。試験用菌株は日局17一般試験法4.05微生物限度試験法I, II.^{20,21)}に収載された方法で調製を行う。これらの微生物株はシードロットシステム²²⁾により管理され、適した機関から入手した微生物を継代数0 (F0) として、マスターシードロット (F1) から5代までを試験に用いる。F5 継代株を解凍した時点でF6 となり継代数が限界になる。近年では微生物数をフローサイトメトリーで管理して凍結乾燥した製品²³⁾が利用でき、多くの無菌試験法において活用されている。

培地性能試験は用いる培地に無菌試験法を妨害する因子又は菌が含まれないこと、手法の適合性試験では検体に菌の生育を妨害する因子がないことをそれぞれ確かめる。いずれにおいても100 CFU以下を植菌する。

培地性能試験では、培地の製造後に1回は試験用菌種で生育に関するバリデーションを行い、培地が性能を維持する期間を予めバリデートしておくことが求められる。市販品培地はバリデートされた使用期限以内のものを使用するが、この場合においても1ロットにつき1回は施設バリデーションとして施設内の条件で試験用菌種の増殖を確認することが望ましい。手法の適合性試験では無菌試験と厳密に同じ方法が求められ、施設、装置、器具、培地及び検体の全てが同じである必要があり、全ての試験用菌種で増殖に問題がないことを確認しておく。製造現場においては製品ごとに適合性試験を行い、製品の製造工程の変更時には再度実施することが求めら

れる。

培地性能試験及び手法の適合性試験は培地に適した菌の増殖を確認しており、培地に適さない菌が増殖できないことは確かめていない。状況によっては、無菌試験法に液状チオグリコール酸培地及びSCD培地にグルコース・ペプトン培地やサブロー培地など、他の培地を追加して対応する¹¹⁾。無菌試験法では、実施した条件下で増殖する微生物がいるかを判定することから、陰性の判定は完全に無菌であることを証明するものではない。

3.3. 無菌試験

無菌試験はこれまでに述べたGrade A環境で無菌的に行うが、その詳細は各施設、設備のマニュアル及び日局17を参照していただきたい。手法としてメンブランフィルター法及び直接法の2法のうちいずれかを用いる。検体に増殖阻害活性がある場合にはメンブランフィルター法が適しているとされる¹¹⁾。直接法では、培地容量の10%を超えないように検体を添加して培養する。検体の10倍量の培地が必要となり、メンブランフィルター法より多くの培地が試験に必要なになる。

無菌試験を行う前に、検体の剤型、容器材質、形状及び最少供試個数と各培地あたりの最少試料採取数を確認する。最少供試個数及び最少試料採取数はどちらも最少であることに注意する必要がある。最少供試個数が無菌試験の全試験を行える本数であれば良いが、各培地ごとの最少試料採取数を合わせた数（合計試料採取数）に満たなければ最少供試個数より多い数が必要になり、逆に合計試料採取数を満たしている時には最少供試個数に注意する必要がある。

メンブランフィルター法は装置として加圧により送液するクローズドシステムと、減圧により送液するマニ

Table 4. Facilities and devices used in NIHS for sterility tests

Facilities and Devices	Descriptions
Clean room	The operation is under Grade D.
HHPC6 + Air Particle Counter (Beckman Coulter)	To count the numbers of particles in the clean room.
Sterile & Containment Isolator 3D Clean System (Airex)	The inside is sterilized with Hydrogen peroxide gas to achieve Grade A area.
Steritest Symbio ISL (Merck)	For the Membrane filtration method with Closed-system.
AIR IDEAL 3P Traceability (bioMérieux)	An air sampler for the microbial monitoring in the isolator.

ホールドシステムの二つがある。クローズドシステムではペリスタルティックチューブポンプにより検体をメンブランに送液するが、同一のシステムで培地を送液してそのまま培養することから操作による汚染リスクが小さい。一方、マニホールドシステムではメンブランの取り出しが必要で、時にメンブランを切断して培地に入れることから、汚染リスクが大きい¹¹⁾。これらのメンブランフィルター法では、メンブランの特性について、材質、流速及び圧力の適正值を把握する必要がある。材質では、検体成分のメンブランへの吸着を考慮する必要がある。メンブランの材質を十分注意して選択する必要がある。抗菌活性を持つ場合には洗浄を行う必要があるが、抗菌成分がメンブランへ吸着した場合には洗浄が不十分となる場合がある。メンブランへの流速が速すぎると圧力の増大に伴うメンブランの破損により細菌が通過する危険性が生じること、流速が遅すぎるとろ過に長時間を要することから、保証された流速及び圧力の適正值に留意する必要がある。

日局17では単に0.45 µm以下のポアサイズのメンブランフィルターを使用することを求めている。細菌の短径は0.3 µm程度であることから、論理的には0.2 µmフィルターが最適に思える。0.45 µmと0.2 µmメンブランフィルターの細菌捕集能力を比較した論文²⁴⁾からは、菌数が少ない場合においては性能に差はなく、さらに0.45 µmフィルターのほうが生菌回収率が高いことが判明している。また、0.2 µmでは流速が低下して試験が高速化できないことから、0.45 µmメンブランフィルターが無菌試験法に最適とされる。

メンブランフィルター法及び直接法の操作を行なった後は、恒温槽内で培養を行う。培養では温度管理が求められ、温度計の定期的な温度補正を行い、可能ならば保温庫内の温度のばらつきを評価する。この温度計は無菌試験の期間中、14日間の温度変化を十分に記録できる記録装置付きの温度計が望ましく、さらに温度が設定範囲を外れる時には警告が行われることが望ましい。

実施環境モニタリングデータの異常や手順の逸脱が

あった時には、無菌試験の結果を棄却して再試験を行うことができる。前述したように無菌試験の検出力は基本的に低く、陽性検体であっても試験を繰り返すことで陰性とする可能性が大きい。極めて大きな逸脱がない限り試験結果を棄却することは望ましくない。

4. 国立医薬品食品衛生研究所での無菌試験における運用体制の整備

4.1. 概要

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部で行われる無菌試験は、主に無菌医薬品の収去試験として行われる。前項で示した基準に従って設置した設備、装置及び運用体制について、導入した設備をTable 4にまとめた。

4.2. 高度無菌室及びアイソレーターの設置

無菌試験はこれまでGrade B環境のクリーンルーム内に設置された10万クラスのクリーンベンチによるGrade A環境で行われていた。移転に伴い、衛生微生物部では陽圧に調整した防塵室を設置し、Grade C相当の空気清浄度を満たして高度無菌室を整備した。実際のGrade C環境ではエアシャワーの設置が求められることから、高度無菌室はGrade D環境として取り扱い、室内にエアレックス社製の無菌試験用（無菌＋封じ込め）アイソレーター装置 3D Clean Systemを設置することでGrade A区域の清浄環境を達成した（Fig.1）。このアイソレーターは封じ込めタイプであり、内部でBSL 2相当の微生物を扱うことができる。高度無菌室ではパーティクルカウンターで、アイソレーター内部では設備自身が粒子数モニタリングを行っている。アイソレーター内部での微生物学的モニタリングではエアサンプラーによって好気性浮遊菌を確認している。これらの設備によって、Grade A区域として最適な条件下での無菌試験及び日局17の改訂に資する試験法の検証が可能となった。これらの設備を定期的に点検及び清掃して試験に用いる体制をとっている。



Fig. 1. An image of the Sterility Test Isolator 3 D Clean System installed in National Institute of Health Sciences

4.3. 無菌試験用の設備・用具

無菌医薬品及び医療機器の無菌試験に資する装置として、メンブランフィルター法用のクローズドシステムとしてMerck社のSteritest Symbio ISLを設置した。この装置では、検体の剤型及び必要量に対応する多数の製品が利用でき、適切な製品を選ぶことで医薬品のみならず医療機器にも対応可能である。日本では単回使用医療機器（SUD: Single Use Device）に関して、2017年7月に告示された再製造単回使用医療機器基準²⁵⁾を満たすことで再製造SUDとして使用することが可能となっており、今後は再製造SUDを含む医療機器の無菌試験への対応する体制を整えていく必要がある。

無菌試験法に必要な微生物はBioBall（bioMérieux社）を購入することで対応した。BioBallは微生物数が厳密に管理された製品であり、Merck社から購入したSCD培地及び液体チオグリコール酸培地の培地性能試験に用いている。BioBallの試験用菌株も適切な培地上で菌数を数えることでバリデーションを実施している。また、試験用菌種のうち製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターの取り扱うNBRC菌株を揃えてあり、国立医薬品食品衛生研究所における試験用菌株の調製法を確立する予定である。

4.4. 標準作業手順書の策定と実施体制の確立

無菌試験法を実施できる設備に加えてGMPに準拠した標準作業手順書（SOP）が求められ、特に国立医薬品食品衛生研究所では公的試験検査機関（Official Medicines Control Laboratories; OMCL）の一翼を担っている²⁶⁾ことから、無菌医薬品の収去試験としての無菌試験法に適しSOPを作成している。収去試験として行う無菌試験では手法の適合性試験は行わず、製造工程で実

施された適合性試験の情報を用いることとした。SOPの一部として設備の保全方法、機器の校正期限をまとめている。OMCLに資するように、SOPを改善していく。

5. 総括と今後の展望

日局17では無菌試験において、「試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない」とされているが、試験環境は適切な設備と適切な試験によって裏打ちされることが求められている。衛生微生物部ではGrade A区域としてアイソレーターを設置して適切に管理することにより、十分な確度を持った無菌試験をメンブランフィルター法で実施することが可能になった。

無菌試験は再生医療等製品や放射性医薬品等の無菌試験の結果を待つことができない製品についても実施される必要があり、これらに対応する核酸増幅法やハイスループット・シーケンシングを含む微生物迅速試験法による無菌試験の研究が国内外で進んでいる。新しい方法が考案される中で、培養により検知する方法は生きた微生物を検知する方法として確立されており、無菌試験の実施体制を整えたことによって、医薬品の微生物学的安全性確保に資する研究が可能となった。今後は収去試験に伴う無菌試験を実施するとともに、医療機器や再生医療等製品への対応、微生物迅速試験法の評価、宇宙ステーションやGrade A区域など閉鎖空間の環境調査などへ設備を活用したい。

文献

- 1) Kawanishi T: *Regulatory science Gakkaishi* 2018;8:1-3.
- 2) Tadano K, Kawanishi T: *Regulatory science Gakkaishi* 2017;7:185-196.
- 3) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.117-120.
- 4) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；p.9.
- 5) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.2424-2429.
- 6) 厚生省：“薬局等構造設備規則”，昭和36年2月1日厚生省令第2号。
- 7) 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課：“GMP事例集（2013年版）について”，事務連絡，平成25年12月19日。
- 8) Katori N: *Yakuzaigaku* 2014;74:414-421.
- 9) The Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme: “PIC/S GMP Guide (RELATED ANNEXES)”，2018; PE 009-14 (ANNEXES).
- 10) Melvin WF: First: *Journal of the American Biological Safety Association* 1998;3:33-42.

- 11) 佐々木裕子：“新GMP微生物試験法 第3版”，佐々木次雄，棚元憲一，菊池裕編，（株）じほう，東京，pp.187-200（2016）
- 12) World Health Organization: “Laboratory Biosafety Manual – Third edition” 2004;pp7-19.
- 13) Tanimoto K, Koshida I, Kokubo M: *Nihon PDA Gakujutsushi To Validation* 2017;19;45-55.
- 14) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.2414-2417.
- 15) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.2429-2434.
- 16) 片山博仁：“新GMP微生物試験法 第3版”，佐々木次雄，棚元憲一，菊池裕編，（株）じほう，東京，p. 445-467（2016）
- 17) Sasaki Y: *Boukinboubai* 2012;40;51-60.
- 18) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.2417-2419.
- 19) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.2411-2414.
- 20) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.109-113.
- 21) 厚生労働省：“第十七改正日本薬局方”，2016；pp.113-117.
- 22) 中川恭好：“新GMP微生物試験法 第3版”，佐々木次雄，棚元憲一，菊池裕編，（株）じほう，東京，p. 97-98（2016）
- 23) Morgan CA, Bigeni P, Herman N, Gauci M, White PA, Vesey G: *Cytometry A*. 2004;62:162-168.
- 24) Nanjo M: *Kankyō Kanri Gijutsu* 2003;21;96-103.
- 25) 厚生労働省：“再製造単回使用医療機器基準”，厚生労働省告示第二百六十一号，平成29年7月31日.
- 26) Katori N: *Kokuritus Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 2014;132; 22-35.