

無菌医薬品の製造における 環境微生物モニタリングでの考慮事項

重要なポイントを三極のガイドライン
との関わりで考える



第3回バイオテストセミナー

於： 東京 2009年5月21日
大阪 2009年5月22日

ファルマ・ソリューションズ(株) 小暮 慶明



本日の講演内容

1. 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか
2. 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い
3. 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか
 - ・規格と試験方法の関連をどう考えるか
 - ・試験測定箇所と製品への汚染の関係
4. 環境管理基準値の逸脱への対応
 - ・逸脱時はどのような措置をとるべきか
 - ・原因追究の方法論
 - ・環境の汚染と製品汚染のリスクの関係をどうするか
5. 表面付着菌測定法をめぐる諸問題



議論1：最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

問題提起（前提：最終滅菌法は**湿熱滅菌**）

1. 無菌医薬品の製造方法は、「最終滅菌法」と「無菌操作法による製造」の2つがある。
この選択は、どの様な原則によるのであろうか？
2. 「無菌操作法による製造」であっても、加熱処理を行う製品がある。それでは、**どの様な加熱条件が最終滅菌法との境界となるのであろうか？**
3. 「無菌操作法による製造」と「最終滅菌法」は、企業にとって、**どこに大きな違いが出るのであろうか？**

議論1：最終滅菌製品と無菌操作法により 製造した製品の境界はどこにあるか

結 論

1. 最終滅菌と無菌操作法の切り分けは、欧州のガイドランなどを参考にしてグローバルな視点で行うべきである。
2. 結論として、「F₀ < 8の滅菌条件は、無菌操作法での製造」として微生物管理を行うべきである。
3. 「無菌操作法」と「最終滅菌法」とでは、環境微生物管理のコストが大きく異なるであろう。

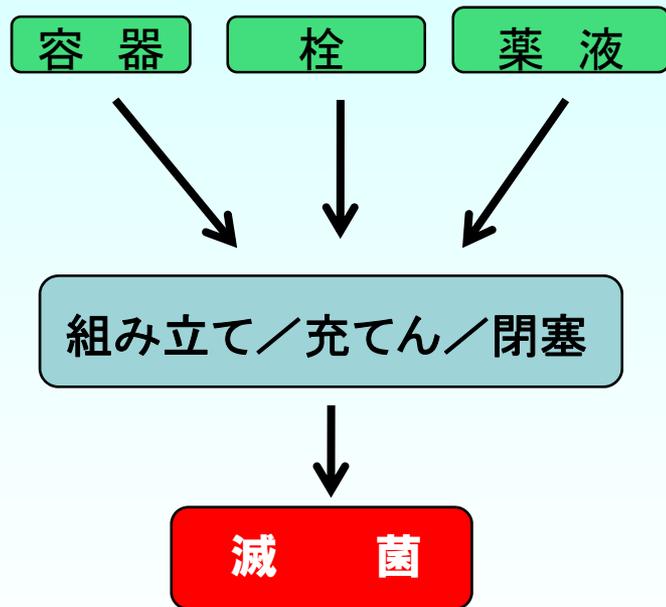
注：「F₀ = 8」は、121°Cで8分間の加熱に相当する熱量である。

議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

最終滅菌法と無菌操作法の様式の違い

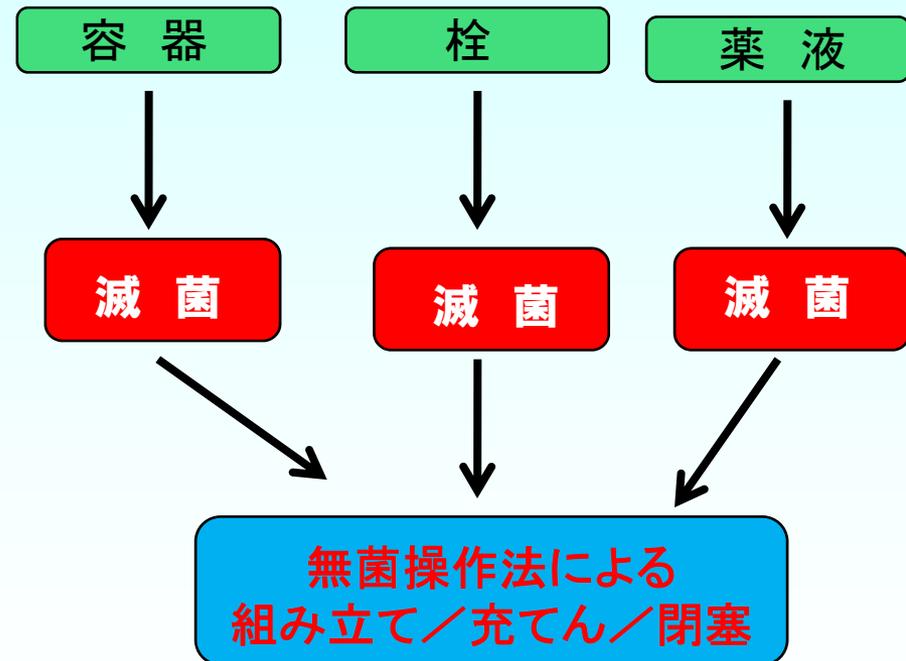
最終滅菌法 (一例)



ここで問題となるのは、

「閉塞状態での加熱」 ≠ 「最終滅菌法」 である。

無菌操作法 (一例)



議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

JP15参考情報

「10.最終滅菌医薬品の無菌性保証」

(前文)

- ・最終滅菌を適用できる医薬品は、通例、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得られる条件で滅菌を行わなければならない。

1. 定義 : 「1.1 最終滅菌」の項

被滅菌物が最終容器又は包装におさまった状態で滅菌され、滅菌後の微生物の死滅を定量的に測定または推測できる滅菌法をいう。

議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

JP15 参考情報「22.微生物殺滅法」

2.1(1) 高圧蒸気法の項 :

「通例の高圧蒸気法の条件」の F_0 計算値

「115~118 °C : 30 分間」 \Rightarrow Min. $F_0 = 7.5$, $z=10$ を仮定

「121~124 °C : 15 分間」 \Rightarrow Min. $F_0 = 15.0$, $z=10$ を仮定

「126~129 °C : 10 分間」 \Rightarrow Min. $F_0 = 31.6$, $z=10$ を仮定

F_0 を計算してみると、およそ「 $F_0 > 8$ 以上」
であると推測できる。

議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

国内では、最終滅菌法については、次の指針が出されている。

事務連絡、平成19年6月4日

「最終滅菌法による無菌医薬品の製造に関する指針」

厚生労働省医薬食品局 監視指導・麻薬対策課 品質指導係

定義

2.55 最終滅菌法 (terminal sterilization);

被滅菌物が最終容器又は包装におさまった状態で滅菌され、滅菌後の死滅を定量的に測定又は推測できる滅菌法をいう。無菌医薬品の場合は通例、10⁻⁶以下の無菌性保証水準が得られる条件で最終滅菌を行う。

議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

最終滅菌法指針 (日本)

表 11-1 パラメトリックリリースの許容滅菌条件

条件	熱負荷量 (F_0)	最大許容 生菌数 (\checkmark 容器)	Bioburden の 最大許容 D_{121} 値 (min)	微生物試験	
				生菌数 試験	耐熱性 試験
1	$\geq 121^\circ\text{C}$, $\geq 15\text{min}$	100 cfu	1. 5	定期的 ^{注1}	必要時 ^{注2}
2	$F_0 \geq 8$	10 cfu	1. 0	定期的 ^{注3}	定期的 ^{注3}
3.	$F_0 : 4 \sim 8$	0 cfu	0. 5	定期的 ^{注4}	定期的 ^{注4}

注1：初期のバリデーション時に加え、少なくとも1～2回/年を推奨頻度とする。

注2：必要時とは、初期のバリデーション時、および生菌数試験で最大許容生菌数のアクションレベルを超えた時をいう。

注3：生産の頻度にも依るが、初期のバリデーション時に加え、少なくとも1回/月を推奨頻度とする。(また、生菌数試験を行う時は耐熱性試験も行うことが望ましい。)

注4：生菌数試験は、無菌試験を実施する。耐熱性試験は、ろ過前液について行う。

現状では F_0 が4以上のものも、対象になっているように思われる



議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

最終滅菌法指針（日本）

前のスライドに示したように、現状では日本の最終滅菌法指針は、「 F_0 が4~8」の滅菌条件も、最終滅菌法の範疇にあるように解釈される。しかし、これは次の点を考慮しなければならない。

- ① この条件は、**暫定的**（経過措置的）であると思われる。
（この記載は、早い時点で修正されると思われる）
- ② **SALが 10^{-6} であることを、担保**しなければならない。
従って、薬液のバイオバーデン管理ならびに分離菌の熱抵抗性調査による管理は必須事項である。
- ③ **滅菌条件が「 $F_0 < 4$ 」の製剤は、早急に無菌操作法による製造での管理を確立する必要がある。（現状で逸脱状態）**

議論1:

最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

■ 最終滅菌法と無菌操作法の選択の原則

1. 最終滅菌法の適用が可能な製品を、無菌操作法で製造してはならない。 ⇒ **患者様へのリスクの回避**
2. 無菌操作法で製造する場合は、最終滅菌法が適用できない理由を、データで立証する必要がある。
(一般的には、薬液の分解データ)
⇒ **製造に無菌操作法を用いることの正当性を立証**
3. 無菌操作法で製造した製品でも、緩和な加熱処理が可能な場合は、それを行うべきである。
⇒ **製造過程での微生物汚染のリスク低減**

議論1:

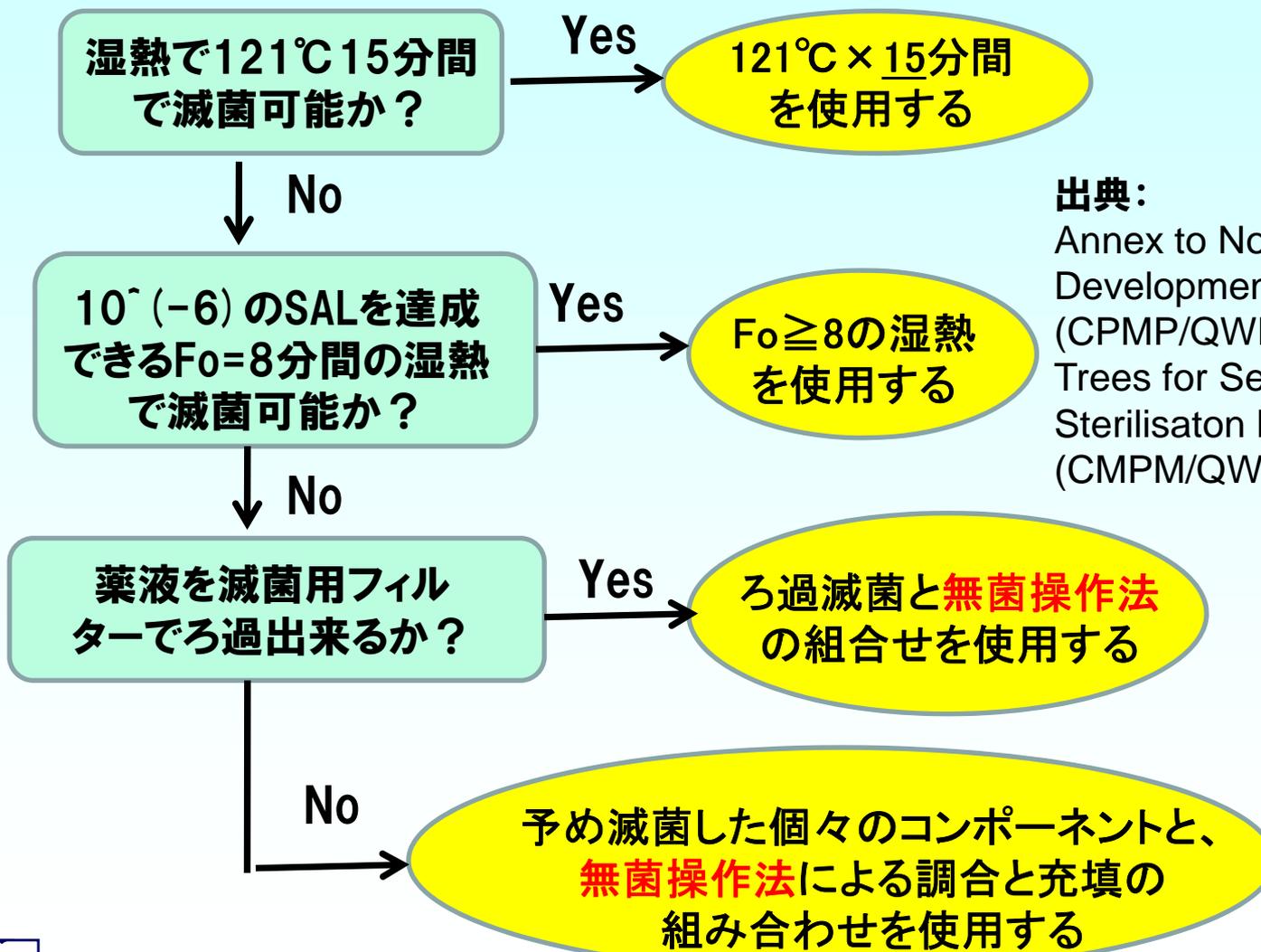
最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

■ 最終滅菌に適用する滅菌方法が、 本来備えているべき要素

- ① 滅菌の機構が十分に解明されている。
- ② 滅菌工程の物理的な重要パラメータが明確であり、それらの制御と測定が可能である。
- ③ 滅菌工程を適切な生物学的滅菌指標体 (BI) を用いて、微生物学的にバリデート出来る。
- ④ 滅菌操作を効果的かつ再現性よく実施できる

議論1： 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか

滅菌法の選択のガイダンス（欧州）



出典:

Annex to Note for guidance on Development Pharmaceuticals (CPMP/QWP/155/96): Decision Trees for Selection of Sterilisation Methods (CMPM/QWP/054/98)

欧州薬局方（6.0，2008年1月）の規定

5.1 GENERAL TEXTS ON MICROBIOLOGY

5.1.1. METHODS OF PREPARATION OF STERILE PRODUCTS

METHODS AND CONDITIONS OF STERILISATION

TERMINAL STERILISATION

Steam sterilisation (Heating in an autoclave)

... For this method of terminal sterilisation the reference conditions for aqueous preparations are heating at 121 °C for 15 min. Other combinations of time and temperature may be used provided that it has been satisfactorily demonstrated that the process chosen delivers an adequate ...

訳文(参考)

... 最終滅菌のこの方法は、**水溶性の製品に対する基準条件は、121°Cで15分間の加熱である。**他の時間と温度の組合せも、その選択したプロセスが適正な...を与えることが十分に立証されているならば、使用することが出来るであろう。

FILTRATION

ASEPTIC PREPARATION

米国薬局方での滅菌条件規定

<1211> STERILIZATION AND STERILITY ASSURANCE OF COMPENDIAL ARTICLE

Steam Sterilization

The process of thermal sterilization employing saturated steam under pressure is carried out in a chamber called an autoclave. It is probably the most widely employed sterilization process.² The basic principle of operation is that the air in the sterilizing chamber is . . .

- 2 An autoclave cycle, where specified in the compendia for media or reagents is a period of 15 minutes at 121° , unless otherwise indicated.

上記は、培地および試薬に関する記載であり、製品の滅菌条件に関して具体的な条件記載はないが、121°Cで、15分間を基準にしていると思われる。USPは、F₀概念の適用を強調している。

本日の講演内容

1. 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか
2. 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い
3. 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか
 - ・規格と試験方法の関連をどう考えるか
 - ・試験測定箇所と製品への汚染の関係
4. 環境管理基準値の逸脱への対応
 - ・逸脱時はどのような措置をとるべきか
 - ・原因追究の方法論
 - ・環境の汚染と製品汚染のリスクの関係をどうするか
5. 表面付着菌測定法をめぐる諸問題



議論2：最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い

問題提起

1. 同じ清浄度グレードの区域で、無菌操作法による製品と最終滅菌製品を製造した場合、**環境モニタリングの測定頻度は変えられるか？**
2. 滅菌（*）前のバイオバーデン管理は、2つの製造方法で違いがあるだろうか？

*：最終滅菌法では、製品を充填し密閉した状態での滅菌であり、無菌操作法では、ろ過滅菌などの最終段階の無菌化工程を意味する。

議論2：最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い

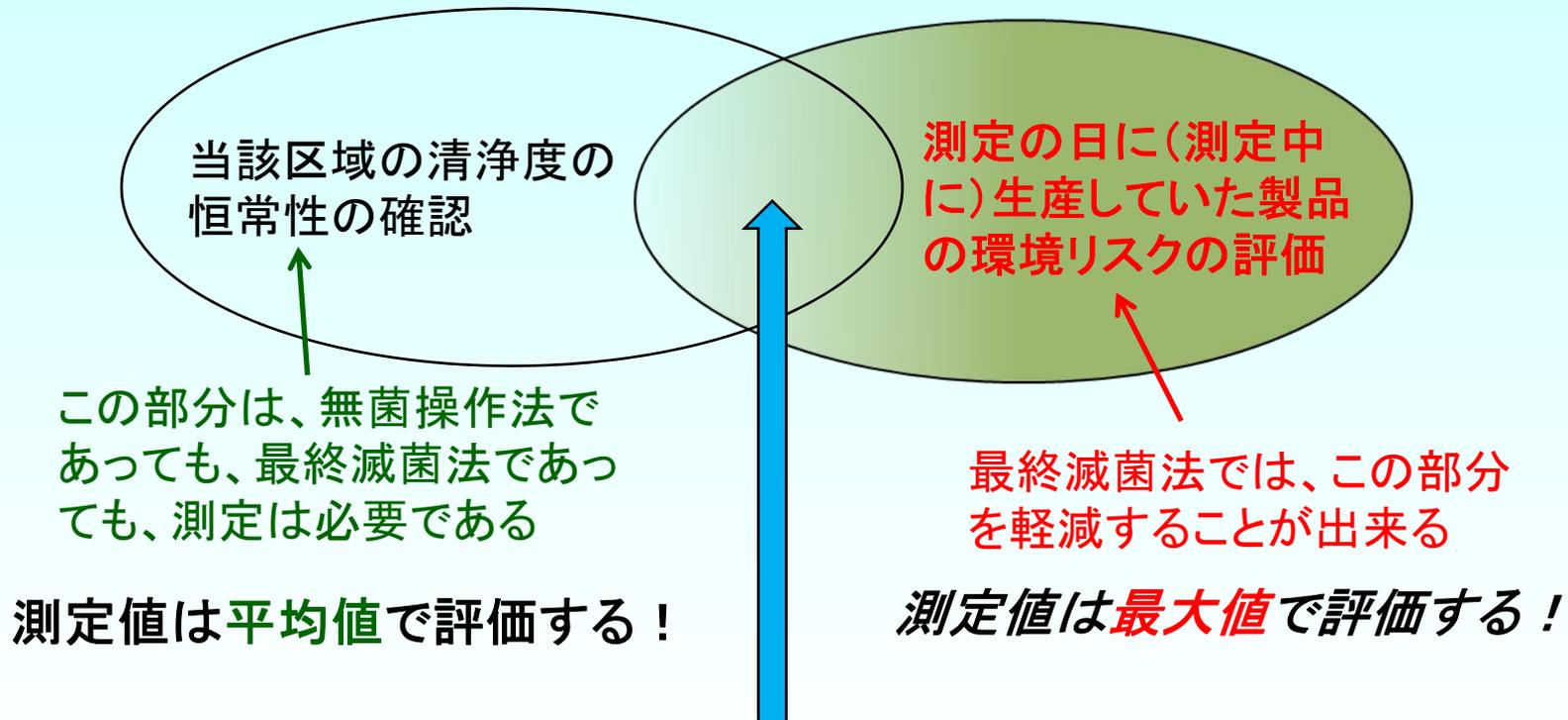
結論

1. 同じ清浄度等級の区域でも、無菌操作法による製品と最終滅菌製品の製造では、環境モニタリングの測定場所・頻度の変更が可能である。なお、最終滅菌法では、無菌操作法の場合より低い清浄度区域で作業が可能である。
2. 欧州向け製品では、湿熱滅菌前のバイオバーデン管理は頻度において差がつけられる場合がある(*)。それ以外の地域では法規面の規定が不明であり、自社の論理を明確にすることで、環境管理に差をつけることは可能である。

* : EU-GMP (Annex 1) は、最終滅菌法および無菌操作法の両方に関して毎バッチ(ロット)について、バイオバーデンの測定を求めている。最終滅菌法でオーバーキル条件の場合は、その頻度を減らすことが出来る。

議論2: 最終滅菌法と無菌操作法での製造における
環境微生物モニタリングの管理の違い

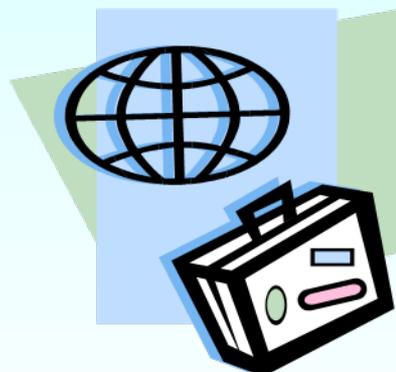
■ 環境モニタリングの2つの側面



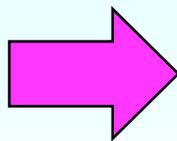
環境モニタリングは、2つの側面を持つが、それらは、特に
Grade A区域での測定で、重複している場合が多い。

議論2: 最終滅菌法と無菌操作法での製造における
環境微生物モニタリングの管理の違い

- 滅菌前のバイオバーデン管理は、無菌化を行う滅菌法の能力のみに関係し、2つの製造方法(無菌操作法と最終滅菌)の性質の差異に関係しない

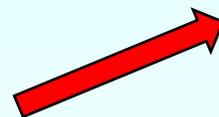


滅菌直前のバイオバーデン
この大きさと種類が問題!

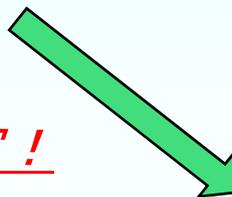


滅菌方法
この能力は常に一定!

バイオバーデンが設計
想定量を超えると



滅菌不全!



バイオバーデンが設計(規定)
範囲内であれば!



無菌化達成

■ 製造法による環境微生物モニタリングの 測定頻度の違い

日本国内の2つのガイドライン(無菌操作法と最終滅菌法)を見ると、測定頻度に関しては、差が無い。ただし、リスクに応じて増減出来ることを注記している。

無菌操作法による製造

モニタリング頻度

モニタリング箇所

最終滅菌法

頻度

縮小は可能!

箇所

リスクに基づく評価

議論2： 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い

EU-GMP Annex 1 (14 February 2008)

Paragraph 17 記載の滅菌法による作業区域の違い

グレード	無菌操作法 Paragraphs 31-35	最終滅菌法 Paragraphs 28-30	備考
A	無菌操作法による調製および充てん	(<u>リスクの高い場合の</u>) 製品の充てん	リスクの高い作業のための局所的なゾーン
C	ろ過を行う溶液の調製	① (<u>リスクが高い場合の</u>) 溶液の調製 ② 製品の充てん	無菌製品の製造において、他より重要度が低い作業ステージ用の清浄な区域
D	洗浄後の構成部品(コンポーネント)の取扱	引き続き充てんを行う溶液および構成部品(コンポーネント)の調製/準備	

unusual risk

議論2： 最終滅菌法と無菌操作法での製造における 環境微生物モニタリングの管理の違い

■ EU-GMP Annex 1 (14 February 2008) での 「リスクの高い場合 (**unusual risk**)」とは 1

最終滅菌法の項

28. コンポーネントおよび多くの製剤の調製・準備は、微生物および微粒子の汚染を低くするために、少なくとも Grade D 環境で行ない、そして適切なる過と滅菌をすべきである。製剤が、微生物汚染が高いか、または**通常よりもリスクがある場合**、例えば、製剤が微生物の繁殖させ易い場合、滅菌を行うまでの時間が長い場合、あるいは、その操作が必ずしも密閉した容器中で行われない場合、その調製作業は、Grade C 環境で行うべきである。

議論2： 最終滅菌法と無菌操作法での製造における 環境微生物モニタリングの管理の違い

■ EU-GMP Annex 1 (14 February 2008) での 「リスクの高い場合 (**unusual risk**)」とは 2

最終滅菌法の項

29. 最終滅菌製剤の充填は、少なくともGrade C環境で行うべきである。
30. 製剤が、環境よりの汚染に対して**通常より高いリスク**を持つのであれば、例えば、充てん作業がゆっくりであるとか、容器の口が広いとか、閉塞まで、どうしても数秒間以上暴露されるという場合は、その充填は、少なくともGrade Cのバックグラウンドを持つ、Grade Aの区域で行うべきである。軟膏、クリーム、懸濁液、および乳液の調製と充填は、一般に、次に最終滅菌工程を持つGrade C 環境で行うべきである。

■ EU-GMPの滅菌前の菌数測定の要求 (湿熱)

EU-GMP Annex 1 (14 February 2008)

- 80. 滅菌前にバイオバーデンをモニターすべきである。滅菌直前の汚染度は、常用限度値 (working limits) 内にあるべきで、この限度値は使用する滅菌方法と関連で決めるものである。 バイオバーデンの定量は、無菌操作法による充填品と最終滅菌品の両方に対して、各バッチについて行うべきである。 最終滅菌製品にオーバーキルの滅菌パラメータが設定されている場合は、計画された適切な間隔で、バイオバーデンをモニターすべきである。パラメトリック・リリース・システムについては、バイオバーデンの定量は、各バッチについて行うべきであり、そして工程内試験として考えるべきである。該当する場合には、エンドキシンのレベルをモニターすべきである。全ての溶液、特に大容量である輸液においては、可能な場合は、充てん直前の部位において、微生物を捕捉するフィルターでろ過をすべきである。

■ EU-GMPのろ過滅菌に対する考え方

EU-GMP Annex 1 (14 February 2008)

- 110. 最終容器中での滅菌が可能な場合、ろ過のみでは十分でないと考えられる。現在利用できる方法として、蒸気滅菌が推奨される。(中略) ろ過工程を補うものとして、ある程度の熱処理を考慮すべきである。
- 111. 他の滅菌法と比較してのろ過法の潜在的な付加的リスクのために、充てん直前での、微生物捕集フィルターによる第2段のろ過を行うことが、賢明である。最終の無菌ろ過は、充てん部位に出来るだけ接近させて行うべきである。

■ ろ過滅菌前の菌数測定の要求

Note for Guidance on Manufacture of The Finished Dosage Form
(CPMP/QWP/486/95, Re-issued April 1996)

■ 7.1 滅菌方法

(前略)

ろ過滅菌に関しては、ろ過前のバイオバーデンの最大許容値を、承認書に記載すべきである。

多くの場合、**10 cfu/100mL以下** が適切なものであるが、フィルターの直径(訳注:厳密には、ろ過をするろ過装置の有効ろ過面積)との関連で、ろ過をする液量によってその値は左右される。
(以下略)

本日の講演内容

1. 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか
2. 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い
3. 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか
 - ・規格と試験方法の関連をどう考えるか
 - ・試験測定箇所と製品への汚染の関係
4. 環境管理基準値の逸脱への対応
 - ・逸脱時はどのような措置をとるべきか
 - ・原因追究の方法論
 - ・環境の汚染と製品汚染のリスクの関係をどうするか
5. 表面付着菌測定法をめぐる諸問題

議論3：環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

問題提起（前提：最終滅菌法は**湿熱滅菌**）

1. 規格と試験方法の関連をどう考えるか

規格と試験法の関係は、本来、まず規格を設定し、その規格が担保されるように試験法を定めるものである。しかし、**環境微生物試験法は、既に様々な試験法が存在していて、それを一つの規格（推奨値であるが）で管理しようとしている。**

2. 試験測定箇所と製品への汚染の関係

環境微生物試験では、どの様な考え方をもって測定箇所を設定し、**製品汚染との関連付**をしたら良いか

議論3：環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

結論（1）

1. 公的文書の環境微生物菌数の基準値は、推奨値であって、規格値ではない。

しかし、自社で根拠を以って基準値の設定することが難しいため、公的基準を準用しているに過ぎない。

現在の状況は、その様な状況になっていない。

- ・測定箇所の菌数の絶対値は見えていない
- ・一定の環境の管理条件下で、その状態が、変化を
起こしているか否かを見ている
- ・使用している環境微生物試験方法の感度と限界を認識し、その感度が一定に維持されていることを
データや記録を以って、客観的に示すべきである。

議論3：環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

結論 (2)

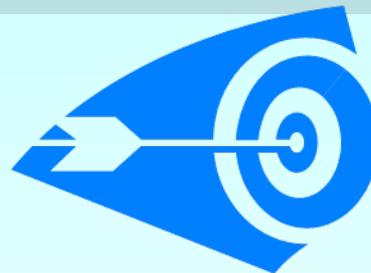
環境微生物試験は、製品への汚染のリスクを評価しているものである。したがって、次の点を留意すべきである。

- ① 測定箇所とその頻度は、明確な目的意識を以て決定すべきである。
- ② 特に、製品の汚染と直接的に関わる測定箇所（直接操作区域；グレード A および 直接支援区域；グレード B）は、その箇所での測定値の逸脱が生じた場合、何を意味するかを、十分に議論しておくべきである。

議論3：環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

規格と試験法は、本来、一体の関係にある

ターゲット（規格）
弓と矢（試験法）



まず規格を設定し、それに対応する試験法を設定する！

しかし、環境微生物モニタリング試験では！

道（規格）らしきものはあるが
そこに行く人（試験方法）の
状態と交通手段は様々である。



使用している試験方法で得られる結果が、環境の何を反映しているかという本質を考える必要がある。

議論3：環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

USP年次総会での<1116> 無菌操作法による製造環境の制御とモニタリングの報告（2008年9月24日）

“**Contamination Incident (Recovery) Rate**”という、「菌数ではなく、菌の出現頻度で環境の管理の状況を見る」という考え方は、試験方法や使用培地の差異を克服する一つの方法として注目される。

James Akers, Ph.D., Chair, USP Microbiology and Sterility Assurance Expert Committee

Microbiology - Overview of Current Initiatives Revisions to <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments

■ <http://www.usp.org/pdf/EN/meetings/ASM2008/presentations/session1track3c.pdf>



Quality of Manufactured Medicines – General Chapters Performance Testing – Microbiology Topics

Session I, Wednesday, September 24, 2008
10:00 a.m.–12:30 p.m.
James Akers, Ph.D., Chair, USP Microbiology and Sterility Assurance Expert Committee

***Microbiology – Overview of Current Initiatives
Revisions to <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments***

 USP Annual Scientific Meeting 2008 • September 24–26 • WestIn Crown Center • Kansas City, Missouri

議論3: 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか

■ Recommended Contamination Recovery Rate Targets

ISO Class (Grade; In Ope.)	Active air sample	Settle Plate (9 cm) 4 hr exposure	Contact Plate or Swab	Glove or Garment
Isolatore or Closed RABS (ISO 5 or better)	< 0.1%	< 0.1%	< 0.1%	< 0.1%
ISO 5 Grade A	< 1 %	< 1 %	< 1 %	< 1 %
ISO 6	< 3 %	< 3 %	< 3 %	< 3 %
ISO 7 Grade B	< 5 %	< 5 %	< 5 %	< 5 %
ISO 8 Grade C	< 10 %	< 10 %	< 10 %	< 10 %

James Akers, Ph.D., Chair, USP Microbiology and Sterility Assurance Expert Committee

赤字部分追記

Microbiology - Overview of Current Initiatives Revisions to <1116> Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments <http://www.usp.org/pdf/EN/meetings/ASM2008/presentations/session1track3c.pdf>



本日の講演内容

1. 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか
2. 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い
3. 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか
 - ・規格と試験方法の関連をどう考えるか
 - ・試験測定箇所と製品への汚染の関係
4. 環境管理基準値の逸脱への対応
 - ・逸脱時はどのような措置をとるべきか
 - ・原因追究の方法論
 - ・環境の汚染と製品汚染のリスクの関係をどうするか
5. 表面付着菌測定法をめぐる諸問題

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

問題提起

- 1 無菌操作法による製造での環境試験結果が逸脱となった時、どの様な措置をとるべきであろうか
2. 逸脱原因の追及は、どの様な方法論が考えられるであろうか
3. 製造環境の汚染と、製品の汚染のリスクの関係をどの様に考えたら良いであろうか

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

結論 (1)

逸脱の状況は様々であり、「定型的な対応方法」というものは存在しない。基本的な事項としては、：

1. 環境微生物の管理値(基準値)逸脱で、最も問題となるのは、汚染を生じたかも知れないという「可能性」であって、製品そのものが汚染したことを意味していないということである。
2. リスクに基づく様々な対応が想定されるが、その前提として、「製品の時系列的な区分がなされている」ことが必要である。

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

結論 (2)

3. グレードA区域に関しては、複数個所の測定を行い、一つの測定箇所値が逸脱した場合の影響範囲を限定的にしておくことが必要である。
4. グレードA区域に関しては、可能な場合には常に、ある測定箇所について各種の試験を実施するようなサンプリング計画とする。
つまり、原則として、測定方法毎に異なった場所を設定しないで、測定箇所に対して複数の試験項目を規定する方法が逸脱を管理し易い。

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

結論 (4)

6. グレードAの作業着付着菌の逸脱が生じた場合、必要な場合は当該作業着が介在した前後の製品の追加の無菌試験を実施する。
7. 逸脱の対応が、「インパクト評価」と「CAPA(是正措置・予防措置)」から構成されるのは、他の逸脱と同様である。CAPAが「教育のみをした」では、不十分である。

特に、作業着付着菌逸脱でこの傾向が多いので、配慮が必要である。

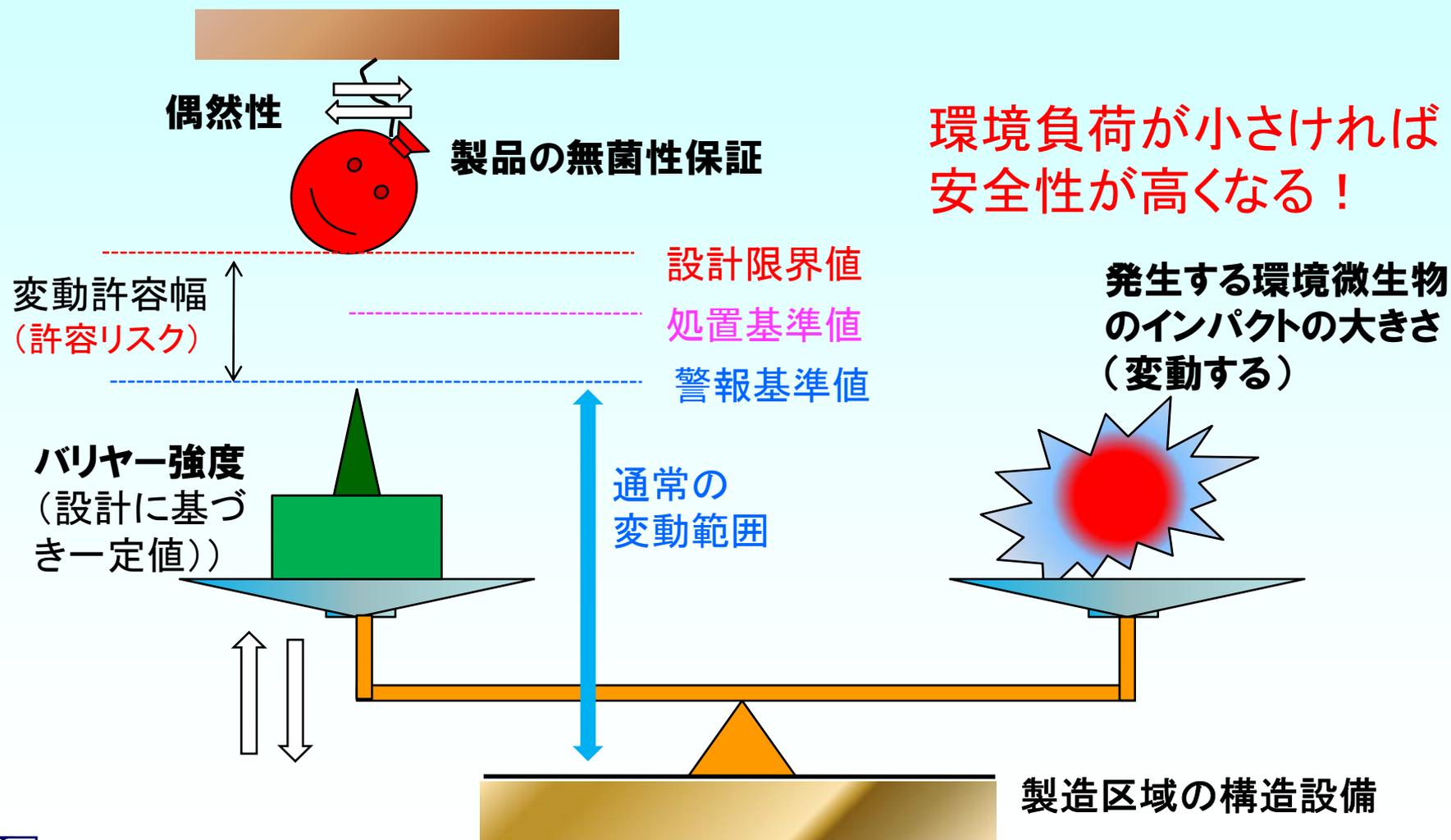
議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

結論 (5)

8. その他にも様々な事項を考慮する必要があり、例えば、次の様なものが考えられる。

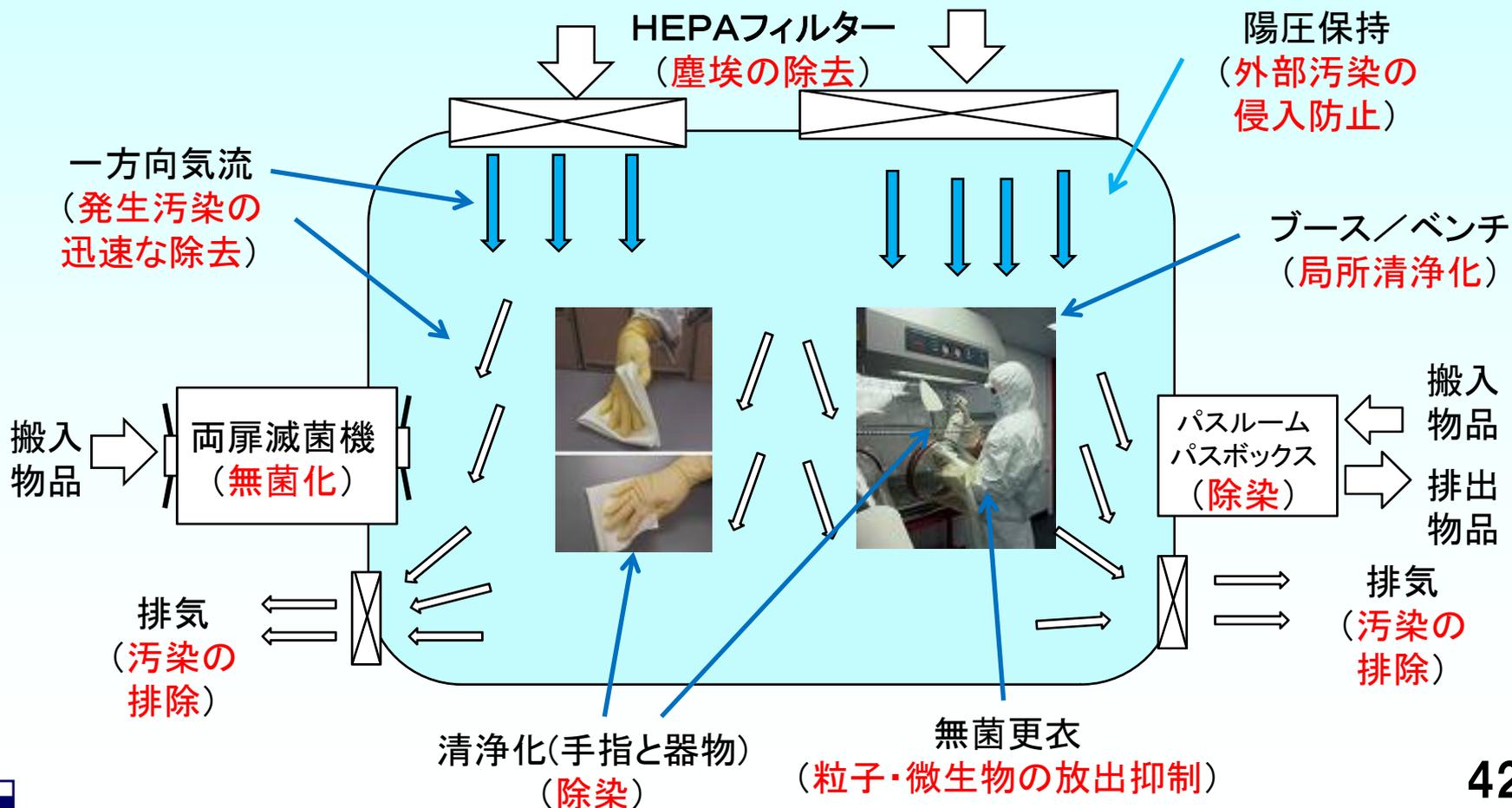
- 汚染菌の製剤中での増殖性／死滅性
- 逸脱発生部位以降の工程の処理内容
(例えば、緩和な加熱処理工程の有無など)
- 当該汚染の発生頻度と内容
(例えば、極めて稀なのか、かなり発生するのか)
- 当該汚染と作業工程トラブルなどとの関連性

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応 環境システムの微生物制御概念



議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

無菌環境システムの主要なバリアー



議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

インパクトの不確実性 (1)

無菌操作法で医薬品を製造する場合、グレードAおよびBにおける環境微生物モニタリング試験結果は、出荷判定で考慮すべき項目となる。

それでは、次のような逸脱が起こった場合、あなたは出荷に際して、製品へのインパクトをどう評価するか？

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

インパクトの不確実性(2)

仮定の質問

無菌操作法による充てん工程は、Grade Aの区域(ブース内であるが、人の手は入る)で実施する。作業終了後の充てん機の表面付着菌の測定箇所(充てん針よりかなり下側)の測定値が、5 cfu/plateであった。

処置基準は1 未満 cfu/plateである。

逸脱報告書の処理が終わらないと製品出荷できない。

では、この測定日に充てんした製品への逸脱の影響は、どの様に評価したら良いか？

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

インパクトの不確実性(3)

Q: あなたはこの時の製品のロットを不適にするか？

Q: 不適としないのであれば、逸脱の報告書で、製品にリスクがないとの客観的判断は、どのような根拠に基づいたのか？

この回答は、真の原因を立証出来ないので、複雑な内容となる。様々な事項を考慮してリスク評価を行うことになる。(「結論」の項を参照のこと)

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

インパクトの不確実性(4)

逸脱対応で重要なことは、逸脱した状況を「測定結果のみで判断することが出来ない」ということである。

様々な要因を考慮し、その測定を行った背景を検証して「第三者が納得できる結論を出す」ことが必要となる。

環境微生物モニタリングは、無菌操作法で医薬品を製造する場合、大変に重要視される。

しかし、その重要性を裏付ける論理は、かなり脆弱な側面を有している。

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

対応への考慮事項：測定結果のタイムラグ

次に挙げられる問題として、**タイムラグ**（試験した時点から結果が出るまでの遅れ）の問題が存在する。

結果が管理基準値を逸脱していた場合、次の2つの側面がある。

- a) **結果が得られた時点では、既に作業が終了している。**
- b) **対策をとる時点では、その微生物学的な状況が大きく変化している。**

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

対応への考慮事項：測定箇所の安定性の把握 (1)

工程での逸脱発生の場合は、既にその工程が終了してしまい、逸脱と判明した時点では、工程へのフィードバックが取れない場合が想定される。

従って、微生物管理は常に予防的であらねばならない。

換言すれば「その箇所の安定性を把握する」ための方法論の確立と管理が必要である。

議論4. 環境管理基準値の逸脱への対応

対応への考慮事項：測定箇所の安定性の把握 (2)

この「予測的」という事項に対する具体的な方法論は、一つはトレンド分析であり、いま一つは出現する微生物に対しての生態学における多様性安定性の原則の応用がある。

迅速法による微生物測定を実施しても、その発生した瞬間の状態を捉えることは出来ない。

「多様性安定性の原則」とは「安定な系ほど多様性に富む」というものである。(詳細は略)

本日の講演内容

1. 最終滅菌製品と無菌操作法により製造した製品の境界はどこにあるか
2. 最終滅菌法と無菌操作法での製造における環境微生物モニタリングの管理の違い
3. 環境微生物菌数の基準値は何を意味するものなのか
 - ・規格と試験方法の関連をどう考えるか
 - ・試験測定箇所と製品への汚染の関係
4. 基準値の逸脱への対応
 - ・逸脱時はどのような措置をとるべきか
 - ・原因追究の方法論
 - ・環境の汚染と製品汚染のリスクの関係をどうするか
5. 表面付着菌測定法をめぐる諸問題



議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

問題提起

1. 無菌室の表面汚染菌調査の方法として、**接触平板法と拭取り法では、どちらが一般的な方法なのだろうか。**
2. 表面汚染菌の調査の方法としては、様々な方法があるが、**どの方法が最も真の汚染状態を反映しているのだろうか。**

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

結論

1. 無菌室の表面汚染菌調査の方法は、欧米では接触平板法が定量的方法とされている。拭取り法は、接触平板法が使用できない箇所、あるいは型枠などにより拭取り面積を一定化することで、半定量的な方法とみなされる。
2. 何れの調査方法を使用しても、表面の菌汚染状態のある一面を示すに過ぎない。測定値は、そこに存在する菌数の一部を示しているに過ぎない。接触平板法は、汚染の分布状態を見る方法であり、拭取り法はそこに存在する菌の総数の測定を目的とした方法である。
(汚染度の低い個所では、両者の値は接近する)

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

表面付着菌測定法の欧米と日本の概念の違い

欧米での表面付着菌の菌数規制概念の前提

⇒ **ロダック平板法(接触平板法)**が基本
となっている。

日本国内の表面付着菌の歴史的経過

→ **拭取り法**(食品分野での管理を
取り入れた)

方法の違いによる本質的な異なりがある

拭取り法 : 存在する菌の総数を見ている

接触平板法 : 汚染の分布の鏡像を見ている

← **実は、ここに多くの情報が隠されている！**

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

環境モニタリング方法の重要な視点 (1)

環境モニタリング試験の方法を考える場合、忘れてはならない重要な視点がある。

- ① 存在する微生物は、多くの場合、菌塊や微小集落として存在している(即ち、細胞の集合体で存在している)。
単一細胞として扱えるサンプルは、極く限られている。
- ② この菌塊や微小集落を構成する微生物の数は多様であり、それが生育していた場所に大きな関係を持っている。

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

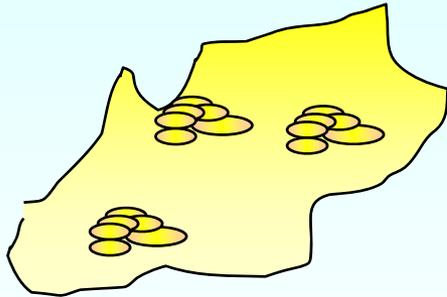
環境モニタリング方法の重要な視点 (2)

- ③ 微生物の培養法で得られる菌数の単位は、Colony Forming Unit (cfu) であり、
1 cfu ≠ 1 cell
ということが大きな問題になる。
- ④ すなわち、サンプリングや試験の時に、この細胞集合体を崩壊させるか、あるいはそのままか、部分的に崩壊させてしまうか・・・で、全く異なった結果が得られることになる。

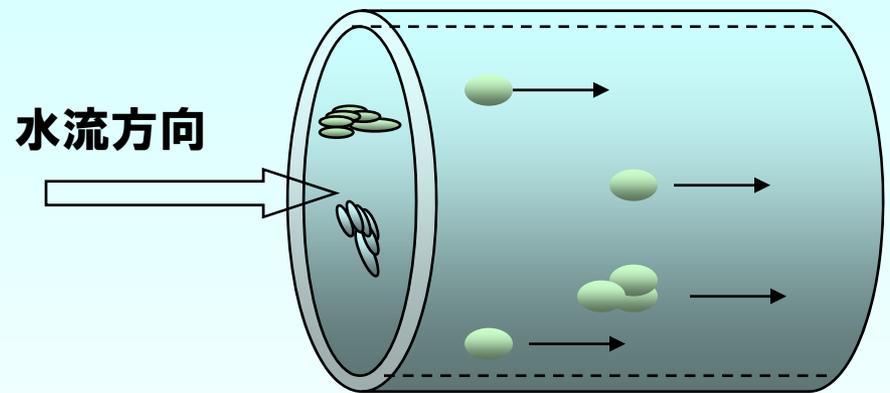
議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

環境モニタリング方法の重要な視点 (3)

被検面での微生物の存在状態は、多くの場合、複数の細胞の集合体である！



ヒトからの発散される微生物は、皮膚片上で微小集落を形成している。



水配管中では、固液界面での微生物の増殖が最も早い。そこから微生物が放出されるか、あるいはバイオフィルムを形成し、そこからフィルムの一部が剥離する。

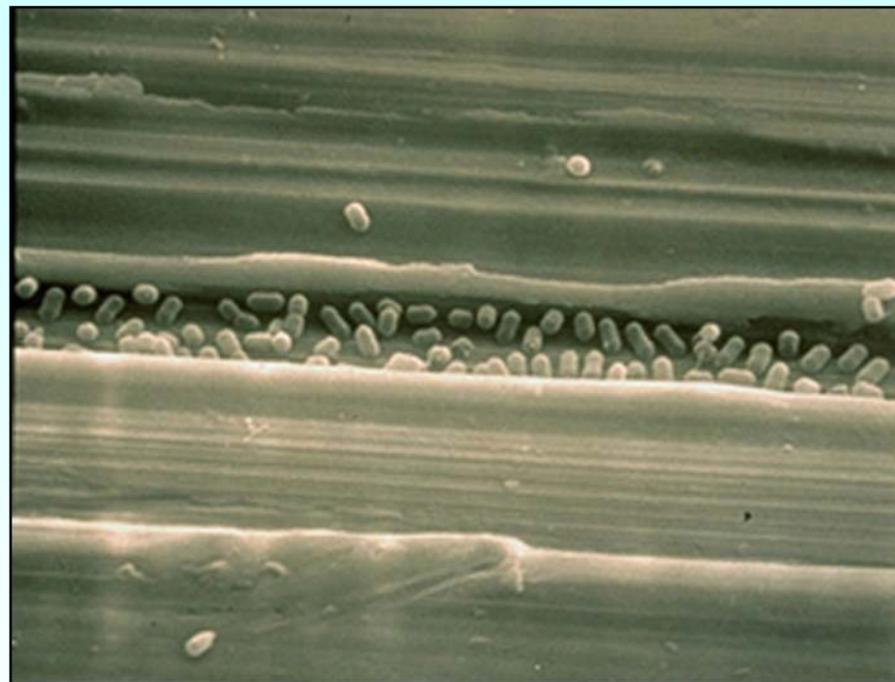


器物表面でも増殖した場合は、微小集落を形成する。

機器と細菌 (Equipment and bacteria)

一見すると平滑に見える表面
であっても、細菌が棲み
ついている！

Even seemingly smooth surfaces
can harbor bacteria !



(写真注記の訳文)

ステンレス片の上のsoy(醤油?)中
に形成されている *Listeria*
monocytogenes の走査電顕像。

[Professor Amy Wong](#) 教授のご厚
意による

Scanning electron micrograph of *Listeria*
monocytogenes forming a biofilm in soy on a
stainless steel chip.

Courtesy of [Professor Amy Wong](#).

Tom Burkett, Ph.D , "Aseptic Processing," [http://www.google.co.jp/search?sourceid=chrome&ie=UTF-8&q="Tom+Burkett"+"Aseptic+Processing"](http://www.google.co.jp/search?sourceid=chrome&ie=UTF-8&q=) より転載

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

環境モニタリング方法の重要な視点 (4)

無菌室環境の微生物汚染では、ある箇所が汚染していたという事実より、「なぜそこが汚染していたか？」ということを考えることが、それ以上に重要である。

接触平板法では、出現したコロニーの分布状態が均一なのか、集中的なのか、あるいは(コロニーの外観分類での)菌種の分布がどうなっているのか・・・など、様々な情報を含んでいる。

議論5: 表面付着菌測定法をめぐる諸問題

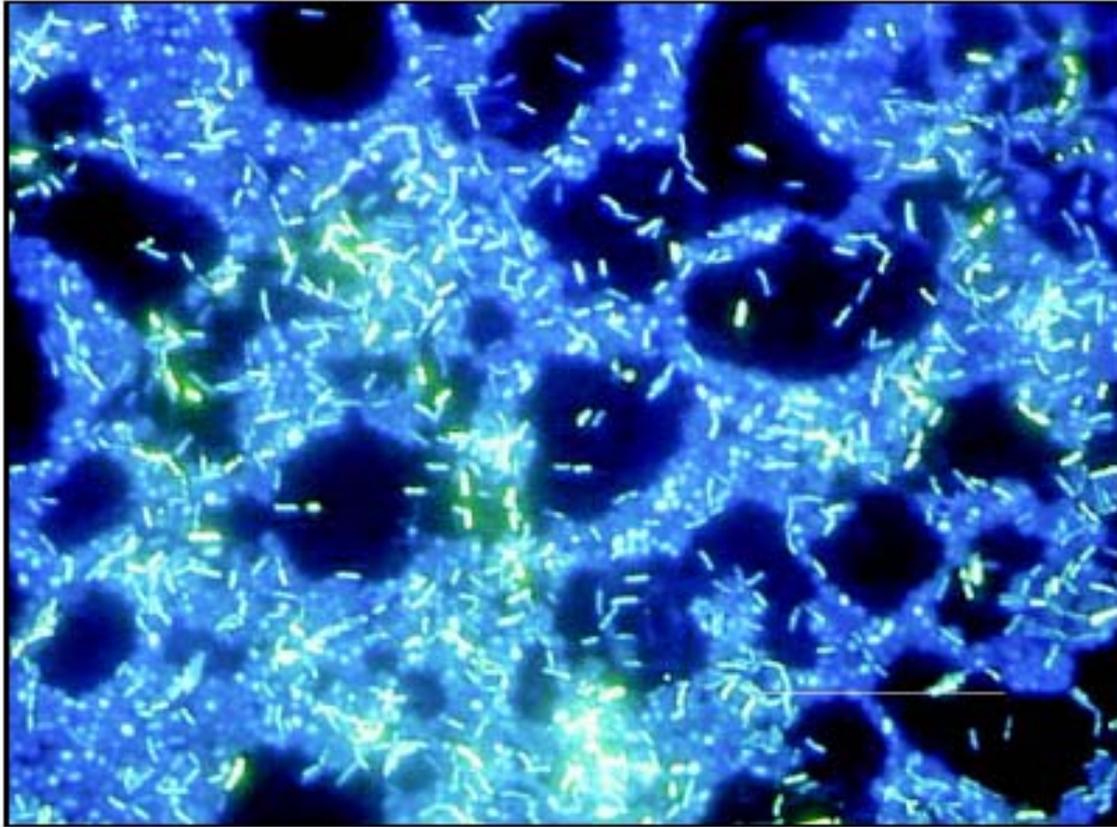
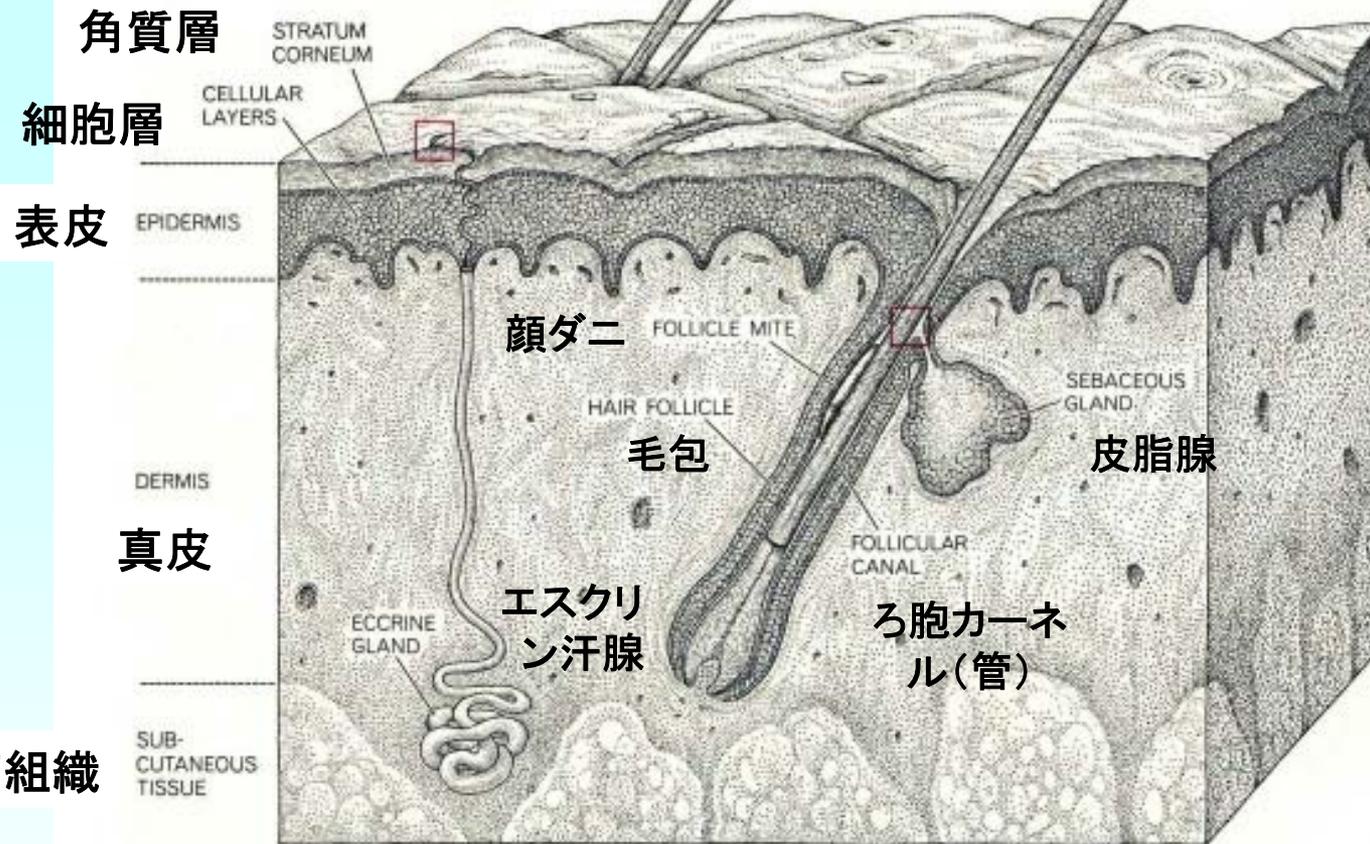


Figure 3. Polymicrobial biofilm grown on a stainless steel surface in a laboratory potable water biofilm reactor for 14 days, then stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and examined by epifluorescence microscopy. Bar, 20 μ .

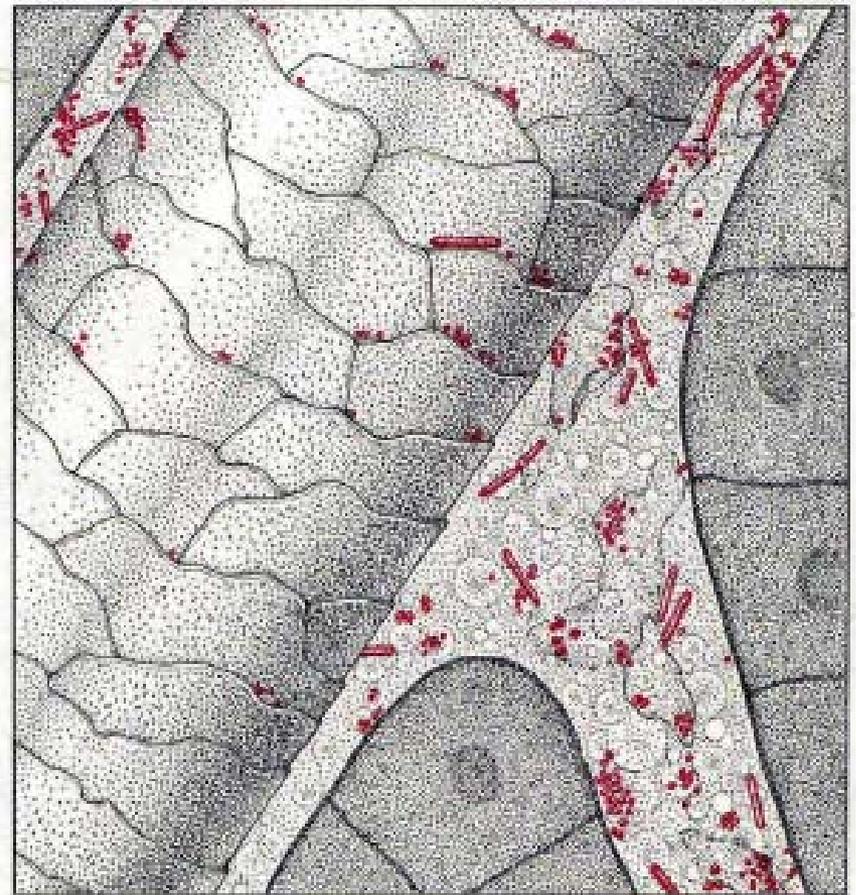
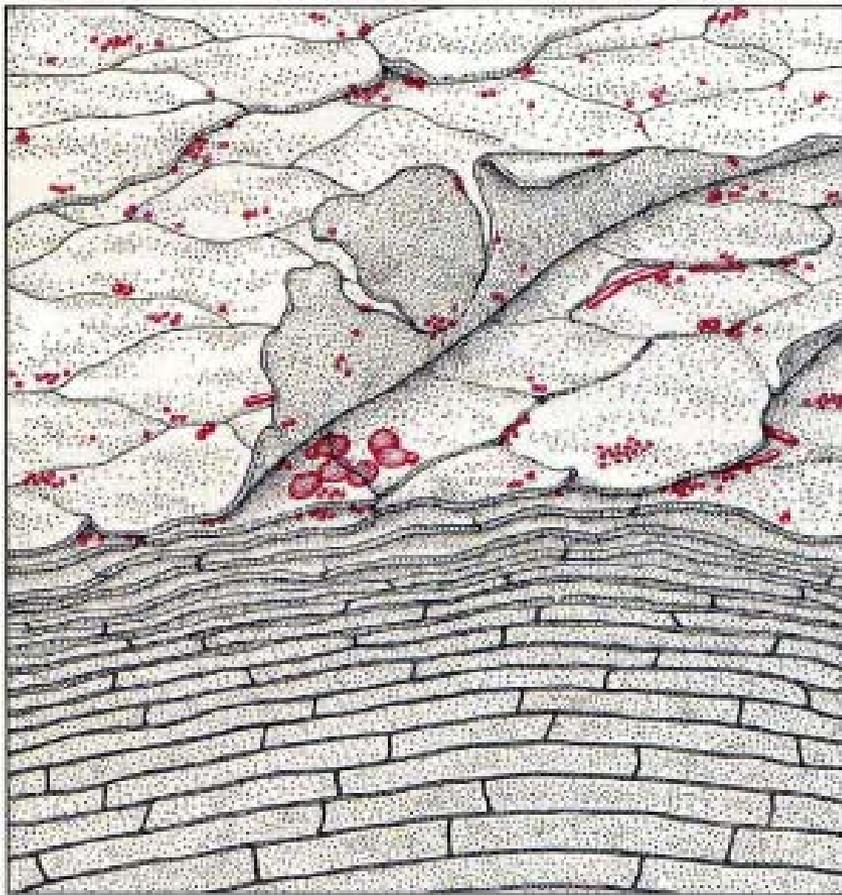
ラボの飲料水を用いるバイオフィーム反応器で、ステンレス片上に形成されたバイオフィーム

(14日間後)

Rodney M. Donlan,
“Biofilms: Microbial Life on Surfaces,” *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 8, No. 9, pp.881-890, September 2002



一般的な微生物の棲息場所を、理想化した断面図中に示した。*Demodex folliculorum*(顔ダニ)は、健康で損傷を受けていない皮膚に住む唯一の動物である。裸眼ではまず見ることが出来ないが、細菌よりも約400倍大きい。*Demodex*は、多くの成人の皮膚に棲息している。イラストは、皮膚を50倍に拡大している。**赤い方形の枠**は、別に拡大図をしめす。出典: *Marples, Mary J. Life on the human skin. Scientific American 220(1): 108-115, January 1969.*



A

B

皮膚の上層(A)。角質層は平らな、ウロコ状の「鱗片(squames)」から構成されている。これは丸まって、剥がれ落ちて行く。鱗片の下や周りは、細菌や真菌の酵母様の細胞が存在する(赤色)。毛包(B)は、多くの細菌が棲みついている。これらの図は、皮膚を約1000倍に拡大したものである。出典 Maples, Mary J. Life on the human skin. *Scientific American*220(1): 108-115, January 1969.

議論5：表面付着菌測定法をめぐる諸問題

環境モニタリング方法の重要な視点 (5)

微生物は、栄養細胞の状態で空気中に浮遊すると乾燥により急速に死滅すると考えられている。

しかし、皮膚片などに付着していることで、乾燥速度が遅くなり、空気中での生存時間が長くなると推測される。

制御された環境でのHVAC（空調）システムは、換気回数を高くすることにより、これら生菌粒子を排除するが、重要なエリアでは、一方向気流とすることで、それら粒子を効果的に除去するように設計されている。



**お疲れ様でした。
何かご質問は
ありませんか？**

鎌倉市長谷寺「和み地蔵」
2008.11.01撮影 提供T.K