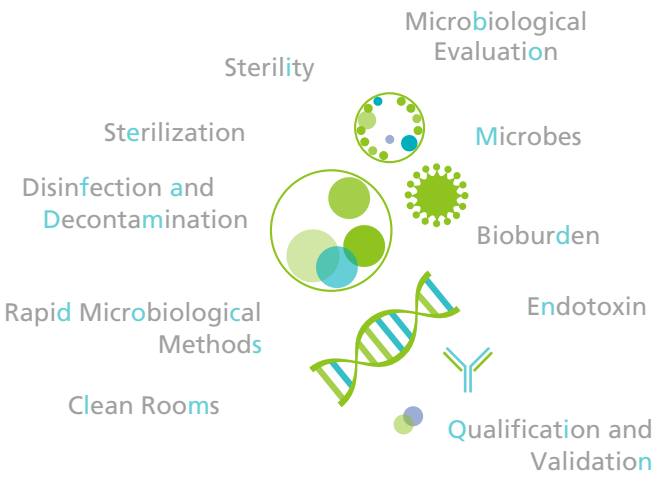
新GMP 微生物試験法 第3版

第十七改正日本薬局方対応

編集
佐々木次雄
棚元　憲一
菊池　裕



じほう

第1章 微生物管理とバリデーション

1-1 GMPと微生物管理

1. 医薬品の微生物汚染管理の意義

医薬品の品質保証，GMPのうえで微生物管理は極めて大きな意義を持っている．医薬品は，他の工業製品や商品と違った特質を持っており，無菌医薬品はもちろん，非無菌の製品においても製造の管理には微生物の管理手法が大きな役割を果たしている．

医薬品の特質として，次に掲げるような点があげられる．

① 医薬品は人の生命に関係する物質であり，疾病，健康および生命に深く結びついている
② 医薬品は人体にとって本質的に異物である
③ 医薬品は疾病などにより体の抵抗力が落ちている人に使用されることが多い
④ 医薬品は専門家により注意深く，間違いなく取り扱われなければならない
⑤ 医薬品の品質特性は外観からは判断できにくいものが多い

しかも，これらの生命・健康に関係する特性は，外観や事後の検査によっては判断することができず，開発・製造の全過程に関係している．

これらの特性を考えるとき，医薬品は開発，製造，保管，流通，使用の全過程を通して，高度な技術と高い倫理感をもって品質確保が行われなければならない．特に，医薬品の品質保証のためには，その品質設計，設備の設計，製造の全過程において不良品が発生しないよう，あらゆる角度から組織的・技術的に管理を行っていかなければならない．このような製品設計，製造と品質管理の方式を定めたのがGMPである．

特に，注射剤等の無菌医薬品および医療機器のうち，その用途，性質から見て，無菌性が要求される製品については，製造のプロセスおよび製品自体について厳しい管理を行わなければならない．また，一般の医薬品についても微生物による汚染を極力防止するよう，衛生管理基準を定めて製造管理を行わなければならない．

医薬品あるいは医療機器について微生物試験を行う目的は次の点にある．すなわち，

① 無菌医薬品の無菌性の確保とその証明

　無菌製品に対しては「製造工程の無菌管理」および「無菌試験」が，製品の無菌性を証明する手段として極めて重要であり，このためには，種々な面で微生物試験法が重要な役割を果たしている．

② 医薬品の製造環境管理の一環として「空気」，「水」および「機械設備」に関する微生物試験は，無菌製品については「無菌性確保」のため，また，非無菌製品については，「衛

できるようなドキュメンテーションシステムを完備することが重要である．

最近，インドを中心に治験データの捏造や不都合な分析データや保存すべきデータの滅却等，GMP 違反事例が多発している．そこで “Data Integrity” が求められるようになってきた．Data Integrity とはデータ・ライフサイクルを通じてデータ収集が完全であり，一貫して正確である程度をいい，データの完全性を保証するには，しっかりした科学的原則と Good Documentation Practices を含む適切な品質システムとリスクマネジメントシステムが必要である．

バリデーションでは，計画，実験結果，評価の内容を文書化し承認することが要件となっているが，これは，

① 正確性の確保
② 整合性の確保
③ 技術の蓄積と継承
④ 作業の標準化（SOP の作成）

のためである．

バリデーションは，微生物を対象とした工程や試験法においても，微生物学，エンジニアリング，製造，統計学，品質管理，品質保証・監査など種々の専門分野の知識，経験の結集として行われるものであり，各分野の専門家の評価を経て承認されたものでなければならない．

1-5　無菌性の保証と微生物汚染レベルの解釈

1．無菌性保証と微生物汚染レベル —「無菌」とは何か？

「無菌」とは「生育可能な微生物が存在しない状態（state of being free from viable microorganisms）」と定義されている[26]．無菌製品は「無菌であること」が必須である．しかし，いかなる試験法によっても，また，いかなるサンプリング方法によっても，母集団が完全に無菌であり，菌がまったくいないということを証明することは極めて困難である．

理由の第一は，「無菌試験法」は抜取検査法であり，無菌試験法に適合したからといっても，母集団全体の「無菌性を保証」することにはならない．また，菌（微生物）は母集団の中に均一に存在するものではないからである．

第二に，無菌試験法は，微生物の生育の有無を培養によって判断しているが，検出力の高い培地を用いても，全ての微生物が生育するような培地は存在しないからである．

米国 FDA GMP[13]，米国薬局方（USP）[12] では「無菌」を次のように定義している．

「当該無菌製品が『**バリデートされた工程によって製造されており**』，かつ『**決められたサンプリング方法と試験法によって試験を行うとき，菌を検出しない**』」

すなわち，無菌製品は：

①「**バリデートされた工程**によって製造された」ものでなければならない．
　また，その製品の無菌性を確認するため，
② **決められたサンプリング方法**で試料を採取し，
③ **決められた試験法**で試験を行い，無菌であることを確認するのである．

工程がバリデートされていること，正しくサンプリングされていること，を前提として抜き

第5章 滅菌法・消毒法・除染法

5-1 概　説

1. 滅菌，消毒，除染等の定義について

第十七改正日本薬局方[1)]（日局17）の『通則』によると，滅菌とは，「被滅菌物中の全ての微生物を殺滅又は除去すること」と定義されている．消毒および除染については日局参考情報の『消毒法及び除染法』に定義が記載され，消毒とは，「対象物又は対象物の表面等の局所的な部位に生存する微生物を減少させること」，除染については「空間や作業室を含む構造設備に生存する微生物をあらかじめ指定された菌数レベルにまで減少させること」とされた．消毒についてはこれまで，「主として人獣に対して病原性のある微生物を殺滅すること」，「生存する微生物の数を減らすために用いられる処置法で，必ずしも微生物を全て殺滅したり，除去するものでない」等，いくつかの表現がなされてきたが，新たに参考情報で定義された内容は，実際の使用状況と期待される効果が加味されている．

関連する用語もいくつかあり，例えば殺菌とは「単に微生物を殺滅すること」を，除菌とは「目的とする対象物から微生物を除去すること」を，静菌とは「微生物の増殖を阻害あるいは阻止すること」を，制菌とは「微生物を特定し，増殖を阻害あるいは阻止すること」を，防腐とは「食品，医薬品，化粧品等の有害物質による劣化を防止すること」を，抗菌とは「殺菌，滅菌，消毒，静菌の全ての方法を総括すること」を意図して使用されることが多い．

2. 滅菌法，消毒法，除染法の概略

滅菌法，消毒法，除染法のいずれを採用する場合でも，一般的には微生物の種類，汚染状況，対象となるものの性質および状態に応じて，その方法の適切な選択と操作法および条件の適正化を行う必要がある．方法の例としては日局17の参考情報に収載されており，その概略をまとめたものを**表5.1**に示す．

滅菌法は，加熱法として湿熱滅菌法，乾熱滅菌法，高周波滅菌法，ガス法として酸化エチレン（EO）ガス滅菌法，過酸化水素による滅菌法，さらには放射線法，ろ過法が日局に収載されている．

消毒法は，化学薬剤を用いて清拭，噴霧，浸漬等により，表面等の局所的な部位に生存する微生物を減少させる方法である．使用する消毒剤の例が日局には収載されており，多種の中から選定できる．

表5.1　第十七改正日本薬局方に収載されている滅菌法，消毒法，除染法

区　分		方　法
滅菌法	加熱法	湿熱滅菌法 乾熱滅菌法 高周波滅菌法
	ガス法	酸化エチレンガス滅菌法
		過酸化水素による滅菌法 ・過酸化水素滅菌 ・過酸化水素低温プラズマ滅菌
	放射線法	放射線滅菌法 ・ガンマ線照射滅菌 ・電子線照射滅菌
	ろ過法	
消毒法	化学薬剤（消毒剤）を用いて清拭，噴霧，浸漬等	
除染法	化学薬剤（除染剤）を気化または噴霧等	

除染法は，化学薬剤を気化または噴霧させることにより，無菌医薬品の製造工程で用いるアイソレーター，RABS（Restricted Access Barrier System）の内部や清浄区域または無菌操作区域の空間や作業室を含む構造設備に生存する微生物をあらかじめ指定された菌数レベルまで減少させる方法である．消毒法と同様，使用する除染剤の例が日局には収載されており，多種の中から選定できる．（注：消毒法，除染法とも，収載されていない薬剤であっても，その妥当性を示すことができれば，使用することが可能である．）

これらの方法に期待される微生物への効果は，消毒＜除染＜滅菌の順で大きく，それぞれに要求される効果の概要を**表5.2**で比較した．

上述したいずれの方法で微生物を殺滅させていく場合も，**図5.1**に示すように対数減少を仮定しているので，10，1，0.1，0.01，0.001，・・・と減少し，少なくとも理論的には永遠にゼロにはならない．そこで，特に滅菌については，生き残っても差し支えないと考えられるレベルを設定し，このレベルに達したときを「滅菌」と称して，実質的には被滅菌物中の全ての微生物を殺滅した状態としている．無菌医薬品や滅菌医療機器に関しては，このレベルが「10^{-6}（0.000001）」であり，無菌性保証水準（SAL）として国際的に採用されている．この「無菌性保証水準10^{-6}」とは，滅菌後に生育可能な微生物が製品中に存在する確率が1/1,000,000以下であることを意味している．

表5.2　微生物に対して各方法に期待する効果

方　法	期待される効果	
滅　菌	無菌性保証水準（SAL）10^{-6}	
除　染	アイソレーターやRABS等の清浄化	指標菌の芽胞を6 log以上減少
	作業室の清浄化	指標菌の芽胞を3 log以上減少
消　毒*	細菌および真菌	3 log以上減少
	芽胞	2 log以上減少

＊消毒に期待される効果は，対象とする微生物種に対して有効な消毒条件か否かを判断する指標であり，全ての微生物種に対して，これらの効果を有する消毒条件しか採用できない，という意味ではない．

第9章 マイコプラズマ否定試験

9-1 マイコプラズマ否定試験の対象微生物

マイコプラズマ否定試験の対象微生物は，分類的にはマイコプラズマ属に限らず近縁なモリキューテス綱の細菌を含む．マイコプラズマおよび近縁の細菌の分類一覧を**図9.1**に示す（下線を引いた属が培養細胞の管理において重要である）．例えば*Mycoplasma fermentans*の分類上の位置は，真性細菌，テネリキューテス門，モリキューテス綱，マイコプラズマ目，マイコプラズマ科，マイコプラズマ属の*Mycoplasma fermentans*種となる．

ウイルスワクチンやバイオテクノロジー応用医薬品の製造に用いられる培養細胞や添加物等は，ヒトを含む哺乳類，鳥類，昆虫由来と多様である．使用する細胞や培養に使用する添加物等の由来に応じて試験対象とするモリキューテスの種を見極める知識が求められる．哺乳類，鳥類由来の細胞であればマイコプラズマとアコレプラズマの汚染が，昆虫細胞であればスピロプラズマ等の汚染が問題になる．

真正細菌　Domain Bacteria
- 門　テネリキューテス　Tenericutes
  - 綱　モリキューテス　Mollicutes
    - 目科属　エントモプラズマ目　Entomoplasmatales
      - エントモプラズマ科　Entomoplasmataceae
        - エントモプラズマ属　*Entomoplasma*
        - メソプラズマ属　*Mesoplasma*
      - スピロプラズマ科　Spiroplasmataceae
        - <u>スピロプラズマ属　*Spiroplasma*</u>
    - マイコプラズマ目　Mycoplasmatales
      - マイコプラズマ科　Mycoplasmataceae
        - <u>マイコプラズマ属　*Mycoplasma*</u>
        - ウレアプラズマ属　*Ureaplasma*
        - ヘパトプラズマ属　*Candidatus* Hepatoplasma
    - アコレプラズマ目　Acholeplasmatales
      - アコレプラズマ科　Acholeplasmataceae
        - <u>アコレプラズマ属　*Acholeplasma*</u>
        - ファイトプラズマ属　*Candidatus* Phytoplasma
    - アナエロプラズマ目　Anaeroplasmatales
      - アナエロプラズマ科　Anaeroplasmataceae
        - アナエロプラズマ属　*Anaeroplasma*
        - アステロプラズマ属　*Asteroplasma*

図9.1　モリキューテス綱の細菌の分類
マイコプラズマ否定試験で用いる主な属に下線を付けた．

9-2 マイコプラズマ否定試験の目的

マイコプラズマ属の細菌は，ヒト，哺乳類，鳥類等の口腔・咽頭，泌尿生殖器，血液において細胞に寄生する小型の細菌で，常在菌として定着している種がある一方，病気を引き起こす種がある．自然感染では宿主特異性があり，ヒト由来の種，ウシ由来の種，ブタ由来の種，鳥類由来の種等に分けられる．ただし，培養細胞での増殖に宿主特異性はなく，動物由来の種がヒト細胞でも増殖する．また，マイコプラズマが汚染していても他の細菌が混入した際に見られるような培養液の混濁はなく，かつ，培養細胞の増殖に問題はなく，形態変化も乏しい（ウイルスのように細胞変性を起こさない）．そのため，継代された培養細胞に汚染している他，ヒト，哺乳類，鳥類等から初代細胞を採取する際に混入してくる．一方，スピロプラズマ属やファイトプラズマ属の細菌は，昆虫と植物間を行き来している（スピロプラズマでは甲殻類に寄生する種もある）．

マイコプラズマ検出法が導入された1970年代には，細胞培養に用いるウシ血清由来の *Mycoplasma arginini*，ブタのトリプシン由来の *Mycoplasma hyorhinis*，作業者が口でピペット操作をすることによるヒト口腔由来の *Mycoplasma orale* などが高頻度に検出されたが，現在ではヒト口腔や血液細胞由来の *M. fermentans* が高頻度に検出されるようになってきた．また，アコレプラズマはウシやヒトが保菌している他，増殖にコレステロールを必要としないことから植物表面でも増殖する．

ウイルスワクチンやバイオテクノロジー応用医薬品の製造に用いられる培養細胞等にマイコプラズマ等が汚染すると，各種のサイトカイン誘導やウイルス増殖への影響等が懸念され，さらにマイコプラズマ等の菌体成分が医薬品等に混入すると本来の効能とは関係のない免疫反応が誘導される可能性がある．そのため，マイコプラズマ否定試験を実施しマイコプラズマ等が感染していない原材料を使用する必要がある．細菌・真菌を対象とする無菌試験とは試験法が異なることから，現在，マイコプラズマ否定試験法は別途規定されている．

9-3 マイコプラズマ否定試験法の公定書間の違い

わが国では，ヒト用医薬品に対するマイコプラズマ否定試験について，以下の2つの公定書がある．

- 日本薬局方（日局）：第十七改正の参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験」[1)]
- 生物学的製剤基準（生物基）：一般試験法「マイコプラズマ否定試験」[2)]

ウイルスワクチンの製造においては，生物基の医薬品各条に「一般試験法のマイコプラズマ否定試験法」が規定される製造工程には生物基試験法によるマイコプラズマ否定試験の準拠が法的に求められており，ろ過前ウイルス浮遊液のみならず種細胞の記載があれば培養細胞にも同法を適用する．一方，ワクチン以外のバイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材については，日局参考情報の試験法を参考にする．さらに，輸出入品

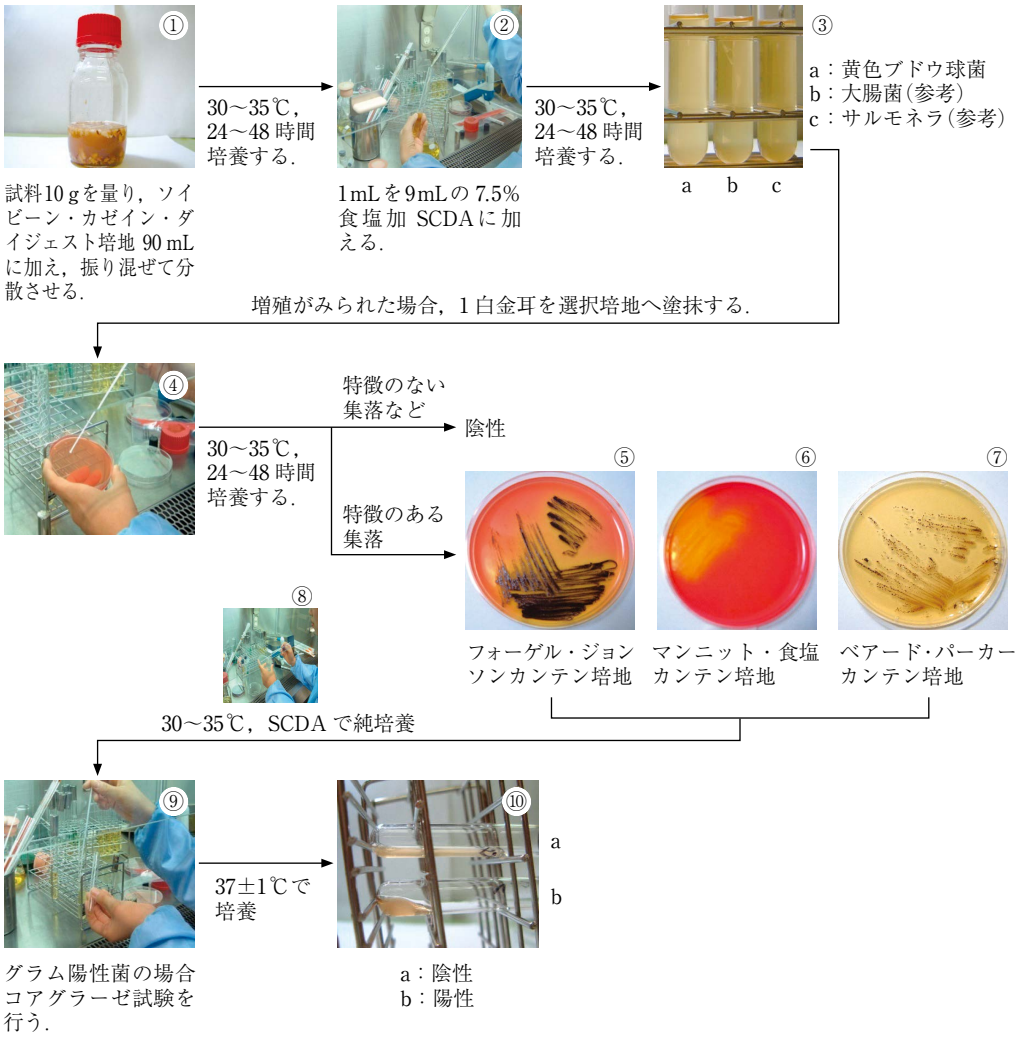
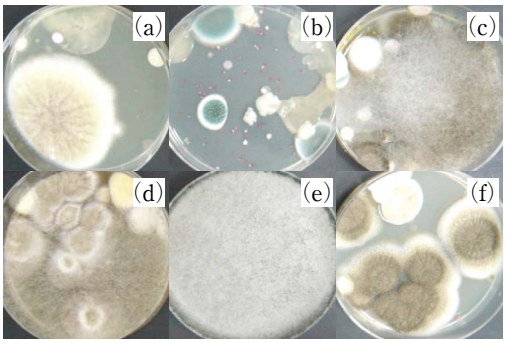


図 10.19　黄色ブドウ球菌の試験例

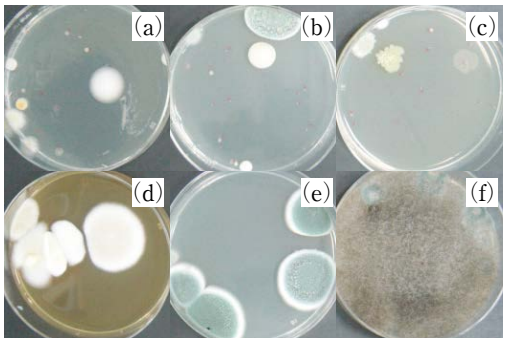
ない場合は黄色ブドウ球菌陰性と判定する．

黄色ブドウ球菌が疑われる集落の確認については同定試験などにて実施するが，一例としてコアグラーゼ試験の方法を記載する．試験は，哺乳類由来の0.5 mLの血漿（ウサギまたはウマ由来のものが望ましい．適当な添加物が加えられたものでもよい）を含む試験管に白金耳などを使って疑われる集落を接種し，37±1℃の恒温槽中で培養する．3時間後に凝固の有無を調べ，その後，適当な時間ごとに24時間までの有無を調べる．コアグラーゼ反応陽性と陰性の対象についても同時に試験を行う．凝固が観察されない場合は，黄色ブドウ球菌陰性と判定する．**図 10.19**に黄色ブドウ球菌試験の流れを示した．

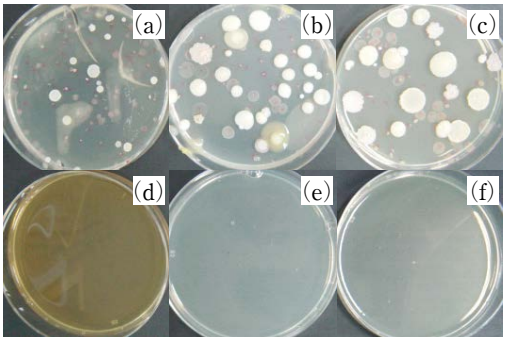
コアグラーゼ（*coagulase*）とは血漿を凝固させる酵素を指し，ブドウ球菌の菌種を分類するための指標とされ，黄色ブドウ球菌はコアグラーゼを産生し，表皮ブドウ球菌はコアグラーゼを産生しない．



カンゾウ①



カンゾウ②



カンゾウ③

培地
a：SD
b：PD
c：GP
d：SD＋抗生物質
e：PD＋抗生物質
f：GP＋抗生物質

SD：サブロー・ブドウ糖カンテン培地
PD：ポテト・デキストロースカンテン培地
GP：GP カンテン培地

図 10.20　クロラムフェニコール添加の有無による培養結果

(3) 抗生物質添加 TYMC 測定培地

抗生物質添加のサブロー・ブドウ糖カンテン培地などを調製するとき，クロラムフェニコール 1 g をエタノール（99.5）に溶かし 100 mL とした溶液を培地の滅菌前に添加し利用すると便利である．

生薬に付着する TYMC を計測するのに，細菌が増殖してくるのを抑制するため抗生物質の添加が重要である．**図 10.20** にはカンゾウ 3 検体に対するクロラムフェニコール添加の有無による培養結果を示した．図 10.20 の上段は抗生物質添加のない真菌用培地 3 種類，下段は真菌用培地に抗生物質のクロラムフェニコールを添加した結果である．カンゾウ①②では抗生物質を添加していない上段で細菌と真菌が同時に検出されている．カンゾウ③は加熱により殺菌処理された検体である．上段の抗生物質が添加されない真菌用培地に *Bacillus* 属の細菌が増殖している．殺菌処理により真菌が死滅し，耐熱性の細菌が残存していることが，抗生物質添加の真菌用培地の培養結果から観察できる．

4. 生薬に付着する酵母について

酵母は自然界の植物などに生息しており，必然的に生薬の付着菌として確認される．生菌数試験では真菌用培地で確認される場合が多く，定型業務では計測の際，集落の一部として処理される．