

# 無菌試験の留意点とバリデーション

大分事業所 池永 義宏

## 1 はじめに

無菌試験法は、注射剤、点眼剤などの無菌医薬品に対して、規定の方法で処理し培養することによって、培地で増殖する微生物の有無を肉眼で確認する試験である。無菌試験は無菌医薬品を製造する環境と同等な無菌環境下で実施し、その環境の無菌性保証も厳密に管理しなければならない。また試験者も試験法の操作手順教育だけでなく、無菌医薬品を製造する作業者と同様に、微生物学、衛生学、無菌環境の教育など幅広い教育が必要であり、試験者の健康状態の把握まで要求される。こうした点は、化学的試験や物理的試験などと比較しても特殊な試験であるといえる。試験法については2007年に日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) によって完全調和され、日本でも第十五改正日本薬局方 (以下JP15) 第二追補<sup>1)</sup>に調和法が記載された。本稿では、無菌試験法の国際調和動向、試験の留意点、バリデーションについて紹介する。

## 2 無菌試験法の国際動向

無菌試験法は日本、米国、欧州の三薬局方 (以下JP, USP, EP) において、これまで完全に同じ内容ではなく、幾つかの相違点を保有した試験法であった。しかし、ICH Q4Bにおいて2007年完全調和に至り、各国で調和法の取り込みが実施されている。日本ではJP15第二追補に記載されたことは前段で述べた。日本以外での調和法の取り込み状況は、欧州でEP Supplement 6.3 (2009.01)<sup>2)</sup>に収載。これによりJP「無菌試験法」とEP「無菌試験法」とは同じ内容となった。米国ではUSP 32 Supplement 1 (2009.08)<sup>3)</sup>において、まだ一部非調和事項が残る状況である。

## 3 無菌試験の留意点

### 3.1 使用する培地

#### (1) 培地の保存期間

保存期間のバリデーションは、実際の保存条件下で所定期間保存した培地を用いて、培地の性能試験を実施することで確認できる。ここでのバリデーション期間としては以前のJP15<sup>4)</sup>と同様に、非密封容器では製造後1箇月、密封容器では製造後1年間を目安にするのが妥当と思われる。

#### (2) 培地のpH

滅菌後の液状チオグルコール酸培地 (以下FTG培地) はpH 7.1±0.2、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (以下SCD培地) はpH 7.3±0.2となるように滅菌前に調整を行うことになっている。通常0.1mol/Lもしくは1 mol/Lの水酸化ナトリウム試液や塩酸試液を用いてpH調整を行うが、水酸化ナトリウム試液で調整し滅菌を行った後では、pH値はわずかに低下する傾向にある。また保存期間を通じて培地のpHが維持できるかなどを勘案し、適切にバリデーションしておく必要がある。培地のpHは微生物の増殖にも影響を及ぼす可能性があるため、培地の性能試験の一環として捉え、調製ごとや性能試験ごとの適切な単位で確認を行うことも必要である。

#### (3) 培地の性能試験

JP15第二追補やEP6.3では、規定さ

れた菌株以外で代替菌の使用を認めていない。しかしUSP32ではまだ独自に *Pseudomonas aeruginosa* の代替菌として *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) を、*Clostridium sporogenes* の代替として *Bacetroides vulgatus* (ATCC 8482) の使用を容認している。

このほか、USP32やEP 6.8<sup>5)</sup>においては *Aspergillus niger* は菌種名変更により、*Aspergillus brasiliensis* となった。

またその他、JP15より内容が変更になった点などを表1に示す。

### 3.2 洗浄液

無菌試験で使用する洗浄液に用いるペプトンの留意点は、JP15第二追補において肉製又はカゼイン製であるが、USP32では、まだ肉製の記載であり、注意を要する点である。

### 3.3 メンブランフィルター法 (MF法)

メンブランフィルターの材質は通常、セルロース混合エステル膜を使用することが多いが、微生物発育阻止活性物質の種類によっては、物質がセルロースに吸着しやすいものがあり、フィルターに残存し発育阻止を生じる可能性があるため、ポリカーボネート膜やポリビニリデンフロライド膜を使用するケースもある (表2)。周縁部が疎水性処理されたフィルターも洗浄液による洗浄効果を高めるために有効である。MF法における製品ごとの操作上の留意点として以下の点があげられる。

表1 培地に関するその他の留意点

留意点	
1	変法 FTG 培地が使用できるのは、規定されている場合か、当局が認める場合である
2	MF 法を適用できない水銀系の防腐剤を含む製品において SCD 培地の代わりに FTG 培地で培養する場合、FTG 培地は培地性能試験に適合したものを使用し、20～25℃で培養する
3	培地を保存する場合、気密容器に入れてバリデーションされた条件で滅菌し、2～25℃で保存する
4	保存培地はバリデーションされた期間を超えて使用してはならない

### (1) 水溶性液剤、水溶性固形剤の試験

水溶性液剤、水溶性固形剤のろ過は、少量の無菌希釈液を事前に行う（プレウェッティング）。

少量の無菌希釈液でろ過を行う作業は、JP15第二追補とEP6.3を比較すると若干ニュアンスが異なり、EPを参考にすると必須の要件ではないと考えられる。

また抗菌活性を有している場合、適合性試験で用いた液量で3回以上洗浄することになるが、一方で抗菌活性を有していない製品の場合、以前JP15では「製品が抗菌活性を有していない場合、適合性試験で洗浄を省略し適切にバリデートできていれば、実測定でも省略できる。」という記載があった。JP15第二追補ではこの具体的な記載はなくなったが、同様な扱いができるものと考えられる。

### (2) 油及び油性液剤、軟膏剤及びクリームの試験

通常、油及び油性液剤、軟膏剤及びクリームの無菌試験は、フィルター上に製品が残る可能性が高いために洗浄操作を入れる場合が多くある。JP15第二追補には、ここまでの記載しかないが、抗菌活性が除けない場合の対応は、以前のJP15に準じて行うことになると思われる。

油及び油性液剤、軟膏剤及びクリームの溶剤として用いるミリスチン酸イソプロピルは、危険物（第4類 第3石油類）に該当するため、高温を避け通常ろ過滅菌して用いる。

#### 3.4 直接法

無菌試験は、メンブランフィルター法が直接法のいずれでも行えるが、ろ過可能な製品に直接法を適用する場合には、メンブランフィルター法より直接法が合理的であることを証明する必要がある。直接法における操作上の留意点を表3に示す。

#### 3.5 観察と結果の判定

観察は、無菌試験が培養法に頼って

表2 フィルターと用途

種類	用途
ニトロセルロースフィルター	水溶性、油性、低濃度アルコール性溶液
セルロース混合エステルフィルター	水溶性、油性、低濃度アルコール性溶液
酢酸セルロースフィルター	蛋白質の吸着が少ない、高濃度アルコール性溶液
ポリビニリデンフロライド (PVDF) フィルター	抗生物質・抗菌剤添加用
ポリカーボネートフィルター	抗生物質・抗菌剤添加用

表3 直接法に関する留意点

留意点	
1	大容量の製品を使用する必要があるとき、接種による希釈影響を考慮に入れて高濃度の培地を用いる方が好ましい場合もある。適切な場合は、高濃度培地を容器内の製品に直接加えることも可能である
2	油性製品を含む培養は毎日穏やかに振る（嫌気培養を除く）

表4 無菌試験が無効となりうる条件

無菌試験が無効となりうる条件	
1	無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータに問題が認められた場合
2	無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、問題が認められた場合
3	陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合
4	当該無菌試験から分離された微生物の同定後、この菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料や手法のいずれかに問題があると明らかに判断される場合

おり、肉眼で菌の増殖を確認することからも非常に重要な作業となる。菌は培養日数に応じて指数関数的に増殖するため明らかに菌の混濁があれば、試験者の誰もが確認できるが、増殖が悪い菌や真菌（カビ）のように沈殿などを作らず混濁しないものは注意を要する。また培養期間内に複数回、定期的な間隔で観察を行い、観察者は複数で実施した方がよい。

結果の判定で培地の混濁が認められ、微生物増殖の有無を確認する場合は、培養後に培地の一部（1mL以上）を同じ培地の新たな容器に移し、両方を4日間以上培養する。JP15 第二追補では、これまで移植する培地量が適量とされていたものを1mL以上と規定された。

また菌が認められた際でも、当該被検製品に無関係な原因により試験が無効であったことが明確に証明できる場合、再試験が実施できる。このための条件を表4に示す。この条件のうち1つ以上該当する場合、試験は無効となる。

表4の条件を1つ以上でも満たすための原因立証と再試験への判断は非常に難しい。試験が微生物汚染により陽性となった場合でも、必ずしも試験を行った環境や試験者から菌が検出されないこともあ

る。また試験方法や材料の調査においても、培養で数日間は経過してしまっており、試験に用いた器材や材料などそのままの状態が残っておらず、それらの汚染状態の直接的な確認も難しい。そのため試験が無効であったことを証明するためには、以下の例を含めた日々の対応が必要である。

1) 施設・装置の環境面に対して、適切な測定数や測定手法、培地の種類の選定が重要になってくる。測定箇所は実際試験者が触れる箇所など作業動線を考慮し汚染源をピックアップできるように配慮する。

2) 器材などの滅菌において温度、圧力、時間を適切に記録し、結果に逸脱がないか確認し、さらにケミカルインジケータを利用した確認も行う。

3) 無菌試験に関係する様々な記録はトレース可能なように実施し、試験操作中に通常と異なる事象が発生した場合、適切に記録するなど原因調査を実施しやすい工夫をする。

4) 試験で陽性となった場合、微生物の遺伝子解析を行い、そのとき環境菌や作業員から菌が検出されていれば、種まで確実に同定し比較する。また得られた塩基配列

表5 適合性試験の事例

試験群	試験に使用する材料			
	培地、 器材	希釈液、 洗浄液	試料	菌
1) 陽性対照	○	○	—	○
2) 試料接種	○	○	○	○
3) 陰性対照	○	○	—	—
4) 試料対照	○	○	○	—

○：試験に使用する —：試験には使用しない

を比較し相同性の度も調査する。属レベルの同定では、直接的な汚染の原因として立証される根拠としては不十分である。得られた結果によっては無菌試験実施中に用いた材料や手法に問題があると判断されることもある。

5) 日頃から試験環境や試験者の微生物汚染に注意を払い、菌の検出数、菌種などを含めて傾向管理しておく。

#### 4 手法の適合性試験における事例

無菌試験の適合性試験は通常、陽性対照と試料接種について操作を行うことになっている。これ以外にも、器材・洗浄液の滅菌状態や作業汚染などを把握するため、試料と菌株を添加しない陰性対照も加えているところが多いと思われる。この3つの試験群のみでも十分ではあるが、さらに菌株を添加せず、試料と洗浄液のみの試験群を追加し、4つの試験群で検討を行う事例もある(表5)。また不活化剤や中和剤を洗浄液に添加した場合は、不活化剤や中和剤の添加、未添加の試験群を追加した6つの試験群の事例もある(表6)。表6に示した適合性試験の例において各試験群で確認される内容を表7に示す。

観察は毎日実施し、最長で5日間の菌量の変化について考察を行う方がより正

表6 抗菌剤の適合性試験の事例

試験群	試験に使用する材料				
	培地、 器材	希釈液、 洗浄液	不活化剤	試料	菌
1) 陽性対照	○	○	—	—	○
2) 陽性対照 (不活化剤添加)	○	○	○	—	○
3) 試料接種	○	○	—	○	○
4) 試料接種 (不活化剤添加)	○	○	○	○	○
5) 陰性対照	○	○	○	—	—
6) 試料対照	○	○	—	○	—

○：試験に使用する —：試験には使用しない

確な結果が得られる。このとき陽性対照と比較し、菌の発育遅延がないかも確認しておく方がよいと考える。

適合性試験に対しては、菌を添加し、ただ発育すればよいということではなく、表5や表6に示したように試料、添加剤が培地や菌に与える影響を正しく評価し、そのときの菌の発育状況も適切に観察することで適合性試験結果の信頼性をより向上させることができる。最終的には、製品の無菌試験で間違いのない結果を保証することにつながると思われる。

#### 5 おわりに

無菌試験は、まず事前の試験法設定(バリデーション)で製品の微生物発育阻止活性の有無を確認し、発育阻止活性が存在する場合は適切な処置を行っていく。製品の試験においては、操作以上に試験環境の面にも厳密な管理や注意が必要である。近年、アイソレータを用いた無菌試験も広く行われ、設備や維持のコスト面、作業者の更衣負担は軽減されてきた。しかし無菌試験を実施する環境は、これまでと変わることにはなく、環境管理・作業教育など疎かにできない。

無菌試験法は、製造ロット全体の中の限

られた量で試験を行い、無菌性を確認するものであるため、培養法による検出感度の問題と合わせてロット全体の無菌性が保証されるものではない。従って、製造工程の管理と合わせて製品の無菌性を確保するものと考えられている。一方、無菌試験がもし陽性になった場合、製造工程や製品出荷への影響は甚大なものになる。試験者は日々、適切に管理された環境のもと、厳密に無菌試験を実施していく必要がある。また今後は、三薬局方で調和法が施行される。統一された試験内容について、今後も注釈を含め有益な情報が出てくるものと思われ、試験を行う立場としては、これらの情報を活用し、より正確に、分かりやすく試験を実施できるように努めていきたい。

#### 文献

- 1) 日本薬局方解説書編集委員会, "第十五改正日本薬局方 第二追補 解説書", 廣川書店, (2009), pp.G-12-19
- 2) European Pharmacopoeia -Supplement 6.3, pp.3919-3922 (2009)
- 3) THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL COMVENTION, The United States Pharmacopoeia 32/NF27, Supplement 1, pp. 3934-3939 (2009)
- 4) 日本薬局方解説書編集委員会, "第十五改正日本薬局方解説書", 廣川書店, (2006), pp.B-499-510
- 5) European Pharmacopoeia -Supplement 6.8, pp.5795-5798 (2010)

表7 抗菌剤の適合性試験の事例(表6)の評価内容

試験群	内容
試験群1) 陽性対照	培地の性能を確認する
試験群2) 陽性対照(不活化剤)	不活化剤が直接、菌に与える影響を確認する
試験群3) 試料接種	試料の発育阻止活性の有無を確認する
試験群4) 試料接種(不活化剤)	不活化剤の有効性を確認する
試験群5) 陰性対照	培地・器材の滅菌状態、試験操作上の不具合を確認する
試験群6) 試料対照	試料の状態(バイオフィルム・混濁)を確認する



池永 義宏  
(いけなが よしひろ)  
大分事業所