

医薬品製造環境等の微生物管理実態調査

医薬品課 植松京子 志岐寿子 山口浩子

キーワード：空中微粒子数 空中微生物数 細菌数 真菌数 特定微生物（大腸菌 緑膿菌 黄色ブドウ球菌）

1 はじめに

医薬品の品質保証において微生物管理は重要な意義をもっている。一般医薬品についても微生物による汚染を防ぎ、その限度を設定し、管理することは製造衛生管理の指標として必要不可欠である。今回、医薬品製造会社（A社及びB社）における製造環境及び製品（非無菌医薬品液剤）の微生物管理に関する実態調査を行ったので報告する。

2 調査条件

1) 調査日

A社：平成17年6月29日、B社：平成17年8月25日

2) 試料

A社：外溶液、B社：内服液

3) 調査項目

製造室内の空中微粒子数

製造室内の空中微生物数（細菌数、真菌数）

製造機器、設備等及び作業員着衣の表面付着微生物数（細菌数、真菌数）

製品中の細菌数及び真菌数

製品中の特定微生物（大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌）の有無

4) 調査室：

A社：調合室、充填室、B社：充填室

3 調査方法

1) 空中微粒子数（ $>0.5 \mu\text{m}$ ）

機器：パーティクルカウンター（リオン株式会社）

空気採取量：1 L

採取地点：1 製造室（平均4m×4m）あたり1点、高さ約1.2 m

採取回数：3～5回

計測：3～5回の平均値を出し、 1.0 m^3 に換算した数を空中微粒子数とした。

2) 空中微生物数

機器：エアー・サンプラー（MAir Tカセット培地付きミリポア・エアー・テスター（日本ミリポア株式会社）

空気採取量：各製造室における清浄度のグレードをD¹（充填、滅菌前の溶液の調製、資材の準

備区域）とし、採取量を 0.2m^3 とした²⁾。

採取地点：1製造室（平均 $4\text{m} \times 4\text{m}$ ）あたり1点、高さ約 1.2m

採取回数：6回（細菌3回、真菌3回）

培地：細菌 Tryptic Soy Ager、真菌 Sabouraud

培養：好気性細菌は $30 \sim 35$ で5日間、真菌は $20 \sim 25$ で5～7日間培養を行った²⁾。但し、真菌については、拡散性菌の増殖によって生菌数が計測できなくなった場合、計測可能であった培養日数までの菌数を実測値とした。

計測：細菌と真菌についてそれぞれの菌数を合計し、採取回数で除し平均値を出した。細菌数と真菌数の平均値を合計し、空気採取量 1.0m^3 に換算した菌数を空中微生物数とした。

3) 表面付着微生物数

拭き取り法：リン酸緩衝液を浸した綿球で機器及び設備の表面の一定面積（ $10\text{cm} \times 10\text{cm}$ ）を4回（縦、横、斜め2回）拭き取った。試料液は平板表面塗抹法に準じて培養を行った。

培地：細菌 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地

真菌 抗生物質添加ポテト・デキストロースカンテン培地

培養：空中微生物数と同様。

計測：細菌と真菌の菌数を合計し、 25cm^2 あたりの微生物数に換算して表面付着微生物数とした。

4) 製品中の細菌数及び真菌数

試料の採取方法：同一製造番号について3～4箇所から同量ずつ採取し、それらを合わせたものを披検試料とした。

平板表面塗抹法：試料 0.2mL を培地に塗抹した。

培地：細菌 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地

真菌 抗生物質添加ポテト・デキストロースカンテン培地

培養：空中微生物数と同様。

計測：細菌と真菌の菌数をそれぞれ計測し、試料 1.0mL あたりに換算して製品中の細菌数及び真菌数とした。

5) 製品中の特定微生物（大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌）の有無

大腸菌：試料 10mL を量り、乳糖ブイオンを加えて 100mL とし、 $30 \sim 35$ で $24 \sim 72$ 時間培養後、培養液をマッコンキーカンテン培地上に塗抹し、 $30 \sim 35$ で $18 \sim 24$ 時間培養した。周囲に赤みがかかった沈降線の帯を持つ赤レンガ色のグラム陰性菌の集落が検出されない場合は陰性と判定した。

（培地の有効性確認と特定微生物試験法の検証のために菌株ATCC8739を使用）

緑膿菌：試料 10mL を量り、トリプト・ソイ・ブロスを加えて 100mL とし、 $30 \sim 35$ で $24 \sim 48$ 時間培養後、培養液をNACカンテン培地上に塗抹し、 $30 \sim 35$ で $24 \sim 48$ 時間培養した。微生物の生育が観察されない場合は陰性と判定した。

（培地の有効性確認と特定微生物試験法の検証のために菌株ATCC9027を使用）

黄色ブドウ球菌：試料 10mL を量り、トリプト・ソイ・ブロスを加えて 100mL とし、 $30 \sim 35$ で $24 \sim 48$ 時間培養後、培養液をマンニット・食塩カンテン培地上に塗抹し、 $30 \sim 35$ で $24 \sim 48$ 時間培養した。黄色の帯に囲まれた黄色の集落が検出されない場合は陰性と判定した。

（培地の有効性確認と特定微生物試験法の検証のために菌株ATCC6538を使用）

4 結果

1) A社

- (1) 表A-1に各製造室の作業中における空中微粒子数 (m^3) を示した。調合室は $2,048,333 / m^3$ 、充填室は $1,311,667 / m^3$ であった。無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法における環境微生物の評価基準²⁾を参考とすると、グレードDにおける空中微粒子数の最大許容粒子数（非作業時）は $3,530,000 / m^3$ であることから、A社の製造室はいずれも基準を満たしていた。
- (2) 表A-2に各製造室の空中微生物数 (cfu / m^3) を示した。調合室は $36.7 cfu / m^3$ 、充填室は $55.0 cfu / m^3$ であった。無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法における環境微生物の評価基準²⁾を参考とすると、グレードDにおける空中微生物数の許容上限値は $200 cfu / m^3$ である。よって、A社の製造室はいずれも基準を満たしていた。

また、細菌についてグラム染色を行った結果、調合室からはグラム陰性短桿菌を検出し、充填室からはグラム陰性短桿菌、グラム陰性球菌、グラム陽性短桿菌及びグラム陽性球菌を検出した。

真菌については、調合室から *Aspergillus* 属及び *Penicillium* 属を確認し、充填室から *Penicillium* 属を確認した。

- (3) 表A-3に機器、設備、着衣の表面付着微生物数 ($cfu / 25 cm^2$) を示した。充填室で作業を行った者について3人のうち1人の着衣から $1.3 cfu / 25 cm^2$ の細菌を検出した。グラム染色を行った結果、グラム陰性短桿菌及びグラム陽性短桿菌を検出した。
真菌については全ての試料で検出されなかった。無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法における環境微生物の評価基準²⁾を参考とすると、グレードDにおける機器、設備の表面付着微生物数の許容上限値は $50 cfu / 25 cm^2$ である。よって、A社の試料はいずれも基準を満たしていた。
- (4) 表A-4に製品中の細菌数及び真菌数 (cfu / mL) を示した。製品9本については細菌、真菌ともに検出されなかった。（参考：非無菌医薬品の最終製剤の微生物限度基準値は、経口（液剤）の場合、好気性細菌数は $100 (cfu / mL)$ 、真菌数は $50 (cfu / mL)^{2)}$ ）。
- (5) 表A-5に製品の特定微生物（大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌）の有無を示した。製品9本については全く陰性であった。

2) B社

- (1) 表B-1に作業終了後の空中微粒子数 (m^3) を示した。充填室は $443,600 / m^3$ であったことから基準を満たしていた。
- (2) 表B-2に空中微生物数 (cfu / m^3) を示した。充填室は $6.7 cfu / m^3$ であったことから、基準を満たしていた。
細菌についてグラム染色を行った結果、グラム陰性短桿菌及びグラム陽性球菌を検出した。真菌については、*Penicillium* 属を確認した。
- (3) 表B-3に機器、設備、着衣の表面付着微生物数 ($cfu / 25 cm^2$) を示した。細菌、真菌ともに全ての試料で検出されなかった。
- (4) 表B-4に製品中の細菌数及び真菌数 (cfu / mL) を示した。製品16本については細菌、真菌ともに検出されなかった。

- (5) 表B-5に製品の特定期微生物（大腸菌、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌）の有無を示した。製品16本については全て陰性であった。

5 まとめ

水分活性の低い製剤に汚染があっても通常は汚染微生物の増殖はないが、液剤は水分活性が高いので、たとえ制菌物質が含まれていても汚染微生物による品質劣化には注意が必要である²⁾といわれていることから、今回は調査対象を液剤としたが、A社及びB社については微生物による汚染はなかった。

また、両社の医薬品製造区域の空中微粒子数と空中微生物数は評価基準を満たしていたが、確認された真菌は土壌、食品及び空気中等に生態分布をもつ属で³⁾、かび毒を産生する種もあることから衛生管理を行うよう指導を行った。

参考文献

- 1) 医薬品開発・製造におけるバリデーション 川村邦夫 著
- 2) 第14改正日本薬局方 参考情報 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法
- 3) かび検査マニュアルカラー図譜 監修 高鳥浩介

表A-1 空中微粒子数（空気1 m³ あたり）（>0.5 μm 作業中

		室温（ ）	湿度（%）
調 合 室	2,048,333	30.1	80
充 填 室	1,311,667	30.5	58

表A-2 空中微生物数（cfu / m³） 作業中

調 合 室	36.7
充 填 室	55.0

表A-3 製造機器、設備等の表面付着微生物数（cfu / 25 cm²）

調合槽の蓋の表面（調合室）	0
調合槽の側面（調合室）	0
作業台1の上面（調合室）	0
移送タンク1の側面（調合室・充填室）	0
移送タンク2の側面（調合室・充填室）	0
作業台2の上面（充填室）	0
作業台3の上面（充填室）	0
作業台4の上面（充填室）	0
作業員1の衣服（調合室・充填室）	0
作業員2の衣服（調合室・充填室）	0
作業員3の衣服（充填室）	1.3

表A-4 製品中の細菌数及び真菌数

	細菌数（cfu / mL）	真菌数（cfu / mL）
No.1	0	0
No.2	0	0
No.3	0	0
No.4	0	0
No.5	0	0
No.6	0	0
No.7	0	0
No.8	0	0
No.9	0	0

表A-5 製品中の特定微生物（大腸菌、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌）の有無

	大腸菌	緑膿菌	黄色ブドウ球菌
No.1	-	-	-
No.2	-	-	-
No.3	-	-	-
No.4	-	-	-
No.5	-	-	-
No.6	-	-	-
No.7	-	-	-
No.8	-	-	-
No.9	-	-	-

- : 菌の発育無し

表B-1 空中微粒子数 (空気1 m³ あたり) (>0.5 μm 作業終了後)

		室温()	湿度(%)
充填室	443,600	25	68

表B-2 空中微生物数 (cfu / m³) 作業終了後

充填室	6.7
-----	-----

表B-3 製造機器、設備等の表面付着微生物数 (cfu / 25 cm²)

充填機	0
キャッパー	0
ｽﾌﾟﾘﾝｸﾞ1の上	0
ｽﾌﾟﾘﾝｸﾞ2の上	0
作業者1の衣服	0
作業者2の衣服	0
作業者3の衣服	0
作業者4の衣服	0
作業者5の衣服	0

表B-4 製品中の細菌数及び真菌数

	細菌数 (cfu / mL)	真菌数 (cfu / mL)
No.1	0	0
No.2	0	0
No.3	0	0
No.4	0	0
No.5	0	0
No.6	0	0
No.7	0	0
No.8	0	0
No.9	0	0
No.10	0	0
No.11	0	0
No.12	0	0
No.13	0	0
No.14	0	0
No.15	0	0
No.16	0	0

表B-5 製品中の特定微生物 (大腸菌、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌) の有無

	大腸菌	緑膿菌	黄色ブドウ球菌
No.1	-	-	-
No.2	-	-	-
No.3	-	-	-
No.4	-	-	-
No.5	-	-	-
No.6	-	-	-
No.7	-	-	-
No.8	-	-	-
No.9	-	-	-
No.10	-	-	-
No.11	-	-	-
No.12	-	-	-
No.13	-	-	-
No.14	-	-	-
No.15	-	-	-
No.16	-	-	-

- : 菌の発育無し