

細胞の培養ディッシュをそれぞれ 5 % 炭酸ガスを含む空気中, 36 ± 1 °C で 3 ~ 6 日間培養する。

10. 培地充てん試験法

本試験法は、無菌操作法で製造される医薬品の無菌性保証の適切性を充てん医薬品の代わりに無菌培地などを用いて検証するプロセスバリデーションの一方法である。したがって、充てん・閉塞工程、作業環境、作業操作、作業従事者などについては、実製品の製造工程を用い、かつ最悪ケースを想定したものでなければならない。本試験を実施するに当たっての必要な情報については、医薬品 GMP, WHO 医薬品 GMP, ISO 基準などを参考にすること。

1. 培地充てん試験の実施頻度

1.1 初期評価

初期評価の対象は、それぞれ初めて使用する設備、装置、工程及び異なった容器デザイン（同じ容器デザインでサイズの異なるものは除く）などである。実製品のロットサイズが 3,000 個以上の場合は、培地充てん試験を少なくとも連続 3 回、別々の日に実施する。実製品のロットサイズが 3,000 個未満の場合は、表 3 による。

1.2 再評価

- 1) それぞれの充てんラインの各作業シフトについて定期的に実施する。無菌作業従事者は、無菌操作に関する教育訓練を受け、培地充てん試験に参加した者でなければならない。
- 2) 充てんラインを 6 ヶ月以上使用しなかった場合は、その充てんラインを再使用する前に初期評価に準じる回数の培地充てん試験を実施しなければならない。
- 3) 無菌性保証に影響を与える工程、設備又は装置の変更（標準部品の交換は再評価の対象にならない）、無菌重要工程作業者の変更（例えば、新しい作業者の参入）、環境微生物試験結果の異常、最終製品の無菌試験で汚染製品が認められた場合には、必要に応じて初期評価に準じる回数の培地充てん試験を実施しなければならない。

2. 培地充てん試験の許容基準

0.1 % の汚染率をじゅうぶん検出できる数の容器に培地を充てんし、95 % 信頼上限値での汚染率が 0.05 % 以上、0.1 % 未満を警報基準値、0.1 % 以上を処置基準値とする。充てん容器数と警報基準値及び処置基準値との関係について表 1 に示す。表 2 は、充てん容器数当たり検出された汚染容器個数の汚染率を求めるために使用される。なお、培地充てん試験における汚染率 0.05 % は最低許容基準であって、製造者はより低い汚染率を達成できるよう努力しなければならない。無菌充てんラインの初期評価及び再評価に対する警報基準値及び処置基準値と、それらに対して必要な行動を表 3 及び表 4 に示す。実製品のロットサイズが 3,000 個未満の場合の培地充てん試験における警報基準値及び処置基準値は、半自動もしくは手動製造を考慮したものとなっている。

2.1 各基準値と必要な行動

2.1.1 初期評価・培地充てん試験

- 1) 警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。
- 2) 連続 3 回以上行った培地充てん試験の何れかにおいて警

報基準値又は処置基準値に達した際には、汚染原因の調査後、更に 3 回以上培地充てん試験を行い、各試験結果が警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2.1.2 再評価・培地充てん試験

- 1) 警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

- 2) 警報基準値に達した際には、汚染原因の調査が必要であり、更に 1 回培地充てん試験を行い、その試験結果が警報基準値未満の場合には培地充てん試験に適合しているものとみなす。

- 3) 処置基準値に達した際には、汚染原因の調査と同時にそのラインで前回成功した培地充てん試験と今回の培地充てん試験との間に製造された製品に関連した関係記録などについて機敏な調査を行い、必要に応じて保存中及び（又は）販売中の製品に対して適切な行動をとらなければならない。汚染原因の調査後、必要に応じて更に連続 3 回培地充てん試験を行い、3 回の培地充てん試験結果が警報基準値未満の場合には、培地充てん試験に適合しているものとみなす。

2.2 無菌性に影響を及ぼす諸要因

警報基準値又は処置基準値に達した培地充てん試験において、汚染原因の調査を行うに当たって、必要な評価対象要因としては以下のものが含まれる。

- 1) 環境微生物モニタリングデータ
- 2) 環境微粒子モニタリングデータ
- 3) 作業従事者の微生物モニタリングデータ（作業終了時、無塵衣や手袋表面などに付着している微生物のモニタリング）
- 4) 培地、器材、装置等の滅菌サイクルデータ
- 5) 滅菌装置のキャリブレーションデータ
- 6) 滅菌機材の保存状態の適切性
- 7) HEPA フィルターの評価（空中微粒子レベル、DOP テスト、流速など）
- 8) 使用前及び使用後のフィルター完全性試験結果（フィルターハウジング組立の適切性も含む）
- 9) 無菌エリアでの空気の流れと圧力の適切性
- 10) 培地充てん試験中に起こった通常と異なった出来事
- 11) 汚染微生物の諸性状検査結果
- 12) 衛生管理方法とそのトレーニング内容の適切性
- 13) 作業従事者のガウニングとそのトレーニング内容の適切性
- 14) 作業従事者の無菌操作技術とそのトレーニング内容の適切性
- 15) 作業従事者の健康状態（特に、呼吸器系疾患による咳やくしゃみなどの影響）
- 16) その他、無菌性に影響を及ぼす要因

3. 培地充てん試験におけるデータ管理

それぞれの培地充てん試験において、下記の事項を詳細なデータとして記録しなければならない。

- 1) 試験実施日時
- 2) 試験実施充てん室、充てんラインの識別
- 3) 容器、栓の種類とサイズ
- 4) 充てん容量
- 5) 充てん速度
- 6) 滅菌フィルターのロット番号、カタログ番号

- 7) 充てん培地の種類
- 8) 充てん容器数
- 9) 培養しなかった充てん容器数とその理由
- 10) 培養容器数
- 11) 陽性容器数
- 12) 培養温度と培養期間
- 13) 実際の製造工程のあるステップを模倣するために使われた方法（例えば、模擬凍結乾燥、又はバイアル空隙ガス置換など）
- 14) 培地充てん試験開始前及び試験実施中に得られた微生物学的モニタリングデータ
- 15) 培地充てん試験参加者リスト
- 16) 充てん培地の性能試験結果（粉末充てんの場合は、微生物発育阻止活性の試験成績も必要）
- 17) 陽性容器から検出された微生物の性状試験結果
- 18) 総合評価

4. 培地充てん試験の方法

液状製品、粉末製品及び凍結乾燥製品の無菌製造工程を検証する方法について示す。基本的には、液状製品に対する培地充てん試験法を応用することによって、他の剤形の医薬品及び充てん容器の無菌性検証が可能である。

4.1 培地の選択と性能試験

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト (SCD) 培地、又は適当な他の培地を使用する。使用培地の性能試験用菌株としては、無菌試験法に指定されている菌株及び必要に応じて環境モニタリングで検出頻度の高い代表菌を 1 ~ 2 株用いる。各菌を培地充てん試験用培地に 10 ~ 100 個接種し、あらかじめ定めた温度で 5 日間培養したとき、明らかな増殖を示さなければならぬ。

4.2 培地の滅菌

あらかじめバリデーションの行われた方法に従って滅菌する。

4.3 培養及び観察

培養に先立ち、容器に漏れが認められたもの、又は損傷したものを除去し、記録にとどめる。20 ~ 25 °C で 1 週間、次いで 30 ~ 35 °C で更に 1 週間（あるいは 30 ~ 35 °C で 1 週間、次いで 20 ~ 25 °C で 1 週間）、又は 30 ~ 35 °C で 2 週間培養し、少なくとも 3 ~ 7 日目に 1 回及び培養最終日の計 2 回、菌の発育の有無を観察する。汚染が認められた容器については、汚染菌の性状検査を実施する。

A. 液状製品

培地充てん手順

施設、装置等の清掃は通常通りに行い、容器、栓、充てん装置部品、トレイなどは標準操作手順書に従って洗浄、滅菌する。培地充てん試験は、最悪ケース（例えば、打栓ラインの修正、充てん針/チューブの修理又は交換、充てんラインのフィルター交換等の介在作業、最長製造時間、最大バッチサイズ、最多作業者数など）を考慮に入れ、実施する。滅菌容器に適量の培地を製品の開放時間を考慮した充てん速度で充てんし、閉塞する。適当な方法で培地を容器の内表面全体に接触させ、あらかじめ定めた温度で培養する。

B. 粉末製品

B.1 充てん粉末の選択と微生物発育阻止活性試験

実製品又はプラセボ粉末を用いる。プラセボ粉末としては、

一般に乳糖、D-マンニトール、ポリエチレングリコール 6000、カルボキシルメチルセルロース塩、粉末培地などを用いる。あらかじめ、充てん粉末が微生物に対して発育阻止活性を有するかどうか調べなければならない。粉末培地は精製水で、他の滅菌粉末は培地で培地充てん試験濃度に希釈し、4.1 項に定める培地性能試験用各菌を 1 培地当たり 10 ~ 100 個接種する。あらかじめ定めた温度で 5 日間培養したとき、明らかな増殖が認められれば、充てん粉末には微生物発育阻止活性が無いものとみなし、本試験に使用できる。

B.2 充てん粉末の滅菌法

乾燥プラセボ粉末を適當な容器（例えば、二重に熱シールされたポリエチレン袋）に入れ、放射線滅菌を行う。

B.3 充てん粉末の無菌性確認

無菌試験法に従い無菌試験を行うとき、適合しなければならない。ただし、用いた滅菌法のバリデーションが行われている場合には、無菌試験を省略することができる。

B.4 培地充てん手順

下記の中から適當なものを選ぶ。

- 1) 適當な方法で容器に滅菌液体培地を充てん後、粉末充てん機を用い、実製品又は滅菌プラセボ粉末を充てんする。プラセボ粉末として滅菌粉末培地を用いる場合は、滅菌液体培地の代わりに滅菌精製水を充てんする。

- 2) 液体培地を容器に分注後、高压蒸気滅菌する。この容器を充てんエリアに移動し、粉末充てん機を用いて実製品又は滅菌プラセボ粉末を充てんする。

- 3) 粉末充てん機を用い、容器に実製品又は滅菌プラセボ粉末を充てん後、適當な方法で滅菌液体培地を充てんする。プラセボ粉末として滅菌粉末培地を用いた場合は、滅菌液体培地の代わりに滅菌精製水を充てんする。

C. 凍結乾燥製品

凍結乾燥製品の場合、培地充てん試験を凍結乾燥製品の実製造工程と全く同じ条件下で行うことはできない。凍結及び乾燥を行うと、汚染菌を死滅させる可能性がある上、培地の特性も変えてしまう。また、復圧ガスとして不活性ガスを使用すると、好気性菌や真菌の発育を阻害する可能性がある。そのため、通常、凍結及び乾燥を避け、復圧ガスとしては空気が用いられる。

培地充てん手順

下記の方法によるか、又はこれに相当する方法を用いる。

- 1) 製品充てん機を用い、容器に培地を充てん後、半打栓状態にし、滅菌トレイに集める。

- 2) トレイを凍結乾燥機にセット後、扉を閉め、製造工程に準じて凍結乾燥の操作を行う。ただし、凍結は行わず、弱い減圧下に適當な時間保持する。

- 3) 減圧保持完了後、復圧し、打栓する。

- 4) 適當な方法で培地を内表面全体に接触させ、あらかじめ定めた温度で培養する。

表 1 培地充てん容器数と基準値

充てん容器数 ^{*1}	汚染容器数		
	許容基準値	警報基準値	処置基準値
3,000	0	—	≥ 1
4,750	0	1	≥ 2
6,300	0	1 ~ 2	≥ 3
7,760	0	1 ~ 3	≥ 4
9,160	0	1 ~ 4	≥ 5
10,520	1	2 ~ 5	≥ 6
11,850	1	2 ~ 6	≥ 7
13,150	1 ~ 2	3 ~ 7	≥ 8
14,440	1 ~ 2	3 ~ 8	≥ 9
15,710	1 ~ 3	4 ~ 9	≥ 10
16,970	1 ~ 3	4 ~ 10	≥ 11

*1 実製品のロットサイズと関連させる必要性はない。

表 2 出現汚染容器数に対する
ポアソン分布の 95 % 信頼上限値

出現汚染容器数 (k)	95 % 信頼上限値 (U)
0	2.9957
1	4.7439
2	6.2958
3	7.7537
4	9.1537
5	10.5130
6	11.8424
7	13.1481
8	14.4346
9	15.7052
10	16.9622

表2の 95 % 信頼上限値 (U) を用い、充てん容器数 (n) 当たり検出された汚染容器個数 (k) の汚染率 (P) を以下のように求めることができる。

$$P = \frac{U}{n} \quad \dots \text{式 } 1$$

例. 5,000 容器に培地を充てんし、2 容器から汚染が認められた場合は、式 1 に $n = 5,000$, $U = 6.30$ ($k = 2$) を代入し、 $P = 6.30/5,000 = 0.0013$ となり、汚染率は 0.13 % となる。

表 3 初期評価・培地充てん試験

製品ロット サイズ	充てん試験 回数	警報基準値 及び必要な行動	処置基準値 及び必要な行動
< 500	1 試験当たり、 製品の最大ロット サイズと同レベル の容器数を用い、 3 回以上	何れかの培地充 てん試験で 1 容 器汚染、原因を 調査の上、更に 1 回培地充てん 試験を行う。汚 染が認められた ら「初期評価・ 培地充てん試 験」を繰り返す。	何れかの培地充 てん試験で 2 容 器が汚染、又は 2 回の培地充て ん試験で各 1 容 器が汚染、原因 を調査の上、 「初期評価・培 地充てん試験」 を繰り返す。
500 ~ 2,999	1 試験当たり、 製品の最大ロット サイズと同レベル の容器数を用い、 3 回以上	同 上	同 上
≥ 3,000	1 試験当たり少 なくとも 3,000 容器以上を用い、 3 回以上	何れかの培地充 てん試験で表 1 に示す警報基準 値に達した際は、 2.1.1 項に示し た行動をとる。	何れかの培地充 てん試験で表 1 に示す処置基準 値に達した際は、 2.1.1 項に示し た行動をとる。

表 4 再評価・培地充てん試験

製品ロット サイズ	充てん試験 回数	警報基準値 及び必要な行動	処置基準値 及び必要な行動
< 500	1 試験当たり、 製品の最大ロット サイズと同レベル の容器数を用い、 3 回	何れかの培地充 てん試験で 1 容 器汚染、原因を 調査の上、「再評 価・培地充てん試 験」を繰り返す。	何れかの培地充 てん試験で 2 容 器以上汚染、汚 染原因を調査し、 初期評価試験を 繰り返す。
500 ~ 2,999	製品の最大ロット サイズと同レベル の容器数を用い、 1 回	同上	同上
≥ 3,000	少なくとも 3,000 容器以上を用い、 1 回	表 1 に示す警報 基準値に達した 際は、2.1.2 項に 示した行動をと る。	表 1 に示す処置 基準値に達した 際は、2.1.2 項に 示した行動をと る。

参考資料

- Good manufacturing practices for pharmaceutical products (WHO-GMP, 1992).
- ISO 13408-1 (Aseptic processing of health care products : Generals).