

製剤機械技術学会 GMP関連技術勉強会テーマ： 微生物迅速計測法の概要とプロセスへの応用

2016年11月22日
アズビル株式会社BSC
EPS事業推進室 松田

azbil

1. はじめに
2. 微生物迅速計測法 各種技術の概要
3. レギュレーションの動向
4. 自家蛍光式の技術・製品と応用事例
5. おわりに

1. はじめに

本勉強会でのご紹介の主旨

歴史的背景をもつ培養による微生物検出に代わる、さまざまな微生物計測 / 計数化・同定の技術が登場している。結果を導く迅速性と精度の高さを期待効用として、現状標準とされている手法による計数化との対比に基づいて応用するチャレンジが試みられている。

多様なアプリケーションのなかで、微生物に関わる清浄度をプロセス変数と捉え、応用に取り組んできた背景に基づき、以下の内容を紹介する。

1. 微生物迅速測定法の分類
 - さまざまな技術の原理と応用優位性を概観する
2. 微生物迅速測定法のバリデーションに関わるレギュレーション
 - 日局方17改正(2016年3月)で収載された迅速微生物試験法の概要を抽出する
 - 代替微生物計測法のバリデーションを定義するUSPが2015年改訂された。この概要を抽出する
3. プロセスの清浄度管理を目的として適用する微生物計測技術とアプリケーション例紹介
 - 自家蛍光式測定 of 技術と製品例
 - あらかじめ設計され、バリデートされたプロセスで、微生物清浄度が維持され、工程能力に応じた運用状態にあることを、モニタリング管理するアプリケーション事例紹介

1. はじめに

補足:

広範囲にわたる微生物管理の立場からの視点に基づいて、現状と方向性を包括的にまとめた資料としては、

- 2016年2月9日に実施された微生物シンポジウム資料
- 第17改正日本薬局方参考情報新規収載 微生物迅速試験法

佐々木次男先生監修　じほう社発行

をお勧めします。

微生物シンポジウム資料のなかで、日本PDA製薬学会 無菌GMP委員会がまとめたセッション「微生物迅速法についての検討 ~用途開発と用途事例~」のまとめにおいて、次のように現状が総括されています。

- 第17改正日局薬局方参考情報に「微生物迅速法」が収載された
- バリデーションは測定原理に応じて実施する
- 応用分野は工程管理、受入・出荷試験等、多岐にわたる
- 微生物迅速法の活用はメリットが多い
- 微生物管理レベルの向上とリスク低減に貢献する
- 各社導入を始めている

本勉強会を通じて、微生物迅速測定法の普及促進が製剤プロセスの改善に貢献できるために、参加いただいた方々から多くの示唆をいただくきっかけになることを期待します。

おことわり: 小生が属するアズビル(株)は、連続プロセス・空調プロセス(つまり居住・作業空間の環境プロセス)計装を対象とする事業であり、微生物試験・分析に関わる微生物計測法を網羅的に述べるだけの背景がありません。限定的な分野についてご紹介することをご了解ください。

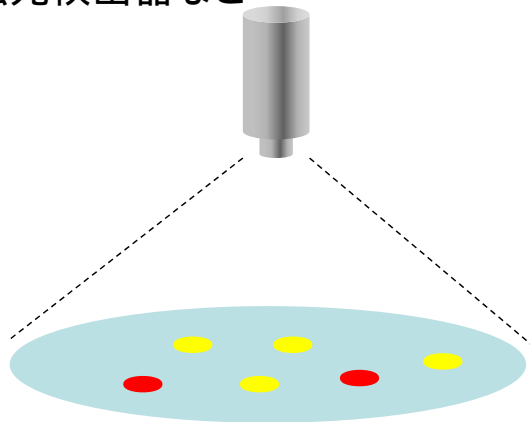
微生物迅速計測法 各種技術分類

- すでに多様な技術をもとに、迅速計測法/試験法が確立してきている。
- 微生物迅速試験法の測定原理分類に基づいて、以下技術の概要を紹介する。
 - 計測原理
 - 技術の原目的(本来目的とされた応用分野)
 - 微生物迅速計測分野への応用における優位性と考慮すべき留意点
 - 製品例

2. 直接測定法

1. 固相サイトメトリー

対物レンズ、
蛍光検出器など



顕微鏡観察が原型と言える

原理

基板など固相上に粒子を捕捉し、顕微鏡や画像スキャンで観察する。蛍光染色などと組み合わせ、特定の性質を持った細胞を検出することができる。

液相のまま観察するものはイメージサイトメトリーに分類されるが、サンプルが静止した状態で観察するという形態に注目すれば、同様のものと言える。

原目的

フィルターろ過で捕集した細菌を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察するところから発展したものは、微生物検出を原目的とする。

イメージサイトメトリーは、細胞形態等の時間変化を観察することなどに用いられるが、全自動セルカウンターとして市販されている製品は、細胞数カウントに特化した、簡易型イメージサイトメーターと捉えることができる。

2. 直接測定法

1. 固相サイトメトリー

微生物迅速検出に応用する際の優位性

- ・蛍光染色することで、細胞の生死判定ができる。
- ・DNA蛍光プローブなどを使うことで、ある程度菌種判定が可能と思われる。

留意点

- ・固相上に捕集するステップが必要。捕集効率など、捕集方法に依存するパラメーターが影響する。
- ・観察範囲の中に対象とする細胞が存在することが必要なため、細胞密度が低くなると、定量の信頼性が下がる。
- ・1 μm 程度の粒子は、形態から粒子の種類の違いが難しい為、基本的に細胞以外の粒子が無いあるいは細胞に対して著しく少ないサンプルであることが前提
- ・染色する場合、染色処理が必要

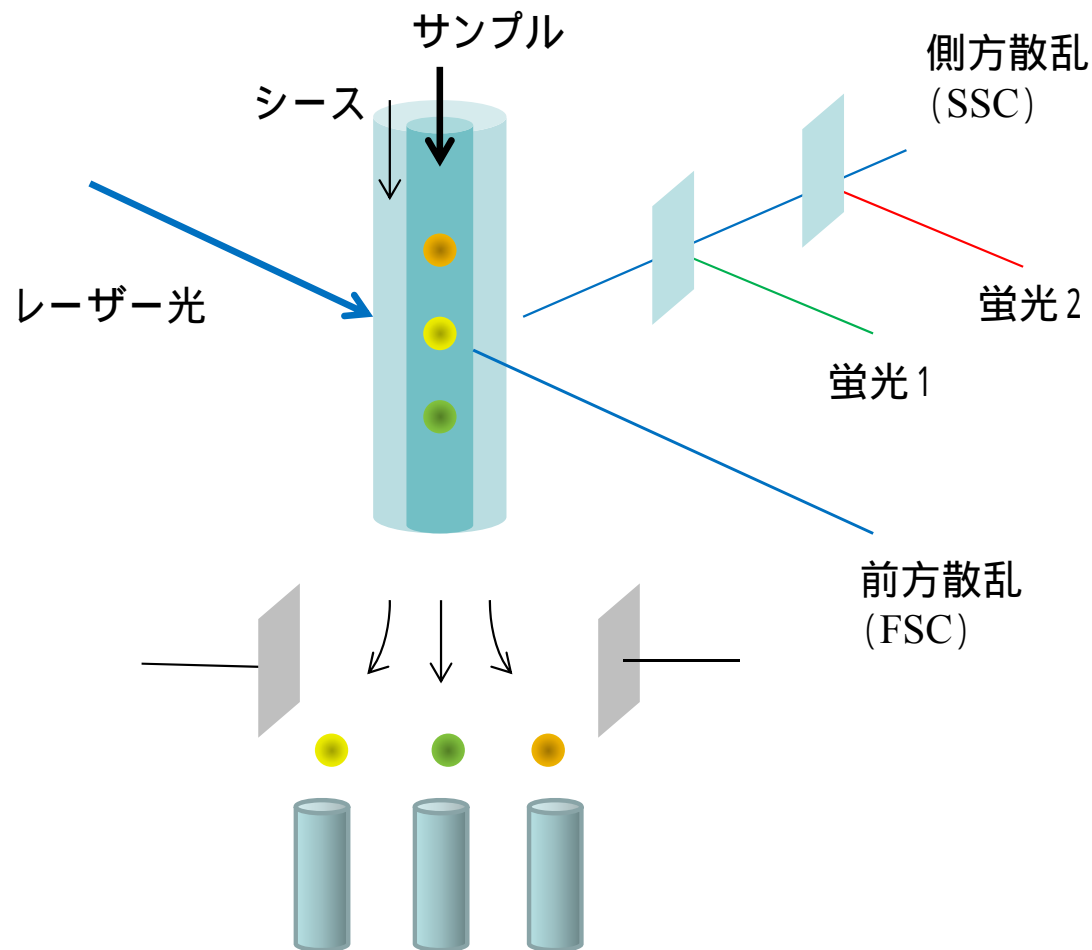
製品例

ScanRDI(ビオメリュー)、BM-300C(シャープ)、バイオプロウラ(光洋産業)、
広義では、サーモフィッシャー BioRadなどのセルカウンター(ただし径5 μm 程度以上)

2. 微生物迅速計測法 各種技術の概要

2. 直接測定法

2. フローサイトメトリー



原理

流体中の粒子をシースフローにより一列に整列させ、一粒子毎にレーザーを照射し、その光学的性質を検出する。FSC, SSCで粒子の大きさと形、蛍光でその性質に関する情報を得る。

原目的

基本的に細胞を蛍光染色したものを測定する。目的に合った蛍光試薬を使用することで、細胞の種々の性質を、細胞毎に解析できる。セルソーターを組み合わせることで、細胞集団の中から、特定の性質を持った細胞を分取することができる。

2. 直接測定法

2. フローサイトメトリー

微生物迅速検出に応用する際の優位性

- ・蛍光染色することで、細胞の生死判定ができる。
- ・DNA蛍光プローブなどを使うことで、ある程度菌種判定が可能と思われる。

留意点

- ・基本的に細菌より大きな細胞を扱う技術の為、細菌計測においてはバックグラウンドの微粒子がノイズとなり、その洗浄の為、一晚程度、パージが必要な場合がある。
- ・蛍光染色することが一般的なため、細菌の自家蛍光を検出するには感度が低い場合がある。
- ・細胞懸濁液をサンプルとすることが一般的なため、処理流量が低く、細胞密度が低いサンプルの計測には適さない。
- ・染色する場合、染色処理が必要
- ・サンプル中に、蛍光を発する微生物以外の粒子が無い或いは細胞数に対して著しく低いことが前提

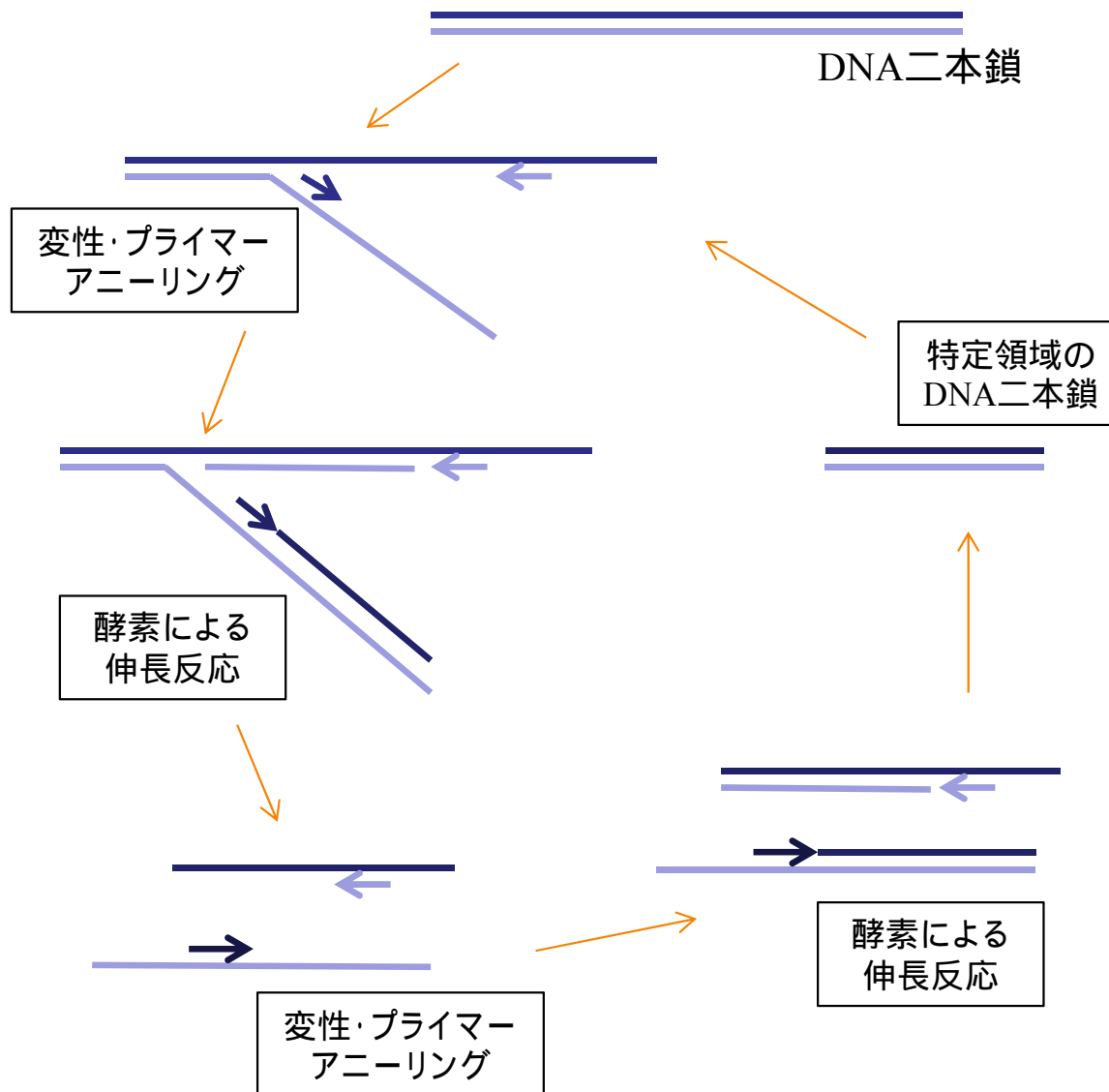
製品例

ベックマンコールター、ソニー、サーモフィッシャー、など各社製品
微生物検出用として BactiFlow (バイオメリュー)

2. 微生物迅速計測法 各種技術の概要

3. 間接測定法

2. 核酸増幅法



原理

DNA合成酵素と、その反応開始の起点となるDNAプライマーを作用させることによって、溶液中に存在する、特定の領域のDNAを増幅する。

原目的

遺伝子工学実験において、実験操作に必要な量のDNAを得る、あるいはDNAの特定の領域を分取するなどのために用いる。微量のDNAがあれば反応が進むため、DNA増幅反応が進行したかどうかで、目的のDNAが存在したかどうか判定することにも使われる。

2. 微生物迅速計測法 各種技術の概要

3. 間接測定法

2. 核酸増幅法

微生物迅速検出に応用する際の優位性

- ・特定のプライマーを使うことで、菌種の判別ができる。
- ・増幅したDNAを回収することで、電気泳動やDNAシーケンシングと組み合わせて、より詳しい解析ができる。
- ・リアルタイムPCRを使用して、検出を特定の菌種に絞れば、定量的な解析ができる。

留意点

- ・PCR反応は比較的、不純物などの阻害物質に弱いので、サンプルを精製する必要がある。
- ・ターゲットとするDNA配列、プライマー配列、使用する酵素とサンプルとの相性など、反応効率に影響する要因が多く、条件検討に労力を要する場合が多い。また、未知試料の場合、反応効率により検出にバイアスがかかる。
- ・DNA抽出などの前処理が必要。また、極端に細胞密度が低いサンプルは検出できない。

製品例

各社サーマルサイクラー、リアルタイムPCR装置

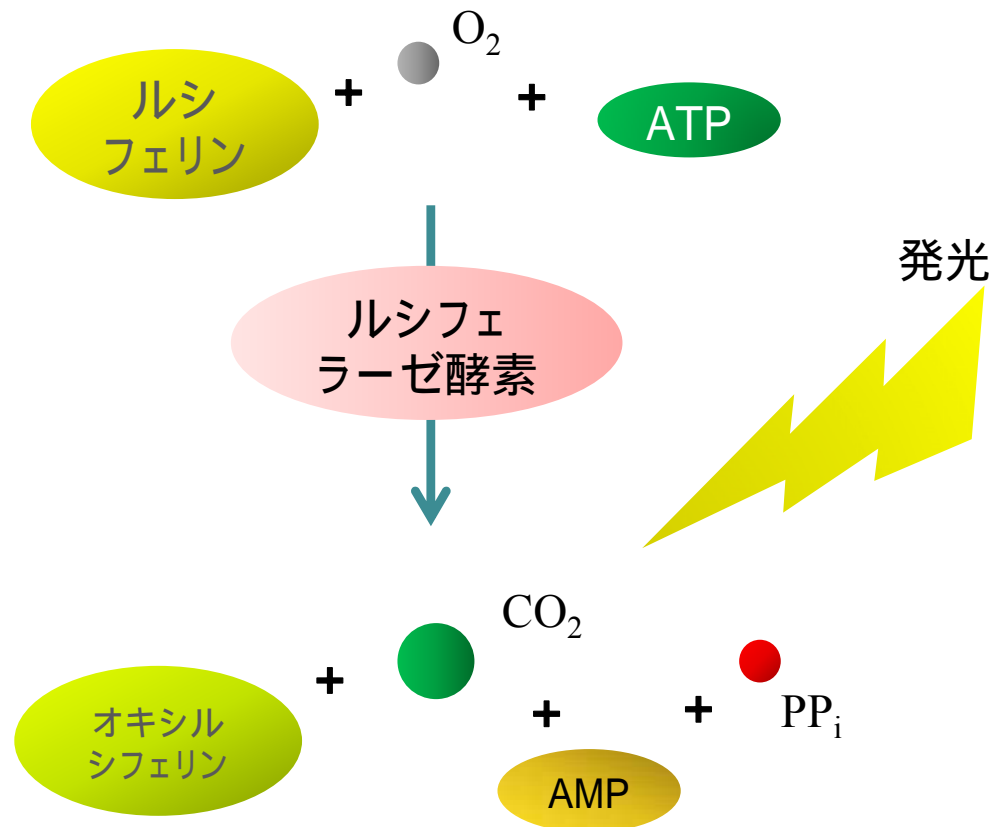
各社プライマーキット

LAMP法による試薬キット(栄研化学)

2. 微生物迅速計測法 各種技術の概要

3. 間接測定法

3. 生物発光・蛍光法



原理

細胞内のATPを抽出し、ATP依存性の酵素反応を利用して、基質を発光あるいは蛍光発光させる。

原目的

ATPを指標として、微生物の有無を検出する。

3. 間接測定法

3. 生物発光・蛍光法

微生物迅速検出に応用する際の優位性

- ・非常に簡単な手順で、感度よく操作することができる。
- ・大きな装置を必要としないため、現場で検査するのに適している。

留意点

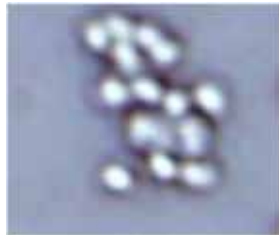
- ・微生物以外でも、ATPを含むものがあれば検出してしまう。
- ・ATP抽出効率が、結果に影響する。
- ・実際の使用においては、ATP量と細胞数の相関を得るのが難しい。

製品例

各社ルシフェラーゼを使用した試薬キット
ルミテスターシリーズ(キッコーマンバイオケミファ)
BIOMAYTECTOR(日立)

3. 間接測定法

4. マイクロコロニー法



顕微鏡で観察した細菌の細胞塊

目視できるコロニーには 10^8 個の細胞があると言われている。ひとつの細胞がそこまで分裂・増殖する前に、より早く検出することで、検出までの時間を短縮する。蛍光試薬で細胞を染色し、検出し易くする場合もある。

原理

寒天培養法において、コロニーが目視で確認できる大きさになる前に、機械で細胞の増殖を検出する。

原目的

微生物の迅速検出。

3. 間接測定法

4. マイクロコロニー法

微生物迅速検出に応用する際の優位性

- ・増殖能を指標としている為、微生物検出の特異性が高い。
- ・生菌のみ(増殖能を有しているもののみ)を選択的に検出できる。

留意点

- ・培養可能な細胞のみ検出できる(VBNCなどに対する課題は従来法と同様)

製品例

Milliflex Rapid (メルクミリポア)

マイクロバイオμ3Dオートスキャナー (BD)

3. レギュレーションの動向

1. 各局のアプローチ

1. USP

- アメリカでは、USP<1223> Validation of Alternative Microbiological Methods を2015年に改訂した。特徴的な概念は以下
 - ユーザは応用目的指向で要求を定義し、バリデートするクライテリアを自ら構築する
 - 装置のバリデーション条件と運用のバリデーション条件
- 微生物迅速計測法を、現在手法の代替技術として応用する視点に立ち、バリデーションの要素と期待される代替のためのクライテリアを定義している。
 - 代替であるが故に、クライテリアとして等価性(Equivalency)に注目している。これが解釈に基づく議論のもとになっているのではないか。
 - ただし、等価性を単純に結果として得られた計数間(従来メソッドと代替メソッド)差異に限定しないとして、4通りの等価性概念を提唱した。

2. 現在、ヨーロッパでは USP<1223> と同様なファーマコペリアである EP 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality の改訂中である。ドラフトから解釈する限り、概念はUSP<1223>と大きな差異がないように思える。

3. 一方、日局方17改正では、詳細なバリデーション条件やクライテリアを定義するのではなく、応用を促進するための理念を謳うにとどめた点で、アメリカ・ヨーロッパとは大きく異なる。

4. ガイドラインとしては、3局の表現は異なるものの、新手法の応用を促進して、プロセスの変革につなげようとするコンセプトは、いずれにも共通のものといえそうである。

3. レギュレーションの動向

2. JP17における微生物迅速測定法に関する記述サマリ

● 微生物迅速試験法

- 有位性を活かし、微生物管理レベル向上、リスク低減に貢献することを期待する
 - バリデーション条件
 - 細菌数/量測定の科学的根拠が示されること
 - 従来計測法との相関性は必須ではない
 - 応用にあたっての条件
 - 迅速性・リアルタイム性など優位性を活用した新たな工程管理方式が展開されることに期待
 - 得られたデータを基に、基準値を決定すること
 - 応用分野の例
 - 製薬用水の水質管理
 - 製造区域の微生物評価
 - 無菌試験
 - 微生物限度試験
 - 保存効力試験
 - 原材料受入試験
- など

3. レギュレーションの動向

2. JP17における微生物迅速測定法に関する記述サマリ

- 無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法
 - 環境モニタリングは、環境が維持されていることの確認を目的とする。
 - 無菌医薬品製造区域が設計された清浄度・微生物制御の達成・維持
 - 無菌医薬品製造環境中の微粒子・微生物数が適切に制御されている
 - 製造設備ごとにリスクアセスメントを実施し、リスクに基づいた基準値を設定する
 - 測定法については、合理的な根拠に基づき代替法を用いることができる
 - 迅速法応用の条件
 - 機器の適格性評価と校正法について十分に検討する
 - 科学的根拠に基づく管理基準を定め、従来法に比較して、同等以上の微生物管理ができるように設定する

● 微生物迅速試験法

JP原文から抽出： (赤字は筆者による)

前文

環境中の細菌の多くは従来の培地ではコロニー形成能が低く、培養法のみではそのような細菌を検出、計数・計量、同定しがたいことが明らかとなってきた。

細菌数・細菌量の測定に当たっては、得られる結果が利用する手法により異なり、最新的手法を用いても、絶対値を得ることは難しい点に留意すべきである。

新手法は従来法と比較し、必ずしも全ての点において優れているわけではないが、迅速性及び精度においては優位であることが多く、真菌やウイルス等にも応用可能であることより、その積極的な活用は関連分野における微生物管理レベルの向上に大きく役立ち、微生物汚染に伴うリスクの低減等に貢献する

● 微生物迅速試験法

JP原文から抽出： (赤字は筆者による)

1 バリデーション

測定対象が細菌数・細菌量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、従来法と比較して優位な点と共に、利用に当たって考慮すべき点についても明らかとする

標準菌株を用いたバリデーションの結果は、従来法がある場合は従来法と比較し同等以上であるべきだが、測定原理が異なることより必ずしも相関関係を求める必要はない

2 応用分野と考慮すべき点

従来法と同等以上の能力を有することを確認することが原則であるが、微生物迅速試験法により新たな管理方法が考案され、従来法がない場合には、その妥当性を検証して微生物迅速試験法を用いることができる

製品試験、環境モニタリング、バイオバーデン試験、原材料管理などをリアルタイムに実施でき、工程管理の新たな方法として活用が期待される。警報基準値(アラートレベル)、処置基準値(アクションレベル)などは得られたデータを元に傾向分析を通じて設定することができる

応用分野

- ・製薬用水の品質管理
- ・製造区域の微生物評価
- ・無菌試験 … など

● 無菌医薬品製造区域の環境モニタリング法

JP原文から抽出： (赤字は筆者による)

総論

無菌医薬品製造区域がそれぞれ設計された清浄度，微生物制御を達成し，維持していることを確認すること，及び

無菌医薬品製造環境中の微粒子数，微生物数が適切に制御されていることを確認する

リスクに応じた基準値を設定すること．また測定方法については，合理的な根拠に基づき代替法を用いることができる．

5. 微生物測定

5.2 迅速法による微生物測定

使用に際しては，機器の適格性評価，校正方法についても十分に検討する

許容基準に関しては科学的論拠を基にそれぞれ設定する必要がある．．．結果として従来法に比較して，同等以上の微生物管理ができるように設定すること．

3. レギュレーションの動向

3. USP<1223> 代替法バリデーションのガイドラインサマリ

- 代替法によって得られる優位性を訴求して応用促進することを提唱する
 - 優位性が応用意図・目的に合致すること
 - 工程の改善
 - 特殊な環境管理、など
- バリデーションのクライテリアにしたがって評価すること
 - 計測・分析する代替法プロセスは従来法(培養法)以上の性能基準を有すること
 - 精度、計測結果の分散、繰り返し性、など
 - 従来法による判定との同等性
 - 同等性を判定するクライテリア
 - 代替法による計数結果は従来法とはけた違いの数値になりうる。
 - 必ずしも数値の一致性で代替法の適格性を評価するものではない。
 - 以下の2つのクライテリアを適用することを提唱する
 - 計数化結果の繰り返し性が高いこと
 - CFUと計数は異なるが、一定の相関性があること
 - この場合、代替法による新たな基準値に置き換えてもよい

自家蛍光式の原理と特徴

1. 原理

1. 流体に励起光を照射し、光散乱と蛍光検出のを利用して、微生物を検出する。
2. 流体中の微粒子によっておこる光散乱
 - 微粒子の存在確定
 - 散乱光強度による微粒子のサイジング推定
3. 励起光に誘起される蛍光の検出と分光分析
 - 微生物中に存在するNADH,リボフラビンなどが蛍光発光源(自家蛍光)となり、微生物判定の情報となる。

2. 特徴

1. 微生物増殖、レーベリングを必要としない。
 - 検出に即時性をもたすことができる：リアルタイム検出
 - 前処理・検出工程・後処理に人手を介さない：連続・自動化可能
 - 原理的にシンプルで、比較的安価である
2. 使用上の考慮を必要とするポイント
 - 類似の蛍光発光物質があれば、誤って微生物と判定することもある
 - 自家蛍光強度は小さく、一定の検出感度を達成するうえでの制約条件となる
 - 擬陽性/擬陰性
 - 流体速度、粒子サイズ、菌種による感度差異
 - 菌種同定にはつながらない
3. 応用分野
 - 連続系流体プロセスの管理分野：環境、水質など

製品事例: アズビル株式会社 製品例

IMD-A: 気中浮遊微生物測定器



IMD-W: 水中微生物測定器

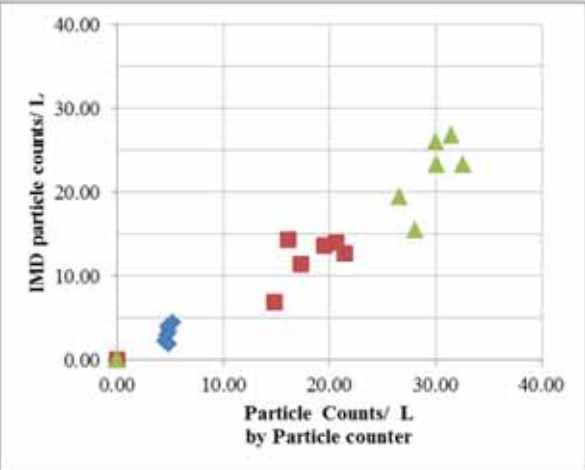
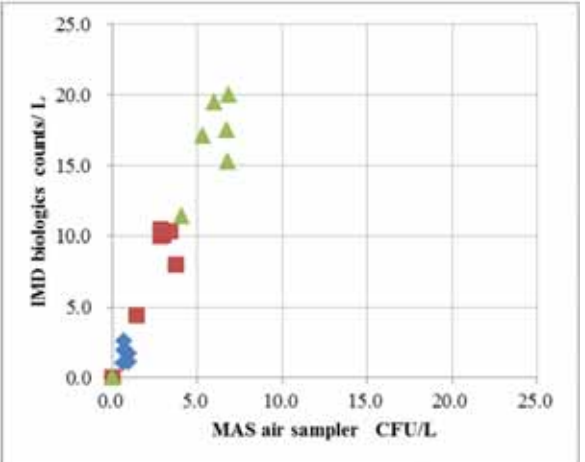
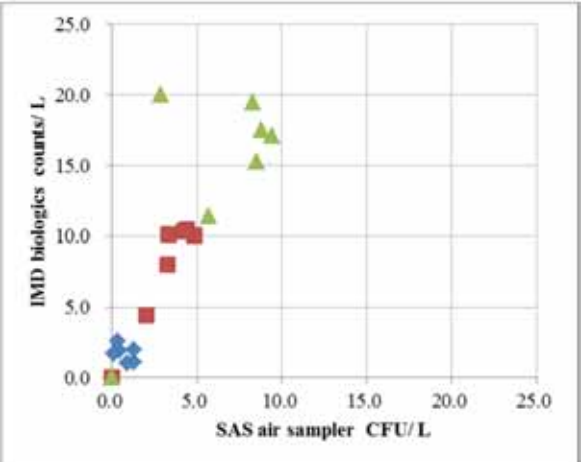
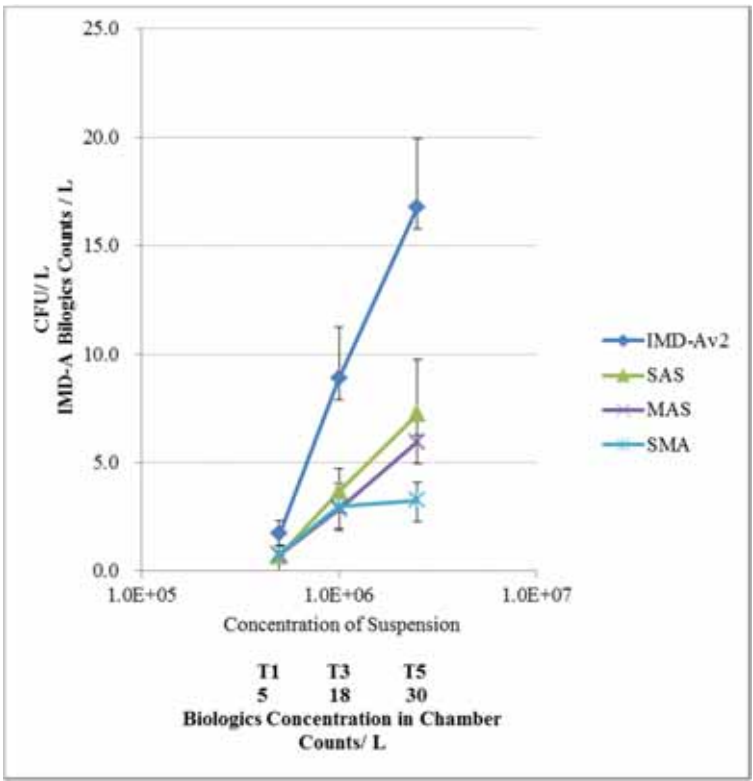


自家蛍光式の技術・製品と応用事例

計測性能検証: IMD-Aの例

微生物検出性能 培養法との相対比較試験例

Bacillus atrphaeus



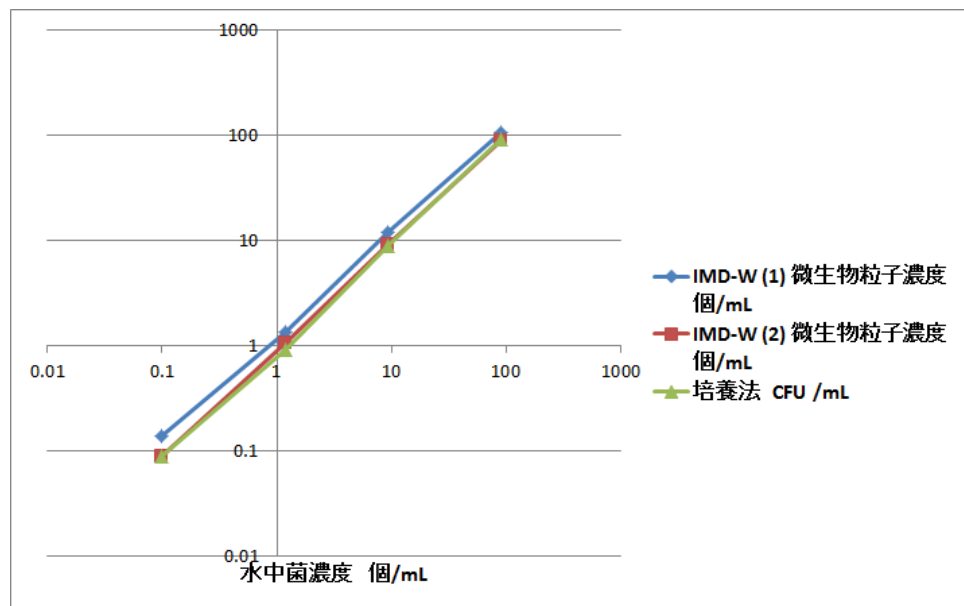
自家蛍光式の技術・製品と応用事例

計測性能検証：IMD-Wの例

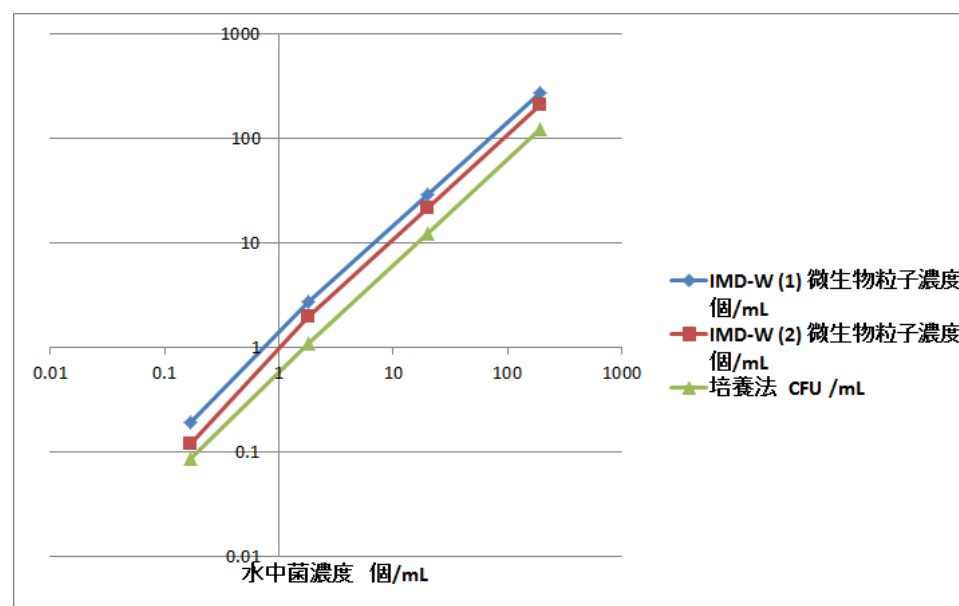


(1) 菌検出性能評価試験： 水棲菌、芽胞菌に対する計測性能

Methylobacterium extorquens
に対する計測性能



Bacillus subtilis
に対する計測性能



Webサイト公開版では、応用事例の紹介を割愛させていただきます。

微生物迅速測定法は、広く認知され、多くの応用が展開される状況にはいたっていない。その背景を、ここで分析解説するものではないが、展開を促進する議論のきっかけになれば幸甚である。

最後に、現状をレギュラトリがどのように見ているかを語りうるドキュメントの抜粋を紹介する。

2011年10月 Azbil BioVigilant社が主催した、アメリカの医薬製造メーカーを招待したコンソーシアムミーティングにおける、FDAのCDERとユーザによるラウンドテーブルディスカッション記録からの抜粋

FDA CDER : Bryan S. Riley, Ph.D.

Users : Pfizer, Amgen, Baxter, Eli Lilly, など約10社のQC Microbiology関係者

Moderator : Michael J. Miller, Ph.D. MICROBIOLOGY CONSULTANTS, LLC
(5年も経過しているものの、いまなお結構新鮮味を失っていないステートメントではないか…)

5. おわりに

FDAと製剤メーカーとのRMM応用についてのディスカッション記録から抜粋
(赤字および意訳は筆者による)

Changing EM Limits

1) How does FDA feel about **the potential need to change EM limits if the IMD-A system does get higher counts than traditionally seen** in each environment?

IMD-Aは従来法より高いカウント結果となる場合、EMリミットを変更することをFDAはどう考えるか？

Answer: **There can be differences in the numbers you will see with two different methods.** **You are somewhat comparing apples and oranges.** Limits can change; they just need to be justified. Setting of limits should be meaningful and based on the threat to the product. A risk-based analysis/approach is needed.

方式が異なれば、異なる計数になるのは当然。変更可能であり、必然性を示すこと

A value of the IMD-A system is that it can do **continuous monitoring and trending.** **When doing continuous EM, you will see an occasional hit.** FDA would be surprised if you don't see one every now and then. **Trending is a reasonable approach to consider when setting new limits.**

IMD-Aの価値は、連続モニタリングと傾向を得ることであり、連続方式のEMによって偶発的な事象も捉えられる。散発的な1個のカウントが得られることはFDAにとって驚きではない。傾向管理は、新しい管理値の設定を考慮したうえで、合理的なアプローチといえる

5. おわりに

FDAと製剤メーカーとのRMM応用についてのディスカッション記録から抜粋
(赤字および意訳は筆者による)

Changing EM Limits

2) What steps do we need to take to **change action and alert limits**?

管理値を変更するにはどのような手順があるか？

Answer: **You can change limits whenever you like. You need to collect your data and perform a risk assessment.** We then suggest that you call a meeting with Bryan Riley and regional FDA representatives to review your data. Local inspectors can also be included in this meeting.

管理値はいつでも変更していい。データ収集し、リスクアセスメントすることが求められる。

3) Would FDA **accept higher action and alert limits** for biologics in Grade A **than 1 bio count**, for example 3 or 10?

FDAは、グレードAで1より大きいアクション・アラートリミット、(たとえば3あるいは10など)を許容するか？

Answer: **Yes, if this was supported by the data from your validation.** It's important to monitor the trends in your environment.

バリデーションで得られたデータに裏付けられた管理値であれば、認める。みなさんの環境の傾向をモニタすることが重要である

ご清聴と多くのご示唆をありがとうございました。

**アズビル株式会社
BSC_EPS事業推進室
松田**

ご意見、ご叱責などあれば、是非下記へ！

080-2234-3405

a.matsuda.sh@azbil.com