

テクニカルホワイトペーパー：

無菌クリーンルームの管理

1. はじめに

無菌環境（アセプティック環境）において製造を行う際、ワイパー、手袋、スワブ、チューブなどの様々なクリーンルーム用消耗品が、その存在や使用によって環境や製品を汚染しないように保証することは極めて重要です。最終製品の無菌性が、完成品の滅菌ではなく、無菌製造プロセスに依存している場合は特に重要となります。無菌環境においては、汚染された消耗品が一つでも混入すると、製造プロセス全体の失敗につながる恐れがあります。そのため、消耗品供給業者が採用している滅菌方法を理解し、そのプロセスが検証（バリデーション）されていることを確認することが重要です。

製品を無菌状態にするために利用できる方法には様々なものがありますが、業界ではオートクレーブ（高圧蒸気滅菌）、電子線（E ビーム）滅菌、ガンマ線滅菌が一般的に使用されています。それぞれの滅菌方法には長所と短所があり、特定の用途に適している一方で、他の用途には適さない場合もあります。

オートクレーブ（高圧蒸気滅菌）は、蒸気と圧力を使用して製品を滅菌します。このアプローチの短所は、滅菌中に使用する包装材料に通気性が必要となるため、多くの製品をオートクレーブにかける前に再包装しなければならず、プロセスと製品に余分な時間と費用がかかる点です。しかし、オートクレーブ装置は手頃な価格で入手できるため、特に小ロットの滅菌を行う場合など、自社施設内で滅菌を行うための適切な選択肢となり得ます。

電子線滅菌（E ビーム）は、透過力が比較的低いため、低密度の製品への利用に限定されます。

ガンマ線滅菌は透過力が高く、高密度の製品や大ロットの滅菌において好まれる手法です。温度変化をほとんど伴わずに、製品全体およびその包装の内部に至るまで微生物を効果的に死滅させます。ガンマ線の持つ高い透過性により、通気性のある包装材料は必要ありません。食品、化粧品、医療機器、医薬品など、様々な産業で広く利用されています。ガンマ線はコバルト 60 の線源から発生し、特に電離作用（イオン化）に優れています。電離とは、原子や分子から軌道電子を取り除くのに十分なエネルギーを持つ放射線ですが、製品に放射能を誘発するほどではありません。電離放射線は微生物の生命に対して致命的な効果を与えます。バッチごとの変動が最小限であるため、ガンマ線滅菌は信頼性の高い無菌プロセスです。

2. 放射線照射のみでは不十分

「照射済み（インラディエイティッド）」と「滅菌済み（ステリライズド）」という言葉は、同じ意味として使用することはできません。放射線照射を行ったということだけでは、米国食品医薬品局（FDA）や多くの医薬品企業によって滅菌の証明として認められません。照射とは、単に製品がガンマ線に曝露されたことを意味するにすぎません。製品が無菌性を達成するのに十分な線量を受けたという検証にはならず、無菌性保証水準（SAL）を算出することもできません。

ANSI/AAMI/ISO は、バリデーションやプロセスのモニタリングに生物学的インジケータ (BI) を使用することを推奨していません。同様に、無菌試験 (ステリリティテスト) は、テストに膨大な数のサンプルが必要となるため、 10^{-2} 未満 (すなわち 10^{-3} 、 10^{-4} など) の SAL を実証するために使用することはできません。 10^{-6} の SAL とは、100 万個の中に 1 個の非無菌ユニットが存在する確率のことです。 10^{-6} の SAL を証明するためには、滅菌プロセスに曝露した後に 100 万個のアイテムに対して無菌試験を行う必要があります。当然ながら、これは現実的ではありません。

ANSI/AAMI/ISO は、滅菌プロセスを検証するために使用できる世界的な標準規格を確立しており、実施した手法やプロセスを実証するために必要な文書を提供しています。製品とその特性に最も適合するように、様々な方法が存在します。広く使用されている規格の一つが 11137 です。欧州連合 (EU) も標準規格 (EN552) を確立しており、世界的に販売する際にはこれを考慮しなければなりません。幸いなことに、ANSI/AAMI/ISO 規格と EU 規格の間には優れた整合性があります。

バリデーションプロセスにおいては、製品の原材料や構成部品、包装の微生物バリア特性、そしてそれらの製品の製造、組み立て、包装が行われる場所に導入されている環境管理を考慮する必要があります。

無菌バリデーションプロセスを開始する前に、製品と包装が放射線照射法に耐えうる能力 (耐性) を評価 (適格性評価) する必要があります。放射線照射に曝露されると、材料によっては強度が低下したり変色したりするものがあり、中には意図した用途に使用できなくなるレベルに達する場合もあるためです。これは、製品と包装を様々なレベルの放射線照射に曝露し、仕様に照らし合わせて試験を行うことで、最大許容線量を決定することにより実施できます。包装を外部から購入している場合は、シールの完全性 (インテグリティ) や包装の適合性に関する情報を供給業者から入手することをお勧めします。ほとんどの包装供給業者は、適合証明書 (CoA または CoC) を提供することができます。

3. 標準規格とガイドライン

滅菌プロセスを検証するために準拠できる ANSI/AAMI/ISO のガイドラインはいくつか存在します。選択される規格は、目的とする SAL を得るために、製品や生産プロセスに最も適合するものです。

ANSI/AAMI/ISO 11137 の「方法 1 (Method 1)」は、日常的な生産において一般的に使用されており、バイオバーデン (微生物汚れ) 抵抗性モデルを使用して滅菌線量を設定します。また、頻度の低い生産のためのオプションや、25 kGy の最小線量を実証するためのオプションもあります。SAL も選択する必要がある、通常は製品の意図された用途によって決定されます。侵襲的 (インベシブ) な医療機器において一般的に受け入れられている SAL は 10^{-6} であり、これは使用されている中で最も高い SAL です。

4. 初期バリデーションの実施

本稿では、ANSI/AAMI/ISO 11137 の方法 1 に焦点を当てます。滅菌の直前にランダムに選択された製品の 3 つのロットから、各 10 個のサンプル (計 30 個) に対してバイオバーデン試験を実施します。アイテムが非常に大きい場合や非常に高価な場合は、製品の一部 (SIP: サンプル品部分) をテストしてバイオバーデンを測定し、その結果を製品全体に対して補正することができます。バイオバーデン試験には、生存微生物の分離、培養、および菌数測定が含まれます。

す。

その後、製品の 100 個のサンプルに対して、 10^{-2} の SAL を与える検証線量（ベリフィケーションドーズ）で放射線照射を行います。100 個のサンプルに対して無菌試験を実施し、陽性（非無菌）が 2 個以下であれば、バリデーションは受け入れ可能とみなされます。日常的な SAL 滅菌線量は、元のバイオバーデン測定結果に基づいて算出することができます。ANSI/AAMI/ISO 11137 には、製品のバイオバーデンに基づいて、選択した SAL を達成するために必要な線量をリスト化した表が提供されています。

5. 四半期監査

ANSI/AAMI/ISO 11137 規格は、滅菌線量を再確認するために 3 ヶ月（四半期）ごとの間隔で監査を実施することを推奨しています。規定されている手順は、滅菌の直前にロットから 110 個の製品ユニットをランダムにサンプリングすることです。10 個の製品ユニットについてバイオバーデン試験を行い、100 個のユニットには初期の線量設定で決定された検証線量（ 10^{-2} ）を照射します。監査は、季節的な変動、原材料や構成部品、作業員の交代、あるいは環境によって引き起こされる可能性のあるバイオバーデンの変化をチェックすることにより、プロセスを検証します。微生物の放射線に対する抵抗性の変化もバリデーションに影響を与える可能性があります。四半期監査には、ある種の包装完全性試験（例：バースト試験、メチレンブルー染色試験、または微生物チャレンジ試験）も含まれる必要があります。

6. バイオバーデン回収率試験および発育阻止物質（生菌数測定不活性化）試験

初期バリデーションの一環として、他にもいくつかの試験が必要です。バイオバーデン試験の手順については、微生物を回収する能力（回収率）を評価しなければなりません。バイオバーデンサンプリング方法の効率を決定する一つの手法は、無菌のユニットに既知の菌数の微生物を接種することです。そのサンプリング方法を実行し、回収パーセンテージ（回収率）を決定します。その後、回収係数を使用してバイオバーデンカウントを調整します。例えば、バイオバーデン回収係数が 80% であり、初期のバイオバーデンカウントが 150 である場合、カウントは 188 ($150 / 0.8$) に調整されます。もう一つのアプローチは、微生物の回収に有意な増加が見られなくなるまで抽出操作を繰り返す、繰り返し回収法を実施することです。

米国薬局方（USP）の発育阻止物質試験（B/F 試験）は、製品が微生物の増殖を阻害しないことを検証し、無菌試験における偽陰性の可能性を排除します。標準的な無菌試験は、選択された少量の微生物を製品に添加することによって実施されます。結果は 7 日以内に陽性の増殖を示す必要があります。試験サンプルにおける増殖は、試験製品の中または表面に阻害物質が存在しないことを示します。

7. 放射線照射施設

製品を処理するための放射線照射施設を選択する際には、考慮すべき多くの要因があります。所有している製品の種類、照射費用、および自社施設から照射施設までの距離は、すべて決定を下す際のエレメントとなります。cGMP および ISO9000 に準拠した放射線照射施設を選択する必要があります。また、すべての要求事項を満たすことができるか確実にするために、供給業者監査（サプライヤーオーディット）を実施することをお勧めします。

照射施設は、パレット（スキッド）またはコンテナ上において、放射線が吸収される量が最小になる位置と最大になる位置を決定するために、製品のドーズマッピング（線量分布測定）を行う必要があります。線量計（ドシメーター）は、通常、包装構成の各軸をはじめとする多くの場所に配置されます。ドーズマッピングからの情報に基づいて、製品の積載パターン（ローディングパターン）が開発されます。積載構成はお客様の仕様書（顧客仕様書）に詳細に記載され、このパターンが各処理ロットで維持されます。あらかじめ決定された最小線量および最大線量の位置に配置された 2 つの線量計が、すべての処理ロットで使用されます。

8. 放射線照射インジケータの限界

一般的に在庫管理のために使用され、一部の製品に見られる放射線照射インジケータは、無菌性の有効な指標にはならない点に注意することが重要です。しかし、製品が放射線処理サイクルを通過したかどうかを迅速に示す役割は果たします。通常、照射後にインジケータの色は黄色から赤色に変化しますが、pH の変動によってもインジケータの色が変化する点に注意が必要です。例えば、アルカリ性物質に曝露されると、照射されたパッケージの赤いインジケータが黄色に戻ってしまふことがあります。

消耗品供給業者から提供される無菌証明書（CoS : Certificate of Sterility）には、製品が検証された滅菌プロセスを通じて滅菌されたことを保証するために必要な情報が含まれている必要があります。CoS には、製品名およびカタログ番号、ロット番号、放射線照射管理番号、照射日、製品がどのように滅菌され、その滅菌プロセスがどのように検証されたかの説明、規定された最大および最小線量、実際の供給最大および最小線量、ならびに通常は品質代表者である承認者の署名と役職が記載されていなければなりません。CoS は製品の無菌性の記録として維持・保管される必要があります。

9. 環境モニタリング

環境やプロセスにおける要因は、バイオバーデンレベルに影響を与える可能性があります。このため、無菌クリーンルーム用消耗品の供給業者には、作業員、空気、表面、精製水（脱イオン水）、装置表面、化学薬品、部品、アSEMBリ、材料などの潜在的な汚染源を追跡するために、環境モニタリングを実施することが推奨されます。例えば、空気中のバイオバーデンをサンプリングするために、ロータリー遠心エアサンプラー（RCS）を使用することができます。空気中に存在する微生物は、サンプラー内部の培地ストリップ上にサンプリングされます。その後、バイオバーデンレベルを測定するために培地を培養します。

10. まとめ

無菌環境において製造を行う場合は、クリーンルーム用資材が検証されたプロセスで滅菌されていることを確認することが極めて重要です。単に消耗品に放射線を照射したということだけでは、その無菌性を保証するのに十分ではありません。消耗品製品が単に照射されただけでなく、そのプロセスが ANSI/AAMI/ISO 規格に検証されていることを確実にするために、無菌ロットごとに CoS（無菌証明書）を要求してください。

【免責事項】

本書は、2014 年にバークシャー・コーポレーションが公開した技術資料（テクニカルホワイト

ペーパー) をもとに、配布資料向けに参考和訳・再構成したものです。



Sterile Cleanroom Management

Lynn Stanard, Sr. Quality Manager, Berkshire Corporation

When manufacturing in an aseptic environment, it is critical to ensure that the various cleanroom consumables, such as wipers, gloves, swabs, tubing, etc., will not compromise your environment or products with their presence or use. This is particularly important if the final product's sterility is dependent upon aseptic processing, rather than sterilizing the finished product. In an aseptic environment, entry of a contaminated consumable product could cause your manufacturing process to fail. It is important to understand the sterilization methods used by your consumables suppliers and to ensure that their processes have been validated.

There are various methods available to render a product sterile, with autoclaving, e-beam, and gamma radiation being commonly used in the industry. Each sterilization method has advantages and disadvantages that make it suitable for certain applications and unsuitable for others.

Steam autoclave uses steam and pressure to sterilize a product. A disadvantage of this approach is that many products will have to be repackaged prior to autoclaving, as the packaging used during sterilization must be permeable, creating additional time and expense for the process and product. However, autoclaves are available at reasonable prices so it can be an appropriate option for sterilization within one's own facility, especially when sterilizing small batches.

Electron beam sterilization (e-beam) has a relatively low penetrating power, limiting its utilization to low-density products.

Gamma radiation has a higher level of penetration and is a preferred method for high-density products and/or large batches. It effectively kills microorganisms throughout the product and its packaging, with little temperature variation. Permeable packaging is not required due to the penetrating nature of gamma rays. It is widely used in a variety of industries including food, cosmetics, medical devices, and pharmaceutical products.

Gamma rays are generated from Cobalt-60 sources and are particularly good at ionization. Ionization is radiation with sufficient energy to remove orbital electrons from atoms or molecules, yet not sufficient to induce radioactivity in the product. Ionizing radiation has a lethal effect on microbial life. Because there is minimal variation from batch to batch, gamma radiation is a reliable sterility process (see Fig. 1).



Figure 1. Gamma rays are generated from Cobalt-60 sources. Photo courtesy of STERIS Isomedix Services.

IRRADIATION ALONE IS NOT ENOUGH

The words “irradiated” and “sterilized” cannot be used interchangeably. Irradiation alone is not recognized by the Food & Drug Administration, or by many pharmaceutical companies, as proof of sterilization. Irradiation simply means that the product was exposed to gamma rays. It does not provide any validation that the product received a sufficient dose to achieve sterility, and a Sterility Assurance Level (SAL) cannot be calculated.

ANSI/AAMI/ISO does not recommend using biological indicators for validation and process monitoring. Likewise, sterility testing cannot be used to substantiate a SAL of less than 10^{-2} (i.e., 10^{-3} , 10^{-4} , etc.) because of the high numbers of test samples that would be tested. A SAL of 10^{-6} is the probability of finding one non-sterile unit in one million. In order to prove a SAL of 10^{-6} , one million items would need to be sterility tested after exposure to the sterilization process. Obviously, this is not practical.

ANSI/AAMI/ISO has established global standards that can be used to validate a sterilization process, providing the necessary documentation to substantiate your methodologies and processes. Various methods exist to best fit the product and its properties. One that is widely used is 11137. The European Union (EU) has also established standards (EN552), which must be taken into consideration when selling globally. Fortunately, there is a good agreement between the ANSI/AAMI/ISO standards and the EU standards. The validation process must consider the product’s raw materials and components, the microbial barrier properties of the packaging, and environmental controls in place for the manufacturing, assembling, and packaging of those products.

Before starting the sterility validation process, it is necessary to qualify the product and packaging’s ability to withstand the irradiation method. This is necessary because some materials lose strength or discolor when exposed to irradiation, some to the point where they would be unacceptable for their intended use. This can be done by exposing the product and the packaging to various levels of irradiation and testing them against the specifications to determine its maximum tolerated dose. If packaging is purchased from an external source, it is recommended that you obtain the information regarding seal integrity and packaging compatibility from the supplier. Most packaging suppliers will be able to provide a Certificate of Conformance or Analysis.

STANDARDS AND GUIDELINES

There are several ANSI/AAMI/ISO guidelines which may be followed to validate a sterilization process. The standard that is chosen is one that best fits your product and production processes to obtain the desired SAL. ANSI/AAMI/ISO 11137 Method 1 is commonly used for routine production and involves establishing a sterilizing dose using a bioburden resistance model. There are also options for infrequent production and substantiation of a 25 kGy minimum dose. The SAL must also be chosen and is typically dictated by the product’s intended use. The commonly accepted SAL for an invasive medical device is 10^{-6} which is the highest SAL in use.

PERFORMING THE INITIAL VALIDATION

For this article we will concentrate on ANSI/AAMI/ISO 11137 Method 1. A bioburden study is performed on ten samples from each of three lots of product, which are randomly selected immediately prior to sterilization. If the item is very large or very costly, a sample item portion (SIP) may be tested for bioburden and the result corrected for the entire product. Bioburden tests involve the removal, culture, and enumeration of viable organisms. One hundred samples of the product are then irradiated at the verification dose that will give a SAL of 10^{-2} . Sterility testing is performed on the 100 samples, and if there are no more than two positives (nonsterile) the validation is considered acceptable. A routine SAL sterilization dose can be calculated based upon the original bioburden results. ANSI/AAMI/ISO 11137 provides a table that lists the required dose to achieve a selected SAL based on the bioburden of the product.

QUARTERLY AUDITS

ANSI/AAMI/ISO Standard 11137- 1994 recommends that you perform audits at three-month intervals to reaffirm the sterilization dose. The prescribed procedure is to randomly sample 110 product units from a lot immediately prior to sterilization. Ten product units are tested for bioburden and 100 units are subjected to the validation dose (10^{-2}) that was determined in the original dose setting. Auditing verifies the process by checking for bioburden changes that may be caused by seasonal fluctuation, raw material and components, changes in personnel, or the environment. Changes in the organisms' resistance to radiation may also affect the validation. Quarterly audits should also include some type of packaging integrity testing (e.g., Burst Test, Methylene Blue Dye Test, or Microbial Challenge).

BIOBURDEN RECOVERY AND BACTERIOSTASIS/ FUNGISTASIS TESTING

Several other tests are required as part of the initial validation. The bioburden procedure must be evaluated for ability to recover organisms. One method to determine the efficiency of the bioburden sampling method is to inoculate sterile units with a known population of bioburden. The sampling method is performed and the recovery percentage is determined. The recovery factor is then used to adjust the bioburden counts. For example, if the bioburden recovery factor is 80 percent and the initial bioburden count is 150, then the count is adjusted to 188 ($150/0.8$). Another approach is to perform a repetitive recovery method where the extraction method is repeated until there is no significant increase in the recovery of microorganisms.

The USP Bacteriostasis/Fungistasis (B/F) test verifies that the product does not inhibit microorganism growth, eliminating the possibility of a false negative in the sterility test. The standard sterility test is performed by adding a low level of selected microorganisms onto the product. The results should show positive growth within seven days. Growth in the test samples shows that there are no inhibitory substances in or on the test product.

IRRADIATION FACILITIES

There are many factors to consider when choosing an irradiation facility to process your product. The type of product you have, the cost of the irradiation, and the proximity of the irradiator to your own facility are all factors in making your decision. You should choose an irradiation facility that is cGMP and ISO9000 compliant. A supplier audit is also recommended so that you are assured they will be able to meet all your requirements. The irradiation facility will need to perform a dose mapping on your product to determine the locations on a skid or container, where the minimum amount of radiation is absorbed and where the maximum amount of radiation is absorbed. Dosimeters are placed in many locations, typically at each axis of the packaging configuration. Based on the information from the dose mapping, a loading pattern will be developed for your product (see Fig. 2). The loading configuration is detailed in a customer specification and this pattern is maintained for each load. Two dosimeters, placed in the predetermined minimum and maximum dose locations, will be used for every load.



Figure 2. Totes entering an irradiation chamber according to a predetermined loading pattern. Photo courtesy of STERIS Isomedix Services.

LIMITATIONS OF IRRADIATION INDICATORS

It's important to note that the irradiation indicators that are typically used for inventory control and found on some products do not provide a valid indication of sterility. However, they do quickly indicate whether a product has been through a radiation cycle. Typically, the color of the indicator changes from yellow to red after radiation, although it's important to note that a shift in pH may also cause a change in the color of an indicator. For example, exposure to an alkaline may change the red indicator of a package that has been irradiated back to yellow.

A Certificate of Sterility (CoS), which is provided by consumables suppliers, should contain the necessary information to assure that the product has been sterilized through a validated sterilization process. The CoS should state the product and catalog number, the lot number, the irradiation run number, the date of irradiation, a statement of how the product was sterilized and how the sterilization process was validated, the maximum and minimum specified dose, the maximum and minimum delivered dose, and the signature and title of the approver, who is typically a quality representative. The CoS should be maintained as a record of product sterility.

ENVIRONMENTAL MONITORING

Factors in the environment and process can affect bioburden levels. For this reason, it is recommended that suppliers of sterile cleanroom consumables perform environmental monitoring to track potential contamination sources such as people, air, surfaces, deionized water, equipment surfaces, chemicals, parts, assemblies, and materials. For example, a Rotary Centrifugal Air Sampler (RCS) can be used to sample bioburden in the air. Any microorganisms that are present in the air will be sampled onto a media strip inside the sampler. The media is then incubated in order to numerate the bioburden level.

If you are manufacturing in an aseptic environment, it's important to determine that your cleanroom supplies have been sterilized with a validated process. Simply irradiating the supplies is not enough to ensure their sterility. Require a CoS with each sterile lot to assure that the consumables product has been not only irradiated but that the process has been validated to ANSI/AAMI/ISO standards.