

タイトル：バイオプロセスにおける純粋培養工程をさらに改良するためのシンプルな戦略

著者： Michael Hines, Chris Holmes, and Ryan Schad

(Pharmaceutical engineering, 2010, vol 30, No3, 1-11)

翻訳：堀部 智久 (Tomohisa HORIBE)

はじめに

あらゆるスケール（100,000 リッターのスケールから小さな反応リアクターまで）のバイオリアクションや発酵工程において、その成果をなすためには純粋培養が必要である。ここでは、“純粋培養”あるいは“純粋培養の性能”という言葉は、“無菌の”あるいは“無菌状態の保証”という言葉の代わりに用いており、“バイオリアクションは本質的に、必要としない異種よりも有益で必要とされる多くの数の微生物や細胞を成育させる過程である”ということの意味している。偶発的に混入した異物によって生じるコンタミネーションは、時間とお金を費やすばかりでなく、生産能力を損ない、さらに、コンタミネーションを生じたその原因物の出所を突き止めることや、排除することは非常に困難である。

純粋培養のバイオプロセスのデザインや操作の多くは、決まりきっており共通認識されたものである。最近の機器は、純粋培養を行う能力がその機器のデザイン内に組み込まれており、最新の技術、コントロールシステムを含み、無菌状態を確認するための正しい操作手順がなされ、純粋培養が維持されるようになっている。しかしながら、これらのコントロールシステムは、時間とともに、質の低下や老朽化に加え、人員の入れ替わりによる経験不足や培養プロセスの変化のために効果的ではなくなってくる。時には、長い間、堅実な作業を行っていることで、安全、安定しているという誤った考えを生み出し、このことが作業の満足（あるいは、純粋培養を行う必要性に対して注意が欠落すること）にさえつながり、結果として避けようのない外来から混入した異物を成育させてしまう (**Foreign Growth; FG**)ということになってしまう。

結局のところ、丈夫で純粋培養を行う能力を有している培養工程というものが技術部門のサポートスタッフだけでなくマネジメントにとっても最終目標となる。何か問題が起こったときに、多大な労力を払うことなく原因究明を行うサポートスタッフもなく、意識せずに滅菌に関する専門家を作り上げるよりも、何か問題が起こる前に純粋培養に関するデザインやその実行において率先してマネジメントする方が明らかに有益である。

以下に記載することは、伝統的なバイオプロセスリアクターや発酵工程の純粋培養の性能を維持、改良するのに役立つ数多くの戦略、図表で示したケーススタディ、そして技術である。これらは、簡便で、数多くのスケールで長年、純粋培養の操作をマネジメントしてきたことに基づいたものであり、実際に作業に携わる人たちをターゲットとしたものである。ここでは、伝統的な発酵システムにおいて微生物によるコンタミネーションを防ぐ

ことに焦点をあてる。そして、いかなる偶発的に混入した異物からもバイオリアクターシステムを保護するために適用できる。自身の培養システムおよび作業工程を理解し、ビジネスと工程に必要とされるものに見合うようにここで記載されている仕組みや原理を適切に当てはめるかどうかは、本誌を読まれた読者次第である。長い成育時間や異物との接触、さらには選択薬（例えば、抗生物質）の不足から生じる可能性があるリスクは、使い捨てや、新しい器具類を使用すること、さらには、より厳格な環境や生物のコントロールによって、排除することができる。

本誌の主な内容は、以下4つの基本的なセクションに分けられる。1.無菌操作のためのデザイン 2. 一般的なコンタミネーションの根本原因 3. 異物の成育(FG)が確認された時のトラブルシューティング 4. 純粋培養をより理解し改良するために正しく微生物学を適用することである。また、追加として、いくつかの例やケーススタディ、考え方を説明するための図表が含まれている。

設備のデザインおよび無菌化のための最良の手法

本稿の内容は、現在のバイオリアクターの作業工程をサポートしている科学者やエンジニアを対象としている。しかしながら、現在の無菌化のデザインを最良のものとするために、たとえ短期であれ検査、調査を行うことは、読者の純粋培養工程におけるトラブルシューティングあるいは、工程のさらなる改良に役立つであろう。外部から異物が混入して、それが成育すること(FG)を防ぐことが長期間の純粋培養の作業工程を成功裏におさめることに対してもっとも重要であると理解する必要がある。

滅菌操作のための適切な無菌化(SIP)システムのデザインの検討

適切な無菌化のためのデザインは、多くのテキストや論文で書かれている^{1,2}。主要なポイントは基本的には、次のように述べられている。

- 蒸気を使い、滅菌するすべての範囲、領域を 121.1°Cまで急速にあたためること。(121.1°Cは、最低限必要とされ、15分間の蒸気下での加圧滅菌とともに、米国薬局方 (the United States Pharmacopeia (USP))³のスタンダードな無菌化のための温度である。)
- 凝集液(物)を障害なく排水する装置。
- 簡便に空気を置換すること。
- 滅菌された空気を使って余剰な蒸気を交換すること(余剰蒸気は、真空を作り出すために、どんなに費用をかけても避けなければならない。)

これらのことならびにその他に考えるべき要素について以下に述べる。

滅菌する範囲、境界—滅菌された設備につながっている工程の配管は、滅菌されたシステムとそうでないシステムを隔てる一番近いバルブを通して完全に無菌化する必要がある。

無菌状態のシステムを作り出すために、もう一つの手法としては、適切な 0.2 マイクロメートル相当の滅菌フィルターを通すことである。その他の滅菌範囲は、容器の壁自体、機器のシールド部分（圧力勾配を受けやすい部分）、供給ノズル、内部の冷却コイル、断裂ディスク、滅菌フィルター、蒸気トラップ、排出ラインそして、計器ポート上の O-リング（エラストマー）である。より詳細な滅菌範囲、境界についての検討は、コンタミネーションの根本原因に関する次のセクションで述べる。

使い捨て—使い捨てができるバイオリアクターや装備は、好評になりつつある。というのも、これらは、細胞培養のバッチごとのクロスコンタミネーションのリスクを減らすことができ、その結果、融通性が生まれ、準備の時間を最小限にして、クリーニングの費用を減らし、そして、バリデーションの規定を容易なものにするからである。さらに、使い捨ては、一般的に固定されたリアクターよりも少ない接触（滅菌範囲のポイント）であるために、結果として、FG をより防ぐことにつながる（明らかに、使い捨てのスケールとしては巨大な発酵スケールの操作には、適さないだろう）。バイオリアクターは、スケールアップを必要とするため、使い捨てによって生じる融通性との兼ね合いとしては、コスト増加がすすむことと、そして、より多くの伝統に基づいて作成されたバイオリアクターシステムを整えることである。反応量が増加することで、この兼ね合いがより使い捨ての方向へシフトし続けることになるであろう^{4,5,6}。

蒸気—蒸気は、極端に加熱あるいは薄められてはいけぬ。まず第一に、迅速に蒸気を回復させること。飽和した蒸気は、その対応する圧力に対する沸点での蒸気である。これは、極端に加熱された蒸気とは異なる。この極端に加熱された蒸気とは、与えられた圧力における沸点より高い温度に加熱された蒸気のことである。加熱された蒸気がバイオリアクターの滅菌に望ましくない理由の一つは、気化熱を移すために冷却する必要があり、このことにより、飽和した蒸気よりも結果として効率を下げることになるからである。これに関連して、薄められた蒸気は、蒸気内に空気あるいは他のガスがミックスされた蒸気であり、この蒸気は、与えられた圧力に対して予測されるより低い蒸気温度で観測されるか、あるいは、飽和蒸気曲線上の与えられた温度に対する圧力より高く観測される。

凝縮物—凝縮物は、蒸気滅菌サイクルの間中、形成されるので、システムは蒸気トラップが取り付けられている低い地点に迅速かつ完全に排出されるようにデザインされなければならない。

エア—除去—エアは、滅菌を効果的にするために飽和蒸気によって完全に置換されなければならない。エアは、バキュームによって引き出されるか、蒸気自身によって効果的に置換される必要がある。一般的には、エアは滅菌フィルターを通して外に排出される。

コールドスポット—温度測定はすべての地点が滅菌温度を越えた状態で保持されていることを確認するため、システム内でもっとも温度が低い地点を測定範囲に含める必要がある。重複して温度測定を行うことが、滅菌温度が維持されていることを確認するために極めて重要である。

装置の排水—工程装置内のすべての領域は、完全に排水できるシステムになっている必要がある。理想を言えば、全ての装置の表面は一つの共通に存在する底面の排出口（それぞれの排出ポイントは、可能であればコールドスポットとなる）の方へ排出される必要がある。蒸気トラップは、この排出口内の凝集物を取り除くために設置すべきである。

配管とパイプスロープ—滅菌化のための工程の配管作業は装置内に完全に排出して戻すように作られる必要がある。もし可能であれば、離れた排出地点の数は、最小限にする必要がある。滅菌された配管は、残留物がたまることをなくすために、スロープをつけておく必要がある。このようなスロープは、もし蒸気の流れの方向に対して存在するならば、かなり大きいものが必要となる。決して、底面からラインを分岐してはならない。凝縮物が増大することを促進してしまうからである。重要な配管装置の品質は、湿気を逃すことができ、自由に排水できることである。その結果、もれがなくなるのである（湿気をおびた絶縁物は効率が悪く、蒸気を密閉する際にコールドスポットを生み出す可能性がある）。

エラストマー—Oリングやガスケットなどは、不測の事態にこれらのバックアップがないために、よく滅菌境界線において極めて重要な部分となる。したがって、バイオリアクターの状態に対して適切な材料や構造でデザインする必要がある（適切な滅菌状態にするための温度状況を意味する）、不測の事態を起さないために、適度な頻度で交換する必要がある。

バルブ—明らかに、すべてのバルブが無菌状態であるわけではない。完全にバルブを滅菌することに対しては、高温に耐えるダイヤフラムバルブの方がボールバルブよりも適している。これは、ボールの背面をクリーニングすることが難しいためである。しかしながら、ボールバルブは、蒸気を用いて持ち上げることができる。ダイヤフラムバルブに対する注意点としては、作業工程を長く行うために、ダイヤフラムを通過する蒸気の温度や流れ、拡散する圧力をコントロールすることである。蒸気シールとは対照的に復水シールを用いることはまた、バルブのエラストマーの寿命を延ばすことにつながるのである。

インラインとオフライン間のモニタリング装置の交換—いくつかのケースにおいて、必要とされるインラインモニタリング装置の数は、外付けの実験的なサンプリングを行うこと、

あるいは重要な操作パラメーター間に間接的なつながりを導入すること、これらのことにより減らすことができる。分析機器の適切な数や配置、さらには工程におけるチェックは、以下に対して調整する必要がある。1. 重要かつ必要不可欠な操作コスト 2. 機器ポートの数を増やすこと自体がバイオリアクターに対して FG のリスクを増加させることになる純粋培養における懸念事項、この 2 点である。

デッドレグ—滅菌システムの配管の配置は、FG のないシステムを維持するのにもっとも重要な事項の一つである。“デッドレグ” と呼ばれる状態を回避することが非常に重要である。基本的に、“デッドレグ” とは、分布している配管システムの枝分かれ部分あるいは、末端部分における、一方向状態として定義され、この状態は、作業工程において清掃や滅菌することが困難な残留液エリアを生み出す結果となる。ASME BPE 基準では、発酵のようなバイオプロセスシステムでは、他のバイオプロセスと共に、ターゲット L/D 比が 2:1 になるようにデザインするべきであると提案している。L は、流れに対して垂直な ID 壁から測定した“デッドレグ”の延長部分の長さとして定義され、D は、“デッドレグ”の延長部分の直径である。この厳格な割合により、工程の配管は、滅菌の失敗あるいは FG を引き起こす溶液あるいは残留液をクリーニングすることなしに、効果的に SIP (適切な滅菌) や CIP (適切なクリーニング) サイクルを完了することができる。

アジテーターシャフトシール—二つの機械によるシールが基準である。重要な事は、純粋培養の操作内のシールは蒸気あるいはきれいな復水のように滅菌された液体と共になめらかな状態にしておくことである。技巧をこらした滅菌の設備や構成をデザインすることは、しばしば費用的に高額となり、特殊な化学物質や薬品を生産する施設に適用されるのみである。これらは、巨大なパイプのダイヤフラムやクリーンなバルブ、衛生的なチューブ、特別に滅菌された付属品、取り外しできる装置や器具、自動化された SIP/CIP システム、そして、工程時に使用する超純水を含んでいる。それでもなお確実な純粋培養を、より低コストなデザインで行うことができる。例えば、溶接された接続パイプが付いた標準規格の工業用バルブ、より厳格な滅菌の手段、そして、バルブ/パイプの保守的なメンテナンスなど、これらはすべて、純粋培養を改良するためにコスト的にも効果的な方法である。(低いコストデザインで作業工程をバリデーションすることは、困難なことであり、結果的にメンテナンスがより高額になるということに注意する必要がある。)

コンタミネーションの根本原因

外来からの異物の成育(FG)は、本来失敗である。つまり、1. 滅菌工程における初期の段階ですべての外来の生物を殺すこと、また、2. 外来の侵入を常に防いでいる状態をうまくキープし続ける工程、このどちらかにおいて失敗することである。あるいは、シンプルに異物を殺すことができなかつたことや、排除し続けられなかつたことということになる。

さらに、システムの欠陥は、次のように分類することができる。

○デザインおよび滅菌する範囲、境界

○設備

○人為的ミス（手技、手法において）

デザインおよび滅菌する範囲、境界における欠陥

上記に述べたように、滅菌する範囲、境界は、外来からの微生物が存在しない環境を維持するそのシステムの観点で定義される必要がある。滅菌する境界のどのような移動や損傷もシステム内に FG を生み出す可能性がある。それゆえ、FG から使用者のシステムを保護するための最初の目的は、この滅菌範囲、境界を知ることである。

滅菌範囲、境界のすべての部分を知るだけでなく、いかに境界の滅菌状態が時間ごとに変化しているかを理解する必要がある。不完全な滅菌境界の状態、例えば、溶接部分内の小さな亀裂は、もし、差圧が常に良好であれば、滅菌状態を維持するかもしれないが、もし、圧力が均一化するか、あるいは工程におけるいくつかのポイントで真空状態が生じたならば、たとえそれが一瞬であったとしても、もはや滅菌状態を維持することはできないであろう。そのために、作業工程を通して、滅菌境界のまわりや滅菌範囲内への微生物による侵入、そして、いかに、いつ、作業工程が境界点と関わっているか（蒸気、給水、作業工程、ガス、など）を理解することが極めて重要である。

もっとも一般的な滅菌境界における失敗は、もちろん、漏れである。滅菌システムにおける漏れは、微生物による汚染の経路を生み出し、その結果として、使用者が選択したセルラインのために維持されている工程内、つまり、栄養豊富で環境がコントロールされた状態の中へ入り込むことになる。外来からの微生物は、“ride in”あるいは“grow in”のどちらかの様式で混入する。“ride in”とは、コンタミ物が給水あるいはガス内に存在し、作業工程内に運ばれる状態のことである。“grow in”は、コンタミ物がシステム内における欠陥を見出し、漏れが生じている地点で増殖し、結果的に漏れを起している地点や時には、流動勾配を利用して内部で繁殖する状態のことである。

漏れと欠陥は、自然におこりうる避けることができないシステム上の腐食や老朽化の結果であり、そのため、工程内における漏れを見つけ出して、取り除いていくことは、延々と続くチャレンジである。先を見越して漏れを検出するプログラム、つまり、定期的に検査して、作業の前に漏れが修復されるシステムは、純粋培養を成功させるためには不可欠である。圧力チェックと軽ガス（水素、ヘリウム）チェックシステムは、滅菌境界内の漏れをチェックするためのスタンダードな手段であるが、限界点もある。例えば、もし、ラインがリアクターのバルブの上流部分（“バルブのすぐそばの部分”）で漏れるなら、圧力チェックでは、漏れを見つけ出すことはできないであろう。これは、滅菌境界がこの“バルブのすぐそばの部分”であるからである。また、圧力チェックがすでに完全に行われてきたとしても、いくつかの欠陥によっては、SIPの極端なヒーティングやクーリングサイクル

ルが起こるまで検出することができない。そのため、これらの手段は、綿密な目視や手作業による検査といったシンプルかつ予防的で徹底したメンテナンスや、漏れを検出するための日々の努力と共に行う必要がある。

しばしば、漏れは検査によって見つけることが簡単である。図 5 は、滅菌された発酵システム内のデキストロース供給ラインにおいて漏れが生じているバルブの写真である（バルブハンドルは、写真の角度により見ることができない）。このように汚れた漏れは、直接生じた FG によるものではないかもしれないが、それでもなお、検出されればできる限り早急に修復する必要がある。頻繁な目視と手作業による検査、そして全ての漏れに対する警戒や用心を組織的に常に行うことは、長期間外来からの異物の成育がない状態で作業できることにつながるのである。

設備の欠陥

外来の微生物の出所となる設備の欠陥は、滅菌フィルターのひび、溶接部分の欠陥、あるいは、不完全な O リングなどが原因で、滅菌境界における漏れがさらに進行して生じる。さらに、設備の年数、欠陥や欠損は、滅菌状態を危ういものとする要因となる。また、たとえ滅菌やクリーニングがある地点の設備に対して限定され/バリデートされているとしても、時間の経過とともに、システムは微妙に腐食、劣化し、滅菌状態に問題を起こす可能性のあるシステムの変化や設備の欠陥を生み出すことになるだろう。シンプルな例として、スプレーボール内のほこりは、配管内のクリーニングパターンを変化させ、培地を阻止することになる。さらに、溶接部分の欠陥は滅菌されなかった異物が成育するポケット部分を隠してしまうことにつながる。

少量の残留培養液は、不完全なクリーニング、排水、あるいは、露出しているつなぎやシール部分、その欠陥などから配管内に蓄積し、積み重なっていく、そしてこのことが、時間ごとに滅菌中の熱伝動を妨げ、遮断することにつながっていく。そして、最終的には、外来からの微生物が潜伏するスポットをつくりだしてしまう。

培養液が付着し、蓄積する要因となるバイオリアクター内のボルトやねじで絞められている結合部分を考慮する必要がある。最近の配管では、ボルトで絞められた結合部分はあまり一般的ではないが、今でもなお、多くのバイオリアクター、とりわけ、長い間使われてきた発酵リアクターでは存在している。ボルト、ねじ、そして、ワッシャーは、時々予期せず、ヒーティングとクーリングのサイクルの繰り返しから緩み、そしてこのことにより、微生物によるコンタミネーションが発生する環境を生み出すポケットや裂け目を作り出すことになる。時間ごとに、培養液や付着したバイオフィームは、隔離されたポケットを作り出し、滅菌状態を生き残る外来からの微生物のコロニーを生み出すことになり、その結果、最終的に、配管内のコンタミネーションにつながる。

解決策としては、できる限り多くのボルトで接合された部分を取り除き、溶接されたものと交換して、古くなった接合部分を取り除き、クリーニングして新しいものと交換する

といった、周期的な検査システムをつくり、そして続けることである。

しかしながら、より溶接された結合部分に移行することで、溶接自体が FG を妨げることを議論する上での新たな重要なポイントになる。

溶接における欠陥は、特に同じような材料でつながれた結合部分、つまり、ボルトでつながれた結合部分では、コンタミの原因となる微生物が繁殖する場所を作り出すことにつながる。これは、とくに溶接の欠陥部分が滅菌するのに難しい場所であるときにあてはまる。ステンレススチールを溶接する時、溶接自体を完全なものにするために溶接物を熱して、一定のペースで調整して、温度を維持することが非常に重要である。例えば、あまりにも早く溶接することは、溶接物内部にムラが存在し、このムラにより微生物が住みつき、腐食を起す可能性があるか、さらには最悪の場合、完全に滅菌するための蒸気が届きにくいポケットを作り出すことになる。溶接の温度は、二つの溶接間、とりわけ、溶接の末端部分のオーバーラップしている場所がとても重要である。もし、このオーバーラップ部分で溶接が冷えてしまうと、溶接のつなぎ目において穴ができてしまう結果となる。一つの例として、このような欠陥は、溶接がオーバーラップしている部分がある配管壁の上部に円状あるいは四角形で溶接されたパッドが存在するときに見受けられる。図 7 は、FG の一因となる溶接部分の欠陥を含んだ古い発酵システム配管内の溶接されたパッドの写真である。

図 7 に見られるような場所や溶接部分が存在するときもっとも最良な手段は、すべての疑わしい領域を削りとり、再溶接して、溶接部分をなめらかにすることである。このように溶接部分をなめらかにして仕上げるのが、溶接周りに材料物が滞留する機会を極めて減らし、結果として検査、チェックを容易にさせることになる。

人為的ミス（手技、手法において）

いかに作業工程が自動化されたとしても、人の介入が、あらゆる製剤加工において現在でも不可欠である。ある意味ですべての FG の根本原因は、人為的ミスにつながるのである。つまり、デザイン時のミスからメンテナンス、操作、手順、ルーティンではない手作業時におけるミス、そして、不注意、あるいは、破壊行為までの人為的ミスである。次のセクションでは、純粋培養の操作に影響を与える人の決定、判断、そして、操作技術に関する重要な問題点を述べる。

予防的なメンテナンス

予防的なメンテナンス(Preventive Maintenance; PM)は、明らかに、バイオ製造の施設において信頼性（設備の年数にかかわらず）、安全性そして、純粋培養の性能を維持する上で不可欠である。しかしながら、PM の作業それ自体は、全体の半分であり、残り半分は効果的な PM のスケジュールをデザインすることである。つまり、何を必要とするのか、そして作業を完璧に行う際の正しい頻度、この両方を決定するのに十分にそのシステムを

理解することである。残念ながら、最適な決定を行うために異なった専門技術がしばしば異なったタイプの設備に必要となる。もし、これらが複雑でなければ、急を要しないメンテナンスのコスト（当然のことながら、PMは、常に急をようするものではない）は、最小限にしていこうということが一般的である。すべての滅菌境界に対して正しいPMの作業を頻繁に行うことは、この作業の範囲外であるが、この考えの重要性をいくつかの例を用いて以下に示す。

●蒸気トラップ：蒸気トラップは、もしこれが不調であったり、正しくセットアップされていなければ（バイパスができていたりなど）、もはや効果的な滅菌境界ではない。それゆえ、すべての重要な蒸気トラップは、PM作業計画の一つである必要がある。そして、滅菌境界に対して“失敗しそう”メンテナンス戦略にかかるコストを考慮して、蒸気トラップの“PM”時に、定期的な間隔でトラップを交換するというを実際に明確しておく必要があるかもしれない。トラップは、もし、長期間未使用の状態であり、そして設備や装備が利用されていない状態であれば、不調になることが知られており、再スタートの際には、トラップに対して特に注意を払わなければならない（長期間未使用後には、滅菌ワールドテストを実行することがあるため）。

もっとも重要なことは、滅菌境界における重要なトラップが適切にセットアップされており、そして温度チェックを行うこと（温度センサーあるいは、温度スティックを介して）、そしてこれらが現状で正しく機能していることを確認するために適切な場所においてトラップを確認することであり、以上のことを検査することが操作する人の責任である。このことは、明らかにPMで行うことはできない。というのも、すべての操作でこれらのことを行う必要がある、そのため、一度の記録あるいは、別々のチェックリストで詳細に記載、記録していく必要があるからである。

●バルブ：ダイヤフラムバルブ内のダイヤフラムは、時間経過とともにすり減ってくる。そのため、周期的に検査して交換することがとくに重要である。この正確なタイミングは、使用の頻度や高温などにさらされている度合いに基づく必要がある。

同様に、ボールバルブ内のボール表面あるいはソケットもまた、FGを生み出すことになり欠陥部分を発生させることになる。ボールバルブは一般に、ダイヤフラムバルブより長く、厳しい作業工程にも耐えるため、PMの作業スケジュール内に含める必要がある。

●容器：発酵装置やバイオリクターの内部は、経験をもった滅菌に関するエキスパート（容器に関するエキスパートも加えて）によって、培地の滞留や残留、そして、FGにつながる腐食や欠陥がない状態であるということを確認するために、定期的に検査する必要がある。

●エラストマー：結合部分をシールするために発酵装置の内部やその周りで使用されるエラストマーは、作業ですり減る、あるいはひび割れを起こしていないことを確かめ、定期的に交換する必要がある。再度、“失敗しそうな”メンテナンス戦略は、一般的にお勧めできない。これは、上記に述べたように、滅菌境界において重要な要素であるからである。

●多岐にわたる接続：いくつかの予防的行動は、それぞれの工程に対して独特である。例えば、ラージスケールの発酵装置の外側にいろいろな種類の配管を行う際に、ポータブル接続管（家庭にあるねじのついたホースコネクションポート（配管をつなげるポート）と同じような）を介して特別な場合に追加するようのねじ式ニップル接続管が存在していた。このニップル接続管は、通常ねじで絞めたプラグでシールされており、蒸気下でブロックされているが、しかしながら、この接続部分が、長い間使われないと、結局のところ、ねじで絞められた結合部分はゆるみ、その部分においてもはや圧力を維持できなくなる。そして、容器内の基本的な滅菌工程の間に、接続部分近辺の蒸気が壊れ、外へ逃げ、滅菌されていない空気が滅菌後のタンク内に引き込まれ、その結果コンタミネーションを引き起こしたのである。そのため、再発を防止するためにも、スタートアップにおけるチェックリストに、他の滅菌チェックの間もニップルがしっかりと締まっていることを確認する項目を含めて改定されることになった。

操縦者の技術

手順書と作業記録が完璧に存在して、毎回、再現よく基準に従って作業を行えることが理想的であるが、しかしながら、現実には、いくつかの操作ステップは、経験あるいは最適に行えるようにコーチングされてきたことにより得られたある種のマニュアル技術も必要となる。

正しい操作技術が必要となる例として、パイプ内の蒸気先端から、滅菌された原料までの移行する工程、つまりは、マニュアルで滅菌された給水圧力調整槽を満たしていく工程などである。全ての蒸気トラップを閉じた後、圧力調整槽がなお一定の圧力を保っている間は、蒸気は、給水圧力調整槽がラインを満たすために開かれている間（あるいはその直前）に閉じなければならない。余剰な蒸気（トラップができ、真空を作り出す）ができる機会を与えてはならず、圧力調整槽は常に蒸気あるいは、給水で一定の圧力を保っておく必要があるので、操作技術（あるいは、正確に自動化された一連の流れ）は非常に重要である。

変更

GMP 操作は、安全性、同一性、強度、純度、質（SISPQ）を生み出し、そして、作業工程の安全性は、工程あるいは設備の変更によって影響を与えないと保証するよう、工程をコントロールする際の公式な変更を要求している。バイオプロセスの操作に対しては、作

業工程の安全性や SISPQ を同様に重視して、計画的に、また、計画的でないにしても純粋培養の工程を注意深く、細かく調べることは重要である。

コンタミネーションの調査と復旧

もし、長い間バイオプロセスの作業に携わってきているなら、その間に、FG によるコンタミネーションを経験してきたことであろう。そして、もし、不運にも多数のコンタミネーションの事例を処理してきたなら、それぞれの事象が完全に独特なものであると知っているはずである。残念ながら、根本原因を調査することもまた同様に、どんな要因でどんなコンディションが重要であるかを予測する手段はなく、独特なものなのである。確かに、時々、操縦者のコントロールの範囲を越えた出来事、あるいは工程設備の外側での変化が、最終的にコンタミネーションにつながる重要な要因となるだろう（この事実を示しているケーススタディ、表 F を参照のこと）。

それでもなお、たとえ広範囲な調査と復旧ガイドがすべての FG の事象をカバーするように改定できないとしても、一般的な戦略で作られている FG の調査と共通で十分である。

FG の事象に対するトラブルシューティングの第一ステップは、作業工程に異常があるかどうかを決定することである。後ろ向き調査によって、どこで FG が生み出されるかをしばしば示唆することができる。逆にいえば、FG あるいは滅菌境界における欠陥もまた、絶え間ない工程のモニタリングによっても検出できないのである。もっとも不運ことは、時々あるいは不定期的に欠陥を起すシステムを有することである。次のセクションでは、FG が生じた時のトラブルシューティングにおいて成功した検査ポイントを詳細に説明する。

調査、検査の到達目標は、デザイン/滅菌境界、設備、あるいは、人為的要因による失敗を見だし、確定することである。表 G は、体系的な FG の検査に取りかかるためのチェックリストのサンプルである。重要な行動に関しての検討が次のチェックリスト内に含まれている。重要なことは、過去に動いていて、正しくメンテナンスされていたからといって、現在、問題がないという保証はまったくないということである。

時間は重要である。

もし、操作中の工程（生産物に対するコンタミネーションの分析テストとは、対照的に）で FG を検出できるなら、給水タンク、材料容器、バイオリアクター/発酵装置、圧力調整槽、バルブ、などを含む作業工程の状況が“作動中”で検査することが極めて重要である。この状態で、セットアップにおける欠陥、異常な様子、漏れ、あるいはその他の不調、作業工程中のアラーム、冷却スポット、目視できる欠陥部分などを調べる必要がある。

データを取る

次のステップでは、一般的に次のような作業工程や FG についてできる限り多くのデータを取っておくことである。つまり、

- FG の年数
 - FG のパターン
 - 最近の変化あるいは異常な観測
 - FG の同定
 - 容器の経歴
 - 最近の検査報告/調査/環境のモニタリングデータ(EM)
 - 設備の不調
 - 現在起こっている問題点
- などである。

検査を広げる

データ調査を広げていくために、バッチプロット、滅菌温度、コントロールバルブの位置、背圧、給水の流れやタイミング、そして、作業工程の介入、あるいは、以前の異常な変動を含むこれら目視で確認できるデータから、自動化されたプロファイルと工程のプロファイルを調査する必要がある。

圧力チェック後、あるいは、軽ガス（水素あるいは、ヘリウム）を用いたより高感度なチェック後に、検査を実行することによって、SIP 中に、あるいは、“作動中” に起こるかもしれない漏れの位置を探し当てることにつながる。重要な注意点として、純粋水素ガスは、追跡ガスとして決して使うべきではない。窒素に 5%の水素を混ぜた標準的な工業用グレードの混合ガスが、現在漏れの検出に使用される。この混合ガスは、高価でなく、不燃性（ISO 規格#10156 に基づき）で、簡単に利用でき、そして、水素ガスを追跡ガスとして使用する上で必要となる重要な性質もなお兼ね備えている。

コメント/意見、注意に対して一連の記録、手順、方法を見直すこと、そして、作業に関係する人へ操作に関してのインタビューを行うこともまた、異常な作業上の問題点を明らかにすることに役立つのである。最近の設備に関するデータ（EM やクリーニング記録など）を追跡すること、最近の設備や作業工程の変更記録を集めること、そして、最近のメンテナンス作業を見直すこと（もし可能であれば作業ノートをチェックすること）これらすべてのことは、どの設備あるいはデザインがもともとの作業能力から変化しているかを突きとめることにつながるのである。

実践で得る

システム内を歩く。つまり、漏れ、冷却スポット、間違えてセットされた蒸気トラップ、間違った接続などを含む異常がないかを探さなければならない。エアフィルターを検査して、完全にチェックすることも必要である。そして、温度プローブ、pH、D0、などを取り除き（そして、キャリブレーションをチェックして）、プローブ、O-リング/ガスケット、グ

ローブを検査、調査するのである。

さらに明らかにするためには内部を開けてみる

もし、上記に述べたような行動によっても根本原因の所在を突きとめる努力が無駄に終わるなら、より徹底した内部の検査工程が必要となるだろう。内部の検査は、次のような適切なチェックが含まれる必要がある。つまり、明らかに目視できる欠陥、すべての壁や内部の表面部分をかなり徹底して調べることにより検出できるわずかな欠陥、アジテーター/シャフトの傷つきやすさ、溶接部分の欠陥、あるいは、滞留（一般的に古いタンクにおいて）、コイルリーク（もし、タンク内部にコイルを有するなら、常にこれらコイルを検査する必要があり、定期的な検査プログラムに入れておく必要がある）、そして、ボルトで結合された部分の欠陥（一般的に古い容器において）などである。

実験に基づいて

これは、推測であり、シナリオテストでもあるが、例えば、もし滅菌工程が疑わしければ、滅菌作業を行う必要がある、その作業で、滅菌境界内のできる限り広範囲を最小限の温度が保っていることを確認することができる。これは、温度マッピングあるいは、ラインの温度チェックに対する赤外線感知技術と同じくらい洗練されたものである。もう一つの例として、培地の滞留を検査することである。

検査に取りかかるとき、偶発的に微生物のデータを取ることは、FG やその根本原因を理解するために極めて重要である。下記のディスカッションでは、FG を微生物学的に理解することがいかに検査の手助けとなるかを詳細に述べる。

微生物学的検査

はじめに、FG のコントロール戦略およびテスト法の感度と限界を理解しなければならない。これらを理解することは、作業工程の質を評価し、いかに、そして、どのポイントでFG が作業工程に持ち込まれるかを理解する上で極めて重要である。コントロールシステムとともにいくつかの重要な要因としては、サンプルの頻度、テストボリューム、テスト培地、テストの方法、擬陽性のリスク、テストの確認、再テスト/再サンプルの選択、などである。

本来、FG のテストとは、既存の微生物が大半成育している中において小さな不明な微生物の集団が存在していることを確認するスクリーニングである。つまり、このような外来からの微生物を単離して、その結果、同定して評価する手段を有することは、極めて重要である。選択培地やアガーは、このテストに必要不可欠である。テストプレートあるいは、テストチューブから非選択培地上で単離するために画線培養することは、その微生物を同定するための単一コロニーを得るのに十分であるかもしれない。しかしながら、奇妙なこ

とに、選択培地が生産産物の培養の成育を阻害するよう、そして、コンタミネーションへとつながる可能性のある成育を逆に刺激するようなことが起こっているのである。このことが、図9と図10で示されている。

一度でも、外来からの微生物が単離されたなら、適切な同定テストを完全に行うべきである。生化学的、そして、遺伝学的 ID 法も用いて、一つ単離された微生物を他のもの（すなわち、異なった場所から、あるいは、以前に起こった FG のもの）と比較することで、その結果、共通な原因因子かどうかの確認を行う。限定された手技の中で遺伝学的に同一であるとコンタミネーションの微生物を確認するためには、共通のシステム下での調査に重点を置くこと、あるいは、そのかわりに、独立して根本原因を調査することに専念することが大切である。

生産培地、そして、“メディアホールド実験”用の培地内の炭素/窒素活用そして成長速度における形態学的特徴を決定するための実験は、単離された微生物の ID とともに開始する必要がある。（メディアホールドとは、おそらく外来からと思われる微生物の成育をサポートするに都合のよい栄養培地を使用している発酵装置やその関連システムのテストラン“滅菌”のことを言う。）形態学的特徴の実験は、微生物の根源や侵入時期についての仮説を容易にする。これらの実験は、また、適切なメディアホールドの戦略を決定する際の基礎を生み出すことになる。

もし、抗生物質がプラスミドを選択するために生産培地に含まれる、あるいは、培養で生み出されていれば、FGの微生物に対する最小限阻害濃度(MIC)は、侵入の時間や根本原因を理論づける際に有用である。

比較のためのベースラインがないシステムで、手順が決まっていないテストを考える際には、注意が必要である。この状況で、間違ったデータや解釈を回避するため、さらなる作業が、さまざまな微生物の回復を証明するために、そして、テストの方法を‘評価/バリデート’するために必要とされる。

目標とする戦略に合わせる

理想的なシナリオ（しかしながらあいにく現実には存在しない）とは、永遠に FG のない状態で滅菌することができるバイオリアクションシステムを有することである。さらに、FGが生じた後に工程の作業能力を確かめるためにメディアホールドを開始するかどうかの決定は、容易なことではない。というのも、設備をサービスにまわすのには、かなりの労力を要することになるからである。それゆえ、作動している工程に基づき、“目標に合わせて”時間枠を明確に定めること、そして、システムの性能をこの時間枠内で明らかにできるだけのメディアホールドテストの戦略をデザインすることが、意味のあることなのである。再度、下記に述べているのは、従来の微生物の発酵工程から得られたものであるということに注意する必要がある。しかしながら、その原則は、特別な工程やビジネスへの要求度合いに応じて調節することで、どのようなバイオリクターシステムにも適用できる。

設備の領域、培地、終了時間、サンプリング/テストの戦略、そして、数多くの繰り返し、これらの明確な目標に適切に合わせることで、操作の柔軟性を維持するうえでもきわめて重要である。例えば、作業工程のサイクル時間（あるいは、設備がセットされ動いている間のもっとも長い作業工程時間）に加えて、適切な安全性に基づいた終了時間を明確にすることが好ましい。

安全性因子は、追加のホールド時間とテストを行う際の感度の両方によって説明することができる。培地をより長い時間かけて培養すれば、もし、そこに微生物が存在していると、より FG を検出しやすくなる。また、より多くの容量でテストすることでも FG を検出しやすくなる。これらの要素を適切に組み合わせることで、技術部門、そして品質部門のパートナーとも意見が一致する最適な安全性因子を得ることにつながるのである。

哺乳類細胞培養のような、さらに厳しい滅菌化に対しては、目標とする実験に合わせることで、安全性因子として必要とされる作業工程時間に加えて、追加のホールド時間も滅菌を維持することに集中して行うであろう（仮に、とても長い散水タイプのバイオリアクションに対して、その作業工程の間滅菌テストを維持することでさえ、実際には、再スタートの状態ではないとしても）。特定のバクテリアによるコンタミネーションを克服するために、より短期間の微生物の発酵に関しては、異なったアプローチが用いられる。例えば、一つの工程として、SIP から生産物の採取、そして、採取前培養液の $50 \mu\text{L}$ ($5 \times 10^{-5}\text{L}$) を一般的なテストにかけるまでには、24 時間かかる。さらに FG が検出され、分析されるまでには、2 時間かかる。メディアホールドは、培養液の 5ml ($5 \times 10^{-3}\text{L}$) をテストするように、そして、ホールド時間を 6 時間延ばして、合計 30 時間になるようにデザインされる。このことにより、体積から 100 倍 ($5 \times 10^{-3} / 5 \times 10^{-5}$)、ホールド時間から 64 倍 (6 時間の追加により、ダブリングタイムの 6 倍、つまり、 $=2^6$ に相当する) の感度が増加し、その結果、トータルとして、 $100 \times 64 = 6400$ 倍の安全性因子が増加することになる。

適切な FG の微生物を使って滅菌が維持されている培地のそれぞれのバッチ成長テストを行うことは、現在、使用している培地の妥当性を確かめるのに必要となる。少なくとも、この作業には、現在関心のある微生物が含まれているだろうし、以前の FG の微生物や、あるいは、USP の微生物も含まれているかもしれない。

もし、検査によって根本原因が判明しないなら、より大規模な検査を伴ったメディアホールドがコンタミネーションの根源を発見するのに有用である。しかしながら、この作業は、予期せぬことにより操作上限限されてしまうことを回避するため、目標とする基準を設定した後に、開始すべきである。一般的な、“目標とするホールド戦略に合わせる”ということは、工程期間の開始時に加えられたすべての原料を含み、そして、結果としてシステムが全体として、“目標となる時間枠”に合わせ、FG がいない状態であることを明らかにすることができる。対照的に、検査を伴ったメディアホールドは、これら原料、材料の追加を適切なホールド時間で切り離し、その結果、コンタミネーションの根源を同定することにつながるのである。それぞれ加えられる原料の量は、その工程に応じた十分な容量に基

づく必要がある。もし導入されるのであれば、添加物間のホールド時間をコンタミネーションが検出できるよう十分に長くする必要がある。テストの感度を上げ、時間の間隔を減らすために、テストの容量を増やすこともできる。図 11 は、24 時間ごとに添加される作業工程に基づいた、検査を伴ったメディアホールドの一例を示している。

おわりに

発酵工程において FG の発生は、どの程度その作動している工程が依存しているか、FG に対して許容があるかにもよるが、製造における損出や生産力の減少の大きな要因である。培養液の中には依然として生産できるものもあるかもしれないが、通常の生産工程では、FG の結果として生産性の損出、あるいは、工程内の変更、移動に苦しむことになる。ほとんどの微生物や細胞の培養工程では、FG に対してのゼロ・トレランス（不寛容）を有しており、そのため、検出できうる FG に対しては、完全に処理を行う。

バイオテクノロジー産業が発展するに従い、さらなる改善が、次のような点で行われるであろう。それは、検査の反応がタイターや特異的活性物が増えることによりさらに短縮化されること、より少量の臨床上で用いられる化合物が必要となるためにディスプレイ（使い捨て）のシステムがより一般的になること、企業は、現在動かしているバイオリアクションにおいて、技術的により卓越していく（あるいは、外注により第三者の機関を使って、さらに特殊化する）ことから、これら操作上の改善がさらなる改良につながることで、そして、設備がより効果的に、より信頼度が高く、さらに改良されて動くこと、である。企業は、これら先頭に立って進化するために、バイオテクノロジー産業において競合的な利益を生み出すことになる。

これに対応して、バイオリアクションは、より短縮化され反応容器はより特殊化されているので、純粋培養の性能を改良する必要性はこの競合的な利益を得るためにかなり重要になるのである。この数十年間よく理解され、実行されている基本原理を用いることで、実際には、低いコンタミネーションの割合で作業は成功している。それなのに、なぜ技術は改良して、企業はより発展しているのにコンタミネーションはバイオリアクションを悩ませ続けているのか？最近の研究によると、バイオリアクションの生産スケールにおけるコンタミネーションの割合は、なお 2%以上である¹⁷。答えは、コンタミネーションを排除するようにより多くの最良な滅菌デザインを行うことである。つまり、人的要因やシステムの劣化は、すべて傷つく可能性のある部分を継続的にかつ徹底的に調査するという行動と結びついて、すべての純粋培養の操作に対して必ずもたらされるのである。

今回、我々は滅菌のデザインや滅菌化の基本を記載した。我々は、いくつかの例やケーススタディを通して、体系化され型にはまった作業、そしてそこでは、バイオリアクターのスタッフがシステムの劣化や設備あるいは手順の変更に関して常に警戒を行い、最前線でシステムが問題なく動き続けるよう予防的な検査に専念している、このような体系化された作業の構築を行うことの重要性を詳細に記載した。さらに、我々は、コンタミネーション

オンが起こったときに、さらなるコンタミネーションを最小限に抑える微生物学的要素を含んだ、効果的かつ分かりやすい検査をいかに行うかを記載した。

本文以上

<図表の説明>

表 A ケーススタディ―(not) hot pockets

表 B ケーススタディ―隠れたスプレーリングのデザインにおける欠陥

表 C ケーススタディ―エラストマーにおける問題点

表 D ケーススタディ―不十分な放出板のデザイン

表 E ケーススタディ―ねじ式接続の隙間部分における微生物の侵入

表 F ケーススタディ―作業工程のエアーに関して

表 G 外来から侵入した微生物の成育を検査する際のチェックリスト

図 1 発酵装置における SIP の間の蒸気を用いたエアーの置換

図 2 排出ホールがない内部の CIP スプレーリングの概略図

図 3 Oリングを通り抜けて漏れた培地が付着した内蔵 pH プローブ

図 4 不十分な放出板のデザインとその改善

図 5 ハンドバルブにおけるデキストロースの漏れ

図 6 長く使用されてきた発酵装置のねじ式接続部分の内部の漏れ

図 7 欠陥部分を示しているバイオリアクター内部の溶接部分

図 8 タワーウォーターリーク付き圧縮エアクーラー

図 9 非選択アガプレート。生産物である微生物の中に混じって目視できる外来からの微生物の成育（小さなコロニー）があることに注目すること

図 10 グラム陰性の生産物である微生物から単離された（図 9 からの小さなコロニー）、外来から侵入した微生物である *Bacillus* が成育している選択 Columbia CNA アガープレート

図 11 材料の添加とサンプリングの時間を図式化した検査を伴ったメディアホルドのスケジュール表