

タイトル：微生物学的汚染を最小化するための製薬の水装置の設計と管理

著者：Tim Sandle, PhD

(Pharmaceutical Engineering, 2017, Vol 37, No 4, 51-55)

翻訳： 京都大学大学院医学研究科薬剤疫学分野 大学院生 石田 亮 (Ryo ISHIDA)

水を媒介する微生物は広く存在しており、異なる環境下で生存または成長するための能力は変化に富んでいる。それゆえ、管理されていない水装置は患者に害を与え、医薬品の品質を落とす可能性がある。水の精製は、製造製品において原薬または他の原料間での相互作用を防ぐために必要とされている。水は、微生物学的に管理かつ監視されなければならない。

化学的、物理的な水の精製方法は、両者とも、ほとんどの場合、百万分の一（即ち、 $1 : 10^{-6}$ ）未満に汚染物質のレベルを減少することが可能な確固たる技術に基づいている。これらの方法は、十億分の一（ $1 : 10^{-9}$ ）の範囲での分析感度を有している。

化学的分析は、通常、問題への迅速な対応を保障するのに十分な早さで回答を生み出すが、微生物学的評価は、しばしば遅く、かつ不正確である。（ATP 生物発光法や蛍光 DNA 特異的染色法のように）迅速な微生物学的方法が、次第に実施されているが、ほとんどの製薬グレードの水の微生物学的評価は培養法に依存している<sup>1</sup>。このことは、バイオバーデン（試料に混入している微生物の数）の結果が数日経過するまで得られない<sup>2</sup>ということの意味しており、十分な設計原理を相当に強調している。

本稿では、製薬施設の水装置における効果的な微生物学的管理を維持するために必要な管理指標と共に、適切な設計に必要なとされる要件のいくつかを検討する。

## 製薬グレードの水

米国薬局方（USP: United States Pharmacopeia）や欧州薬局方（Ph.Eur.: European Pharmacopeia）で定義される医薬品製造に関する水の 4 つの等級が存在する：（主に）飲用の水（USP）、精製水（USP と Ph.Eur.）、高度精製水（Ph.Eur.）そして WFI、即ち注射用水（USP と Ph.Eur.）である。飲料水は、他の等級の水に対する第一段階である；製品への直接の接触はない。それぞれの等級は、製造方法、要求される精製度、貯蔵過程と配分過程に関連する微生物の問題を有している。

精製水は、典型的には逆浸透法によって製造され、無菌性または非発熱性（即ち、内毒素の特定を必要としない場合）を意図しない製剤で用いられる。使用には、経口製剤や局

所製剤ならびに錠剤やカプセル剤の造粒過程をも含む。そのような医薬品において、問題は、全般的なバイオバーデンや“好ましくない”微生物が存在しないことである：これらは投与経路に基づき、潜在的な患者への害の脅威を与える<sup>3</sup>。精製水は、注射用水や製薬グレードの清潔な蒸気の供給原料でもある。高度精製水は、Ph.Eur.で要求されるような眼科用薬、耳鼻科用薬、皮膚科用薬や他の医薬品の調整を意図されている。この等級の水は、内毒素（ $<0.25$  endotoxin units [EU] / mL）とバイオバーデン（ $<10$  colony forming units [CFU] / 100 mL）の双方の管理を必要とする。

注射用水は、製薬産業で用いられる中で最も高品質の水である；逆浸透と蒸留のいずれかによって精製される（2015年からUSPとPh.Eur.双方による）。バイオバーデンおよび内毒素の管理要件は、Ph.Eur.では、 $<10$  CFU / 100 mL（バイオバーデン）と $<0.25$  EU / mL（内毒素）として公表されている。注射用水は、高度清潔域での試薬の清掃に加えて、静注製剤、透析、洗浄溶液の調整にも使用される。

### 微生物学的懸念

民間の水道会社や自治体から供給される飲料水は、化学汚染物質のレベルが、確立された安全基準の範囲内にあるかを確実に保障するために監視され、大腸菌、腸球菌、緑膿菌や糞便中の腸内細菌を含む微生物に対してスクリーニングされている<sup>4</sup>。ほとんどの場所では、製薬施設へ供給される水の品質は十分なものである。しかしながら、保証条件として、多くの施設は、糞便中の汚染マーカーに大腸菌のような微生物に対して水を検査することを採択している。現場での飲料水が、処理され、軟水化され、精製され（必要な等級に従って）、分配される。

ほとんどの十分に設計された水装置は、制御された状態に維持される一方で、微生物学的な問題が生じる可能性がある。微生物の付着は、微生物表面間での引力的かつ反発的な物理化学的相互作用のバランスの結果で生じる。主な問題は、バイオフィルムの形成—微生物が（不十分な流量の配管のような）表面に付着する際に生じる粘液様の微生物学的集落—である。

細菌細胞が一度接合すると、グリコカリックス（水溶性の高分子粘性マトリックス）として知られる多糖類を分泌することによって、バイオフィルムが発達する。グリコカリックスは、個々の細菌が細胞表面に自身を被包することを可能にする；これらの微生物が蓄積するにつれて、バイオフィルムが形成される。バイオフィルム形成に伴う段階は（図1）の通りである：

1. 個々の細胞は細胞表面に集合する（第一の付着）
2. 不可逆的な付着
3. 細胞外高分子物質が生成し、付着は不可逆となる
4. バイオフィルム構造が発達し、成熟する
5. 単細胞（または細胞の凝集塊）は時間とともにバイオフィルムから放出される

付着のこの様式は、比較的ゆっくり生じる。様々な因子がその過程に影響しており、関与する細菌のタイプ、環境中の細菌集落の大きさ、およびその増殖期の期間を含んでいる<sup>5</sup>。一般的に、グラム陰性菌は、より簡単に細胞表面へ付着させやすくする細菌細胞の付属肢（線毛）によって、より容易にバイオフィルムを形成する<sup>6</sup>。表面の荷電は、細菌の付着に関連したもう一つの重要な事象である<sup>7</sup>。

バイオフィルム内での微生物の成長は、供給源という点で、しばしば急速である（図2）。しかしながら、時間とともに異なった速度でバイオフィルムから汚染物が溶出されるため、使用者のアウトラインからの様式は、しばしば散発的である。グラム陰性菌は水生環境で見られる細菌集落の大部分を構成しているため、バイオフィルムは水装置で特に問題となる。さらに、これらの型の微生物は、細胞壁の構成成分として内毒素を格納している<sup>8</sup>。

水の精製過程の多くの段階は、汚染物質を減少するように設計されていながらも、逆説的にバイオフィルム形成を促進する状態を生み出している可能性がある。一例は、マトリックスを通した高深度の濾過過程である。水がフィルタに浸透するにつれて、微生物はマトリックスに吸着され、その場で複雑な集落を形成する。さらに、精製の過程が、栄養濃度を変化させ、集落形成が可能な環境の連続的なニッチェを作り出す可能性がある。本質的には非常に低レベルに栄養素を枯渇させるその過程の最終段階では、極端な環境が形成される<sup>9</sup>。この環境は、存在する微生物からの過剰な応答を引き出し、それらを排除するのを困難にさせている。

適切に設計され、維持されている装置では、精製水や注射用水に存在する微生物汚染のリスクは低い。しかしながら、微生物が検出される度に（そして、確実に仕様を上回った場合には）、重大な害を生じる。

## 良い設計原理

水生成のそれぞれの段階がリスクに寄与する一方で、微生物学的増殖を減らすことができる、たくさんの設計や制御プロセスが存在している<sup>10</sup>。

## ブレイクタンク

生成過程で生み出された水が供給路に再流入するのを防ぐブレイクタンクは、微生物の定着が生じる最初のエリアである。新たに流入する飲料水中に存在する微生物は、自身をタンクの側面や底部に付着させ、バイオフィルムを形成する。タンクから採取された検体は、通常、飲料水の仕様を満たしており、蓄積していく生物量を即時に反映することはない。定期的な維持とタンクの流水洗浄は、主な予防対策である。

## 活性炭床

床のマトリックスは、精密に分割された木炭から構成され、それは低分子量有機物の除

去において高い有効性を示す。また、塩素のような混合物の酸化や除去も行う。広大な表面積、および塩素除去に伴う床上の栄養素の蓄積は、微生物の急速な集落形成と増殖に繋がる可能性がある。微生物のほとんどはグラム陰性菌であり、細胞溶解を経て、内毒素の供給源となりうる。全過程の水装置管理における不可欠な点は、頻回の交換と組み合わせで、温水または蒸気で定期的に床を殺菌化できることである。殺菌化は、新しい水装置に対しては（週ごとのように）高頻度で開始されるべきである；これは、微生物のバイオフィームの傾向のレビューに基づき、経時的に（1 か月ごとに）減少されることが可能であるかもしれない。6 か月から 1 年間のデータは、バイオフィームのパターンを評価するために必要とされる。

### 軟水化剤

硬水を利用する場所では、脱イオン化装置と逆浸透装置への干渉を防ぐために、軟水化剤が必要とされる。水がレジン充填カラムを通過する際に、2 価のカルシウムおよびマグネシウムカチオンは、ナトリウムイオンと交換される。しかしながら、レジンマトリックスは、潜在的な微生物の集落形成のための広大な表面領域を提供することになる。水質を維持するためには、紫外線や塩素のような殺菌化や管理の対策が不可欠となる。

**“流入する飲料水に存在する微生物は、自らをタンクの側面や底部に付着させ、バイオフィームを形成する”**

### 脱イオン化装置

標準的な脱イオン化装置は、荷電されたレジンカラムで構成される。これらは、カチオンとアニオン除去とに区別されていてもよいし、または、混合床装置を利用してもよい。脱イオン化の利点は、カラムが 1 モル濃度 (M) の塩酸と 1M の水酸化ナトリウムでの再生を必要とすることであり、それらは双方とも強力な殺生物性を有している。再生頻度が高い場合には、カラムは衛生的な状態に維持される。殺菌化されていないカラム、または 2 日以上再生されていないカラムでは、活性炭床と同様の問題が存在し、微生物が生育するリスクとなる。

電気式脱イオン化装置は、再生化剤を加える必要なく持続的なカラム再生を可能にする。それらは、維持することは容易であるが、微生物の生育も促すことになる。逆浸透膜は、微生物を濾過除去するが、適切に維持されていない場合には、微生物の生育が起こりうる。微生物の細胞壁の破片が分離すると、内毒素は容易に膜を通過することが可能になる。

### 保存と配分装置

不十分に設計された保存配分装置は、再集落形成の機会を生じ、最終的には汚染を生み出すことになる。バイオフィームは緩徐にかつ偶発的に汚染物を放出するため、集落形成

は、しばしば検出するのが困難である。(水中の微生物集落は、滅多に正規分布を示さず、これは、全体的な傾向が識別できるようになる前には、レベルが顕在化または不顕在化することを意味する。)

### 保存タンク

水の保存タンクは、通常、ステンレスで建造される。それらが利用される場所では、容量、使用頻度、そして内表面の洗浄、殺菌化の頻度を決定することが重要となる。定期的な水交換は、汚染の予防に役立つ；一方で、遅い交換は、より潜在的な汚染リスクをもたらす。保存タンクは、水位変動を管理するために開放されるべきである。外気からの微生物汚染を防ぐために、開放口には疎水性エアフィルタを取り付けられるべきである。これらのフィルタは、真空状態を生み、タンクの内破に繋がる可能性があるフィルタ閉塞を回避するためにも用いられる。開放口フィルタの完全性試験は、定期的に行われるべきである(例えば、6または12か月に一度)。

### 保管温度

非常に低量のミネラルを含有する水が必要とされる場合には、時に、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) が用いられるが、再循環ステンレス装置で注射用水を供給することは標準的な手段である。65°Cから80°Cの温度で稼働する再循環装置は、65°C以下の冷温点は生じていないことを示しながら、自己浄化を行う。精製水装置は、高温にも低温にもなりえる。冷水装置の鍵となる側面については、以下でより詳細に論じられる。

### 配管とタンクの設計

配管とタンクが不十分に設計されたり、または不適切に維持された場合、それらは、水装置の他のどの部分よりも汚染に発展する可能性がある。十分に設計された配管にとっての一般的な要件は：

1. 滑らかな内表面。微生物は粗い表面に対してよりも滑らかな表面に対して付着しにくく、それゆえ、腐食への耐性、および **rouging**(酸化鉄の生成)を回避することが重要である(ステンレスの電解研磨法によって達成されるように)。配管接合部と溶接部も滑らかさを損なう可能性がある。
2. タンク内での連続的な水の移動と配管中の速い流れ；毎秒1-2メートルの範囲の速度は、十分であるとされてきた<sup>11</sup>。このことは、微生物が表面に付着し(そして、バイオフィームを形成する)機会を最小化する。ずり応力が生じる場所では、微生物は表面に対して不十分にしか付着しない。水の移動がない場所では、ずり応力も生じない(ずり応力は、流速と共に増加する)。
3. 水が停滞したままになり得る領域の回避：
  - a. 分岐管が長すぎることによって、主管の乱流が内容物の配置を変えることができない

ような場合には、水は“デッドレグ”（製薬用水配管を分岐させる所などで流水せず溜りとなる箇所のこと）で停滞する可能性がある（図 3）。原則は、常に分岐管の長さを最小化することである。

- b. 水は、特に使用点一中でも頻回かつ定期的な使用がない地点のバルブ部分で停滞したままとなっている可能性もある。このことは、衛生的なバルブや（ボールバルブという）代替法よりは遥かに優れてはいる“zero dead leg”バルブによって、効果が打ち消される可能性がある。しかしながら、これは、内毒素を放出するバイオフィルムを内部に收容することが可能であるため、誤った安全対策には繋がらないだろう。排水のための正しい傾斜を確保することによって汚染リスクを減少させることもできる。
  - c. 装置が完全に排水可能となっていることを保障するために、環状管は原地点から折り返し地点まで傾けられる（“低くなる”）べきである。
4. 漏出の回避。水の漏出は、内部から外部環境へ水の架橋を生み出す可能性があり、細菌がそこを通して装置に侵入する可能性がある。保存タンクは、大気由来の微生物侵入を回避するために、通気口にフィルタを併せて装備されるべきである。それらは、窒素のような不活性気体の“毛布”の下に保たれることも可能である。
  5. 高温での保存および配分。前述の管理における最善の試みがあるにもかかわらず、内毒素を放出するバイオフィルムのリスクは非常に重大であると考えられることから、ほとんどの製薬企業は 65°C以上に維持された保存および配分の温度を義務付けている。もし、製薬企業が計画通りに、低温においても機能すると実証できる十分なデータを保持していれば、より低温でも受容される可能性はある。  
しかし、65°Cはほとんどの製造工程では高温すぎる温度であると考えられるべきである。このことは、使用点では一般的に何らかの冷却機構が備えられていることを意味する。この目的のために使用される熱交換器は、内毒素および細菌汚染の供給源となる可能性があり、したがって、高温循環の利点の多くを相殺し得ることは留意されるべきである。
  6. パイプやタンク内に加工された表面の使用、それらの（有毒物質の浸出リスクを引き起こさないような）適正使用がバイオ汚染の対処に役立つ<sup>12</sup>。

## 冷水装置

精製水の装置は、品質を維持するために、高温の代わりに、一般的にはオゾン、紫外線、インラインフィルタを用いている。考慮すべき重要な点は：

1. オゾンは、定期的に殺菌化に使用される。それは、微生物の外表面を攻撃し、細胞壁と細胞膜を破壊する。
2. 紫外線は、いくつかの微生物を減少させる特性を有するが、滅菌剤ではない<sup>13</sup>。効果は、経路長、流速、光源の年数に依存する。製薬の水処理装置における微生物減少に

ほぼ共通して使用される波長は、254 ナノメートル(nm)である。紫外線は、その効果は、しばしば、不十分な維持管理または多機能ランプによって減少されるが、殺菌剤として使用されるオゾンや過酸化水素の分解過程の触媒としても用いられる。

3. フィルタは、微生物の集落形成に対して理想的なマトリックスである；圧力差を注意深く監視することや頻回の殺菌化または交換を必要とする。万が一、フィルタにバイオフィームが生じた場合は、殺菌化によってバイオフィーム内のほとんどの微生物を殺傷できるが、おそらくマトリックスを取り除かないことで急速に集落が再形成される可能性がある。加えて、集落内の高度耐性を持つ“存続細胞”の存在が、影響を受けずに残存し、再び生育するだろう。
4. 熱可塑性の材料は（低温では）ステンレスよりも生物付着を受けないために、冷水装置では一般的にそれらを用いる。配管を構成するために用いられるプラスチック材料は、典型的には、ポリプロピレンまたは PVDF である。
5. 配管中の屈曲は、できる限り、なだらか、かつ少なくすべきである；タップポイントは、最小限にされるべきである。水の穏やかな流れを妨げることは、乱流を生む結果となり、循環する微生物が集落形成可能な表面に付着する機会をより多く生み出すことによって、バイオフィーム形成を促進する。

## 使用点

製造エリアの水の地点は、循環する水のループから輸送管（またはチューブ）を經由した利用点までを含む水輸送と関連しており、ポリ塩化ビニル (PVC)、塩素化 PVC、ポリプロピレン、または PVDF のように適切な無害化された材料で製造されるべきである。輸送管は、使用後は排水され、(24 時間ごとのように) 定期的に交換されるべきである；シンクからの飛び跳ねやエアロゾルからの集落再形成を防ぐために、管理が実施されなければならない。新たな管材は、設置前に殺菌化されるべきである；(一定時間、または決められた水量で) 使用前の洗浄は、管材と放出口では共通事項である。これらの対策が、輸送過程の間での水の汚染を回避するために実施される。

## 上手くいかない時には

水装置管理の欠損や微生物汚染は、多くの原因を有する可能性があり、それらの原因には、老朽化したレジン、老朽化したフィルタ、不十分に維持された紫外線、不適切な管理、効果的な熱の分布の未達成、(熱変換器のような) 漏出、デッドレグ、そして水装置の修繕（例えば、配管中の切断）を含む。

## 水装置の取り扱い

水の質を修正、改善するために様々なオプションが利用できる。選択される方法は、微生物による劣化の原因、問題の根源、水質の要件、取り扱う量、そして配分装置の様式に

依存する。装置設計は、微生物集落のサイズやそれに対する除去能に影響する可能性がある。デッドレグ、タップまでの長い配管、排水不可能なパイプ、そして U 字管なども微生物学的な問題を生む可能性がある。

微生物汚染を除去するために、4つの方法が日常的に用いられている：熱、化学物質、濾過、紫外線である。それぞれにおいて、接触時間が重要である。

先述の通り、熱は、(75°C以上が最適とされる場合) 65°Cから 80°Cで維持される温水装置の循環の中で利用される。これが不十分である場合には、装置を加熱する適応を有するべきである(一時間以上、121°Cまで熱を加える)。

化学物質的処理(例えばオゾン、塩素、二酸化塩素、過酸化水素、過酢酸、そして水酸化ナトリウム)は、非加熱の水に対して適しているが、蒸留、脱イオン化、そして逆浸透によって生成された水の配分装置を処理することにおいても利用できる。使用される化学物質濃度は、配分装置の水の状態に依存する。例えば、塩素処理は、最低値 0.2mg/L の遊離塩素濃度が達成されれば、一般的に有効である。接触時間は、水温と pH で変化するだろう；0.2mg/L の遊離塩素濃度に対する基準の時間は 30 分から 60 分である。さらに重要なことは、加えられたどの化学物質も、どこかのポイントで除去されなければならない。

0.22 マイクロメートル ( $\mu\text{m}$ ) の多孔性膜を用いた膜濾過法は、使用が穏やかで連続した水循環が維持される場合(すなわち、使用するために放流されるもの以外は、水は持続的

**“微生物のほとんどはグラム陰性菌であり、細胞溶解を経て、内毒素の供給源となりうる”**

に保存タンクに戻され、再濾過される)には適切である。原理上は、濾過は良好に作用するが、処理量が多い場合には、遮断と“grow-through”を防ぐための定期交換を要するために、比較的高価となる。この理由から、製造工程で用いられる水の汚染管理に 0.22 $\mu\text{m}$  のフィルタを使用することは難色が表示されている。フィルタは配分過程の前段階でのみ用いられるべきである。

紫外線照射 (254 nm) は、良好な光学的透明度を有する水の滅菌に用いられる；それは複数のランプ装置の上を水が流れる再循環装置において、特に機能する。接触時間は量と流速に応じて変化するが、通常は、1 から 10 秒の範囲内にある。この時間は、紫外線が水の中を浸透し、存在する細菌と接触するのに必要とされる。

### 微生物学的モニタリング

頻回なモニタリングは、微生物学的な管理を確認するために重要である。これは、典型例として、膜濾過法による微生物測定法や、選択方法として R2A のような低栄養寒天培地を使用するバイオバーデン評価を含む(図 4)。該当する場合、内毒素試験として *Limulus Amebocyte Lysate* 試験 (LAL 試験 : *Limulus polyphemus* の血球抽出物から調製されるライセート試薬を *Limulus Amebocyte Lysate* と呼ぶ) も推奨される。いずれの場合でも、

実行または警告を行う境界点は、妥当性検証データに基づかなければならず、通常の稼働状況からの重大な変化を通知するために十分低く設定されなくてはならない。

## 結論

製薬企業の水配分装置では、微生物の付着は、バイオフィルムの形成、水汚染の悪化、飲用水の美観の減少、配管の腐食割合の増加、生存する病原体の増加を通じた微生物学的安全性の低下、を引き起こす可能性がある。それゆえ、微生物の管理は、エンジニア、生産担当者、そして、微生物学者にとっての懸念事項である。

本稿では、水装置中の微生物学について概説し、医薬品グレードの水の設計、管理、生成方法の全体像を示した。設計と管理のそれぞれの側面については、これまでも議論されているが、おそらく最も重要な 2 点は、静水（それは常に汚染の供給源である）を回避すること、そして、水装置のそれぞれのステップで適切な場所に殺菌化のための設備を置くことである。

本文以上

<図表の説明>

図 1 一般的なバイオフィルム形成

図 2 水装置における微生物数はバイオフィルム形成後に指数関数的に上昇する

図 3 デッドレグを伴う不十分な設計の配管

図 4 膜濾過試験