

博士論文

食品・医薬品製造における洗浄工程の工程能力指数を用いた統計的評価
(Statistical evaluation of cleaning processes in food and pharmaceutical
manufacturing using process capability index)

平成30年 9月

上永吉 剛志

山口大学大学院創成科学研究科

目次

第1章	序論	4
第1節	研究の背景.....	4
第1項	食品企業を取り巻く環境.....	4
第2項	医薬品企業を取り巻く環境.....	4
第2節	研究目的.....	5
第3節	論文の構成.....	7
第2章	工程能力を用いた洗浄工程の統計学的評価	9
第1節	はじめに.....	9
第2節	工程能力指数を用いた解析.....	9
第3節	洗浄能力値による評価.....	12
第4節	まとめ.....	14
第3章	食品製造工場の洗浄統計解析	15
第1節	はじめに.....	15
第2節	洗浄能力を用いた評価.....	15
第1項	工程能力指数を用いた解析.....	16
第2項	洗浄能力の観点からの評価.....	17
第3項	考察.....	18
第3節	まとめ.....	19
第4章	医薬品製造設備の洗浄統計解析	20
第1節	はじめに.....	20
第2節	バイオ医薬品の製造.....	20
第3節	洗浄データの統計解析.....	24
第1項	工程能力指数を用いた解析.....	24
第2項	洗浄能力の観点からの評価.....	27
第4節	まとめ.....	28
第5章	バイオ医薬品における洗浄不活化評価	29
第1節	はじめに.....	29
第2節	洗浄工程後の不活化評価.....	30
第1項	実験方法.....	31
第3節	結果及び考察.....	34
第1項	結果.....	34
第2項	考察.....	38

第4節	まとめ	39
第6章	結論	40
第1節	各章のまとめ	40
第2節	品質工学的知識統合モデルの構築	41
NOMENCLATURE		45
参考文献		46
引用 URL		50

第1章 序論

第1節 研究の背景

第1項 食品企業を取り巻く環境

日本の食品製造業は、日本の製造業中で12.5%の就業者を占め、一番多くの就業者を雇用する最も巨大な産業であるが、食品製造業の生産性は、全製造業平均の約6割程度と低迷している[1, i-iii]。食品製造業は、昨今の食品企業による相次ぐ不祥事の影響もあり、規制当局による食品安全制度強化の動きが顕在化されたため、安全性を確保するための食品衛生管理手法であるHazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)の遵守などが最優先されている[2]。また、食品の消費者ニーズ多様化を背景に製品ライフサイクルの短期化が進んでおり、消費者の嗜好の変化に合わせて短期間で次の新製品を開発しなければならないのであるが、食品企業の売上高に対する研究開発費は、約1%程度と極めて低い状況である[3, iv]。

食品製造業の競争力を強化するためには、幅広い視野に基づき課題解決に向けた常により良いオペレーションを追求しようという考え方が必要になる[4]。そのためには、生産性の向上を念頭にコスト削減や製造プロセスの効率化が急務であり、最終目的である売り上げと利益を追求することになるのであるが、生産性を重要視するあまり食品の品質や安全性が疎かになってはならず、この複雑な現状が食品製造業のジレンマとなっている[v]。食品は、製品ライフサイクルの短期化、製造過程の生産性向上、高度な安全性の確保などの高いハードルがあり、これまで品質を損なうことなく最も効率的かつ経済的に食品を提供するための研究が少なく遅れている[5, 6]。

第2項 医薬品企業を取り巻く環境

医薬品の最も顕著な特徴は、それが人の生命との関連性が強い製品であるという点である。この人の生命との関連性が強いという特徴のため、製造プロセス開発には、安全

か安全でないか、効くか効かないかという判断基準がはっきりしている[7]。新薬の開発はとても難しく、近年では新たな疾患領域の開発が拡大するとともに高度な安全性が要求されるようになり、研究開発に要する時間は長期化する傾向にある。従って、研究開発期間では当局の基準に沿って安全性と有効性の評価にほとんど時間が費やされることになり、このことは医薬品企業にとって大きな経済的負担である。このため医薬品企業は継続的改善を進めており、工程の最適化によるコスト削減を目指しオペレーショナル・エクセレンスが導入されてきている。

オペレーショナル・エクセレンスを確立した企業では、業務オペレーションあるいは業務改善プロセスが現場に定着し、業務オペレーションを競争上の優位性にまで徹底的されている。そして、常により良いオペレーションを追求しようという考え方が現場の末端まで浸透し、継続的なオペレーションの進化を可能にする仕組みができている状態にあるとされる。しかしながら、一般的にオペレーショナル・エクセレンスは、Total Quality ManagementやLean Six Sigma等の業務改善手法の考え方で、供給リスクの最小化を目指す医薬品への導入は適用範囲が限定的で極めて困難である。そこで医薬品の競争力を強化するためには、研究開発のみならず幅広い視野に基づき課題解決に向けた議論が医薬品業界には必要になるのであるが、医薬品は製造過程の変化に敏感、複雑な製造方法、高度な品質要求などの高いハードルがあり、これまで製造プロセスまで踏み込んで議論された研究事例が見当たらない[8]。最近になり、医薬品業界でようやくこの問題を論じられるようになったが、原薬から製剤製造までの様々なプロセスを対象に全体がシステムとしてうまく機能できるような製造プロセスが十分に明らかにされていない。特に抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品は、製品開発や技術が大きく進歩する一方、生体特有の自由度の高いプロセスであるため、規制当局の関心が非常に強く、医薬品製造における製造・品質管理の基準「Good Manufacturing Practice」(以下、GMP)の遵守や安全性などが最優先されてきたため、品質を損なうことなく最も効率的かつ経済的に医薬品を開発し提供するための研究が遅れている。

第2節 研究目的

食品や医薬品の品質トラブルは、健康被害に直結する重大なリスク要因である。世界的に食品や医薬品の事故がクローズアップされるようになったことから、品質工学的な手法の要求が高まっており、本研究では製品の安全性と品質を保証する上で欠かせない

必須のプロセスである洗浄工程に焦点を当てた。これまで洗浄技術は、汚れの種類や性質といった洗浄対象物に対する汚れのメカニズム、汚れを除去するための洗浄剤及び洗浄方法、あるいは物理的な作用による洗浄を実施する装置を中心に多くの研究開発が進められてきており、特に品質工学に基づく汚れの測定、基準値の設定、洗浄評価法等に関する研究は不十分である (Figure 1-1)。

そこで本研究では、洗浄工程の管理基準の最適化を目指し、より進んだ手法として品質工学の統計的管理手法の一つである工程能力指数を用い、新たに洗浄データからその能力を定量的に評価する手法を検討し、提案した。更に洗浄工程によるタンパク質の不活化が洗浄バリデーションの裏づけになるという観点から、信頼性のある有効な不活化評価手法の検討を実施した。

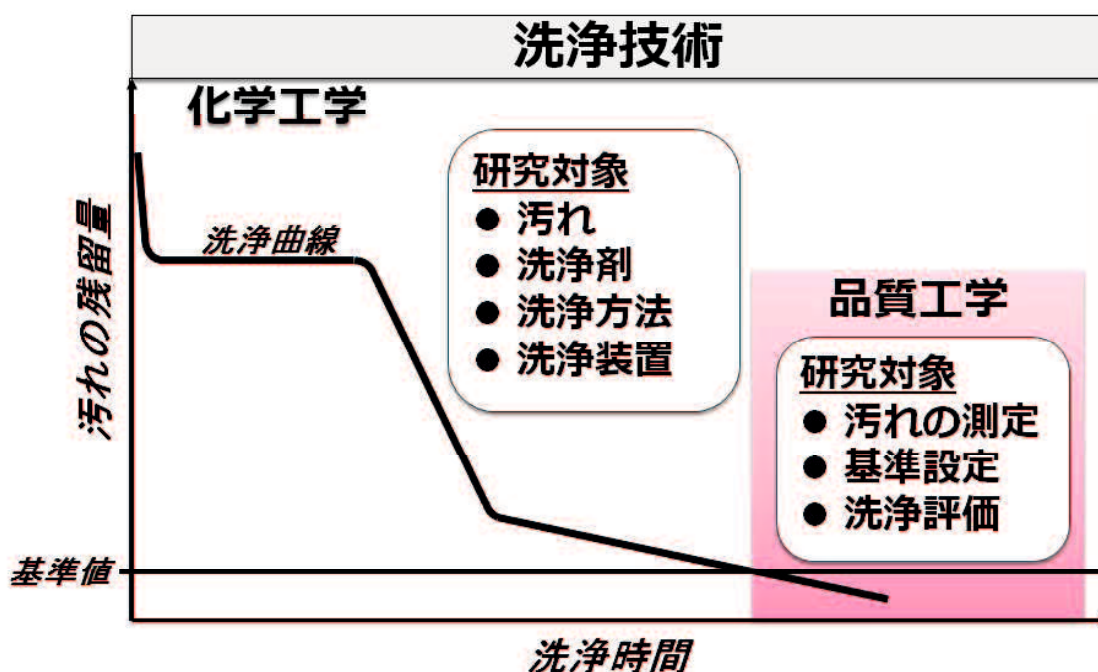


Figure 1-1: Components of cleaning Technology

第3節 論文の構成

本論文は、序論と結論を含む6章で構成される(Figure 1-2)。最初に第1章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、品質リスクマネジメントの指標の1つである工程能力指数を用いて評価する手法を検討した。洗浄工程は、許容限度値以下となるように洗浄するため、洗浄基準値は、上限規格で設定される。従って、洗浄能力を評価する場合、上限規格値を考慮した工程能力指数(以下Cpuと称する)で算出した。また、洗浄対象品目ごとの基準値によらず設備の洗浄能力そのものを評価する手法として、製造設備の積み上げられた実績値を基にあるCpuの値を目標値として設定した場合の残留量の統計学的期待値を洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示す値として、洗浄能力値(以下Pckと称する)を新たに考案した。

第3章では、第2章において提案した工程能力指数による洗浄能力の評価手法について、宮城県産業技術総合センターで検討された食肉加工工場の洗浄の報告をもとに考察した。この報告では、自主管理として現在主に利用されている蛍光法によるATP測定(単位:RLU(Relative Light Unit))と、さらなる方法として油脂残留物量測定の併用を推奨している。しかしながら、Cpu及びPckの解析からは、ATP測定での評価は信頼性に欠ける結果といえ、洗浄の評価手法そのもの、又は基準値の設定方法を見直す必要があるが分かった。また、Cpu及びPckという統計学的な工程能力指数ツールを用いて評価する手法は、具体的な設備の洗浄能力そのものを統計学的に数値化することで、より科学的な管理基準に基づく現場での安全判断がより容易となり、信頼性の高い管理が継続的に可能になることを示すことができた。

第4章では、実際の抗体医薬品製造設備で実施されている洗浄工程の実績データをもとに、工程能力指数を用いて洗浄能力の評価手法を検証した。製造プロセスの機器ごとに算出したCpuの解析により、一般的な抗体原薬製造設備におけるエンジニアリング的な知見とクリーニングデータが一致していることを定量的に示すことができた。また、Pckを使用して、今後の洗浄バリデーションプロトコルを検討する上で重要な要素となる洗浄サンプリング箇所及びサンプリング数の妥当性検証や洗浄不良のリスク軽減などの検討を可能とする手法を確立することに成功した。

第5章では、第4章の評価結果をもとに更に抗体医薬品の不活化あるいは構造や活性の変化をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)及び表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いて評価した。その結果、モノクローナル抗体は、

洗浄工程の過程で実施されるアルカリ処理及び熱処理により構造的に分解し、結合活性も失われることが明らかになり、不活化評価を工程能力指数による解析と組み合わせた新たな評価手法を開発することができた。

最後に第6章では、結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

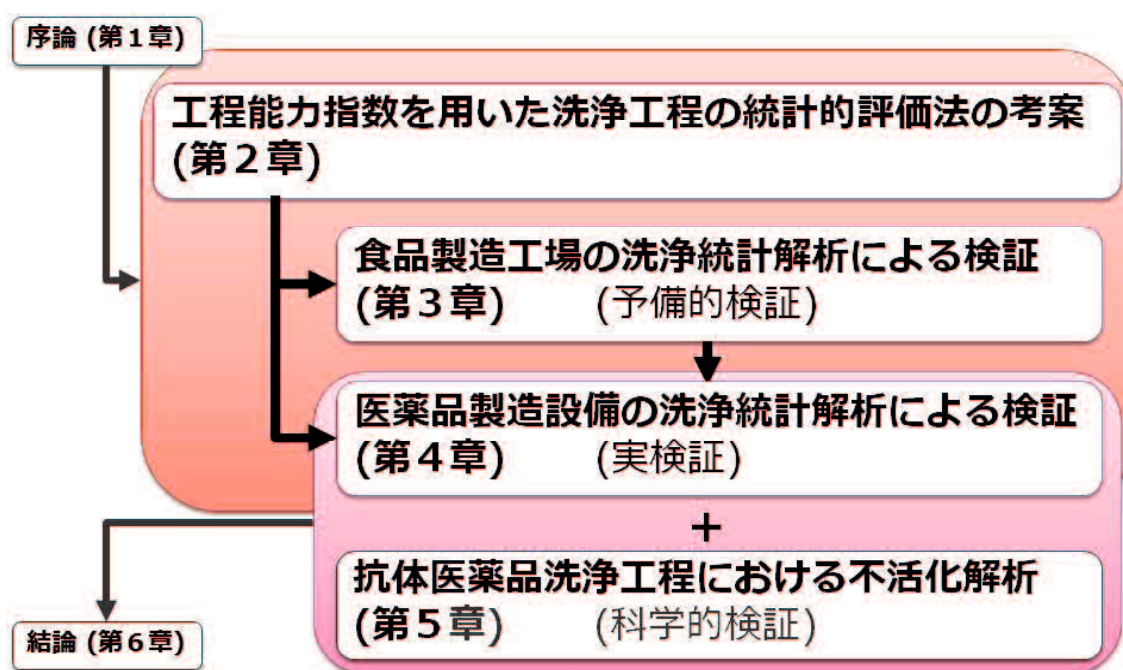


Figure 1-2: Chapter Organization

第2章 工程能力を用いた洗浄工程の統計学的評価

第1節 はじめに

食品や医薬品の製造現場の多くは、未だに熟練されたオペレーターの知識と経験に頼って、それぞれのプロセスに応じた現場調整を行い、慎重に製造を行っているのが実態である。高品質な製品を製品ライフサイクルにわたって供給していくためには、継続的な製造プロセス改善を行えるシステムを確立することが重要となる。特に品質に影響を与える重要制御パラメーターについては、ロバストな管理をしていくために、過去の製造データから統計学的手法で、製造実績に基づいた管理基準の検討を進める必要がある。

食品や医薬品の製造プロセスは単位操作の組み合わせであり、異なるサイズの複数のタンクやモジュール化された多様なスタンドアローンシステムが必須となっている。この製造プロセスでは、使用する機器が多く、洗浄範囲が広いことが特徴となっており、この特徴がハードルとなって製造プロセスの洗浄工程全体を相対的に評価する手法の研究が遅れている。

そこで本章では、洗浄工程の管理基準の最適化を目的に、品質工学の統計的管理手法の一つである工程能力指数を用い、新たに洗浄データからその能力を定量的に評価する手法を検討した。

第2節 工程能力指数を用いた解析

管理状態にある工程、又はデータが正規分布に従うあるいは仮定した工程における品質達成能力が、工程能力(C_p)である。 C_p とは、その工程能力を数値化したもので、上側規格限界(USL)と下側規格限界(LSL)の間の距離である規格幅を工程のばらつきである標準偏差の6倍(6σ)と比較したもので(Figure 2-1)、その計算は式(Equation 2-1)となる。 C_p は規格限度内で工程を完了する能力を表す尺度であり(Table 2-1)、一般的に不良率のリスクがない1.33($4\sigma/3\sigma$)以上の値であれば十分な能力を備えていると見なされている[9]。

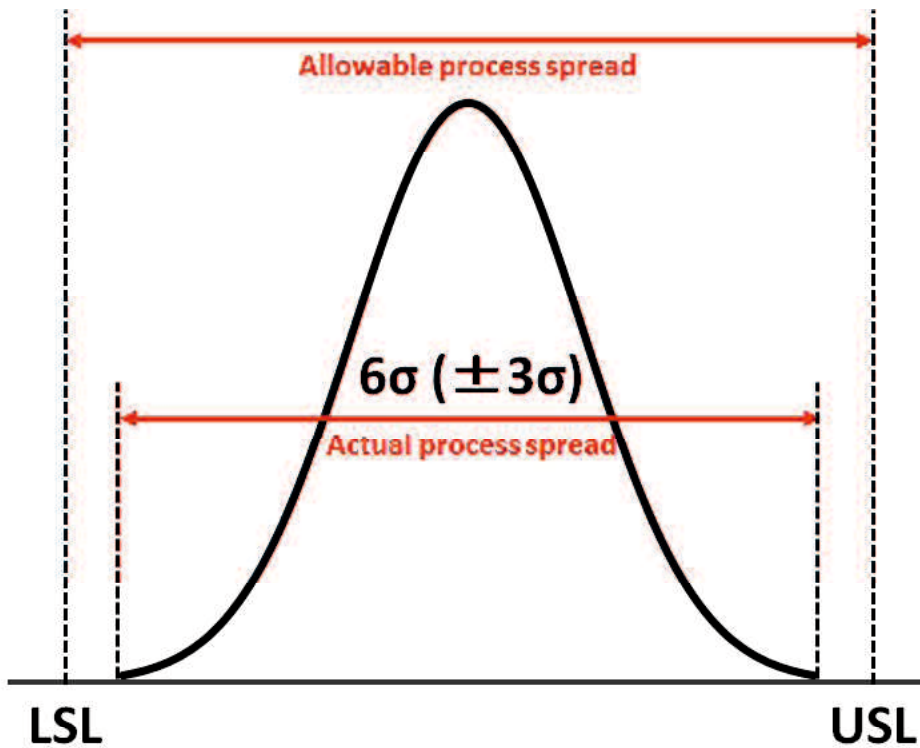


Figure 2-1: Comparison of actual process spread to allowable process spread

$$C_p = \frac{USL - LSL}{6\sigma} \quad \text{(Equation 2-1)}$$

Table 2-1: Acceptance value of process capability

Process capability	Defect rate	Acceptance
0.33 (1σ/3σ)	31.7%	Not capable
0.67 (2σ/3σ)	4.5%	Not capable
1.00 (3σ/3σ)	0.27%	Not capable
1.33 (4σ/3σ)	0.0063%	Capable
1.67 (5σ/3σ)	0.000057%	Capable
2.00 (6σ/3σ)	0.0000002%	Capable

しかし、実際には測定した値が平均値と規格値が同じにはならず、規格の中心から外れるケースもあり、規格が上下一方に著しく近くなっていることがある。この場合、平均値の偏りを考慮してCpの計算が補正され、平均値から平均値に最も近いものまでの幅を見ることになり、この工程能力指数はCpkと呼ばれる。Cpkには、ばらつきと上限規格と下限規格の両方の最小値を評価する両側規格と工程平均値と規格限界の上限又は下限との差異を評価する片側規格があり、特に上限能力指数をCpu、下限能力指数をCplと呼ばれている。つまり、片側許容範囲の場合、Cpkは指定された許容範囲に応じてCpu又はCplと等しくなることになり、それぞれ式(Equation 2-2) (Equation 2-3) (Equation 2-4)と定義される。

When upper and lower specification limits exist

$$Cpk = \min[Cpu, Cpl] \quad (\text{Equation 2-2})$$

When upper specification limit exists

$$Cpu = \frac{USL - \mu}{3\sigma} \quad (\text{Equation 2-3})$$

When lower specification limit exists

$$Cpl = \frac{\mu - LSL}{3\sigma} \quad (\text{Equation 2-4})$$

洗浄工程は、微生物汚染、異物汚染又は交叉汚染等のリスクから製造設備を保護し、汚染物質を確実に設定した許容限度値以下となるように洗浄するため、洗浄基準値は式(Equation 2-3)の上限規格で設定される。従って、洗浄能力を評価する場合、平均値は洗浄データの平均値、標準偏差は洗浄データの標準偏差式となり(Figure 2-2)、洗浄工程の工程能力指数である Cpuは、式(Equation 2-5)の様に定義される。

尚、管理状態にあるが本質的に非正規である工程で行われる工程能力評価は、正規性の前提とする解析を利用すると誤りのある評価を導くリスクがあるため、非正規工程能力評価技術を使用することを留意すべきである。

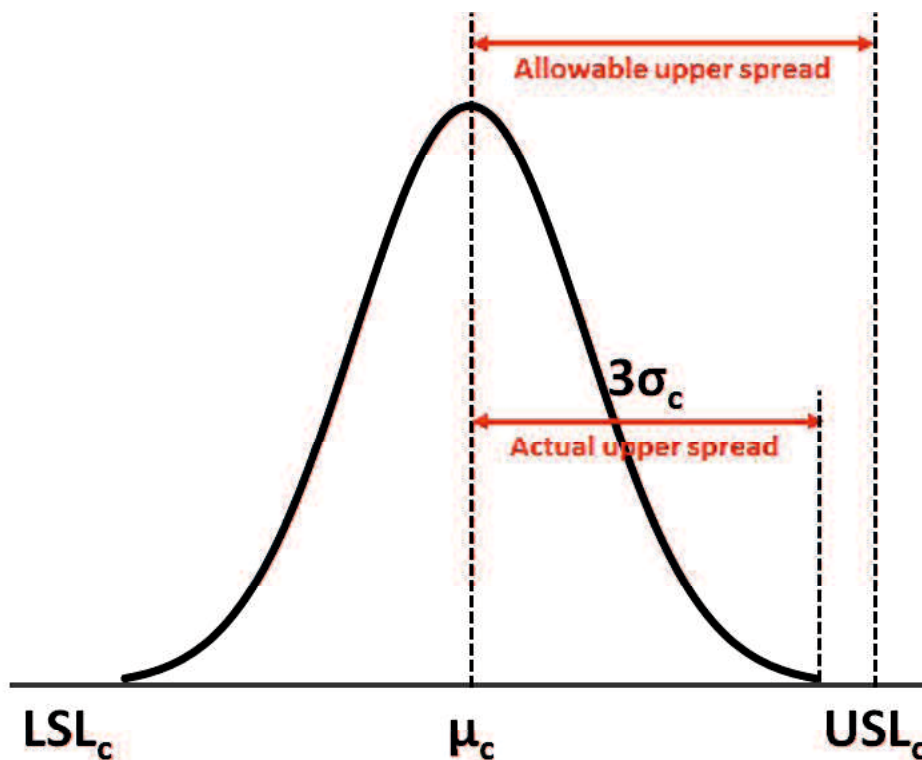


Figure 2-2: Comparison of the spread of cleaning process data to the spread of the specification limit for cleaning process data

Cpu for cleaning process

$$Cpu = \frac{USL_c - \mu_c}{3\sigma_c} \quad \text{(Equation 2-5)}$$

第3節 洗浄能力値による評価

ここで統計学的に洗浄工程の能力を評価する場合、2つの観点と考えられる。1つ目の観点は洗浄対象品目が基準値以下まで洗浄対象物を除去できるかであり、他方の観点は洗浄対象品目の管理基準値の難易度によらず洗浄対象物をどのレベルまで除去できるかである。

前者は、洗浄対象品目そのものの基準値によって消費者の安全を担保できるレベルま

で洗浄対象物を除去できるか評価するのに適しており、特に複数品目を製造する食品や医薬品の製造設備では必須の評価である。

後者は、洗浄対象品目ごとの基準値によらず設備の洗浄能力そのものを評価するのに適していると考えられるが、食品や医薬品業界ではこれまであまり実施されてこなかった。ここでは後者の方法について検討し、設備の積み上げられた実績値(accumulated)を基に、あるCpuの値を目標値(desired)として設定した場合の残留量の統計学的期待値を式(Equation 2-6)により算出した。この期待値は、洗浄のCpuの算出式である式(Equation 2-5)から逆算されるものであり、洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示すものであることから、洗浄能力値(Cleaning Performance Value) (Pck)と表現する。

Cleaning performance value based on actual cleaning results of manufacturing facility

$$Pck = Cpu_{(desired)} \times 3\sigma_{(accumulated)} + \mu_{(accumulated)}$$

(Equation 2-6)

つまり洗浄能力値Pckは、Cpu(desired) =1.33となるときの設備の残留物の期待値であり、今回のケースでは製品Xと製品Yの洗浄データから算出された洗浄能力値(A ppm)として表される。この洗浄能力値が仮に新たな製品Zの洗浄基準値(B ppm)よりも低ければ、 $B \text{ ppm} > A \text{ ppm}$ となり、現在の洗浄方法で十分に洗浄が可能という予測を立てることができる(Figure 2-3)。

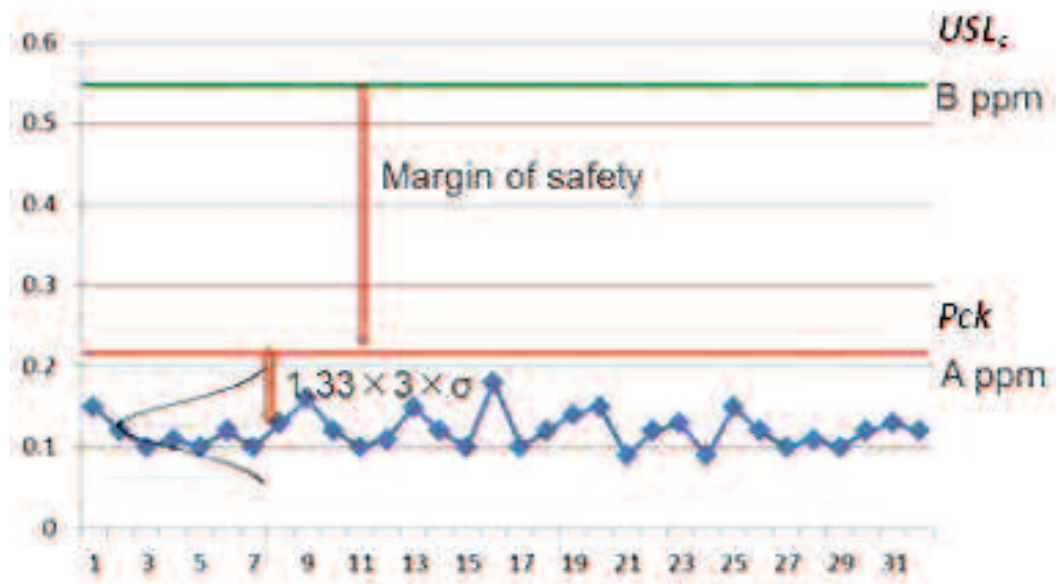


Figure 2-3: Cleaning limit and cleaning performance value

第4節 まとめ

本章では、食品及び医薬品製造における製造工程の管理基準の最適化を目指し、品質工学のフレームワークを適用した製造工程の新たな効率化手法の検討を進め、まず食品及び医薬品製造の安全性と品質を保証するうえで欠かせない必須条件である洗浄工程に注目し検討した。洗浄の難度が高い食品や医薬品の製造設備において、品質工学の工程能力評価手法の一つである工程能力指数を用い、洗浄能力を定量化する手法を確立した。更にこれまでの製造実績データを解析し、洗浄対象品目ごとの基準値によらず設備の洗浄能力そのものを評価する手法として洗浄能力指数を考案し、製造能力を初期の段階から把握することができるフロントローディング型のロバストなモデルを構築した。尚、洗浄性は製品毎に大きく異なることがあるため、このアプローチは全てのマルチユースに適用できる訳ではない。通常、一つの設備又は装置で製造される製品群は、粘度や基本的な組成などに関して互いに似通った特性を持つため、cleanabilityも狭いレンジ内にあると期待できることが、この解析方法の前提となっていることに留意すべきである。

第3章 食品製造工場の洗浄統計解析

第1節 はじめに

2007年以降、世界的に食品事故が社会問題となり、食の安全がクローズアップされるようになったことから、品質工学的な手法の要求が高まっている。そこで本章では、製品の安全性と品質を保証する上で欠かせない必須の条件である食品製造の洗浄評価に焦点を当てた。食品製造設備おける清浄度維持のために利用される最も一般的な手段は、洗浄剤による洗浄や高圧蒸気による滅菌である。製造使用後の設備機器を衛生上、品質管理上常に清潔に保つ必要があるため、複雑な配管ラインやタンク類を分解することなく、洗浄剤や高圧蒸気を流すことによって内部を定置洗浄(CIP)や定置滅菌(SIP)する方法が年々広く採用されるようになってきている[10, 11]。実際の食品製造ラインでは、その清浄度を目視判定するにも限界があり、特に洗浄の頻度や時間といった設定条件は、スワブ法やリンス法等の試験により実際の残留量を測定することで最適化される。

本章では、洗浄工程の管理基準の最適化を目指し、品質工学の統計的管理手法の一つである工程能力指数を用い、新たに食品の洗浄データからその能力を定量的に評価する手法を考察する。

第2節 洗浄能力を用いた評価

2016年のHACCP制度化検討の動きに伴い、製造現場において洗浄後の清浄度確認が求められるようになりつつある。清浄度の科学的検証には従来の細菌検査に加え、予防への活用法を含めATP測定、油脂残留物量の測定、発色反応測定等の評価法が迅速衛生検査ツールとして開発されてきている[12]。食品の品質や安全性を担保するためには、科学的な根拠に基づいたリスクマネジメントが必須であり、この考え方は食品製造設備の洗浄基準値についても適用が進んでいる[13]。しかしながら、洗浄の管理規準値は食品衛生法等で決められていないため、自主管理として設定しなければならず、食品の安全リスクの最小化を目指す食品工場への導入は適用範囲が限定的で極めて困難である。食

品の衛生管理を強化するためには、幅広い視野に基づき課題解決に向けた議論が必要になるのであるが、これまで継続的な衛生管理の進化を可能にする仕組みまで踏み込んで議論された研究事例が見当たらない。

羽生の報告によると、食品製造工場内の衛生管理状況把握の手段として、菌数検査や異物混入検査は数値もしくは有無で判定するため管理しやすいが、清浄度検査は目視判定など経験に基づく対応を行っていることが多く、スタンダードとするためには検査方法、基準値、基準値の設定方法、頻度などに課題があるとしており、清浄度を中心に食品工場の現状調査を行い、ATP測定や油脂残留物量測定による検出法について検討している[14]。羽生の報告の中では、食肉加工工場の製造ラインを洗浄後に拭き取り、食品工場の自主管理として現在主に利用されている蛍光法によるATP測定(単位：RLU(Relative Light Unit))と、さらなる方法として油脂残留物量測定による洗浄の残留状況の調査を行っている。残留度調査の洗浄基準値をそれぞれ設定し、ATP測定値については、RLU 0以上RLU 1,500未満を「良好」、RLU 1,500以上RLU 4,000未満を「注意」、RLU 4,000以上を「不良」、油脂残留物量については0.0 mg以上2.5 mg未満を「良好」、2.5 mg以上25.0mg未満を「注意」、25.0 mg以上を「不良」と判定している。この調査結果として、油脂分を多く含む食品を取り扱っている場合は、ATP測定のみでの清浄度判定では不十分で、ATP測定値は良好であっても油脂の残存が見られ細菌検査が陽性である場合あり、清浄度をより正確に知るためにはATP測定と油脂残留物量を測定するのが望ましいと結論付けている。

第1項 工程能力指数を用いた解析

第2章で検討した上限規格の設定値である工程能力指数Cpuを用いて、この食肉加工工場の洗浄データの正規性を前提に評価を実施した。その結果、ATP測定値では不合格率が高いためRLU 4,000未満の合格となった測定値で評価したところ、Cpuは0.68と2σである0.67に近い非常に低い値になった。一方、油脂残留物量測定値はCpuが3.93と6σである2.00を大幅に超える高い値となった(Table 3-1)。

Table 3-1: Result of an evaluation of ATP testing and residual oils & fats based on cleaning data

ATP testing

Cpu (-)	0.33 desired	0.67 desired	0.68* actual	1.00 desired	1.33 desired
Pck (RLU)	2,818	3,962	4,000 _(USLc)	5,072	6,182

*The failed cleaning data is not included in calculation of Cpu.

□: not applicable

Residual oils & fats

Cpu (-)	1.00 desired	1.33 desired	1.67 desired	2.00 desired	3.93 actual
Pck (mg)	7.68	9.63	11.64	13.59	25.00 _(USLc)

Safety margin

第2項 洗淨能力の観点からの評価

第2章で新たに考案した残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗淨できるかを示すPckを求めたところ、ATP測定値は、Cpu(desired) 0.67を超えたところで、残留許容基準であるRLU 4,000以上の数値となるために成立せず、油脂残留物量測定値では、Cpu(desired) 1.33でPck 9.63mg、Cpu(desired) 1.67でPck 11.64mg、Cpu(desired) 2.00でPck 13.59mgとなり、いずれも残留許容基準である25mgを下回る結果となった(Figure 3-1)。

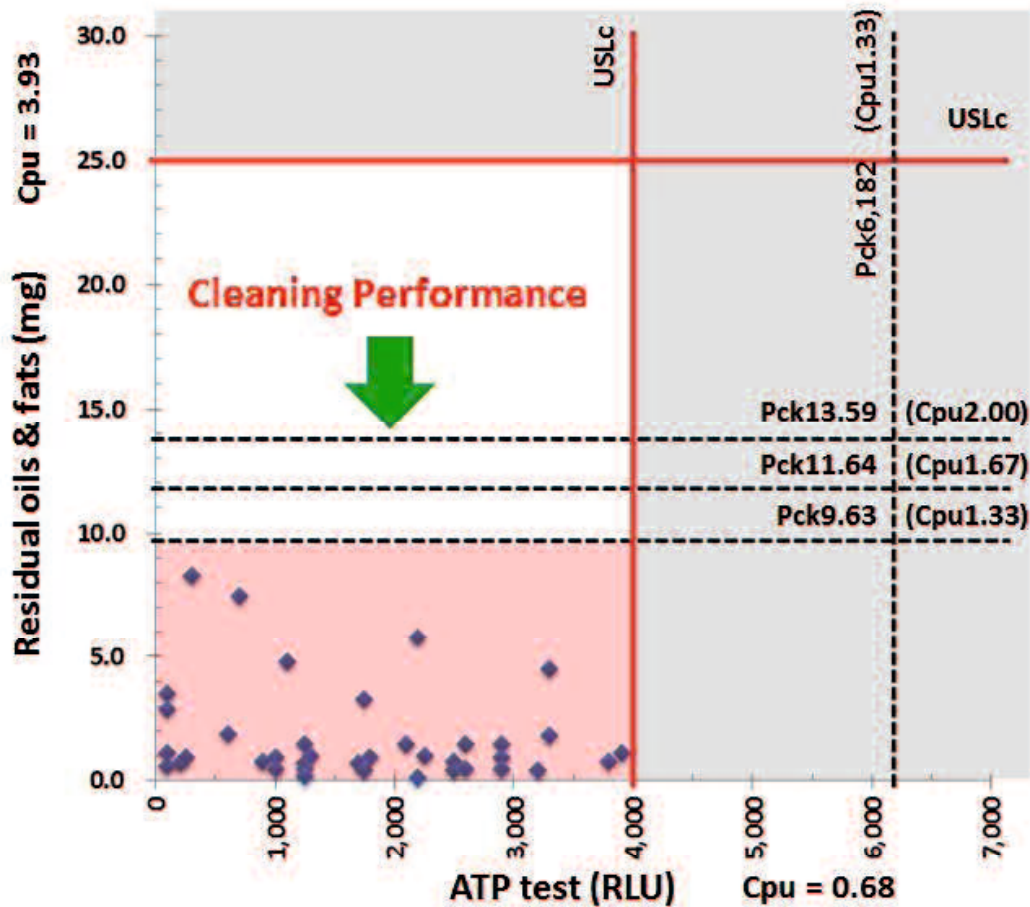


Figure 3-1: Cleaning limit and cleaning performance value of residual oils & fats based on Desired Cpu

第3項 考察

羽生の報告ではATP測定と油脂残留物量測定の併用を推奨しているのであるが、本解析からATP測定での評価は信頼性に欠ける結果といえ、洗浄の評価手法そのもの、又は基準値の設定方法を見直す必要があると考えられる。また、油脂残留物量測定値については、洗浄の工程能力が高いことが確認でき、清浄度を定量的に把握ことが可能な有効な手段と判断できる。また、羽生の報告書の油脂残留物量基準によると、「注意」とする管理幅を2.5 mg以上25.0mgとしているのであるが広くおさえられているため、清浄度の正確な評価が難しく、現場での安全判断がしづらいついたリスクが高くなる可能性がある。残留した油脂がサルモネラの常在化の重要な要因になるとの報告もあり、油

脂含有率が高い食肉を扱う食肉加工工場においては、食中毒の原因となる細菌汚染の低減につながる清浄度評価の手法を確立するが重要である[15, 16]。また、食品製造工程での洗浄対象となる汚れは主に食品残渣が多く、タンパク質や脂質といった様々な成分から構成されるため、洗浄対象となる物質により測定方法が異なる。清浄度の測定方法はそれぞれ特徴や欠点があり、目的により適した方法を選定する場合、慎重な組合せ検討が不可欠である。

第3節 まとめ

本章では、食品の安全性と品質を保証するうえで欠かせない必須の条件である洗浄に焦点を当て、宮城県産業技術総合センターで検討された食肉加工工場の洗浄の報告をもとに品質工学のフレームワークを適用した製造工程の新たな効率化手法を考察した。その結果、有機汚れがプロセス設備に付着しやすく、洗浄の難度が高い食品の製造設備において、品質工学の工程能力評価手法の一つである工程能力指数を用い、洗浄能力を定量化する手法を確立した。

第2章で考案した工程能力指数という統計学的なツールを用いて評価する手法は、具体的な設備の洗浄能力そのものを統計学的に数値化することで、より科学的な管理基準に基づく現場での安全判断がより容易となり、信頼性の高い管理が継続的に可能になることを示すと考えられる。洗浄は機能や構造の因果関係が複雑で、そのメカニズムが判りづらいといった点があり、改善や効率化の重要なポイントは知識の蓄積や統合にある。

次章では品質向上と安定化を念頭に置き、実際の抗体医薬品製造設備で実施されている洗浄工程の実績データをもとに工程能力指数を用いて、洗浄能力の評価手法を更に検証した。

第4章 医薬品製造設備の洗浄統計解析

第1節 はじめに

世界的に医薬品の承認に向けたガイドラインの中で、品質工学的な手法の要求が高まっており、高品質な医薬品を製品ライフサイクルにわたって供給していくために、継続的なプロセス改善を行えるシステムを確立することが必要となる。この流れを踏まえ、医薬品開発の中心となっている日本、米国及び欧州による医薬品規制の世界的な調和を目指す医薬品規制調和国際会議(ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)により製剤開発(以下、ICH Q8) [17]、品質リスクマネジメント(以下、ICH Q9) [18]、医薬品品質システム(以下、ICH Q10) [19]の3つのガイドラインが近年発効された。また、2010年9月にInternational Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE)は、新たなベースラインガイドとしてRisk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products (以下、Risk-MaPP)を発行した。Risk-MaPPは、ICH Q9に基づいた製品の品質及び作業員の安全の確保を両立させながら交叉汚染リスクを管理するための科学的リスクベースド・アプローチを提示するものである[20]。しかし、これらのガイドラインはあくまで概念の内容の記載が中心であり、その具体的な対応については各医薬品企業に委ねられている。

現在、医薬品の安全性を確保するために、薬理学的で毒性学的なリスクを特定し、理解する手法がGMPの中に浸透しつつある[21]。そこで本章では、抗体医薬品をはじめとしたバイオ医薬品における製造工程の管理基準の最適化を目指し、品質工学のフレームワークを適用した製造工程の新たな効率化手法を検証する。

第2節 バイオ医薬品の製造

抗体薬品に代表されるバイオ医薬品生産は、生物反応によって目的物を生産する培養を行うアップストリーム工程と目的物の純度を上げる精製を行うダウンストリーム工程から構成される(Figure 4-1)。

アップストリーム工程では、目的物質を生産するために微生物や動物細胞を培養する。特に抗体は糖鎖構造を持つ高分子タンパク質である抗体医薬品の製造には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞をはじめとする動物細胞が最もよく用いられている。これらの動物細胞は培養する環境の影響を受けやすく、環境を最適化することが重要である[22]。品質や生産性に影響を与える環境因子の代表的なものとして、温度・pH・浸透圧・溶存酸素濃度・溶存二酸化炭素濃度などがあり、培養する環境を適切に維持する必要がある。培養工程の主な製造機器は、培地調整槽、培地貯槽、バイオリアクター、遠心分離装置及び膜分装置となる。

培養工程は、まずセルバンクで液体窒素の気相中に凍結保存されている抗体産生細胞株(CHO細胞)を凍結融解することからスタートする[23]。凍結保存された状態から起眠させたCHO細胞は三角フラスコに播種して継代培養し、増殖に合わせながら播種を繰り返し、バイオリアクターの容量を上げて拡大培養を行う。拡大培養が完了すると培養液を生産用のバイオリアクターに播種し、目的生産物である抗体を生産する。

生産用バイオリアクターの培養が完了したあと、細胞培養液からのハーベストを回収し、細胞分離のための遠心分離と濾過が行われる。細胞分離は培養液中の動物細胞を澄清液と分離する工程で、細胞が破碎されてしまうと細胞内の夾雑タンパク質・DNA(Deoxyribonucleic Acid: デオキシリボ核酸)が漏出してしまうため、できるだけダメージを与えないように細胞を分離する必要がある[24]。このため、遠心力を利用して比重が異なる成分を分離する方法やデプスフィルターなどの膜分離を用いて細胞を分離する方法がとられる。

ダウンストリーム工程は、目的物質の純度を上げるために不純物を除去し濃縮する。抗体医薬品は投与量が多いため最終製品の純度を高くする必要があり、精製工程では、目的物質の不均一性の恒常性、有効成分の純度、目的物質関連物質の含量、宿主由来のタンパク質やDNAなどの目的物質由来不純物、培地成分やクロマト担体から離脱したリガンドなどの製造工程由来不純物の除去が重要となる[25]。特に抗体医薬品の抗体分子は、糖鎖構造等において不均一性を持つため、一定の品質特性を持つモノクローナル抗体を精製するため、精密な分離を可能にするカラムクロマトグラフィーが精製工程における中心的な役割を担っている[24, 26]。精製工程の主な製造機器は、バッファー調整槽、バッファー貯槽、カラムクロマトグラフィー、ウイルス除去膜装置、限外ろ過装置及びプロセス貯槽となる。

細胞分離後のプロセス液は、Protein Aをリガンドにしたゲル担体を充填したカラム

に通液される。Protein Aは黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在するタンパク質で、抗体(免疫グロブリン) IgGのFc領域に特異的に結合する性質を持ち、一般的にこのProtein Aを吸着体のリガンドに用いた抗体精製方法が使用されている。Protein Aのクロマトグラフィー工程で吸着された抗体は、中性のバッファーで非吸着成分を洗浄し除去した後、酸性のバッファーで吸着抗体をリガンドから解離させ、抗体を高率に回収する。カラムクロマトグラフィーは、目的物質とそれ以外の不純物の分子の大きさ、イオン強度、そ水性などの違いによって分離する手法である。抗体生産プロセスでは生物学的親和力を利用した選択性の高いクロマトグラフィーが多く使用されている[27]。最初のクロマトグラフィーでProtein Aに吸着された溶出されたプロセス液中の抗体は、その後低pH処理によるウイルス不活化を行う。低pH下では抗体の高次構造が変化しやすいため、凝集体の生成を引き起こす場合がある。この抗体凝集体はヒトに投与した場合に抗原性を示すことが懸念されるため、後段の精製工程による凝集体の除去及び残留量のモニタリングが求められる。Protein Aでのクロマトグラフィーでは一般的に95%に近い純度までプロセス液は精製されるが、宿主細胞タンパク質などの不純物が多く残っており、引き続きイオン交換クロマトグラフィーで除去する必要があるため、多段のクロマトグラフィー工程が設定される。イオン交換クロマトグラフィーでは、カチオン交換やアニオン交換などのカラムによる精製が行われる。また、特定の不純物を除去する目的で、ハイドロキシアパタイトやミックスモードなどのカラムが選定される場合もある。

次にタンパク質生産に用いられる動物細胞は、ウイルスに感染している可能性があるため、規制当局よりウイルス安全性確保が強く求められており、ウイルス除去フィルターにより精製工程で確実にウイルスを除去する必要がある。生物製剤からのウイルス除去には、一般的に熱処理や化学薬品などによるウイルス不活化法とフィルター除去法がある。フィルターによるウイルス除去は、不活化法に比較しウイルスの残骸が製剤中に残らず、タンパク質の変性の影響が少なく、また、除去原理が大きさの違いによる分離であることから、基本的に溶液の条件によらない確実な方法として広く製造プロセスに用いられている[28]。

ウイルス除去されたろ過は、限外ろ過装置に送られ、ろ過膜の孔のサイズによって分子量レベルで分画され濃縮される。限外ろ過は、タンパク質の濃縮に不可欠な技術であり、限外ろ過膜を用いた脱塩やバッファー交換はダイアフィルトレーションと呼ばれている。ダイアフィルトレーションとは、ろ過と同じペースで溶媒がろ液側に移動し、溶液中から低分子が除去され、高分子が濃縮されていくろ過方式である。

精製工程によって高純度、高濃度されたプロセス液は原薬と呼ばれ、その後、補助剤の添加、無菌化、凍結乾燥、充填包装などの製剤工程を経て医薬品となる。バイオ薬品原薬製造には大量のバッファーや洗浄液を必要とするため、調整準備や貯蔵には多数のタンクが必要である。また、製造機器を支援するための蒸気、注射用蒸留水といったユーティリティー設備や廃棄物処理システムが必須であり、製造支援設備は全ての機器で共用されている。

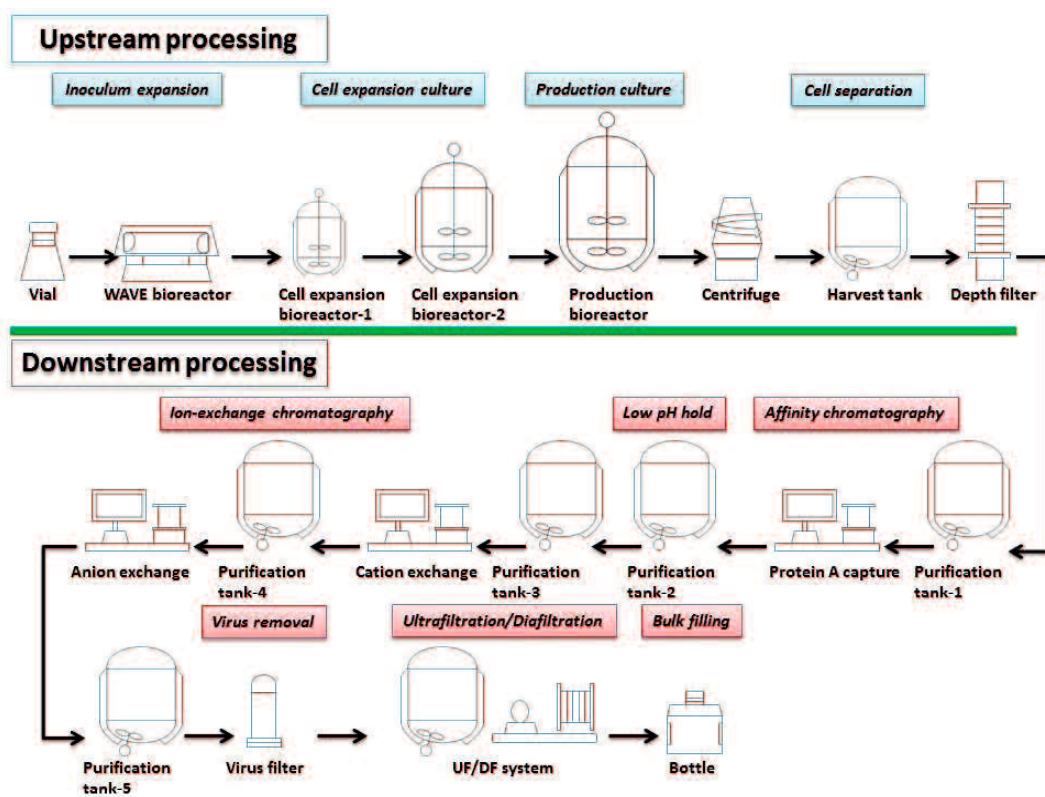


Figure 4-1: Process flow for an antibody production process

第3節 洗浄データの統計解析

品質に影響を及ぼす医薬品製造設備の洗浄作業が、交差汚染防止に対して有効であることを確認し、恒常的に適応できるようにすることを目的とし、まずは抗体医薬品製造の実設備おけるこれまでの洗浄データを整理し、洗浄能力の評価を行った。

バイオ医薬品製造設備おける清浄度維持のために利用される最も一般的な手段は、水酸化ナトリウムを希釈した洗浄剤等による洗浄や高圧蒸気による滅菌である。製造使用後の製造設備機器を衛生上、品質管理上常に清潔に保つ必要があるため、複雑な配管ラインやタンク類を分解することなく、洗浄剤や高圧蒸気を流すことによって内部をCIPやSIPする方法が主流となっている。頻度や時間といった設定条件は、洗浄バリデーションとしてスワブ法やリンス法等の適格性試験により実際の残留量を測定することで最適化する。また、十分な流速が確保できない等の理由により洗浄不足の発生が懸念される箇所については、洗浄剤を系内に満たし、一定時間保持することによって洗浄する方法がとられている。

抗体原薬の製造プロセスは、培養工程においてサイズの異なる複数のリアクターを使用することに加え、精製工程においてはクロマトシステムや多くのタンク類を使用する単位操作の組み合わせとなっている。このため、使用する機器が多く、洗浄範囲が広いことが特徴となっている。

第1項 工程能力指数を用いた解析

今回、抗体原薬製造設備を製造プロセスの機器について、製品Xの洗浄データを洗浄対象品目ごとの基準値に対する百分率を取ることによって標準化し、平均値、標準偏差及びCpuを算出した(Table 4-1)。

まず培養槽であるが、小・中容量の拡大培養のバイオリアクターに比べ、大容量の生産培養のバイオリアクターのCpuが低い値となっている。培養槽の洗浄は上部鏡部に設置されたスプレーボールと大型のインペラを擁した上部攪拌機を回転させることで機械的に実施されるのであるが、構造的にインペラ設置高さより上部はスプレーボールのみでの洗浄となる。培養中は著しい発泡が生じるので、培養槽の上部空間は泡沫によりかなり汚れる。バイオリアクターの容量が大きくなるほど上部空間が大きくなり、スプレーボールによる洗浄範囲も広範囲となるため、このことが生産培養のバイオリアクタ

一の洗浄難度を高くした理由と考えられる。

次に細胞分離工程の遠心分離装置とハーベストタンクであるが、それぞれCpuが高い値となっている。遠心分離装置の洗浄性が高い理由としては、洗浄液をほぼ満杯に入れた状態で遠心力による洗浄を実施し、その後ローター部を分解してスワブまで実施しているためと考えられる。そしてハーベストタンクは、大容量のタンク内部を上部鏡部に設置されたスプレーボールと洗浄液を溜めた状態で小型のインペラを擁した下部攪拌機回転させることで洗浄するのであるが、次工程のデプスフィルターに送液する短期間の使用であるため、短時間での使用による汚れの少なさが影響している可能性がある。

また、クロマトグラフィーシステムと精製貯槽の一部については、洗浄基準を満たしているものの、Cpuについては他のプロセス機器に比べ比較的低い値となっている。クロマトグラフィーシステムは、ポンプから洗浄液を通液し、配管を浸漬して洗浄している。しかし、クロマトグラフィーシステムは口径の小さい水平やU型の配管が多く使用されており、洗浄しにくい構造になっていることがCpuの値が小さい理由として考えられる。一方、精製貯槽は、多少の容量の違いがあるものの全て下部攪拌機を有する大型なプロセスタンクであり、内部をハーベストタンクと同様にスプレーボール洗浄と下部攪拌機による溜め洗浄する。精製工程では、Protein Aをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより精製したのち、高純度な抗体にするために不純物を除去していく工程が続くのであるが、精製貯槽の中では、特に精製タンク3のCpuの値が低い。精製タンク3では、プロセス液を受け入れる前に前段の精製タンク2において低pH(3~4程度)にする不活性化工程が行われており、低pHに起因する不純物の発生されたものが精製タンク3に移送され長時間ホールドされたため、洗浄難度が高くなった可能性があると考えられる。従って、精製貯槽の洗浄性の違いは構造によるものだけではなく、精製工程におけるプロセス液の性状の影響も否定できない。

そして限外ろ過のCpuが高い理由としては、洗浄液をほぼ満杯の入れた状態で循環による洗浄を実施し、その後フィルター部を分解してスワブまでしているためと考えられる。

これらの考察により、抗体原薬製造設備を製造プロセスの機器ごとに算出したCpu結果は、プロセス機器のそれぞれの構造や洗浄方法、あるいはプロセス機器で実施される工程におけるプロセス液の性状に基づいた説明が十分可能であり、一般的な抗体原薬製造設備におけるエンジニアリング的な知見とクリーニングデータが一致しているといえる(Table 4-2) [29]。

Table 4-1: Process capability (upper limit) (Cpu) from product cleaning data based on process equipment

Process Equipment	% of cleaning limit (residue/limit * 100)	Standard deviation	Normality test (p value < 0.05)	Cpu
Cell expansion bioreactor-1	23.12	7.78	Pass(H ₀)	3.29
Cell expansion bioreactor-2	31.26	13.37	Pass(H ₀)	1.71
Production bioreactor	32.84	16.38	Pass(H ₀)	1.37
Centrifuge	22.91	5.28	Pass(H ₀)	4.87
Harvest tank	8.95	6.39	Pass(H ₀)	4.75
Chromatography	32.25	17.41	Pass(H ₀)	1.30
Purification tank-1	26.98	13.84	Pass(H ₀)	1.76
Purification tank-2	28.37	16.47	Pass(H ₀)	1.45
Purification tank-3	38.95	27.86	Pass(H ₀)	0.73
Purification tank-4	27.97	10.87	Pass(H ₀)	2.21
Purification tank-5	24.19	18.66	Pass(H ₀)	1.35
Ultrafiltration/Diafiltration	17.86	6.79	Pass(H ₀)	4.03

H₀: null hypothesis

Table 4-2: Cleanability of biopharmaceuticals manufacturing facilities

Cleanability	High	Low
Tank	Small capacity	Large capacity
Piping	Short length	Long length
	Large diameter	Small diameter
	Simple flow path	Complicated flow path
Contaminant	Low protein	High protein
	Low viscosity	High viscosity
	Low concentration	High concentration

第2項 洗浄能力の観点からの評価

第2章で示したように製品Xの洗浄データに製品Yの洗浄データを加え、あるCpuの値を目標値として設定した場合の洗浄能力値 Pckを新たに考案した。このアプローチは、残留量の統計学的期待値を洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示すものであることから、任意のCpuにおける全てのプロセス機器について容易かつ迅速に計算することができる (Table 4-2)。これらのプロセス能力限界の適合性は、同一の洗浄プロセスを用いる異なる抗体薬物物質からの計算に進行中の洗浄データを組み込むことによって強化することができる (Figure 4-2)。つまり、製品Xの洗浄データに同じ洗浄プロセスを適用する異なる抗体原薬の製品Yや製品Zなどの複数のデータを加えることにより、洗浄能力値の信頼性はより高くなるため、プロセスに対する理解 (Process understanding) の蓄積に基づく工程の継続的な改善は、米国食品医薬品庁 (FDA) のプロセスバリデーションガイダンスの基本思想と完全に整合するものである。

尚、洗浄性は製品ごとに大きく異なることがあるため、このアプローチは全てのマルチユースプラントに適用できる訳ではない。抗体原薬の製造設備においては、製品が全てIgGであり、共通の分子構造を持つことからcleanabilityも狭いレンジ内にあると期待できることが、この解析方法の前提となっていることに留意すべきである。

Table 4-2: Process capability limits for total organic carbon (ppb) for process equipment based on desired process capability index (Cpu)

Process Equipment	Pck based on historical records			Range of cleaning criteria based on ADE
	1.00 Desired Cpu	1.33 Desired Cpu	1.67 Desired Cpu	
Cell expansion bioreactor-1	177 ppb	209 ppb	243 ppb	430-1580 ppb
Cell expansion bioreactor-2	309 ppb	389 ppb	471 ppb	
Production bioreactor	317 ppb	391 ppb	468 ppb	
Centrifuge	205 ppb	258 ppb	313 ppb	
Harvest tank	96 ppb	119 ppb	142 ppb	
Chromatography	288 ppb	347 ppb	409 ppb	
Purification tank-1	254 ppb	307 ppb	363 ppb	
Purification tank-2	315 ppb	384 ppb	455 ppb	
Purification tank-3	389 ppb	483 ppb	580 ppb	
Purification tank-4	261 ppb	307 ppb	355 ppb	
Purification tank-5	334 ppb	417 ppb	502 ppb	
Ultrafiltration/Diafiltration	160 ppb	192 ppb	225 ppb	

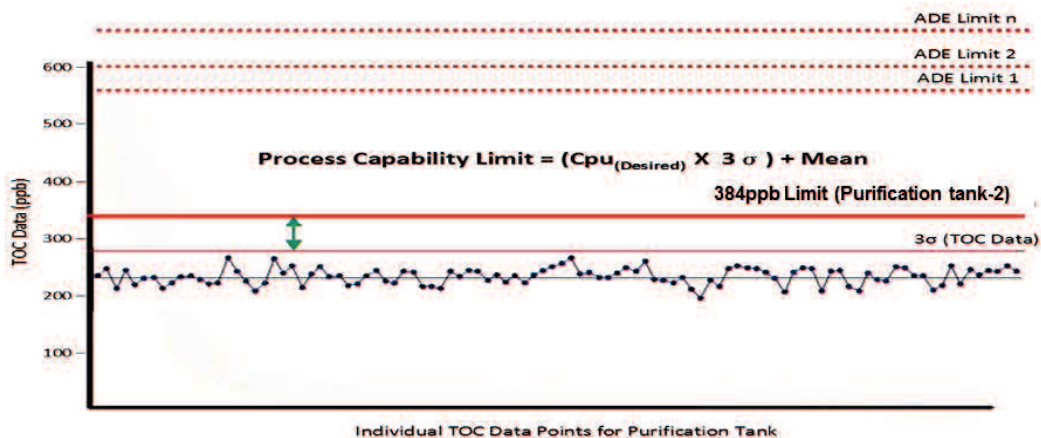


Figure 4-2: Process capability limit and acceptable daily exposure (ADE)-based limits

第4節 まとめ

医薬品の安全性と品質を保証するうえで欠かせない必須の条件である洗浄に焦点を当て、実際の抗体薬品製造設備の洗浄工程で実施されている洗浄の実績データから実設備の洗浄能力を統計学的に検討した。まず、製造プロセスの機器ごとに Cpu を解析した結果については、プロセス機器のそれぞれの構造や洗浄方法、あるいはプロセス機器で実施される工程におけるプロセス液の性状に基づいた説明が十分可能であり、抗体原薬製造設備における一般的なエンジニアリング的な知見とクリーニングデータが一致していることを定量的に示すことができた。また、洗浄能力値 Pck のアプローチにより、残留量の統計学的期待値を洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示すことができた。

尚、抗体原薬の精製工程においては、本章で述べた設備特性に加え、製品特性の観点からも精製された抗体タンパク質はプロセス設備に付着しやすく、洗浄の難度が高いことが一般的に知られており、洗浄バリデーションにおける重要な課題となっている。この点について我々は Degradation Study を行い、興味深い結果を得ているので、次章で報告する。

第5章 バイオ医薬品における洗浄不活化評価

第1節 はじめに

医薬品の安全性を確保するために、薬理的で毒性学的なリスクを特定し、理解する手法が GMP の中に浸透しつつある。この科学的根拠に基づくリスクベースド・アプローチは、International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Q9 Quality Risk Management (以下、ICH Q9)「品質リスクマネジメントに関するガイドライン」制定に伴い、医薬品の品質管理への適応が不可欠とされており、この考え方は医薬品製造設備の洗浄バリデーションの基準値についても適用が進んでいる。これまで、洗浄後の機器残留物の安全性評価として洗浄バリデーションの基準値は、イーライリリー社が提案した 1/1000、1/10000、10ppm といった基準が慣習的に提唱されており、基準費値の設定として科学的根拠に乏しい状況にあった。2010 年 9 月に International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE) は、新たなベースラインガイドとして Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products (以下、Risk-MaPP)を発行した[20]。Risk-MaPP の基本コンセプトでは、一貫性があり確固かつ科学的なアプローチに基づいたリスクマネジメントを確保することが求められており、健康への影響に基づいた限界値を設定するために薬理的及び毒性学的要素である無毒性量(NOEL)や Permitted Daily Exposure(以下、PDE)又は Acceptable Daily Exposure(以下、ADE)が利用されている。この流れに沿った形で 2015 年 3 月に European Medicines Agency(EMA)から EU-GMP Annex15 Qualification and Validation (以下、EU-GMP Annex15)、同時並行に Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation. Scheme (PIC/S)から PIC/S-GMP Annex 15 Qualification and Validation (以下、PIC/S-GMP Annex15)がそれぞれ改訂された。EU-GMP Annex15 及び PIC/S-GMP Annex15 では、洗浄バリデーションの残留限度は毒性学的評価することが求められており、洗浄バリデーション限度値の設定に PDE 又は ADE が採用された[30]。医薬品製造設備の洗浄は医薬品の交叉汚染防止にきわめて重要な作業であり、製造工程や製造支援システムの洗浄作業がバリデーションの実施対象として規制当局のガイドラインに規定されている。洗浄バリデーションとは、製造工程操作由来の残留物汚染によるキャリアオーバーが製造品目の品質に最大のリスクをもたらす状況や製造工程に対して機器の洗浄手順を確立し、その洗浄手順により恒常的に異物混入を防止されることを検証することであ

る。近年の洗浄基準の規制強化の中、ヒトの健康への薬理的で毒性学的な科学的根拠に基づいたリスクの特定や理解が GMP の中に進展しつつある[21]。

EU-GMP Annex15 及び PIC/S-GMP Annex15 における PDE 又は ADE の設定には、臨床データから導き出された閾値から導き出されることになるが、開発初期段階ではヒトへの投与による毒性データが不足しているため品目特有の PDE 又は ADE を設定することが困難である。そのため多くの場合、確率に基づいた実際的な毒性学的懸念の閾値/Threshold of Toxicological Concern(以下、TTC) アプローチによって設定されることになる。TTC アプローチは、広範な毒性試験が行われてない化学物質について安全サイドの推定値を提供するために用いられ、毒性の推定値が非常に安全サイドにあるので、製品内の微量汚染物質の評価に有用とされている[31]。TTC は推定値であるため、洗浄バリデーションの基準値を設定する場合、より慎重な検討が不可欠である。そこで TTC アプローチを用いる場合、対象となる製造品目が洗浄後に不活化しているか否かが重要な条件となり、TTC を科学的な根拠で補完し、汚染リスク低減を担保するための新たな手法が必要となる。

遺伝子組換えなどのバイオテクノロジーにより製造されるタンパク質、ポリペプチド及びそれらの誘導体並びにそれらを構成成分とする高分子なバイオ医薬品は、高温状態や極端に酸性あるいは塩基性に pH が傾くと分解し、薬理的に不活性となることが知られている。一般的に抗体医薬品をはじめ多くのバイオ医薬品の製造設備におけるプロセス接液箇所は、酸化剤及びアルカリ化剤や高温に曝される環境で洗浄されるため、構成成分のタンパク質の分解をもたらすと言われている。しかしながら、これまで医薬品に関連するタンパク質の分解試験についての発表が少数あるが、これらの論文には詳細な記述が示されておらず、分解が完全なのか部分的なのか、又はまったく分解していないかは、いずれも示されていない[32, 33]。

そこで本章では、洗浄工程によるタンパク質の不活化が洗浄バリデーションを裏づけになる可能性があるという観点から、信頼性のある有効な方法を確立するために検討を進めた。

第2節 洗浄工程後の不活化評価

筆者らは、酸化剤及びアルカリ化剤が低濃度でも高分子タンパク質であるモノクローナル抗体を顕著に分解することをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルゲル電気泳動法/Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)にて確認し、暴露限界値を非常に低レベルまで低減できることを示すことに成功した[34]。

本章では、バイオ医薬品製造設備の実生産スケールにおける新たな洗浄評価法として、洗浄後の高分子タンパク質の不活化を定量的に計測する方法の有効性確認した。

実際の医薬品製造設備における洗浄工程は、「定置洗浄/Cleaning In Place(CIP) + 定置滅菌/Steam In Place(SIP)」もしくは「バッチ浸漬洗浄/Immersion Batch Cleaning(IBC)」が実施されるため、実生産と同等の洗浄条件にて処理した後にモノクローナル抗体が不活化しているか評価した。不活化は構造もしくは活性の変化を指標とし、それぞれを評価する手法として SDS-PAGE に加え表面プラズモン共鳴法/Surface Plasmon Resonance (SPR) を用いて評価した。

第1項 実験方法

第5章では、抗体医薬品の精製工程にあたるクロマトシステムや精製貯槽において洗浄能力が比較的低い値となっていた[35]。そこで、これらクロマトシステムや精製貯槽における実生産時の洗浄条件をワーストケースとして設定し、洗浄評価を行った。検証の対象とした抗体医薬品設備での洗浄の実工程では、「CIP+SIP」もしくは「8時間以上の浸漬処理(CI: Caustic Immersion)」が実施されているので、精製工程での抗体最大残留量にこれらの処理した後、抗体医薬品が不活化しているか評価を実施した。抗体最大残留量は式(Equation 5-1)で算出される。

$$\begin{aligned} \text{Maximum antibody residue} &= \text{Maximum antibody Production per liter of culture} \\ &\quad \times \text{Maximum culture volume} \\ &\quad \times \text{Maximum residue rate} \end{aligned} \quad (\text{Equation 5-1})$$

これまでの実績や世界的な抗体原薬製造設備では、治験薬製造における最大培養液量は 2,000L、培養液 1L あたりの最大抗体産生量は 3g/L が主流となっている。また、精製各工程の回収率は 90%以上を示しているケースが多く、クロマトシステムや精製貯槽に残留する抗体原薬の量は最大でも 10%となるため、想定される最大残留量は下記のように算出できる(Equation 5-2)。

$$\text{Maximum antibody residue} = 3\text{g/L} \times 2,000\text{L} \times 10\% = 600\text{g} \quad (\text{Equation 5-2})$$

次に、製造設備の洗浄作業では、水酸化ナトリウムを希釈した洗浄剤として 2%NaOH を 50L 以上使用しているため、洗浄剤中の最大抗体濃度は 600g/50L=12g/L となる。従

って、サンプルは製造状態を忠実に再現するために必要な緩衝液を適宜添加し、12g/L以上の抗体濃度になるように調製した。

1. 使用試薬

(1) Preparation of samples

Monoclonal antibody (mAb)、Formulation Buffer (FB): 50 mM histidine、6% sucrose、0.1% polysorbate 80(pH 5.9)、1N Sodium hydroxide solution、1N Hydrochloric acid

(2) SDS-PAGE

NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)、NuPAGE MES SDS Running Buffer (20x)、Marker12 unstained Standard、NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0x10well、NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)、Ethanol(HPLC: high performance liquid chromatography)、Acetic acid

(3) SPR

Amine Coupling Kit、Biacore Maintenance Kit type2、HBS EP+ X10 Buffer、Glycine 2.0、Acetate 5.0、NaOH 50、Human recombinant

2. 調製サンプル

抗体残留量のワーストケースを想定し、最終濃度が 12g/L 以上になるように下記の手順で調製した (Table 5-1)。

Table 5-1: List of samples prepared

Sample name	Sample	Reagent A	Autoclaving	Reagent B	Note ^{*3}
Blank	FB ^{*2}	0.5N NaOH	Yes	0.5N HCl	
mAb-intact	mAb	No	No	No	Untreated
mAb-control	mAb	DDW ^{*1}	No	DDW ^{*1}	
mAb-Caustic/autoclave	mAb	0.5N NaOH	Yes	0.5N HCl	NaOH treatment (8 h) and autoclave 15 min
mAb-Caustic only (8 h)	mAb	0.5N NaOH	No	0.5N HCl	NaOH treatment (8 h)

*1: Sterilized water/Deionized distilled water (DDW)

*2: Formulation Buffer (FB)

*3: "h" is an abbreviation for hours, "min" is an abbreviations for minutes in this table.

- (1) Add 1mL of Reagent A (0.5N NaOH or DDW according to Table 5-1) to each samples (mAb or FB) in order to simulate CIP or CI.
- (2) Heat-treat with autoclave (121°C, 30 minutes at 15 psi.) to simulate SIP, only for the corresponding samples.
- (3) Add 1 mL of Reagent B to neutralize alkali. (0.5N HCl or DDW according to Table 5-1)
- (4) Add DDW to adjust the mAb concentration to around but less than 12g/L.

第3節 結果及び考察

第1項 結果

1. SDS-PAGE の結果

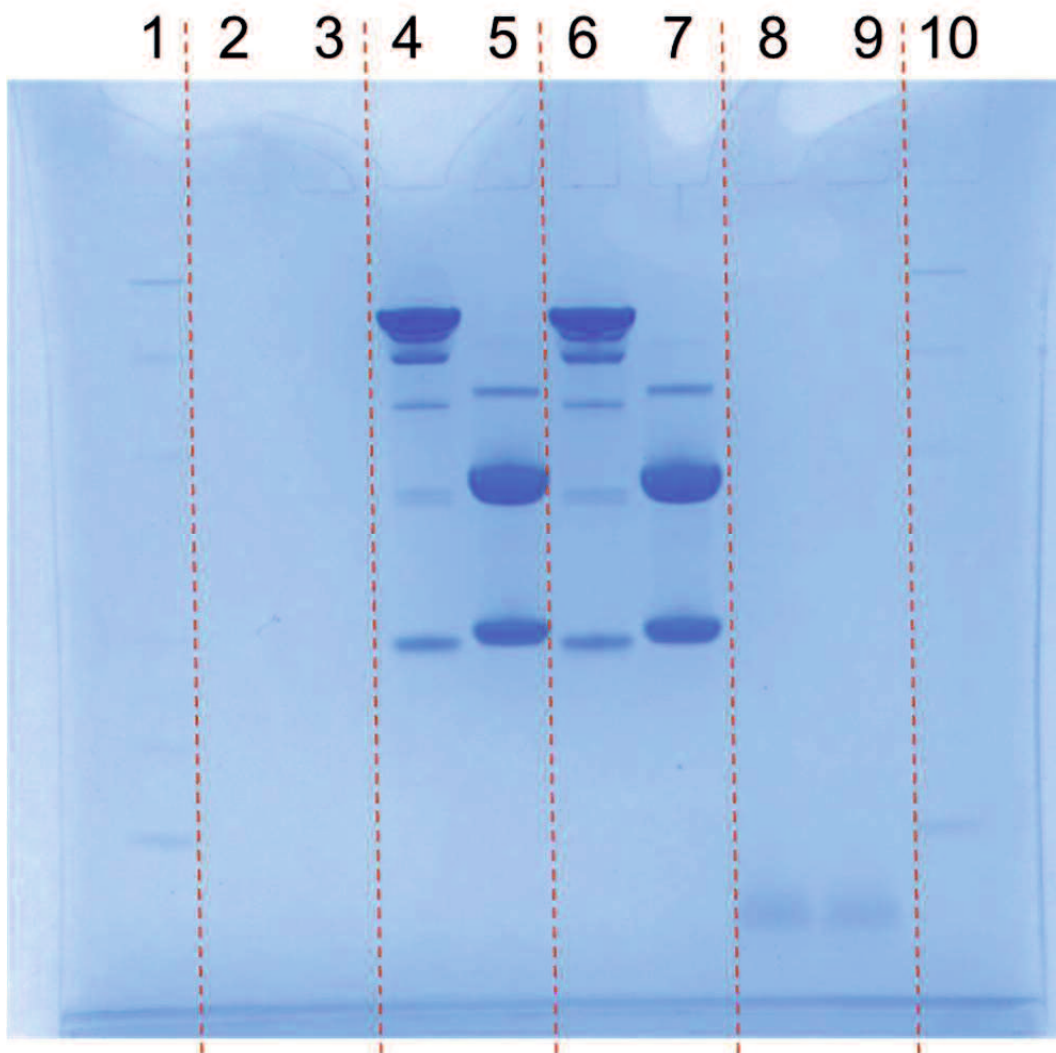
還元/Reduction(R)条件としては、各調整サンプル 39 μL と Sample Buffer 15 μL 、Reducing Agent 6 μL を混合し、100 $^{\circ}\text{C}$ で1分間保持した後、室温まで冷却した。また、非還元/Non-Reduction(NR)条件としては、各調整サンプル 45 μL と Sample Buffer 15 μL を混合し、80 $^{\circ}\text{C}$ で3分間保持した後、室温まで冷却した。ロード量を12 μL に調整し、泳動バッファーマES SDS Running Buffer を用い、泳動条件を200V/120mA/100W/30分に設定し、CBB 染色を行った。

(1) CIP+SIP

検証の対象とした抗体医薬品設備での洗浄の実工程で実施されている「CIP+SIP」を想定し、CIP時に使用される洗浄剤である水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ処理とSIPと同様な条件をオートクレーブで設定した加熱処理にて再現した。その結果、アルカリ処理と熱処理を施したサンプルにおいて、低分子量の位置にフラグメントと思われるバンドが検出され、不活化していることが確認できた(Figure 5-1, Lane 8, Lane 9)。

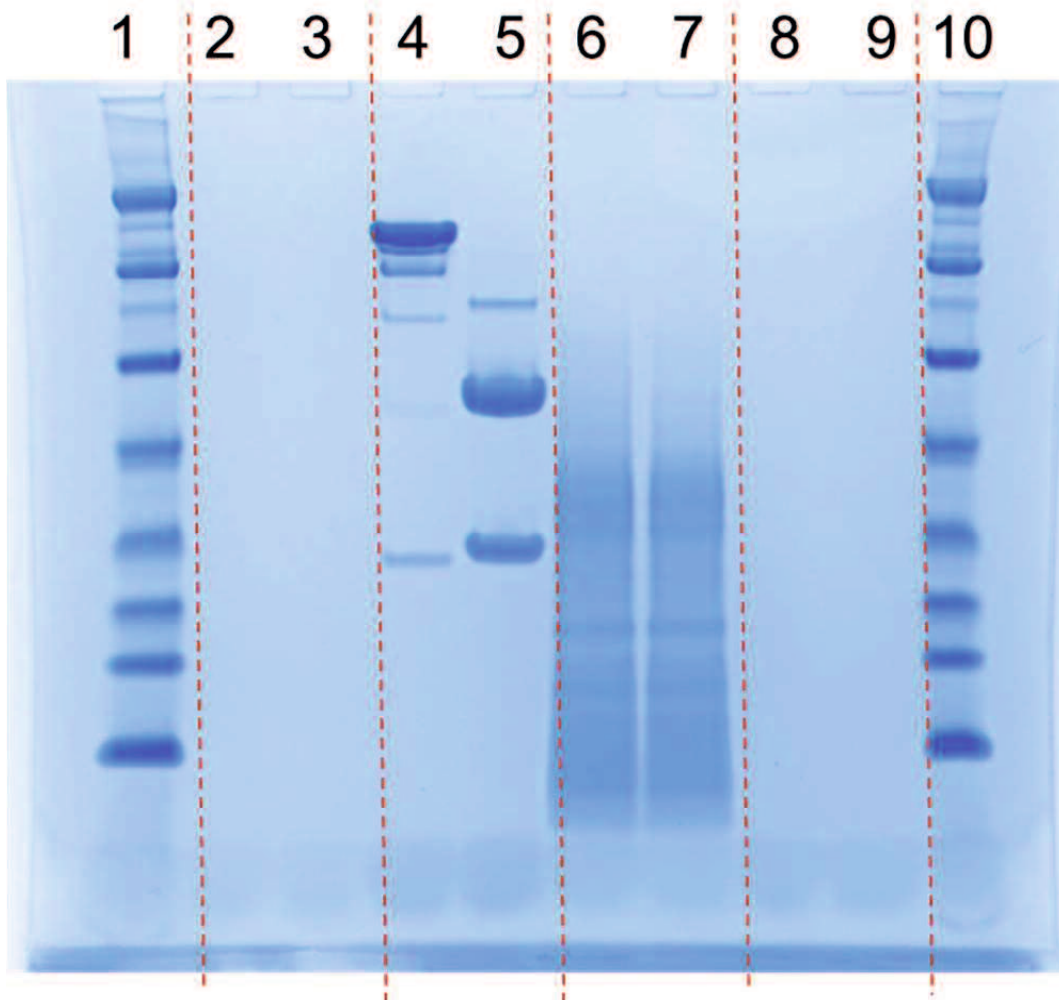
(2) CI

抗体医薬品設備の精製工程におけるクロマトシステムの一部で実施している水酸化ナトリウム溶液を洗浄剤とした浸漬による影響を検証した。その結果、8時間浸漬したサンプルで実施したところ Smear が観察された(Figure 5-2, Lane 6, Lane 7)。明確なバンドが無く全体が Smearing していたことから、長時間のアルカリ処理により抗体タンパクが分解され、抗体自体が不活化していることが確認できた。



Lanes 1: Marker; 2: Blank (NR); 3: Blank (R); 4: mAb-intact (NR); 5: mAb-intact (R); 6: mAb-control (NR); 7: mAb-control (R); 8: mAb-alkali/heat treated (NR); 9: mAb-alkali/heat treated (R); 10: Marker. (R): Reduction condition, (NR): Non-reduction condition

Figure 5-1: Effects of "CIP + SIP"



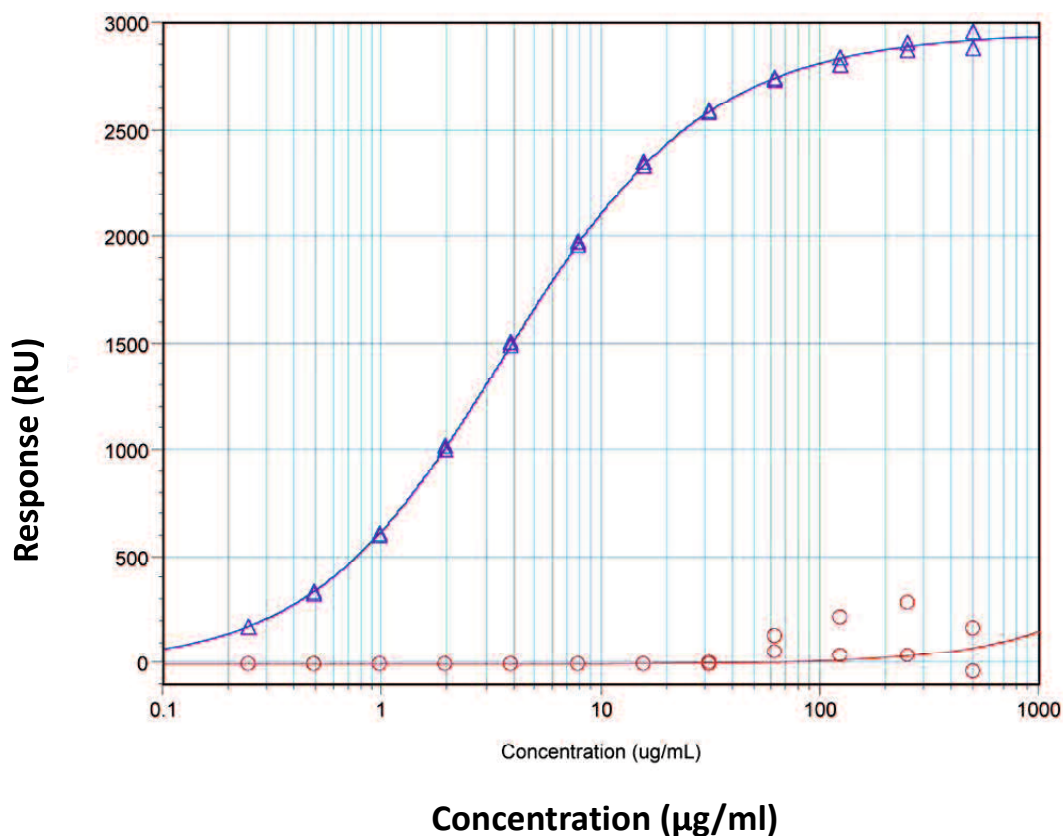
Lanes 1: Marker; 2: Blank (NR); 3: Blank (R); 4: mAb-intact (NR); 5: mAb-intact (R); 6: mAb-alkali treated (NR); 7: mAb-alkali treated (R); 8: Blank (NR); 9: Blank (R); 10: Marker. (R): Reduction condition, (NR): Non-reduction condition.

Figure 5-2: Effects of "CI" (Caustic immersion)

2. SPR の結果

水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ処理とオートクレーブによる加熱処理を施した NA-degraded のサンプルにおいて、低分子量の位置にフラグメントと思われるバンドが検出されているが、実際の結合活性にはどのような影響がでているか確認するため、さら Non-degraded との比較実験を実施した。尚、結合活性の測定には SPR 解析装置として、BIAcore T100/T200 (GE healthcare) 及び Sensor Chip CM5 (GE healthcare) を用い、室温 25 °C にて実施した。Sensor Chip CM5 上への固定化は、アミンカップリングプロトコールに従って行い、pH 5.0 (10 mM 酢酸塩) の条件下で固定化量は RU 値で 2500 になるように調整した。また、結合反応には、Running 緩衝液として HBS-EP+10X を 10 倍希釈して使用し、インジェクションパラメータを流速 30 μ l/min にて接触時間 180 秒間に設定して測定した。結合パラメータの解析は、ライフサイエンス研究における解析用ソフトウェアとして世界に実績のある SoftMax Pro ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて行った。

SPR を用いて Non-degraded 及び NA-degraded のサンプルについてモノクローナル抗体の結合活性を解析したところ、Non-degraded ではモノクローナル抗体に対する明らかな結合活性を有しているが、NA-degraded を比較したところ、その結合活性を完全に失っており、抗体としての毒性学的な危険性はまったく認められないという結果を得られた (Figure 5-3)。このことにより、アルカリ処理及び熱処理によって、モノクローナル抗体の結合活性が失われることが確認することができた。



Δ: Non-degraded, ○: NA-degraded.

Figure 5-3: Binding affinity analysis of monoclonal antibodies using BIACORE

第2項 考察

アルカリ処理及び熱処理を行うことにより、モノクローナル抗体は構造的に分解し、結合活性も失われることが明らかになった。また、アルカリ処理のみであってもアルカリに長時間浸漬されることにより、不活化されることも確認された。以上の結果より、現行の抗体医薬品設備での洗浄の実工程で実施されている運用どおり CIP 及び SIP を実施した場合、モノクローナル抗体は分解され結合活性も失われることが確認できた。

また、今回対象とした抗体産生量 3g/L のモノクローナル抗体が、ワーストケース最終濃度 12g/L の残留量の条件で、アルカリ処理及び熱処理により分解され結合活性も失われたことから、同じモノクローナル抗体で抗体産生量 3g/L 以下の抗体医薬品であれば、洗浄液中の抗体濃度は今回の検討条件よりも低くなり、現行の洗浄方法によっ

て同様の分解を受けることになる。従って、今回の検討をワーストケース考えることにより、今後他の品目の抗体医薬品を製造する場合のモデルケースとして、適用することができると考えられる。

第4節 まとめ

2015年以降、洗浄バリデーションの残留限度は毒性学的評価することが求められおり、洗浄バリデーション限度値の設定に、PDE 又は ADE が採用された。開発初期段階ではヒトへの投与による毒性データが不足しているため、品目特有の PDE 又は ADE を設定することが困難であり、確率に基づいた TTC アプローチで設定されることになる。しかしながら、TTC は広範な毒性試験が行われてない化学物質についての推定値であるため、洗浄バリデーションの基準値を設定する場合、より慎重な検討が不可欠である。

そこで本章では、対象となる製造品目が洗浄後に不活化しているか否かが重要な条件となり、不活化が洗浄バリデーションを裏づけになる可能性があるという観点から、信頼性のある有効な方法を確立するために検討を進めた。

クロマトシステムや精製貯槽における実生産時の洗浄条件をワーストケースとして設定し、洗浄評価を行った。抗体医薬品設備での洗浄の実工程で実施されている「CIP+SIP」及び「8時間以上の浸漬処理」で精製工程での抗体最大残留量を処理し、モノクローナル抗体の不活化は構造もしくは活性の変化を SDS-PAGE 及び SPR を用いて評価した。その結果、アルカリ処理及び熱処理あるいは長時間のアルカリ浸漬処理でモノクローナル抗体が不活化されることが確認できた。

今回の検討対象はモノクローナル抗体であるため、同じ抗体医薬品であれば現行の洗浄方法によって同様の分解を受けることが考えられる。今後は、SDS-PAGE 及び SPR の解析による不活化評価手法と第4章で述べた洗浄実績データに基づいた工程能力指数による解析と組み合わせた新たな評価モデルとして検討を進め、モノクローナル抗体以外の高分子医薬品の適用も含め研究を進める。

第6章 結論

第1節 各章のまとめ

食品や医薬品の安全性と品質を保証する上で製造設備の洗浄は必須の工程である。製造使用後の設備機器を衛生上、品質管理上常に清潔に保つため、設備を分解することなく、洗浄剤や高圧蒸気を流すことによって内部を定置洗浄(CIP)や定置滅菌(SIP)する方法が広く採用されている。実際の製造ラインでは、清浄度を目視判定するにも限界があり、洗浄の頻度や時間といった設定条件は実際の残留量を測定することで最適化される。しかしながら、近年の洗浄基準の規制強化、製造過程の生産性向上、高度な安全性の確保などを考慮して、品質を損なうことなく効率的かつ経済的な洗浄工程に関する研究は不十分である。本研究では、洗浄工程の管理基準の最適化を目指し、より進んだ手法として品質工学の統計的管理手法の一つである工程能力指数を用い、新たに洗浄データからその能力を定量的に評価する手法を提案した。更に洗浄工程によるタンパク質の不活化を洗浄バリデーションの評価として採用し、信頼性のある有効な不活化評価手法を検討した。

最初に第1章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、品質リスクマネジメントの指標の1つである工程能力指数を用いて評価する手法を検討した。洗浄工程では許容限度値以下となるように洗浄するため、洗浄基準値は上限規格で設定され、洗浄能力評価は上限規格値を考慮した工程能力指数 C_{pu} で算出される。そこで、ある C_{pu} の値を目標値として設定した場合の残留量の統計学的期待値を洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示す値として、洗浄能力値 P_{ck} を新たに考案した。この考案により、これまでの製造実績データを解析することで洗浄対象品目ごとの基準値によらず設備の洗浄能力そのものを評価することが可能となり、製造能力を初期の段階から把握することができるフロントローディング型のロバストなモデルを構築することができた。

第3章では、第2章において提案した工程能力指数による洗浄能力の評価手法について食肉加工工場の洗浄の報告をもとに考察した。この報告では、自主管理としてATP測定と油脂残留物量測定の併用を推奨している。しかしながら、 C_{pu} 及び P_{ck} の解析からATP測定における低信頼性や油脂残留物量測定における管理幅のリスクといった問題点を定量的に示すことができ、洗浄評価手法そのもの、又は基準値設定方法を見直す必要があることが分かった。また、 C_{pu} 及び P_{ck} という統計学的な工程能力指数

ツールを用いて評価する手法は、具体的な設備の洗浄能力を統計学的に数値化することで、より科学的な管理基準に基づく現場での安全判断がより容易となり、信頼性の高い管理が継続的に可能になることを示すことができた。

第4章では、実際の抗体医薬品製造設備で実施されている洗浄工程の実績データをもとに工程能力指数を用いて、洗浄能力の評価手法を検証した。抗体医薬品の精製工程では比較的口径の小さい水平配管や接液部の表面積が広い機器が多く、洗浄の難度が高いと言われており、Cpuの解析によりクロマトシステムや精製貯槽が他製造工程の機器に比べ低い値となっていることが判明した。Cpuの結果は、プロセス機器のそれぞれの構造や洗浄方法、あるいはプロセス機器で実施される工程におけるプロセス液の性状に基づいた説明が十分可能であり、抗体原薬製造設備における一般的なエンジニアリング的な知見とクリーニングデータが一致していることを定量的に示すことができた。また、Pckを使用して、今後の洗浄バリデーションプロトコルを検討する上で重要な要素となる洗浄サンプリング箇所及びサンプリング数の妥当性検証や洗浄不良のリスク軽減などの検討を可能とする手法を確立することに成功した。

第5章では、第4章の評価結果をもとにクロマトシステムや精製貯槽における実生産時の洗浄条件をワーストケースとして設定し、抗体医薬品設備での洗浄の実工程で実施されている「CIP+SIP」及び「8時間以上の浸漬処理」で精製工程での抗体最大残留量を処理し、モノクローナル抗体の不活化は構造もしくは活性の変化をSDS-PAGE及びSPRを用いて評価した。その結果、抗体は洗浄工程のアルカリ処理及び熱処理により構造的に分解し、結合活性も失われることが明らかになり、不活化評価を工程能力指数による解析と組み合わせた新たな評価手法を開発することができた。

第2節 品質工学的知識統合モデルの構築

食品の製造プロセスは消費者のニーズの変化に対応するための即応性が求められるため、開発コストに厳しい制限がかかる一方、2007年以降の相次ぐ食品に関する事件が発生し、食品の品質が社会的に大きな関心となっている[vi]。製品の品質保証は、徹底すればするほどコストがかかり、このことは殊に食品企業にとって大きな課題となっており、国民の健康や生活に密接に関連する医薬品業界に比べ、その対応が遅れている[36, vii]。食品に関しては、医薬品ほどの厳密さを要求されるものが無いため、法律に基づいたGMPの策定はされておらず、その代わりに食品の製造又は加工の方法及びその衛生管理の方法について、食品衛生法の総合衛生管理製造過程で規制されている[37]。食品企業は、総合衛生管理製造過程の承認に向けて、HACCPの考え方に基づいた衛生管理及びその前提となる施設設備の衛生管理等を実施することになる[38]。これまで厚生労働省は、HACCPによる衛生管理の普及を推進していたのであるが、海

外から求められる安全基準に対応するため、2016年12月に製造・加工、調理、販売等を行う全ての食品等事業者を対象として、HACCPによる衛生管理の制度化を進めることになった[iii]。HACCPとは国連食糧農業機関と世界保健機関の合同機関であるコーデックス委員会から発表され、各国にその採用を推奨しているグローバルスタンダードである。これまで勘や経験に頼る部分が多い従来の衛生管理方法とは異なり、食品の製造や加工におけるあらゆる段階の工程で発生のおそれがある微生物汚染等の危害をあらかじめ分析し、その結果に基づいて製造工程のどの段階でどのような対策を講じればより安全な製品を得ることができるかという重要管理点を定めおり、これを連続的に監視する。つまりHACCPは、原材料受入から最終製品までの工程ごとに要件となっている7原則を基に危害の防止につながる特に重要な工程を継続的に監視・記録する工程管理手法である。この材料受入から最終製品までのそれぞれの工程にHACCP計画が規定され、各工程ごとに7原則の小さなサイクルが回り、HACCPが導入されることになる(Figure 6-1)。

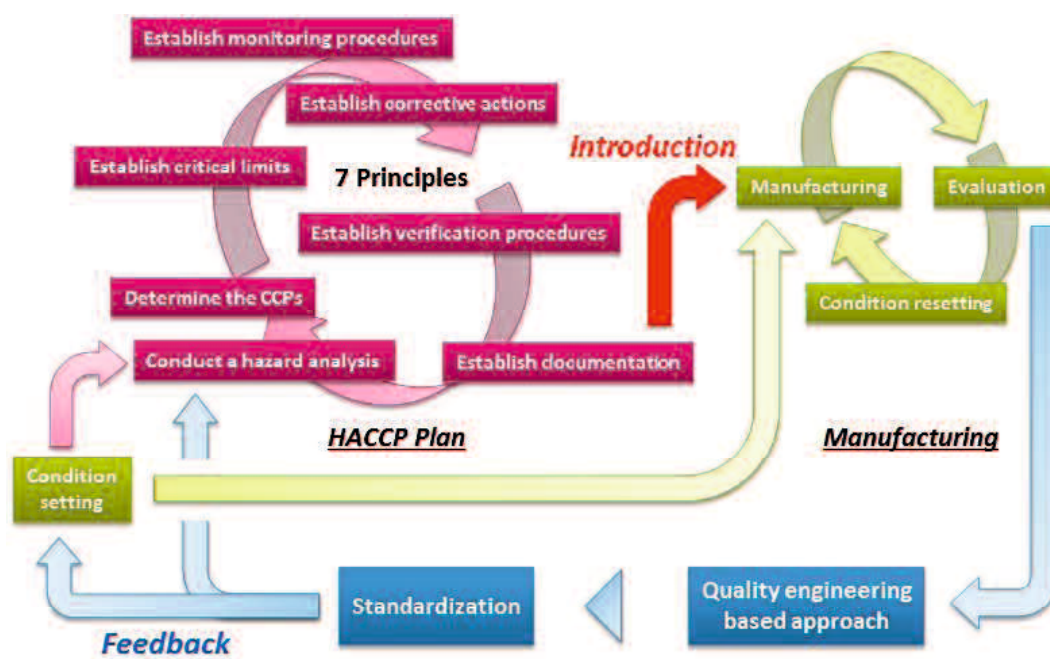


Figure6-1: Model - HACCP plan and food manufacturing

医薬品の製造プロセスは将来にわたって成功を継続し、患者にとって有意義な治療方法を開発するため、常に10年先を見据えなければならない。そのためには、医薬品企業は治療方法に関する専門的知識を広げ、将来にわたって成功していく能力を獲得しなければならない。一方、財務面も考慮する必要がある、少なくとも治験フェーズ

Ⅲ試験（第Ⅲ相）に到達できる有力なプログラムを持つまでは、全体的な研究開発費を増やすことなく成果を出していく必要がある。医薬品の場合、医薬品の非臨床試験の安全性に関する信頼性を確保するための基準「Good Laboratory Practice」(GLP)及び医薬品製造における製造・品質管理の基準「Good Manufacturing Practice」(GMP)が薬事法に取り入れられ、非常に厳格に遵守されている (Figure 6-2) [39]。

GLP や GMP では医薬品の安全性や有効性を議論する上で品質保証の審査があり、医薬品の開発段階から製造の品質全体を通して管理されている。例えば、製造ラインが変更された場合、同等性確保の観点から機械等の特性の差から最終製品の品質に影響があるため、規制当局への届出が要求されている[40]。

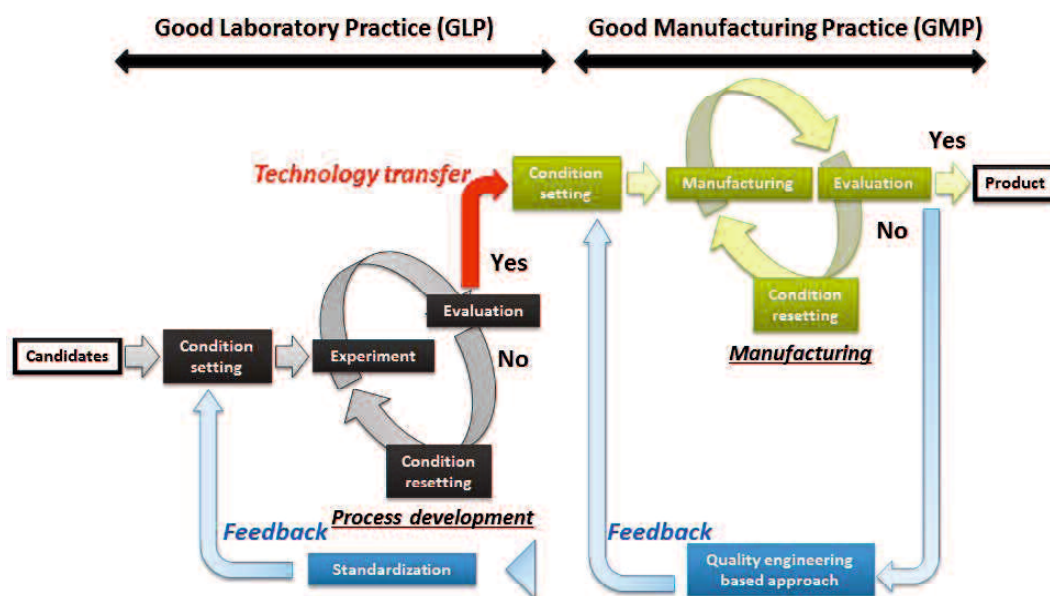


Figure 6-2: Product flow - pharmaceutical manufacturing processes

アーキテクチャ論の藤本や桑嶋によると食品や医薬品は、インテグラル型のプロセス産業であり、製品設計や工程設計が一体不可分になっていることから、自動車のような部門間分業にならない。食品の製造プロセス開発は、製品の構造と機能の関係に未知な部分が多く、人の感性により評価されるので判断基準があいまいである[41]。そして医薬品の製造プロセス開発には、機能や構造の因果関係が複雑で、例えば副作用や有効性の有無やそのメカニズムが判りづらいといった点がある[42]。経験の積み重ねによるノウハウや複雑且つ高度な製造技術が要求される食品や医薬品の新製品開発は容易ではないにも拘わらず、製造プロセス開発は短期間で移行するため、この限られた期間で開発コストを低減しながら進めることになる。また、製造現場では熟練

されたオペレーターの勘と経験に頼り、それぞれのプロセスに応じた現場調整を行い、それぞれの場面に応じた製造を行っているのが実態である。しかしながら、食品や医薬品の製造プロセス開発において、これまで研究開発のみならず製造プロセスまで踏み込んで幅広い視野に基づき課題解決に向けた議論が見当たらず、品質に関わるプロセス及び製造情報やこれまでの蓄積した製造ノウハウを活用し、迅速に一貫性のある対応ができる仕組みを新たに考えることが重要になる。

そこで本研究の中で、複雑な食品や医薬品の製造状態を統計に基づく品質工学的な観点で評価した実製造の解析データをプロセス及び製造条件設定に橋渡しが可能となる品質工学的知識統合のPDCA サイクルモデルを構築した。つまり、製造実績等に基づき品質工学的な重要パラメーターの解析が進み、製造から開発にフィードバックすることで技術移管情報が最適化されていけば、双方向からの知識を相互に活用することができるようになり、この大きなPDCA サイクルを回すことで生産性の向上と品質保証の確保の両立が可能になると考える。

今後は、本研究で構築した製造実績データから工程能力指数の解析に基づいた検討を進め、製造能力にあったプロセス管理基準の解明に向けて研究を進める。

NOMENCLATURE

C_p	: process capability
C_{pk}	: process capability index
C_{pu}	: upper process capability index
C_{pl}	: lower process capability index
USL	: upper specification limit
LSL	: lower specification limit
σ	: standard deviation
μ	: mean value
USL_c	: upper specification limit of cleaning process
σ_c	: standard deviation of cleaning process
μ_c	: mean value of cleaning process
PcK	: cleaning performance value
$C_{pu}^{(desired)}$: desired upper process capability index
$\sigma_{(accumulated)}$: standard deviation based on actual results of manufacturing facility
$\mu_{(accumulated)}$: mean value based on actual cleaning results of manufacturing facility

参考文献

- [1] Y. Hironaka, "2 times productivity of food factories (Syokuhin Kouzyou No Seisansei 2 Bai)", Nikkan Kogyo Shimbun, Tokyo, 12-40 (2016)
- [2] T. Yano; "practice!! Hazard management of food factories (Jistusen!! Syokuhinkouzyou No Hazard Kanri)", Saiwai Shobo, Tokyo, 1-6, 129-141 (2011)
- [3] S. Tanaka, "Business Model of Food Manufacturers to Survive in The Octuple Whammy Era" (in Japanese), Mizuho Industry Focus, 127, 2-37 (2013)
- [4] M. Treacy, F. Wiersema, "The Discipline of Market Leaders (No. 1 Kigyou No Housoku)", Nikkei Publishing, Tokyo, 54-81 (2003)
- [5] Y. Hironaka, "The Actual Circumstances of Food Industries in Japan Observed through Total Factor Productivity" (in Japanese), Japan J. Jpn. Soc. Prod. Manage., 15, 99-104 (2008)
- [6] L. Yan, "The Role of Management Control in Balancing between Quality Management and Cost Reduction" (in Japanese). Melco J. Manage. Account. Res., 5, 31-44 (2012)
- [7] T. Fujimoto, "Successful product development (Seikousuru Seihinkaihatu)", Yuhikaku, Tokyo, 105-128 (2000)
- [8] H. Sugiyama, " Business model of continuous improvement in pharmaceutical production processes", the 23rd European symposium on computer aided process engineering, (2013)
- [9] DaimlerChrysler Corporation, Ford Motor Company, General Motors Corporation, "Production Part Approval Process" 4th Edition", Automotive Industry Action Group, 7-9 (2006)
- [10] M. Numama, M. Miyazaki, K. Umehara, H. Kurata; "Method of Monitoring Washing Efficacy for Sanitation Control. Sanitation Degree Index as a Process Control Method - Sanitation Degree Index as a Process Control Method" (in Japanese), Japan J. Food Microbiol., 13, 173-177 (1997)
- [11] K. Nakanishi, " Fundamental Studies on the Adhesion of Proteinaceous Residues on the Surface and Its Cleaning in Food Processing " (in Japanese), Jpn. J. Food Eng., 7, 1-13 (2006)
- [12] S. Kawasaki; "Microbial detection technology food manufacturing" (in Japanese). Jpn. J. Food Eng., FOOMA JAPAN, 5-6 (2018)

- [13] Jpn. J. Food Eng.; " Food Engineering Handbook (Syokuhinkougaku Handbook)", Asakura Publishing, Tokyo, 372-383 (2006)
- [14] Y. Hanyu; " Investigation of Hygiene Management Methods on a Food Manufacturing Site and Development of Cleaning Level Judgment Technique " (in Japanese), Japan J. Tohoku Agri. Res., 63, 185-186 (2010).
- [15] T. Morita, H. Kitazawa, T. Iida, S. Kamata; " Examination about survival of Salmonella in the environment of an oil-meal manufacturing plant" (in Japanese), Jpn. J. Anim. Hyg., 30, 75-83 (2004).
- [16] N. Kokubun, K. Kunitake T. Okushiba, J. Matsuura, H. Murakami, T. Morita, K. Okabe, K. Nakajima, N. Ishizaki, C. Dogasaki, " Optimization of Evaluation Method for Hand Washing and Hand Washing Method in the Meat Processing Plant" (in Japanese), J. Japan J. Food Microbiol., 31, 100-107 (2014)
- [17] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guidelines: Q8 Pharmaceutical Development, August (2009)
- [18] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guidelines: Q9 Quality Risk Management, November (2005)
- [19] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Quality Guidelines: Q10 Pharmaceutical Quality System, June (2008)
- [20] ISPE Baseline Guide: Risk-Based Manufacture of Pharmaceutical Products (Risk-MaPP), International Society for Pharmaceutical Engineering (ISPE), First Edition, September (2010)
- [21] A. Walsh, Cleaning Validation for Biologics "Can Alternative Approaches to the Permitted/Acceptable Daily Exposure be Justified?", Biopharm International, 2, 14-18 (2015)
- [22] Sei Murakami, Haruo Suzuki, Keisuke Shibuya, " Advances in Biopharmaceutical and Vaccine Manufacturing Plants", Hitachi Hyoron, 2012-12, 36-39 (2012)
- [23] Yoshihiro Kaneko, "Issues and deployment goals cell culture technology for monoclonal antibody production", Japan J. Jpn. Soc. Biotechnology , Vol.91 No.9, 511-513 (2103)

- [24] Japan Ministry of Health, Labour and Welfare, "Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies", Issue No. 1214 (2014)
- [25] The Bio-Virus Safety Committee of Japan PDA, "Biologics handbook for manufacturing and quality control, Jiho, 29-40 (2016)
- [26] Kenji Omasa, "Cytoarchitecture, cell culture and downstream process in Monoclonal antibody production", CMC Publishing, 155-167 (2015)
- [27] Koichi Kamekura, Takato Mizunuma, Naoki Yumiza, Kazuo Sugaya, Biopharmaceutical manufacturing facility, IHI engineering review, Vol.49 No.2, 67-73 (2009)
- [28] Tetsuo Sato, "Virus and Prion Removal Filter Planova", Japan J. Jpn. Soc. Polymer Science , Vol.56 No.9, 767 (2007)
- [29] ISPE Guide: Biopharmaceutical Process Development and Manufacturing , 103-116, October (2013)
- [30] Guideline on Setting Health Based Exposure Limits for Use in Risk Identification in the Manufacture of Different Medicinal Products in Shared Facilities, European Medicines Agency, November (2014)
- [31] P. Price, G. Wiltshire, "Modeling the chronic non-cancer effects of mixtures of migrants using Cramer classes and quantitative models of uncertainty", Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, December (2009)
- [32] K. Kendrick, M. Kreuze, A. Canhoto, "Analysis of Degradation Properties of Biopharmaceutical Active Ingredients as Caused by Various Process Cleaning Agents and Temperature" Journal of Validation Technology Summer (2009)
- [33] J. Wenchang, Q. Wei, R. Nitin, C. Cylia, "Bench-Scale Characterization of Cleaning Process Design Space for Biopharmaceuticals", Biopharm International, March (2009)
- [34] X. Wang, T. Kaminagayoshi, T. Doi, K. Takenaka, Y. Miko, O. Shirokizawa, A. Walsh, "Development of a Technique for Quantifying Protein Degradation", Biopharm International, Vol. 29, Issue 11, 38-44, 53 (2017)
- [35] T. Kaminagayoshi, K. Takenaka, T. Doi, S. Omori, M. Sadamitsu, S. Tsuji, Y. Miko, O. Shirokizawa, A. Walsh, " The Statistical Evaluation of Cleaning Processes Using Process Capability and its Application to New Product Introduction", Pharmaceutical Technology, Vol. 42, Issue 5, 48-51, 64 (2018)
- [36] Y. Hironaka; "Quality management of food factories (Syokuhinkouzyou No

- Hinshitsukanri)", Nikkan Kogyo Shimbun, Tokyo, 9-14 (2012)
- [37] Japan Food Hygiene Association; "Guidelines for Creating A Food Safety HACCP Program (Syokuhin No Anzen Wo Tsukuru HACCP)", Japan Food Hygiene Association, Tokyo, 12-19 (2013)
- [38] A. Yamada, K. Hisa, M. Fukuoka, T. Hagiwara, T. Sakiyama, H. Watanabe; "Study on Problems of HACCP at Food Kitchen Manufacturing a Wide Variety of Products in Small Quantities" (in Japanese), Jpn. J. Food Eng., 8, 59-71 (2007).
- [39] T. Kaminagayoshi, S. Haruyama, "Quality Based Approach for Efficient Biologics Manufacturing", Int. J. Industrial Eng., 10, 852-856 (2016).
- [40] Japan Pharmaceutical Manufacturers Association; "Text Book 2016-2017", Japan Pharmaceutical Information Center, Tokyo, 6-15 (2016)
- [41] T. Fujimoto, "Successful product development (Seikousuru Seihinkaihatsu)", Yuhikaku, Tokyo, 151-168 (2000)
- [42] T. Fujimoto, " Japanese-style process industries (Nihongata process industries)", Yuhikaku, Tokyo, 110-134 (2009)

引用 URL

- i) <http://www.maff.go.jp/j/tokei/sihyo/data/03.html/> (Apr. 24, 2018)
- ii) http://www.maff.go.jp/j/zyukyu/jki/j_doutai/doutai_top.html/ (Apr. 24, 2018)
- iii) <http://www.shokusan.or.jp/sys/upload/116pdf2.pdf/> (Apr. 24, 2018)
- iv) <http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000161539.html/>(Apr. 24, 2018)
- v) http://www.fmric.or.jp/management/zaimu18/zaimu18_101_01_shibazaki.pdf/ (Apr. 24, 2018)
- vi) http://www.food-communication-project.jdf/activity23_04.pdf/ (Apr. 24, 2018)
- vii) <http://www.agriworld.or.jp/shabunken/hojyojigyo/H25jigyoku.pdf/> (Apr. 24, 2018)

謝辞

本論文は、筆者が山口大学大学院創成科学研究科博士後期課程ライフサイエンス系専攻に在籍中の研究成果をまとめたものである。この論文の執筆にあたっては、多くの方々のご指導、ご支援、ご厚意を頂いた。ここに心より深謝の意を表す。

山口大大学院創成科学研究科教授 山本 修一先生には、指導教官として本研究の遂行にあたって終始、ご懇篤なご指導とご高配を頂くとともにご多忙中にも関わらず、密接な対話や深い議論を通じて多くの知識や示唆を頂戴した。これらの多方面にわたる貴重なアドバイスのおかげで本論文を完成させることができ、また、それと同時に今後の研究の展望を持つことができた。ここに深謝の意を表す。

同研究科准教授 吉本 則子先生には、副査としてご助言を頂くとともに本研究を進める中で研究の進め方などに細部にわたりご指導を頂いた。常に自身の論文を客観的に捉え、わかりやすく人に説明することの重要性を気づかせて頂いた。ここに深謝の意を表す。

清浄度管理手法や統計解析に関する検討やディスカッションの中で、ライフサイエントピア株式会社の白木澤 治氏に資料を提供して頂くとともに有益なご助言を頂いた。ここに同氏に対して感謝の意を表す。

同研究科の院生・学生諸氏には、社会人学生として講座や行事に参加の際に快く迎えて頂いた。ここに感謝の意を表す。

最後に、社会人学生としての研究活動をサポートして頂いた会社の同僚や上司、これまで温かい目で見守って頂いた両親、そして山口大学大学院技術経営研究科に引き続き創成科学研究科博士後期課程への挑戦を快く応援して頂いた家族に深謝する。

要旨

食品や医薬品の安全性と品質を保証する上で製造設備の洗浄は必須の工程である。製造使用後の設備機器を衛生上、品質管理上常に清潔に保つため、設備を分解することなく、洗浄剤や高圧蒸気を流すことによって内部を定置洗浄(CIP)や定置滅菌(SIP)する方法が広く採用されている。実際の製造ラインでは、清浄度を目視判定するにも限界があり、洗浄の頻度や時間といった設定条件は実際の残留量を測定することで最適化される。しかしながら、近年の洗浄基準の規制強化、製造過程の生産性向上、高度な安全性の確保などを考慮して、品質を損なうことなく効率的かつ経済的な洗浄工程に関する研究は不十分である。そこで本研究では、洗浄工程の管理基準の最適化を目指し、より進んだ手法として品質工学の統計的管理手法の一つである工程能力指数を用い、新たに洗浄データからその能力を定量的に評価する手法を提案した。更に洗浄工程によるタンパク質の不活化を洗浄バリデーションの評価として採用し、信頼性のある有効な不活化評価手法を検討した。

最初に第1章では、序論として本研究の背景及び目的を述べ、論文の構成を示した。

第2章では、品質リスクマネジメントの指標の1つである工程能力指数を用いて評価する手法を検討した。洗浄工程では許容限度値以下となるように洗浄するため、洗浄基準値は、上限規格で設定されるので、洗浄能力評価は上限規格値を考慮した工程能力指数(以下 C_{pu} と称する)で算出した。また、洗浄対象品目ごとの基準値によらず設備の洗浄能力そのものを評価する手法として、製造設備の積み上げられた実績値を基に、ある C_{pu} の値を目標値として設定した場合の残留量の統計学的期待値を洗浄工程において残留物を物理的な量としてどのレベルまで洗浄できるかを示す値として、洗浄能力値(以下 P_{ck} と称する)を新たに考案した。

第3章では、第2章において提案した工程能力指数による洗浄能力の評価手法について、食肉加工工場の洗浄の報告をもとに考察した。この報告では、自主管理としてATP測定と油脂残留物量測定の併用を推奨している。しかしながら、 C_{pu} 及び P_{ck} の解析からは、ATP測定での評価は信頼性に欠け、洗浄評価手法そのもの、又は基準値設定方法を見直す必要があることが分かった。また、 C_{pu} 及び P_{ck} という統計学的な工程能力指数ツールを用いて評価する手法は、具体的な設備の洗浄能力を統計学的に数値化することで、より科学的な管理基準に基づく現場での安全判断がより容易となり、信頼性の高い管理が継続的に可能になることを示すことができた。

第4章では、実際の抗体医薬品製造設備で実施されている洗浄工程の実績データをもとに工程能力指数を用いて、洗浄能力の評価手法を検証した。 C_{pu} による解析の結果は、プロセス機器のそれぞれの構造や洗浄方法、あるいはプロセス機器で実施される工程におけるプロセス液の性状に基づいた説明が十分可能であり、抗体原薬製造設備における一般的なエンジニアリング的な知見とクリーニングデータが一致しているこ

とを定量的に示すことができた。また、Pck を使用して、今後の洗浄バリデーションプロトコルを検討する上で重要な要素となる洗浄サンプリング箇所及びサンプリング数の妥当性検証や洗浄不良のリスク軽減などの検討を可能とする手法を確立することに成功した。

第5章では、第4章の評価結果をもとに更に抗体医薬品の不活化あるいは構造もしくはは活性の変化を SDS-PAGE 法及び表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。その結果、抗体は洗浄工程のアルカリ処理及び熱処理により構造的に分解し、結合活性も失われることが明らかになり、不活化評価を工程能力指数による解析と組み合わせた新たな評価手法を開発することができた。

最後に第6章では、結論として本研究によって得られた知見を整理し、今後の展望や課題について述べた。

Abstract

The capabilities of cleaning processes have been statistically evaluated using data from both food and pharmaceutical manufacturing facilities, using the Process Capability Index (Cpu), which is one of the several indices used in Quality Risk Management.

At first, the capability of cleaning processes for securing food safety and quality was statistically evaluated from actual data obtained from the cleaning processes of food manufacturing facilities using Cpu. The approach presented in this study could be used in establishing sampling strategies and reducing the risk of insufficient cleaning, which are important factors to consider in future cleaning protocols.

Secondly, the capability of cleaning process was evaluated for an antibody drug manufacturing facility using Cpu. Consequently, the capability of the cleaning processes for all equipment used in actual production was successfully evaluated. The study demonstrated that the cleaning process for the bioreactor, cell separation equipment, and ultrafiltration/diafiltration system had high process capabilities. It also indicated that the chromatography system and the purification tank had relatively low Cpu values compared to other equipment, yet they still fell within their cleaning limits. For the purification process of antibody drugs, which uses extensive horizontal piping with relatively small diameters and equipment having large product contact surfaces, cleaning is generally considered to be difficult. Using the Cpu, it was determined that the cleaning process for chromatography system and the purification tank were the lowest of all the manufacturing process equipment.

Additionally, the evaluation of the cleaning procedures was carried out by modeling the cleaning conditions for the chromatography system and the purification tank in actual production as the worst-case scenario. The maximum residue of antibody from the purification process was treated with "CIP + SIP" and "CI" (immersion to alkaline solution for more than eight hours), which are procedures used in the actual cleaning processes of antibody drug manufacturing equipment, and the inactivation of monoclonal antibody was evaluated by observing the changes in the structure and biological activity using the SDS-PAGE and SPR. As a result of this evaluation, it was confirmed that these monoclonal antibodies were inactivated by the alkaline / heat treatments or immersion in alkaline solution for at least 8 hours.

Process development and manufacturing activities are linked to each other like two wheels connected through technology transfer and feedback. The results of this study suggest a new PDCA (plan-do-check-act) cycle, incorporating HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) system in food manufacturing or GMP (Good Manufacturing Practice) in pharmaceutical manufacturing, to provide feedback from quality assessment based on manufacturing data and assist technology transfer between process development and manufacturing departments.