



| | |
|--------------|---|
| Title | 微粒子濃度計算による細胞製造における無菌操作の環境設計に関する研究 |
| Author(s) | 風呂光, 俊平 |
| Citation | 大阪大学, 2025, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/101625 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

微粒子濃度計算による細胞製造における無菌操作の
環境設計に関する研究

風呂光 俊平

2025 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

| | |
|---|-----------|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1.1 緒言 | 1 |
| 1.2 無菌操作区域構築の考え方 | 3 |
| 1.3 細胞加工製品の製造における無菌操作 | 5 |
| 1.4 本研究の目的と構成 | 6 |
| 第2章 清浄空気の収支による無菌操作区域設計の考え方 | 10 |
| 2.1 緒言 | 10 |
| 2.2 方法 | 13 |
| 2.2.1 無菌操作区域のモデル設定 | 13 |
| 2.2.2 清浄空気の収支による反応速度論的解析 | 16 |
| 2.3 結果 | 21 |
| 2.3.1 換気回数一定条件下で微粒子発生速度が領域 1, 2(A)及び 2(B)の微粒子濃度に与える影響 | 21 |
| 2.3.2 微粒子発生速度一定条件下で換気回数が領域 1, 2(A)及び 2(B)の微粒子濃度に与える影響 | 23 |
| 2.4 考察 | 25 |
| 2.4.1 CPZ の室内吸排気による製品への微生物汚染リスク | 25 |
| 2.4.2 APA の設計に向けた SZ における吸気と排気の清浄度への寄与 | 27 |
| 2.4.3 APA の構造設計に向けたアプローチ | 32 |
| 2.5 小括 | 36 |
| 第3章 作業者の動作による製品に対する微生物混入の影響 | 37 |
| 3.1 緒言 | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2 方法..... | 40 |
| 3.2.1 資材外装由来の製品への微生物混入評価 | 40 |
| 3.2.2 手残存由来の製品への微生物混入評価 | 46 |
| 3.2.3 作業者周辺空間由来の製品への微生物混入評価 | 49 |
| 3.3 結果..... | 52 |
| 3.3.1 SZ 内の微粒子濃度が資材外装、手残存及び作業者周辺由来の微生物混入に与える影響 | 52 |
| 3.3.2 具体的装置を想定した細胞加工操作による微生物混入 | 55 |
| 3.4 考察..... | 57 |
| 3.4.1 資材外装残存由来の製品への微生物混入に関する考察 | 57 |
| 3.4.2 手残存由来の製品への微生物混入に関する考察 | 58 |
| 3.4.3 作業者周辺由来の製品への微生物混入に関する考察 | 59 |
| 3.4.4 具体的装置を想定した細胞加工操作に関する考察 | 59 |
| 3.4.5 作業者の動作特性を踏まえた無菌操作の環境設計の考え方 | 60 |
| 3.5 小括..... | 63 |
| 第 4 章 総括 | 64 |
| 本報に関する論文 | 67 |
| 略語リスト | 68 |
| 参考文献 | 71 |
| 謝辞 | 78 |

第1章 序論

1.1 緒言

医療用無菌製品の安全性は、患者の健康と治療の成功に直結するため、非常に重要な課題である [1]. 製品に微生物が混入すると、成分の構造変化を引き起こし有効性が保証できなくなる可能性がある。また、微生物が混入した製品が体内に入ることで感染症を引き起こす可能性や異物反応や毒素の生成を引き起こす可能性がある。無菌性が保証されていない場合、患者の命に関わる重大なリスクを伴う。したがって、製品の無菌性を保証することは、製品の品質管理において非常に重要な事項である。

医薬品製造における無菌性保証 (Sterility assurance) の歴史は、医療と製薬の発展とともに進化してきた。19世紀に、手洗いや消毒の重要性が認められ、手術中の無菌操作 (Aseptic treatment) が導入され、外科手術の生存率が向上した [2]. 20世紀に入り、無菌製薬の概念が広がり、蒸気滅菌や乾熱滅菌が普及し始め、医薬品の無菌性が確保されるようになった [3]. さらに、抗生物質であるペニシリンの発見、そしてそのペニシリンの大量生産が始まり、製薬業界で無菌製造技術が進展した [4]. 無菌環境での作業を行うためのクリーンルーム技術が進展し、無菌製造の環境管理も向上した [5]. 細胞培養や遺伝子組み換え技術の発展に伴い、無菌操作の重要性が高まった [6]. 2000年代から、無菌性保証におけるリスクベースの考え方方が普及し、効率的で効果的な無菌管理ができるようになった [7].

医薬品の無菌性を確保するための方法として、原則として最終滅菌法が要求される。最終滅菌法は、製品が最終的な包装状態で滅菌される方法であり、高い信頼性を持つ。しかし、最終滅菌が適用できない製品も存在する。その場合、無菌操作法を運用することで製品の無菌性を担保する必要がある。無菌操作法で

は、製品あるいは中間製品の無菌性を保証するために、無菌性が担保された原材料を用い、無菌性が担保された製造工程を実施することが求められる。

製造工程における偶発的な微生物の混入を検出するためには、対象の破壊を伴う全数試験が必要となる。このため、引き抜き試験などの部分的な検査方法では、微生物の存在を完全には確認できない。したがって、無菌性の担保には、無菌化を保証するプロセスにより微生物の存在を否定する必要がある。最終滅菌法においては、滅菌処理のプロセスの妥当性を構築し、滅菌バリデーションにより無菌性の評価を行うことが求められる。一方、無菌操作法においては、製造工程のプロセスの妥当性を構築し、無菌プロセスシミュレーションにより無菌性の評価を行うことが求められる [1,8]。

無菌操作法による無菌性確保のためのプロセス構築については、特に重要な役割を果たす。無菌操作法は、バリア性の高い包材で包まれた無菌性が担保された原材料や工程資材を、包材表面の除染や消毒による無菌化プロセスを経てパスピックスなどエアロック機能を有する装置を介して重要操作区域 (Critical Processing Zone, CPZ) に導入し、CPZ 内で外因性の汚染混入を排除しつつプロセス操作を実施することで、プロセスを行う対象物の無菌性を担保する手法である。CPZ は、High Efficiency Particulate Air (HEPA) フィルタを通した清浄空気の一方向流から構築される無菌空間であり、適切に CPZ の清浄度レベルを維持することで、プロセスを行う対象物の無菌性に影響を与えないようにすることが必要である。

本研究では、従来の医薬品製造に比べて、比較的小規模な製造であり、多品種で生産プロセスも製品毎に異なることが想定される細胞加工製品の無菌性確保のための無菌操作法に焦点を当て、その環境構築の設計に関して、環境中の気流の收支に着目した微粒子の反応速度論的解析を通して詳述する。また、作業者が

CPZ に原材料や工程資材を持ち込む導入工程や、 CPZ 内に手や腕を入れて操作する介入を伴う動作をする際の微粒子混入についても、微粒子混入の推定機序を示し、機序に基づく数式計算を行うことで定量的評価を行い、作業者の作業に伴う微粒子混入に関しても合わせて詳述する。

1.2 無菌操作区域構築の考え方

無菌操作区域 (Aseptic Processing Area, APA) の構築における設計アプローチは、無菌性の確保において極めて重要な要素である。本研究では、無菌性を維持するための CPZ 及びその周辺領域 (Support Zone, SZ) の清浄度管理に焦点を当てる。APA の設計と運用に関して、以下のような具体的な考え方を述べる。

CPZ を適切に維持するためには、CPZ と SZ を適切な清浄度レベルで管理する APA、すなわち構造設備の仕様を決定する必要がある。SZ は、CPZ の清浄度レベルに影響しないように、必要な清浄空気の風量や風向き、つまり気流を管理し、適切な清浄度レベルを維持できるようにする必要がある。特に、SZ の清浄度レベルは CPZ のバリア性が高ければ低く抑えることが可能であるが、CPZ がエアバリアなどの空間の一部が開放されたバリア性の低い隔壁を有する場合は、SZ に要求する清浄度レベルを引き上げる必要がある。APA 設計においては、プロセスが SZ から CPZ へ作業時の手挿入やパスボックスを介さない資材導入の直接的な介入操作を必要とする場合、その介入操作によって生じる CPZ への影響を制御し、CPZ が対象の無菌性に影響を与えない管理運用を考慮する必要がある。

APA 内に供給する空気は、High Efficiency Particulate Air (HEPA) フィルタを通過した微粒子が適切に除去された清浄空気である必要がある [9]。APA では、清浄空気の供給により微粒子を管理し、微粒子に付着する微生物を抑制するバイ

オクリーンルームの考え方に基づいて清浄度レベルが定められている [5]. そのため, APA 内の雰囲気は $0.5 \mu\text{m}$ と $5.0 \mu\text{m}$ の二種類の径の微粒子数により管理されるが, 特に $0.5 \mu\text{m}$ の微粒子によって清浄度レベルを微粒子清浄度として管理する. APA 内の雰囲気における微粒子数は, 確率論的にその領域の微生物汚染のリスクレベルを決定すると考えられる. HEPA フィルタは微粒子の径に対して一定の除去効率を維持し微粒子を除去する. したがって, HEPA フィルタに供給する空気は, 原則として微生物汚染のリスクレベルが変動しないように, 微粒子濃度が変動しない空間から採取することが求められる. CPZ の清浄空気に使用する空気を SZ から吸引する場合は, SZ 内の微粒子濃度分布を理解し, 作業者から生じる発塵の影響を考慮して, 適切に APA を設計する必要がある.

SZ 内における作業者は最大の発塵源であり, 微粒子中の微生物存在確率が高く, 非常に高い微生物汚染リスクを有する [7,10,11]. SZ 内は作業者の時間当たりの発塵量である微粒子発生速度に依存して管理可能な清浄度レベルに違いが生じる. SZ 内を高清浄度レベルに維持するには, ガウニングなどで作業者の微粒子発生速度を抑制することが効果的である [12]. 作業者の発塵により生じる微粒子分布は作業者の身長と同等の高さ付近より下に生じ, 微粒子の重力落下やクリーンルームの気流管理による影響で, より下部の方が高くなる [13]. そのため CPZ の清浄空気に使用する空気を SZ から吸引する場合, 吸引するための吸引口の位置をどこにするかで, 採取した空気の質が異なる可能性が生じる. 作業者の微粒子発生速度の違いや発塵した微粒子の挙動による微粒子濃度の分布は, CPZ の清浄空気に使用する空気を SZ から吸気する APA 設計において非常に重要な考慮事項である. 特にアイソレータシステムのような装置を採用する APA では, 一般的に SZ は微粒子発生速度抑制の程度が低いガウニングの作業環境となることが想定されるため [14], SZ 内の発塵の影響を強く受ける高微

粒子濃度領域あるいは発塵の影響をほとんど受けない低微粒子濃度領域, いざれから装置が吸気を行うかで CPZ への微生物汚染リスクが異なることが考慮される.

APA の設計においては, CPZ と SZ の清浄度管理, 清浄空気の吸気口の位置選定, 作業者による発塵の管理, 微粒子分布の把握と管理, CPZ を構成する装置の特性など, 多岐にわたる要素を総合的に考慮する必要がある. 本研究では, これらの要素を系統的に整理し, 定量的且つ具体的な設計アプローチを提示することで, 無菌性を確保するための環境構築に貢献することを目指す. この知見は, 細胞製造などの無菌性保証が求められる製品製造における品質管理や安全性確保に直接的に寄与するものである.

1.3 細胞加工製品の製造における無菌操作

再生医療や細胞治療の分野では, 細胞加工製品の製造(細胞製造)が重要な役割を果たしている [15]. 現状の細胞加工製品の製造プロセスには, 熟練した作業者による手操作を伴う工程も含み, これにより微生物汚染リスクが増大する可能性がある. そのため, 安全キャビネットなどエアバリアを伴う開放部を有する装置を使用する事例が多く見られる. 特にドナー由来の細胞加工製品の製造では封じ込め要求により, 開放型装置のエアバリアは陽圧ではなく, 装置の排気ユニットに吸引される陰圧で構成される. CPZ の環境構築に使用される空気はすべて HEPA フィルタを通過し, CPZ 内で発生する微生物リスクを含む微粒子を除去して, 装置外へ排出される. これにより CPZ 内で発生する微生物リスクを含む微粒子が除去される. 一方で, 陰圧で構成されたエアバリアを有する CPZ における作業では, 開放部の境界周辺で発生した微粒子が CPZ 内に混入するリスクが高くなる. また, 開放型の装置を採用する APA 設計では, このような, SZ と CPZ の間で作業者の手や腕等が介在する状態を維持して実施さ

れることがある。以上より、作業で生じる微生物を含む微粒子混入のリスクや、CPZ の清浄度レベルおよび製品に及ぼす影響を評価することは大きな意義があると考える。APA の概念図を図 1.1 に示した。

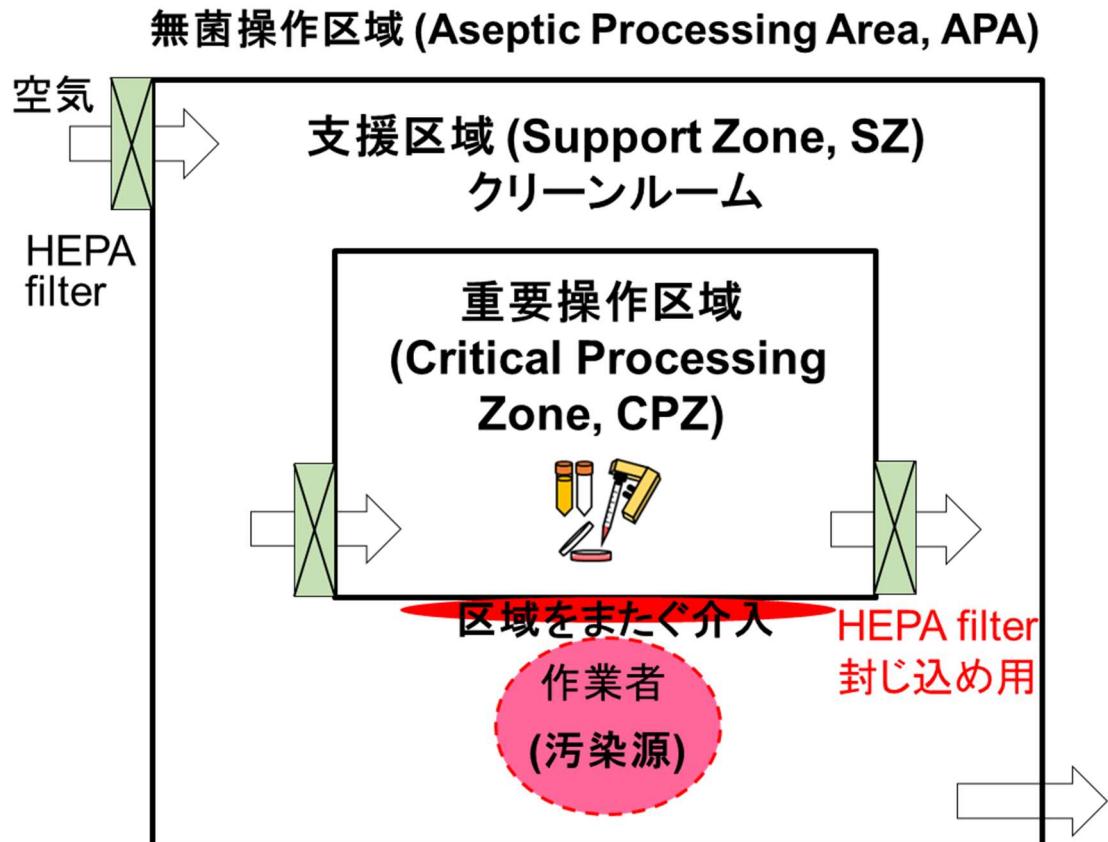


図 1.1 無菌操作区域 (APA) の概念図

1.4 本研究の目的と構成

本研究の目的は、APA 内の CPZ と SZ の気流の収支に着目し、APA の設計の考え方を示すこと、及び SZ 内での作業が CPZ への微粒子の混入に及ぼす影響について定量的に示すことである。目的達成にあたり、本研究では APA 内の CPZ と SZ を気流の流れによって領域分けし、領域ごとに気流と微粒子の速度論的解析を行った。また、SZ から資材や作業者の手や腕が CPZ に導入される際に CPZ の清浄度に与える影響を微粒子混入の機序について定量化することで明らかに

するという戦略をとった。図 1.2 と図 1.3 に、無菌性確保のための無菌操作の概念図と博士論文の構成をそれぞれ示した。

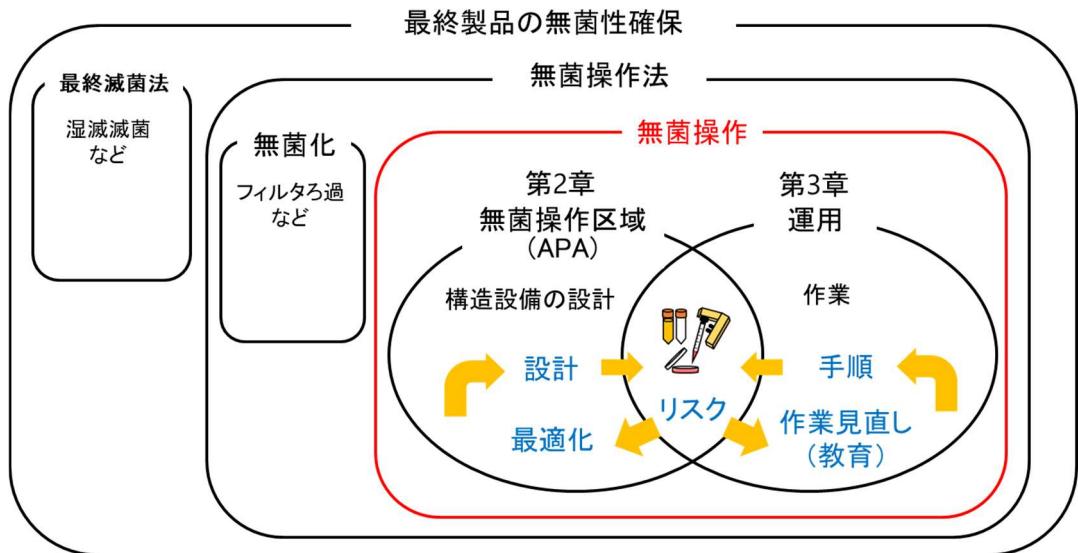


図 1.2 無菌性確保のための無菌操作の概念図

第1章
序論: 医療用無菌製品における無菌性保証の重要性と細胞製造における無菌操作の環境設計に向けた戦略

第2章
清浄空気の収支による無菌操作区域設計の考え方

第3章
作業者の動作による製品に対する微生物混入の影響

第4章
総括: 実際の装置の特性を踏まえた無菌操作の環境設計

図 1.3 博士論文の構成

第 1 章では、医療用無菌製品における無菌性保証の重要性と、無菌のために最終滅菌法が採用できない場合、無菌操作法により製造プロセスを構築し無菌を保証する必要があることを述べた。

第 2 章では、APAにおいて、SZ に採用されるクリーンルームや CPZ を構成する装置の構造設備の気流と発塵源の位置に着目した設計の考え方を示すため、SZ と CPZ を気流の流れに従って領域分けし、気流と微粒子の挙動を速度論的に解釈した。さらにこの解釈結果から、実際のクリーンルームにおける作業者のガウンニングによる発塵の抑制、CPZ の吸気口の設置位置、及びクリーンルームの換気回数など無菌操作環境を構築するための各要素について議論した。

第 3 章では、SZ から CPZ への資材や作業者の手や腕が導入される際の HEPA フィルタを介さない製品への微生物混入について、製品混入の機序を推定し、機序に基づく数式を立てた。数値計算により微生物混入の可能性を定量的に示し、作業者の作業による CPZ 内での製品への微生物混入のリスクについて議論した。

第 4 章では、総括として第 2 章及び第 3 章で得られた結果をまとめ、これらの結果からアイソレータシステムや安全キャビネットなど実際に使用される装置の特性を踏まえた無菌操作環境の設計や微生物混入のリスクについて述べ、無菌操作における工学的意義とその重要性を議論した。

第2章 清浄空気の収支による無菌操作区域設計の考え方

2.1 緒言

近年、細胞製品を用いた再生医療や細胞治療が進展している [16,17]。細胞製品は患者に直接投与されるため、有効性とともに無菌性を含む安全性が求められる。細胞製品の製造、すなわち細胞製造では、患者やドナーから採取・分離された細胞を容器に入れ、製品に必要な細胞数に達するまで拡大培養を繰り返す細胞加工操作が行われる [18]。細胞製品は生きた細胞の産物であるため、製品の無菌性を確保するために製造工程で最終滅菌を適用することはできず [17,18]、すべての工程を無菌的に行う必要がある [18]。無菌操作の目的は、外部から製品への微生物汚染を防ぐことである [19]。いくつかの研究で、浮遊微生物数と浮遊粒子数との間に相関関係があることが示されている [20-22]。無菌操作区域(APA)の無菌性は、浮遊微生物を制御することで達成され、構造設備の設計は浮遊微粒子を用いて評価される [22]。

作業者による細胞培養容器の開放を伴う細胞加工操作は、チャンバーを備えた開放系で実施される [8]。外部環境からの微生物汚染を防ぐために、物理的バリアやエアバリアで囲まれたチャンバー内の領域を細胞加工に採用される [23]。チャンバー内は、細胞加工に関わる環境の中で微粒子数や微生物数が最も低く制御された無菌環境であり、グレード A(ISO クラス 5)[24,25]に相当し、重要操作区域(CPZ)[25]と言われる。CPZ の周囲は、作業者が作業する支援区域(SZ)である [25]。SZ は、作業者の作業によって CPZ の清浄度が影響を受けないような清浄度管理が必要とされる [23]。CPZ が設置されたクリーンルーム内に構成される SZ は、空気中の微粒子濃度が制御された環境である [14,23,26]。清浄度管理区域の分類について、表 2.1 に示した。

表 2.1 清浄度管理区域の分類

| 清浄度 管理の 分類 | 清浄度レベ ル | 最大許容微粒子数 (個/m ³) | | | |
|------------------|------------|------------------------------|---------|-------------|-------------|
| | | 非作業時 | | 作業時 | |
| | | ≥0.5 μm | ≥5.0 μm | ≥0.5 μm | ≥5.0 μm |
| 重要操 作区域 | グレード A | 3,520 | 20 | 3,520 | 20 |
| 直接支 援区域 | グレード B | 3,520 | 29 | 352,000 | 2,900 |
| 間接支 援区域 | グレード C | 352,000 | 2,900 | 3,520,000 | 29,000 |
| 間接支 援区域 | グレード D | 3,520,000 | 29,000 | 作業形態 による | 作業形態 による |

クリーンルーム内の微粒子発生源は、作業者、原材料、機器等が挙げられ、主な微粒子発生源は作業者である [7,10,11]. さらに、安全キャビネットやアイソレータシステムが CPZ として使用されることがよく知られており、これらの吸気と排気のためのダクトの配置パターンは多様である [27]. 従来 APA を設計する技術者は、APA 内の清浄度について経験に依存してきたが、評価するための計算方法が必要とされた.

Whyte ら [26] は、クリーンルームに清浄空気を供給し、換気によって微粒子濃度を制御することを報告した. クリーンルームでは、給気及び排気や微粒子発生源の位置により、換気効率や微粒子濃度分布が変化する可能性がある [28,29].

換気回数、微粒子発生速度、及びエアフィルタの粒子通過率などの変数を用いて、クリーンルームにおける微粒子濃度を計算する方法が開発されている [26,30]。しかし、CPZ や SZ を有する APA における空気の物質収支を考慮した計算手法はほとんど報告されていない。

本研究の目的は、無菌操作のための APA の設計において、空気清浄度を考慮した設計の考え方を提案することである。APA の CPZ、SZ の上部空間、下部空間の 3 つの領域から構成される空間における微粒子濃度の速度論的モデルを構築し、清浄度に及ぼす清浄空気の風量の影響を議論した。また、CPZ の吸気口と排気口の位置を変えた 3 つの事例を設定し、細胞製造における構造設計に基づく運用を考慮した上で、SZ における換気と作業者による微粒子放出の影響を議論した。

2.2 方法

2.2.1 無菌操作区域のモデル設定

High efficiency particulate air (HEPA) フィルタを通過する清浄空気の気流と微粒子発生源の位置に関する微粒子濃度分布を考慮し、SZ をクリーンルーム内の上部領域と下部領域と垂直方向に 2 つの領域に分割したモデルを設定し、3 つの事例を検討した。CPZ の吸気口と排気口の位置の違いにより、APA の清浄度がどのように影響するかを、微粒子発生速度や換気回数を変化させて分析した。

図 1 に示す APA の施設構造モデルを以下のように想定した。容器開放を伴う細胞加工操作を行う APA は、容器開放が可能な一方向流下で清浄度を確保できる CPZ (領域 1) と、CPZ の清浄度に影響を与えない SZ (領域 2) と呼ばれる隣接ゾーンから構成される。領域 2 には APA 外の領域 (領域 3) から空気が供給される。そして、施設構造モデルは、SZ を縦に 2 つの領域 (下部空間；領域 2(A) と上部空間；領域 2(B)) と CPZ に分割し、CPZ のための装置の空気入口と空気出口の位置を変えた 3 つの事例 (事例 1-3) で構成される。

領域 1 のための装置は、装置外から領域 1 に空気を供給する吸気ダクト (領域 4) と、領域 1 から装置の排気口から排気する排気ダクト (領域 5) から構成される。領域 2(A) は、作業者から微粒子が発生する領域である。微粒子は空気の下向きの気流に逆らって移動することができないとし、上部領域 (領域 2(B)) への微粒子の流入はないとする。

事例 1-3 の構造パターンは、領域 1, 4, 5 で構成される機器の吸気口と排気口の位置が以下のように異なるように設定されている。事例 1 では、機器の吸気口と排気口は APA の外側 (領域 3) にある。事例 2 では、吸気口は領域 2(A) 内にあり、排気口は領域 2(B) 内にある。事例 3 では、空気の吸気口と排気口は

領域 2(B)内にある。また、図 2.1 に示すように、各事例には HEPA フィルタが設置されている。ここで、各事例で想定される設備の例としては、それぞれ安全キャビネット（クラス II B2）（事例 1）、安全キャビネット（クラス II A2）（事例 2）、アイソレータシステム（事例 1-3）が挙げられる。

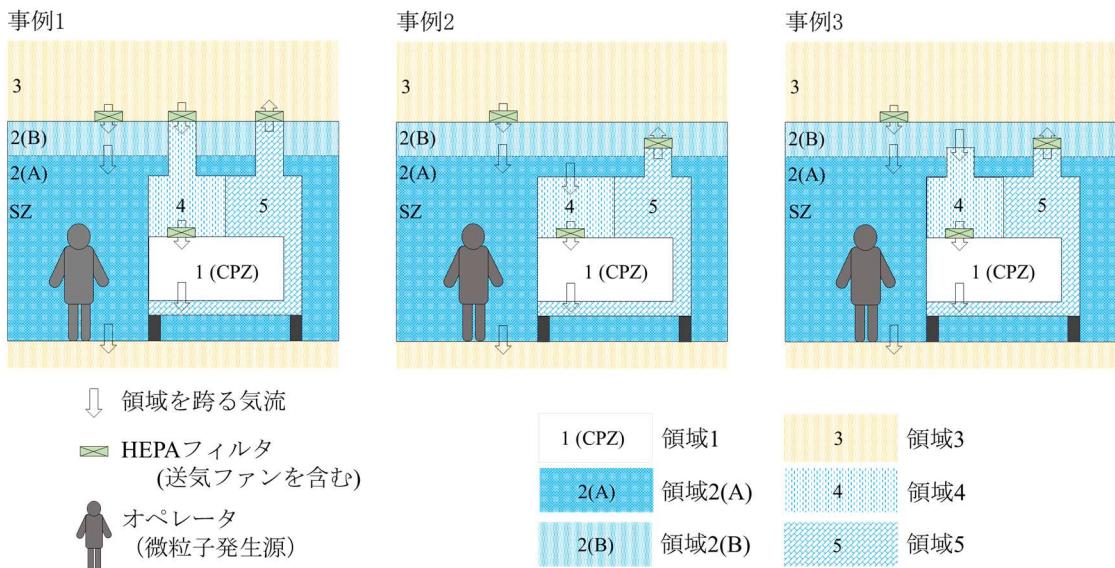


図 2.1 無菌操作区域 (APA) の施設構造モデルの側面図及び重要操作区域 (CPZ) を構成する装置の吸排気口の位置が異なる 3 つの事例. 領域 1 は装置内の CPZ である. 領域 2 は装置が設置されているクリーンルーム内の支援区域(SZ) である. 領域 2(A)と領域 2(B)は、領域 2 を鉛直方向に分割した領域である. 領域 3 は領域 2 の外側の領域である. 領域 4 は装置外部から領域 1 への給気ダクト領域である. 領域 5 は領域 1 から装置外部への排気ダクト領域である. 領域 1,4,5 を合わせて装置を構成する. 破線は領域 2 を仮想的に領域 2(A)と領域 2(B) に分割する境界線を示す. 事例 1 は領域 3 から領域 4 へ給気し、領域 5 から領域 3 へダクトで直接排気することで、装置の吸排気が領域 2 に影響を与えない設定である. 事例 2 は領域 2(A)から領域 4 へ給気し、領域 5 から領域 2(B)へ排気する設定である. 事例 3 は給気が領域 2(B)から領域 4 へ、排気が領域 5 から領域 2(B)へという設定である. 各事例で想定される装置は、事例 1 が生物学的安全キャビネット (クラス II B2), 事例 2 が生物学的安全キャビネット (クラス II A2), 事例 1~3 がアイソレータシステムである.

2.2.2 清浄空気の収支による反応速度論的解析

時間 t [h]における各領域の微粒子濃度 α_i [(particle)·m⁻³]の変化を求める空気の収支方程式を構築した。

内部に領域 2 を構成するクリーンルームは、外部の影響から分離するために隔壁で囲まれた構造設備とし、床面積 A [m²]、高さ H [m]の空間とした。 $F_{32(B)}$, $F_{2(B)2(A)}$, 及び $F_{2(A)3}$ [m³h⁻¹]で表される領域 2 の換気風量は、クリーンルームの換気風量を R_{AC} [h⁻¹]としたとき、 $R_{AC}AH$ [m³h⁻¹]と等しくなるように設定した。HEPA フィルタの微粒子透過率を p とし一定とした。微粒子の発生源は作業者、原材料、装置からである。原材料と装置からの発生源は無視できると仮定し [10,11]、作業者からの平均微粒子発生速度 β [(particle)·h⁻¹]は一定とした。発生した微粒子や異なる領域から持ち込まれた微粒子は、その到達範囲内で速やかに均一かつ定常となるとした。

領域 1 の清浄空気の線速度を v_1 [ms⁻¹]とし、領域 1 の底面積を A_1 [m²]とした。装置の吸排気および装置内の気流を表す気流速度は、 $F_{34}, F_{2(A)4}, F_{2(B)4}, F_{41}, F_{15}, F_{53}$, 及び $F_{52(B)}$ とし、 v_1A_1 [m³s⁻¹]と等しくなるように設定した。領域 2 内に装置の吸排気がある場合、装置の風量 v_1A_1 [m³s⁻¹]は、領域 2 内の換気のための風量に加算または減算されたとした。

領域 1 では、時間 t [h]当たりの微粒子数の変化は、領域 4 から HEPA フィルタを通して領域 1 に供給される風量 F_{41} [m³h⁻¹]とその微粒子濃度 $\alpha_4 p$ [(particle)·m⁻³]の積と領域 1 から領域 5 に排出される風量 F_{15} [m³h⁻¹]と微粒子濃度 α_1 [(particle)·m⁻³]の積の収支で Eq. (1) のように示され、平衡状態(定常状態)における領域 1 の微粒子濃度 α_1 [(particle)·m⁻³]は、Eq. (2) のように示される。

$$\frac{dV_1\alpha_1}{dt} = F_{41}\alpha_4 p - F_{15}\alpha_1 \quad (1)$$

$$\alpha_1 = \frac{F_{41}\alpha_4 p}{F_{15}} \quad (2)$$

領域 2(A)では、 t に対する微粒子数の変化は、領域 2(B)から領域 2(A)に供給される風量 $F_{2(B)2(A)} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とその微粒子濃度 $\alpha_{2(B)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積と、領域 2(A)から領域 4 及び領域 3 に排出される風量 $F_{2(A)4} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ 及び $F_{2(A)3} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とその微粒子濃度 $\alpha_{2(A)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積に作業者からの発塵により生じる微粒子発生速度 (発塵速度) $\beta [(\text{particle}) \cdot \text{h}^{-1}]$ が加算された収支で Eq. (3) のように示され、平衡状態 (定常状態) における領域 2(A)の微粒子濃度 $\alpha_{2(A)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ は、Eq. (4) のように示される。

$$\frac{dV_{2(A)}\alpha_{2(A)}}{dt} = F_{2(B)2(A)}\alpha_{2(B)} - F_{2(A)4}\alpha_{2(A)} - F_{2(A)3}\alpha_{2(A)} + \beta \quad (3)$$

$$\alpha_{2(A)} = \frac{F_{2(B)2(A)}\alpha_{2(B)} + \beta}{F_{2(A)4} + F_{2(A)3}} \quad (4)$$

領域 2(B)では、 t に対する微粒子数の変化は、領域 3 及び領域 5 から領域 2(B)に供給される風量 $F_{32(B)} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ 及び $F_{52(B)} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とそれぞれの微粒子濃度 $\alpha_3 p$ $[(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$, $\alpha_5 p$ $[(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積と領域 2(B)から領域 4 及び領域 2(A)に排出される風量 $F_{2(B)4} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ 及び $F_{2(B)2(A)} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とその微粒子濃度 $\alpha_{2(B)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積の収支で Eq. (5) のように示され、平衡状態 (定常状態) における領域 2(B)の微粒子濃度 $\alpha_{2(B)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ は、Eq. (6) のように示される。

$$\frac{dV_{2(B)}\alpha_{2(B)}}{dt} = F_{32(B)}\alpha_3 p + F_{52(B)}\alpha_5 p - F_{2(B)4}\alpha_{2(B)} - F_{2(B)2(A)}\alpha_{2(B)} \quad (5)$$

$$\alpha_{2(B)} = \frac{F_{32(B)}\alpha_3 p + F_{52(B)}\alpha_5 p}{F_{2(B)4} + F_{2(B)2(A)}} \quad (6)$$

領域 4 では、 t に対する微粒子数の変化は、領域 2(B), 領域 2(A)及び領域 3 から領域 4 に供給される風量 $F_{2(B)4} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$, $F_{2(A)4} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ 及び $F_{34} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とそれぞれの微粒子濃度 $\alpha_{2(B)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$, $\alpha_{2(A)} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ 及び $\alpha_3 p$ $[(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積と領域 4 から排出される風量 $F_{41} [\text{m}^3\text{h}^{-1}]$ とその微粒子濃度 $\alpha_4 [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ の積の

収支で Eq. (7) のように示され、平衡状態（定常状態）における領域 4 の微粒子濃度 α_4 [(particle)·m⁻³] は、Eq. (8) のように示される。

$$\frac{dV_4\alpha_4}{dt} = F_{2(B)4}\alpha_{2(B)} + F_{2(A)4}\alpha_{2(A)} + F_{34}\alpha_3 p - F_{41}\alpha_4 \quad (7)$$

$$\alpha_4 = \frac{F_{2(B)4}\alpha_{2(B)} + F_{2(A)4}\alpha_{2(A)} + F_{34}\alpha_3 p}{F_{41}} \quad (8)$$

領域 5 では、 t に対する微粒子数の変化は、領域 1 から領域 5 に排出される風量 F_{15} [m³h⁻¹] とその微粒子濃度 α_1 [(particle)·m⁻³] の積と領域 5 から領域 2(B) もしくは領域 3 に排出される風量 $F_{52(B)}$ [m³h⁻¹]、 F_{53} [m³h⁻¹] とその微粒子濃度 α_5 [(particle)·m⁻³] の積の収支で Eq. (9) のように示され、平衡状態（定常状態）における領域 5 の微粒子濃度 α_5 [(particle)·m⁻³] は、Eq. (10) のように示される。

$$\frac{dV_5\alpha_5}{dt} = F_{15}\alpha_1 - F_{52(B)}\alpha_5 - F_{53}\alpha_5 \quad (9)$$

$$\alpha_5 = \frac{F_{15}\alpha_1}{F_{52(B)} + F_{53}} \quad (10)$$

事例 1 の定常状態において、Eqs. (2), (4) 及び (6) は、それぞれ Eqs. (11), (12) 及び (13) と式変形できる。

$$\alpha_1 = \alpha_4 p = \alpha_3 p^2 \quad (11)$$

$$\alpha_{2(A)} = \frac{F_{2(B)2(A)}\alpha_{2(B)} + \beta}{F_{2(A)3}} = \alpha_{2(B)} + \frac{\beta}{F_{2(A)3}} \quad (12)$$

$$\alpha_{2(B)} = \frac{F_{32(B)}\alpha_3 p}{F_{2(B)2(A)}} = \alpha_3 p \quad (13)$$

事例 2 の定常状態において、Eqs. (2), (4) 及び (6) は、それぞれ Eqs. (14), (15) 及び (16) と式変形できる。

$$\alpha_1 = \alpha_4 p = \alpha_{2(A)} p \quad (14)$$

$$\alpha_{2(A)} = \alpha_{2(B)} + \frac{\beta}{F_{2(A)4} + F_{2(A)3}} \quad (15)$$

$$\alpha_{2(B)} = \frac{F_{32(B)}\alpha_3 p + F_{52(B)}\alpha_5 p}{F_{2(B)2(A)}} \quad (16)$$

事例 3 の定常状態において、Eq. (2) 及び (4) は、それぞれ Eq. (17) 及び (12) と

式変形できる。

$$\alpha_1 = \alpha_4 p = \alpha_{2(B)} p \quad (17)$$

領域 2(A)における微粒子発生速度が領域 1, 2(A), 2(B)の清浄度に及ぼす影響を調べるため、各領域における微粒子濃度 α_1 , $\alpha_{2(A)}$, $\alpha_{2(B)}$ をそれぞれの平均微粒子発生速度 β に対してプロットした。また、領域 2 における換気回数が領域 1, 2(A), 2(B)の清浄度に及ぼす影響を調べるために、各領域における微粒子濃度 α_1 , $\alpha_{2(A)}$, $\alpha_{2(B)}$ を、それぞれの事例における異なる換気回数 R_{AC} に対してプロットした。ここで、 β は、Romano らの報告 [12] に基づき、作業者がカバーオールタイプの衣服を着用して静止している場合の微粒子発生速度 1.7×10^5 (particle)·h⁻¹ を低発塵速度条件、作業者がカバーオールタイプの衣服を着用して膝を曲げた姿勢の場合の微粒子発生速度 1.8×10^7 (particle)·h⁻¹ を高発塵速度条件とした。各領域における微粒子濃度の算出に使用したパラメータの値を表 2.2 に示す。

表 2.2 各領域の微粒子濃度計算に使用したパラメータ値

| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|--------------------------|-----------------|-----------------------------|----------------------|------|
| 領域 2 の面積 | A | m^2 | 1.2×10^1 | - |
| 領域 2 の高さ | H | m | 3.0 | - |
| 領域 1 の清浄空気の線速度 | v_1 | ms^{-1} | 4.5×10^{-1} | - |
| 領域 1 の底面積 | A_1 | m^2 | 8.0×10^{-1} | - |
| 領域 3 の微粒子濃度 | α_3 | (particle)・ m^{-3} | 3.5×10^7 | [31] |
| 微粒子が HEPA フィルタを通過する率 | p | - | 5.0×10^{-5} | [32] |
| 換気回数一定条件検討における領域 2 の換気回数 | R_{AC} | h^{-1} | 3.0×10^1 | [29] |

2.3 結果

2.3.1 換気回数一定条件下で微粒子発生速度が領域 1, 2(A)及び 2(B)の微粒子濃度に与える影響

図 2.2 に各事例における平均微粒子発生速度 β に対する α_1 , $\alpha_{2(A)}$, 及び $\alpha_{2(B)}$ の結果を示した。領域 1 については、事例 1 では α_1 が 8.8×10^{-2} , 事例 3 では α_2 が 4.0×10^{-2} で一定であり、事例 1 の α_1 は事例 3 の 2.2 倍であった。事例 2 では、 α_1 は $\beta = 1.0 \times 10^4$ で 4.0×10^{-2} となり、事例 3 と同じ値であった。 β の増加とともに事例 2 の α_1 は増加し、 β が 2.3×10^6 のとき α_1 は事例 1 と同じ値を示した。さらに、 β が増加するにつれて、事例 2 の α_1 は対数的に増加した。

領域 2(A)について事例 1 では、 $\beta = 1.0 \times 10^4$ のときに $\alpha_{2(A)}$ は 1.8×10^3 であり、 β が 1.0×10^4 から 1.0×10^5 に増加すると 5.0% 増加し、さらに β が 1.0×10^5 から 1.0×10^6 に増加すると 45% 増加した。 β が 1.0×10^7 を超えると、 $\alpha_{2(A)}$ は対数的に増加した。事例 2 では、 $\beta = 1.0 \times 10^4$ のときに $\alpha_{2(A)}$ は 8.0×10^2 となり、事例 1 の 0.45 倍となった。 β が増加するにつれて、事例 2 の $\alpha_{2(A)}$ は事例 1 と同じ増加率を示した。事例 3 では、 $\beta = 1.0 \times 10^4$ のときに $\alpha_{2(A)}$ は事例 2 のそれとほぼ同じであった。しかし、 β が 1.0×10^7 に近づくと、事例 3 の $\alpha_{2(A)}$ は事例 1 のそれに収束した。

領域 2(B)については、 $\alpha_{2(B)}$ は事例 1 で 1.8×10^3 、事例 2 と事例 3 で 8.0×10^2 と一定であり、事例 1 の $\alpha_{2(B)}$ は事例 2 及び 3 の 2.2 倍であった。

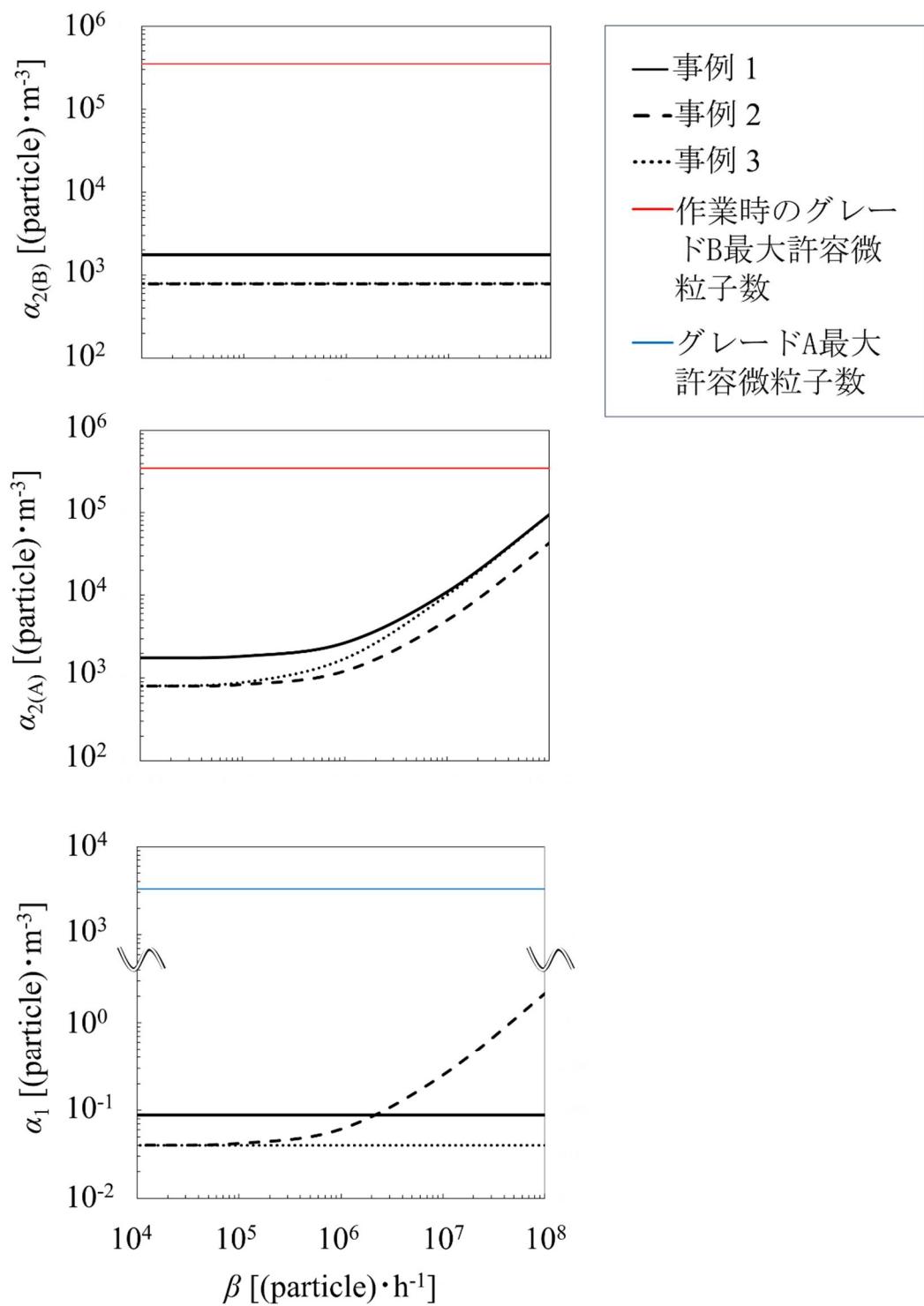


図 2.2 微粒子発生速度に対する領域 1, 2(A), 及び 2(B) における各事例の微粒子濃度

2.3.2 微粒子発生速度一定条件下で換気回数が領域 1, 2(A)及び 2(B)の微粒子濃度に与える影響

図 2.3 は、各事例における換気回数 R_{AC} の違いに対する α_1 , $\alpha_{2(A)}$, $\alpha_{2(B)}$ の結果を示す。領域 1 について、低発塵速度条件下の事例 1 の α_1 は R_{AC} に関係なく 8.8×10^{-2} で一定であった。事例 2 では、 $R_{AC} = 30$ で α_1 は 4.6×10^{-2} , $R_{AC} = 5$ で α_1 は 1.7×10^{-2} となり、 R_{AC} を下げると α_1 が減少することがわかった。事例 3 では、 $R_{AC} = 30$ で α_1 は 4.0×10^{-2} , $R_{AC} = 5$ で α_1 は 1.1×10^{-2} となり、 R_{AC} を下げると α_1 が減少することがわかった。事例 2 及び事例 3 のいずれにおいても、 R_{AC} を下げると α_1 が低下し、事例 1 と比較して一貫して低い結果を示した。高発塵速度条件下では、事例 1 及び事例 3 は、いずれも α_1 が低発塵条件下と同じプロファイルを示した。事例 2 では、 $R_{AC} = 30$ で α_1 は 4.5×10^{-1} , $R_{AC} = 5$ で α_1 は 6.3×10^{-1} であり、 R_{AC} が減少するにつれて α_1 が増加した。また、事例 2 の α_1 は、事例 1 のそれに比べて常に高かった。

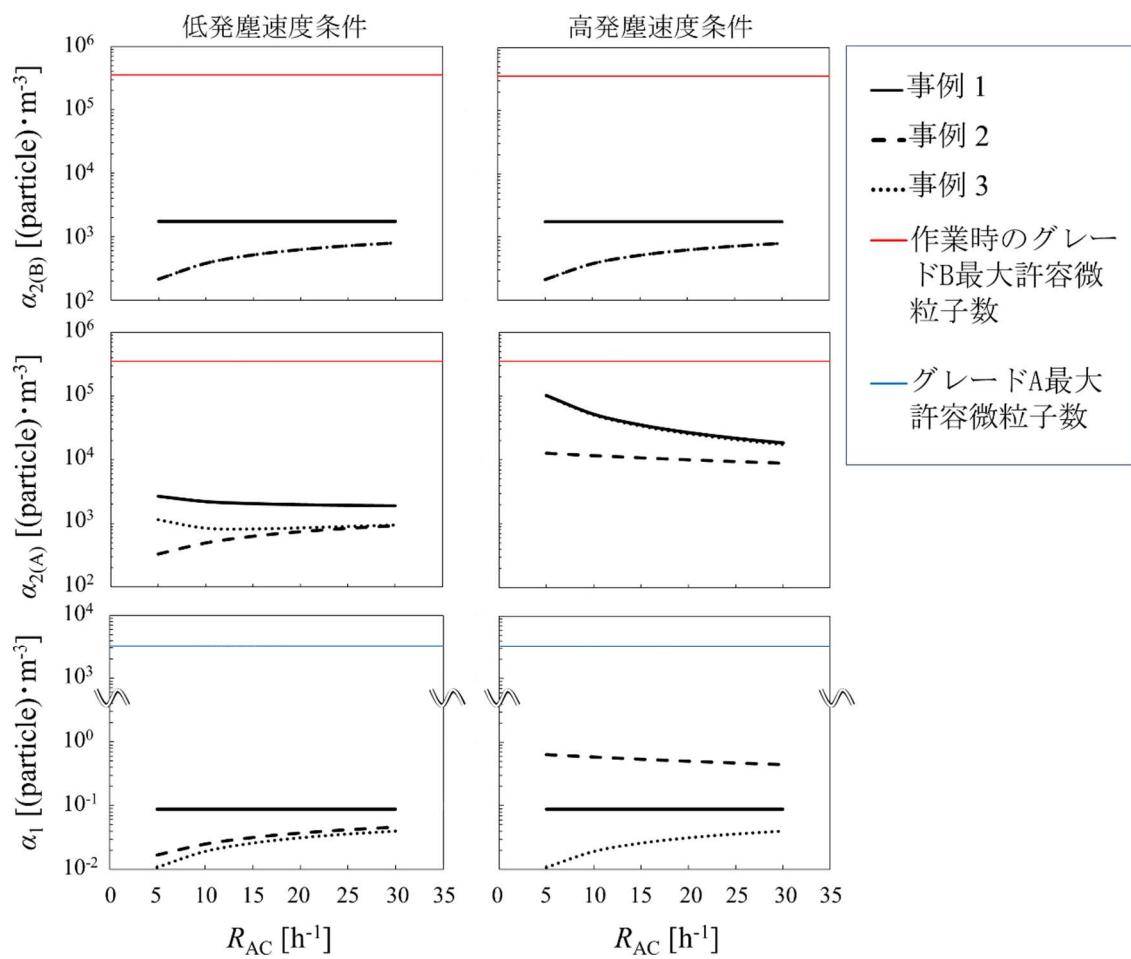


図 2.3 低及び高発塵速度条件における換気回数に対する領域1, 領域2(A), 及び領域2(B) の各事例の微粒子濃度

2.4 考察

無菌製造において、APA の微粒子制御の設計は微生物汚染を防ぐために重要である。特に APA の CPZ と SZ における吸排気口の位置は、安全キャビネットやアイソレータシステムなどの CPZ を有する装置を用いて無菌環境を維持するための重要な論点の一つである [27,33]。また、本論文の提案する SZ を鉛直方向に領域分けする手法は、装置を用いた実用的な制御の観点からも更なる検討が必要である。本論文の APA の構造モデルにおいて、事例 1 は製造規模の大きな製薬会社で広く採用されており、コンタミネーションリスクがない。一方、製造規模が比較的小さい細胞製造では、リスクベースで構造を設計し、事例 2 や事例 3 のように CPZ から HEPA フィルタを通過した気流を SZ に排気する。主に、事例 2 では領域 2(A)から吸気する安全キャビネット、事例 3 では領域 2(B)から吸気するアイソレータシステムが想定できる。しかし、無菌製剤製造における比較的大型の APA と異なり、細胞加工施設における比較的小型の APA の設計思想に関する知見は少ない。そこで、図 2.1 に示す 3 つの事例について、微生物汚染リスクとその吸排気位置への影響、APA の設計考え方について、装置を用いた実際の管理を交えて考察する。

2.4.1 CPZ の室内吸排気による製品への微生物汚染リスク

事例 1 では、図 2.2 の β 及び図 2.3 の R_{AC} によらず α_1 が一定であることから、微生物数と微粒子数の相関が一定であれば、領域 1 の微生物濃度は領域 2 の微粒子発生速度や換気風量によらず一定であることが示唆される。微粒子に対する微生物の相関割合が他の報告 [21,22] よりも比較的高い Fedotov [20] が示した $0.5 \mu\text{m}$ 以上の微粒子数 1.0×10^3 あたり微生物数 1.0 という相関に基づいて

微生物濃度を算出したところ、事例 1 の α_1 が 8.8×10^{-2} であったことから、事例 1 の微生物濃度は約 8.8×10^{-5} (bio-particle)・ m^{-3} と推定できる。開放容器内の微生物汚染は、気流に垂直な容器の有効開放面積と累積開放時間に依存する [34]。10 cm の培養皿を有効面積と仮定し、領域 1 の気流速度 $F_{41} = 1.3 \times 10^3 m^3 h^{-1}$ を用いて開放容器内の微生物汚染を計算すると、 $8.9 \times 10^2 h$ の連続気流で 1.0 個の微生物粒子が導入されると推定される。本研究では、事例 1 の α_1 から算出したこの確率を対照とする。

図 2.2 の事例 1 の β の増加に伴う $\alpha_{2(A)}$ の増加、図 2.3 の事例 1 の R_{AC} の増加に伴う $\alpha_{2(A)}$ の減少は、Whyte ら [26] が示したクリーンルーム内の微粒子濃度が、微粒子発生速度の増加とともに増加し、換気風量の増加とともに減少するデータと一致している。このことは、本論文の空気の収支方程式が SZ の清浄度を検討するために使用できることを示唆している。彼らは、クリーンルーム内の微粒子濃度が換気気流によって制御されることを方程式で示した。このことは、 $\alpha_{2(A)}$ と $\alpha_{2(B)}$ は、SZ 内に持ち込まれた微粒子と SZ 内で発生した微粒子の合計を、クリーンルームの換気気流と装置の吸排気気流の両方を含む総気流で割ることにより計算できることが示唆される。図 2 より、事例 1 の $\alpha_{2(B)}$ の結果から、領域 2(B) の清浄度は、領域 3 から HEPA フィルタを通過した直後の微粒子を含んだ空気で満たされた一定の環境であることがわかる。クリーンルームの天井付近など、微粒子発生源である作業者から離れた位置にある給気口付近は局所的な換気効果が高いいためである。Novoselac ら [28] は、微粒子発生源からの距離によってクリーンルーム内の微粒子濃度に分布が生じることを示しており、微粒子濃度分布でクリーンルームを領域分けしたとき、領域 2(B) が最も微粒子濃度が低い領域と考えられる。このように、鉛直方向に分割した 2 つ領域の微粒子濃度を $\alpha_{2(A)}$ 、 $\alpha_{2(B)}$ で適切に表示できることを確認した。

2.4.2 APA の設計に向けた SZ における吸気と排気の清浄度への寄与

図 2.2 に示す事例 2 の α_1 の結果は、事例 1 の一定値とは異なり、 β の増加とともに α_1 が増加していることから、装置の吸気口が領域 2(A)に位置する場合、SZ での微粒子発生速度が増加すると α_1 が対照値を超えることが示唆される。このことは、装置内で容器を開放する際に、より多くの微粒子が製品に接触する可能性が高まるることを示しており、微粒子濃度と微生物濃度の相関関係から、微生物汚染の確率が高まる可能性が考えられる。装置の吸気口が領域 2(A)にある場合は、領域 1 の微粒子濃度が対照を下回るためには、微粒子発生速度を制御する必要があることが示唆された。図 2.2 より、 β を 2.3×10^6 以下に抑制することで $\alpha_{2(A)}$ を低減でき、 α_1 も対照を下回ることがわかった。従って、微粒子発生の影響を受ける領域から装置が空気を取り込む場合においても、作業者からの微粒子発生速度を抑制することで、CPZ, SZ ともに事例 1 と同等以上の清浄度で APA を構築できると考えられる。図 2.2 より、事例 2 の $\alpha_{2(B)}$ が事例 1 に比べ β に対して低い値を示すのは、SZ の換気用空気に装置内の HEPA フィルタにより微粒子が除去された空気が加わるためと分析された。装置の吸排気により、クリーンルーム内の微粒子濃度は効果的に低減された。事例 2 の $\alpha_{2(B)}$ が事例 1 のそれよりも低くなった機構は、装置から領域 2(B)に排気された空気 ($F_{52(B)}$) が SZ の換気用空気 ($F_{32(B)}$) と合算され、総風量が増加したためと考えられる。また、装置から排気され HEPA フィルタを通過した $F_{52(B)}$ は、 $F_{32(B)}$ よりも微粒子濃度が低い結果となった。このことから、SZ の中で最も微粒子濃度が低い領域である領域 2(B)に、装置から排気される空気が加わることで、さらに微粒子濃度が低減した環境を構築できることが示唆された。しかし、領域 2(A)および領域 2(B)では、装置の吸排気により微粒子濃度が減少しているにもかかわらず、 $\alpha_{2(A)}$ および $\alpha_{2(B)}$ は、対照としての α_1 と比較すると、依然として 1.0×10^3 (particle) • m⁻³ 以上の差

を示している。このことは、CPZ と SZ の間で微粒子濃度にまだ大きな差があることを示している。このことは、隣接する領域 2(A)から領域 1 に物質が直接移動する場合、領域 1 に微粒子が混入する懸念が高いことを示唆している。以上より、微粒子発生の影響を受ける領域から吸気する場合、作業者からの微粒子発生速度を抑えることで、事例 1 と比較して CPZ, SZ ともに微粒子濃度を低減した APA を構築できることが示唆される。一方で、微粒子発生速度が増加すると、SZ の微粒子濃度が上昇し、CPZ の微粒子濃度上昇を招き、CPZ の微粒子や微生物などの清浄度が悪化する可能性がある。

図 2.2 より事例 3 の α_1 が事例 1 のそれよりも低く、 β によらず一定である結果から、SZ から空気を取り込む場合でも、領域 2(B)に装置の吸気口を設置することで、微粒子発生速度によらず対照の α_1 を下回る CPZ を構築できることがわかる。この結果は、微粒子発生速度に依存する事例 2 とは異なり、微粒子発生の影響を受ける領域 2(A)から微粒子発生の影響を受けない領域 2(B)に装置の吸気口の位置を変更したことに起因する。このことは、装置の吸気口を設置する際に、SZ 内の微粒子濃度分布を考慮することが CPZ を設定する上で極めて重要であることを示唆している。微粒子発生速度に非依存的であることは、微粒子発生速度に影響を与えるクリーンルームで着用している衣服の種類や作業者の活動に依存しないことを示唆している [12]。事例 3 における $\alpha_{2(B)}$ の挙動は、図 2.2 および図 2.3において事例 2 とほぼ同じであり、装置の排気口を領域 2(B)に配置することで、装置の吸気口が領域 2(A)にあるか領域 2(B)にあるかにかかわらず、装置内の HEPA フィルタを通過し装置から排気される空気により領域 2(B)の微粒子濃度が低減することを示している。図 2.2において、 β が 1.0×10^6 未満の場合、事例 3 の $\alpha_{2(A)}$ が事例 2 の $\alpha_{2(A)}$ に近づく減少傾向は、Eq. (12)において $\alpha_{2(B)}$ が支配的であるためであり、 β が 1.0×10^6 以上の場合、事例 3 の $\alpha_{2(A)}$ が事例

α_1 の $\alpha_{2(A)}$ に近づく増加傾向は、Eq.(12)において β が支配的であるためと分析される。このことから、事例 3 の領域 2(A)における装置の吸排気に基づく微粒子濃度低減効果は、微粒子発生速度の範囲、すなわち作業者の着衣による微粒子発生速度の程度によって差があることが示唆される。事例 3 では、装置の吸排気が領域 2(B)で行われるため、領域 2(A)の換気風量 ($F_{32(B)}$) に装置からの排気風量が加算されないが、 β が低く Eq. (12) で $\alpha_{2(B)}$ が支配的な場合、領域 2(B)における装置の吸排気による微粒子低減効果が領域 2(A)に及ぶことが示された。領域 2(B)の形成は、クリーンルーム内の気流パターンに影響を及ぼすと報告されている様々な要因、例えば、クリーンルームの吸気口と排気口の位置、気流を妨げる物体、圧力と温度の差、ドアの開閉や作業者の動きなどによって影響を受ける [35]。これらのことから、気流の把握と管理が必要である。装置が SZ 内から吸気する場合でも、気流と微粒子分布を考慮して装置の吸気口を設置することで、微粒子発生速度の影響を受けずに対照を下回る微粒子濃度の CPZ を構築できることが示唆された。具体的には、作業者の更衣による粒子発生速度の抑制の程度に関係なく、対照を下回る微粒子濃度の CPZ を実現できる。

図 2.2 の $\alpha_1, \alpha_{2(A)}, \alpha_{2(B)}$ の結果から、事例 2, 3 では、装置が SZ 内で吸排気することにより、CPZ と SZ 間の微粒子濃度が相互に影響し合っていることがわかった。装置の吸排気による SZ 内の微粒子濃度の変化は、CPZ 内の微粒子濃度に反映された。装置の吸気口を適切に配置し、微粒子発生速度を制御することで、CPZ, SZ ともに微粒子濃度の低い APA を構築できることが示唆された。3 つの事例の結果から、領域 3, 領域 2(A), 領域 2(B)のいずれから空気を取り込む装置であっても、作業者の適切な更衣により微粒子発生速度を抑制することで、対照を下回る微粒子濃度の CPZ を構築できることがわかった。さらに、事例 3 のように装置の吸気口を領域 2(B)に配置することで、作業者の更衣による微粒子發

生の抑制の程度にかかわらず、クリーンルーム外部と装置をつなぐダクトを設けることなく、対照を下回る微粒子濃度の CPZ を構築できることがわかった。

さらに、装置からの排気による清浄度への影響も大きい。事例 2 および事例 3 では、領域 2 (領域 2(A)および領域 2(B)の両方) の微粒子濃度が、図 2.2 および図 2.3 に示した事例 1 のそれよりも低下している。これは、領域 2 の空気が装置内に吸い込まれ、装置内の HEPA フィルタを通過した後、領域 2 に排気されるためである。つまり、装置によって領域 2 で発生した気流がクリーンルーム内の換気のための空気の増加に寄与し、領域 2 における追加の換気効果が生じた。これは、Whyte ら [26] が報告した装置による「additional air cleaning effect (空気清浄付加効果)」または Loomans ら [29] が報告した「equipment acting as a particle sink (微粒子を除去する装置)」とみなすことができる。これらの効果は、装置内の HEPA フィルタによる微粒子除去と、クリーンルーム内の気流増加による見かけ上の換気向上の両方を意味する。事例 2 と事例 3 の領域 2(B)の微粒子濃度は事例 1 よりも低かった。低発塵速度条件における事例 2 の領域 2(A)の微粒子濃度は、事例 1 のそれよりも低かった。これらの微粒子濃度は、換気回数が低下するにつれて低下する傾向があった。 $F_{32(B)}$ よりも微粒子濃度が低い $F_{52(B)}$ の割合が高くなるためである。クリーンルームの換気に使用される $F_{32(B)}$ の微粒子濃度 1.8×10^3 (particle) · m⁻³ に比べ、装置から HEPA フィルタを経て排気される $F_{52(B)}$ は微粒子濃度が低い。具体的には、高発塵速度条件下で 5 h⁻¹ の換気回数のときに装置が領域 2(A)から空気を吸い込んでも、 $F_{52(B)}$ から排気される微粒子濃度は 3.2×10^{-5} (particle) · m⁻³ である。これは $F_{32(B)}$ の微粒子濃度より 10^8 倍低く、著しく清浄な空気となった。したがって、クリーンルームの換気空気を $F_{32(B)}$ から $F_{52(B)}$ に置き換えると、定常状態における領域 2 の微粒子濃度は低減した。低微粒子発生速度条件で、事例 3 の領域 2(A)の微粒子濃度が事例 1 のそれ

と比較して低い傾向にあるのは、領域 2(B)において $F_{52(B)}$ の影響により微粒子濃度が低下した空気が領域 2(A)に移動したためと考えられる。このモデルでは、クリーンルームの換気風量が 30 h^{-1} の場合、換気風量は $1.1 \times 10^3 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ であり、 5 h^{-1} の場合、換気風量は $1.8 \times 10^2 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ であり、いずれの場合も、 $1.3 \times 10^3 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ の追加風量が装置から供給されている。装置の風量は一定であるため、クリーンルームの換気風量が減少するにつれて装置の風量の割合が増加した。領域 2 の容積に対する装置の風量は、領域 2 の換気回数に対応する。つまり、このモデルでは、 $1.3 \times 10^3 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ の装置の気流は、領域 2 における 36 h^{-1} の見かけの換気回数に相当し、これは報告されている製薬用クリーンルームにおける換気回数と同等かそれ以上である [29]。クリーンルームの容積に対して装置からの風量が十分に加わっていれば、クリーンルームの換気風量を低減することができる。微粒子発生速度が低い場合と高い場合では、領域 2(A)の微粒子濃度の挙動は事例 2 と事例 3 で異なる。事例 2 では、装置によって領域 2(B)から排気された空気は、領域 2(A)に到達した後、装置に吸気され、その結果、領域 2 全体に装置からの気流が追加された。事例 3 では、装置の吸気と排気の両方が領域 2(B)で行われるため、領域 2(A)に装置からの気流が追加されることはない。さらに、装置が領域 2(A)から空気を取り込む場合、領域 2(B)から空気を取り込む場合よりも、装置内の HEPA フィルタで除去される微粒子数が多くなる。微粒子発生速度が高い条件下において、事例 1 および事例 3 とは対照的に、事例 2 では、換気回数の低下に対する領域 2(A)の微粒子濃度の上昇が抑制されており、「空気清浄付加効果」の存在が示された。しかし、微粒子発生の影響を受ける領域 1 の微粒子濃度が対照を超えたことから、容器開放を伴う細胞加工時に、より多くの微粒子が製品に接触する可能性が高まる懸念が挙げられる。以上より、装置の吸気口の位置の違いにより「空気清浄付加効果」に差が生じ、PIC/S [36] および FDA

[37] による無菌医薬品製造ガイドラインで示される換気回数と比べて、クリーンルームの換気回数を低減できることがわかった。

2.4.3 APA の構造設計に向けたアプローチ

容器開放を伴う細胞処理のための APA の設計と運用において、考慮すべき要素には、清浄度管理のための気流管理、微粒子発生速度を抑制するための作業者の更衣、CPZ を構成する装置の吸気口の設置位置などが含まれる。以下では、設計段階におけるこれらの要素について述べる。クリーンルームの気流のみに基づいて換気風量を設計する場合、クリーンルームの換気において、装置の「空気清浄付加効果」が考慮されず、過剰換気につながる可能性がある [29,38,39]。換気風量の増加はファンのエネルギーコストの増加につながるため、エネルギーコストの観点からも、適切な換気風量で清浄度を維持することが望ましい。Eq. (15) と Eq. (16) から解析すると、SZ の容積を小さくする、つまり $F_{32(B)}$ を小さくする、あるいは装置の台数や装置 1 台あたりの風量を大きくする、つまり $F_{2(A)}$ と $F_{52(B)}$ を大きくすることで、装置の「空気清浄付加効果」が高まることがわかる。装置が設置され、装置が吸気及び排気を行うクリーンルーム内の換気風量を設計する場合、装置稼働時の「空気清浄付加効果」を考慮することで、必要換気風量を算出することができる。特に、非稼働時間帯など SZ に作業者がいない場合、換気風量を大幅に削減できると考える。このような削減が可能なのは、作業者がいないときは、微粒子発生速度が低いからである。

本研究において、計算結果は環境や運用特性の変動がない APA の清浄度を表す。実際の運用では、換気回数の低減は、クリーンルーム外からの換気風量の減少を意味し、クリーンルーム内の気流パターンを変化させる可能性がある [35]。事例 2 と事例 3 のいずれにおいても、換気回数を減らす際は、気流パターンの

変化とともに微粒子濃度分布の変化を考慮することが重要である。クリーンルーム内の気流は、温度、内部構造、風量など様々な要因によって変化することが報告されている。したがって、領域 2(B)のような無垢空間を形成する場合、気流の設計と管理が重要である。実測に加え、数値流体力学 (CFD) を用いた気流の予測やシミュレーションも報告されており [40]、CFD を用いた気流シミュレーションは無垢空間の形成に利用できる。

事例 2 のように、領域 2(A)に装置の吸気口がある場合、クリーンルームの換気回数を低減した条件下においても、クリーンルーム内の微粒子発生速度を抑えることで、CPZ、SZ ともに事例 1 より微粒子濃度が低い環境を構築することができる。作業者からの微粒子発生速度を抑制する方法としては、報告 [12] にあるように、全身を覆い、皮膚の露出を最小にするクリーンルーム用衣服の着用がある。微粒子発生速度を十分に抑制するためには、クリーンルーム用衣服の材質を慎重に選択し、洗濯、乾燥、滅菌などの運用方法やさらにクリーンルーム用衣服の下に着用する衣服の材質にも考慮する必要がある。作業者の経験、専門知識、教育、訓練も重要な要素である [41]。微粒子発生速度が抑制され、高い清浄度が維持される SZ の環境は、医薬品製造の清浄度管理基準 [24] のグレード B に相当する。グレード B は、装置が微粒子発生源の影響を受ける SZ から空気を吸入する場合に必要とみなされる。グレード B の環境に設置される装置の例は、安全キャビネット (BSC) が挙げられる [14,27]。SZ からエアバリアを介して BSC 内の CPZ に作業者の手や資材を直接導入する場合は、手や資材の表面に付着した微粒子や微生物が混入することが考えられ、潜在的なリスクをもたらす可能性がある [27,42]。作業者から発生する微粒子には微生物が含まれることが報告されている [12]。グレード B の環境における BSC 内での作業において、作業者の介入が微生物汚染の最も重要なリスクであることが示されている [7]。実

際の製造では、BSC に介入した作業者の手や腕が汚染源となり、BSC 内での微生物の落下リスクにつながる可能性があるため [43]、本研究の計算結果と比較すると、汚染の確率は高くなると予想される。微粒子や微生物による汚染の可能性を低減するためには、作業者が存在する SZ 内の微粒子濃度を可能な限り低くする必要がある。したがって、更衣の選定と作業者の動作を適切にすることにより、微粒子発生速度を抑制することが重要である。そして、装置が提供する「空気清浄付加効果」は、SZ 内の微粒子濃度を低減するために有用と考えられる。

領域 2(B)のように、微粒子濃度が低く、微粒子発生の影響を受けない「無垢空間」が形成されている場合、そこを装置の吸気口として利用することができる。このような場合、更衣の必要性を減らすか、または不要とみなすことができる。更衣の必要性が比較的低い清浄度管理環境は、グレード C または D に相当する [24]。グレード C または D では、グレード B と比較して、加温や換気などの空調システムのコストが著しく低く、微粒子発生速度の抑制効果が低い更衣が採用できる [14]。しかしながら、微粒子発生速度を抑制する効果の低い更衣の採用は、作業者から放出されるあらゆるサイズの微粒子数の増加を意味する [12]。5.0 μm 以上 30 μm 未満の比較的大きなサイズの微粒子は、微生物のキャリアとなる可能性があり [10]、微粒子の沈着速度の増加や表面への堆積につながる [44]。微粒子発生速度の抑制効果が低い更衣を採用できる SZ では、作業者表面と資材表面の双方に付着する微粒子や微生物が増加することが予想される。CPZ での作業開始前に、資材表面に付着している微生物が少ない場合は、簡単な除塵や、必要に応じて微生物除去などの消毒を行うことで、CPZ の清浄度を確保することができる。しかし、資材の表面に多くの微生物が付着している場合は、除染パスピックスのような高度な除染システムの使用が必要となる [33]。グレード B と比較して比較的高い微粒子濃度が予想されるグレード C または D の条件

下で管理されている SZ から CPZ に資材を導入する場合、除染パスボックスを使用することで、CPZ の清浄度に影響を与えない作業が可能となる [23]。装置の吸気口と排気口を「無垢空間」に配置し、装置に装着された手袋を介し密閉環境下での操作を実現し CPZ への直接的な介入回避することにより、比較的高い微粒子濃度が予想される SZ に装置を設置した場合でも、製品に接触する微粒子数を抑制する CPZ を構築することができる。アイソレータシステムは、このような密閉された装置の具体例である [14,23,33,39]。SZ からアイソレータシステム内の CPZ に資材を導入する際に、除染パスボックスに資材を通過させるアイソレータシステムを使用することで、CPZ の清浄度に影響を与えない作業を実施することが可能であることが示唆されている [14,23,33]。

装置の吸気口の位置を考慮した設計アプローチにより、換気のためのファンエネルギーを削減でき、クリーンルーム外から装置に接続するエアダクトを必要としない APA を構築することができる。鉛直方向に分割した SZ と CPZ の空気取扱に基づく手法により、SZ から CPZ への資材導入や作業者の介入など、実際の細胞加工の運用を含めた APA 構築の設計アプローチが可能となった。

2.5 小括

SZ を鉛直方向に 2 分割したモデルにおいて、クリーンルーム内の装置の吸気口の位置が、装置内の CPZ とその SZ の両方の微粒子濃度に影響することが示された。すなわち、クリーンルーム内の装置の吸気口の位置が APA の清浄度に影響する。装置が微粒子発生源の影響を受ける領域から空気を吸入する場合、SZ の微粒子発生速度を抑制することで対照の微粒子濃度を下回る装置内 CPZ が構築できる。クリーンルーム内の空気の部分循環は、空気が装置内に取り込まれ、HEPA フィルタを通過し、再びクリーンルーム内に排気されるもので、クリーンルーム内の見かけの換気を高める「空気清浄付加効果」を示している。この効果により、クリーンルーム内の換気回数を低減することができる。気流の上流側に微粒子発生源の影響を受けない「無垢領域」が形成される場合、この領域に装置の吸気口を設置することで、微粒子発生速度が高い条件下でも対照の微粒子濃度を下回る装置内 CPZ を構築できることが示唆される。気流と微粒子発生源の位置に基づいて SZ を鉛直方向の 2 つの領域に分割することにより、BSC やアイソレータシステムなどの CPZ を構成する開放系と閉鎖系の装置を用いた APA 構築の設計手法を提案した。領域ごとに分けた環境設計のアプローチにより、クリーンルーム外から装置に接続するエアダクトが不要になり、換気回数が低減され、微粒子発生速度を高度に抑制した更衣を不要とする APA での細胞製造が実現できることを期待している。

第3章 作業者の動作による製品に対する微生物混入の影響

3.1 緒言

細胞加工を伴う細胞製造においては、必用量の目的細胞を獲得するために従来の医薬品製造に比べて長期間の工程が要求される [45,46]. 一般的に工程は比較的短時間の細胞加工操作が 1 日 1 回以下の間隔で実施される. 培養容器を開放する細胞加工操作は、機械操作に限らず手操作も一般的に採用される [47]. 手操作の場合、製品の再現性確保のために、教育訓練が要求される [48]. 細胞製造では長期間において無菌操作環境を維持する必要があり、大きなエネルギーコストがかかることが想定される. また、無菌性保証に加え、ウイルスなどの存在を否定できない細胞を扱う際には、操作環境内での封じ込めも要求される. そのため、陽圧エアバリアであるクリーンベンチではなく、装置内に吹き込む形式のエアバリアである安全キャビネットが製造に用いられ、作業者の動作によるエアバリアの乱れによる外部微粒子及び微生物の混入懸念が比較的高くなる. 一方で、iPS 細胞などの細胞加工操作には熟練した作業技術が要求されることも多く、作業者が CPZ に手を挿入した介入作業も行われる. また、医薬品の安全性確保の観点から、研究開発のフェーズで行われた操作法が、製造においても要求され、プロセスの変更が困難という特性を有する.

細胞製造において、一般的に CPZ の形態は、作業者が直接装置内にアクセスできる開放式と外部環境から隔離された独立したシステムである閉止式があり、それぞれの特性が微生物汚染リスクに影響を与える [14]. 開放式の例である安全キャビネットでは作業者が SZ と CPZ の境界を跨いで直接手や腕を挿入する介入作業が行われる [42]. 閉止式の例であるアイソレータシステムは隔壁に備え付けられたグローブを介した操作で直接的な介入がないため、微生物混入リ

スクが低いとされる [23,41,49]. このような違いから、一般的に開放式の CPZ を構成する装置は比較的清浄度が高いグレード B 環境に設置され、閉止式の CPZ を構成する装置はグレード C もしくは D に設置され細胞加工操作が実施される [14]. ただし、閉止式の場合、グローブにより操作時の可動域が制限されることで細かな操作を実施しにくい場合があり、製造方法に合わせて適切な CPZ の形態を選択することが重要となる.

第 2 章では、CPZ を有する装置を SZ に設置した APA の環境特性に関して、空気の収支と装置の吸気口の設置位置に着目することで考え方を示した. 環境特性に対して、CPZ の形態に即した作業特性に着目すると、例えば、アイソレータシステムにおいては、隔壁に備え付けられたグローブを介した間接的な干渉であるため微粒子が CPZ 内へ直接侵入することがない. また資材の CPZ への導入の際には、除染パスピックスを経ることで資材表面に付着した微生物混入を防いでいる. そのため、作業者から発生した微粒子の CPZ への混入は、CPZ の HEPA フィルタ通過による混入が主と想定される. 一方、安全キャビネットにおいては、作業者が SZ から CPZ 内に直接手や腕を入れ続けて細胞加工を行う干渉操作に伴って、作業者の手や腕に付着した微生物あるいは作業者周辺の空間に浮遊する微生物がエアバリアによる SZ と CPZ の境界領域を越えて CPZ 内へ侵入し、製品内へ混入する懸念が報告されている [27,43]. 第 3 章では、細胞加工操作の工程を資材の導入、細胞加工、清浄化の 3 工程に大別されるとし、そのうち資材の導入と細胞加工の工程に着目し検討した. HEPA フィルタ通過以外で CPZ 内に微粒子及び微生物が混入する経路として、資材外装由来、手残存由来、及び介入操作中に作業者周辺空間から混入する 3 つを設定し、各経路での製品への微生物混入の可能性を評価した. 第 2 章の環境特性と第 3 章の動作特性を合わせて、APA における製品への微生物混入に対する具体的なリスクを明確に

することとした。

3.2 方法

医薬品製造においてモニタリング対象となる直径 $0.5 \mu\text{m}$ [20,22] の微粒子を評価した。一方向流が CPZ 底面に到達した際の跳ね返りによる乱流の影響を避けるため、培養容器を通気性の台上に設置し、一方向流中で細胞加工を実施するとした。培養容器は細胞加工時のみ開放されたとした。また、直径 $5.0 \mu\text{m}$ 以下の微粒子は一方向流に乗ると報告されている [42]。そのため、CPZ 内へ侵入した微粒子は一方向流に乗り、気流に対して垂直となる開放部分から製品内へ混入するとした。微粒子と微生物の相関を Fedotov ら [20] の報告より 1.0 particle に対し 1.0×10^{-3} bio-particle とし、細胞加工時の資材外装由来、手残存由来、作業者周辺由来の製品内へ混入する微生物数について詳細な機序とともに計算式を作成し示した。

3.2.1 資材外装由来の製品への微生物混入評価

細胞加工操作に必要な資材（ピペット類や原材料等）は、CPZ での単回使用分にパッケージした状態で CPZ に導入されたとした。安全キャビネットなどの開放式装置にて、開放部を気流により遮蔽する場合、資材は開口部から導入されるとした。その際、資材は外装に付着した微生物を消毒もしくは除染によって一定数を低減させた後 ($B_{\text{cle}} [-]$)、CPZ 内へ導入されたとした。また、資材を CPZ 内へ導入する際に、残存した微粒子はエアバリアの気流によって一定数 ($P_{\text{eli,mat}} [-]$) が除去されたとした。アイソレータシステムなどの閉止式の場合、パスボックスなど一定の清浄度レベルを維持した緩衝域において資材を除染し、清浄度レベルを維持した状態で CPZ 内へ導入されたとした（図 3.1）。資材の外装から資材を取り出し、CPZ 内の適切な場所へ配置する際、資材外装残存

微粒子が一定確率 ($P_{rec,mat} [-]$) で資材に再付着するとした。細胞加工時において、資材付着微粒子が一定確率 ($P_{con,mat} [-]$) で資材から落下して製品内へ混入するとした。尚、資材導入による CPZ 内の一方向流の気流の乱れは収まった後に細胞加工操作が行われるとした。

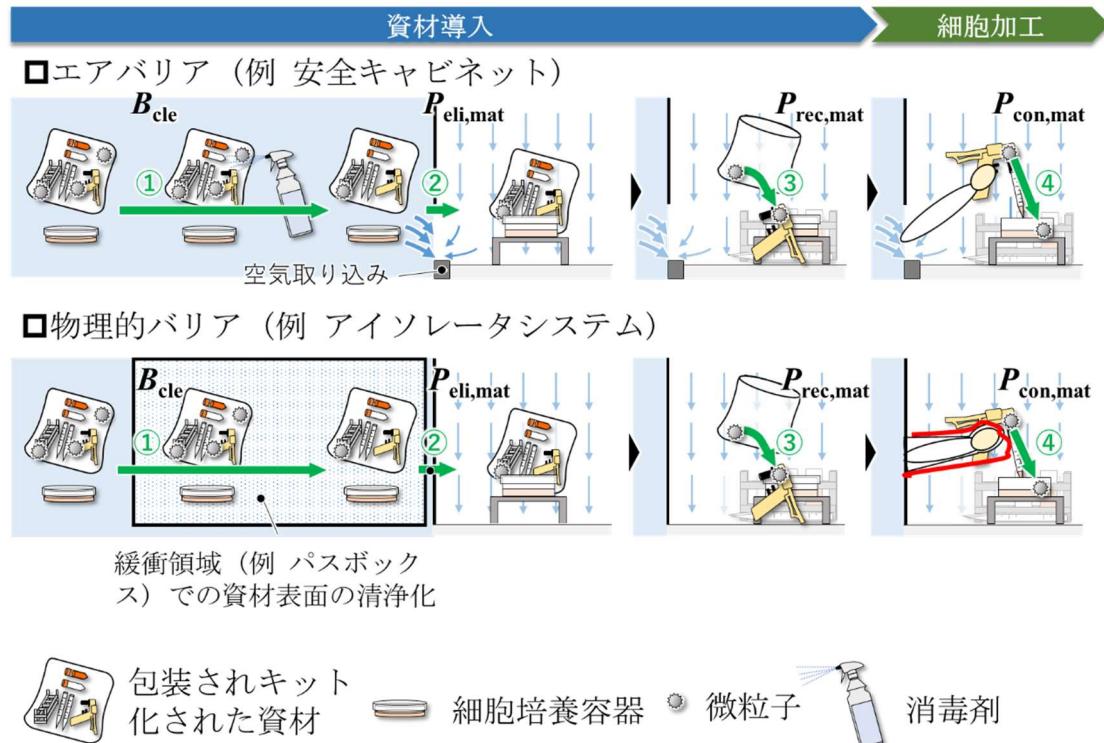


図 3.1 資材外装由来の製品への微生物混入推定機序。①は清浄化後に微生物が残存する確率(B_{cle})を示す。②は資材外装残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{eli,mat}$)を示す。③は資材外装残存微粒子が資材へ再付着する確率($P_{rec,mat}$)を示す。④は資材から落下した微粒子が製品内へ混入する確率($P_{con,mat}$)を示す。なお、微粒子は一定確率 (f) で微生物とする。

資材周辺空間の平均有効体積 ($v_{\text{pac,ave}}$ [m³]), 及び後述の手周辺空間の平均有効体積 ($v_{\text{han,ave}}$ [m³]) は以下に示すように設定した。

資材外装あるいは作業者の手には, CPZ 外部の清浄度レベルに応じて微粒子が付着しているとした [44]. それぞれの付着微粒子数

は, 資材外装あるいは手とそれらの表面から任

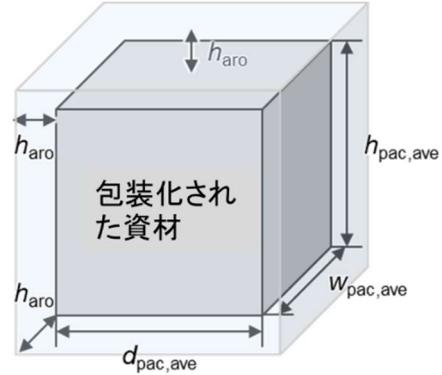


図 3.2 資材周辺の体積

意の距離の間 (資材周辺空間あるいは手周辺空間) に存在する微粒子数であるとした (図 3.2). したがって, Eqs. (18)(19)に示すように, それぞれの周辺空間の平均高さを仮定し, この厚さを加味した資材あるいは手の体積からそれぞれの体積を差し引くことで, それぞれの周辺空間平均有効体積を算出した. 算出に際し, 表 3.1 に示す代入値を使用した.

$$v_{\text{pac,ave}} = (2h_{\text{aro,ave}} + d_{\text{pac,ave}})(2h_{\text{aro,ave}} + w_{\text{pac,ave}})(2h_{\text{aro,ave}} + h_{\text{pac,ave}}) - d_{\text{pac,ave}}w_{\text{pac,ave}}h_{\text{pac,ave}} \quad (18)$$

$$v_{\text{han,ave}} = (2h_{\text{aro,ave}} + d_{\text{han,ave}})(2h_{\text{aro,ave}} + w_{\text{han,ave}})(2h_{\text{aro,ave}} + h_{\text{han,ave}}) - d_{\text{han,ave}}w_{\text{han,ave}}h_{\text{han,ave}} \quad (19)$$

周辺空間高さ ($h_{\text{aro,ave}}$ [m]) は, 1.0×10^{-2} 一定とした。資材の大きさについて, 細胞培養で頻繁に使用されるピペットや遠沈管がまとめられる大きさを想定して, 平均奥行 ($d_{\text{pac,ave}}$ [m]), 平均横幅 ($w_{\text{pac,ave}}$ [m]), 平均高さ ($h_{\text{pac,ave}}$ [m]) をそれぞれ設定した.

表 3.1 計算に使用した資材及び作業者の手のサイズのパラメータ値

| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|--------|----------------------|----|----------------------|------|
| 周辺空間高さ | $h_{\text{aro,ave}}$ | m | 1.0×10^{-2} | - |
| 資材平均奥行 | $d_{\text{pac,ave}}$ | m | 4.0×10^{-1} | - |
| 資材平均横幅 | $w_{\text{pac,ave}}$ | m | 2.0×10^{-1} | - |
| 資材平均高さ | $h_{\text{arm,ave}}$ | m | 4.0×10^{-2} | - |
| 平均手長 | $d_{\text{han,ave}}$ | m | 1.8×10^{-1} | [51] |
| 平均手幅 | $w_{\text{han,ave}}$ | m | 8.2×10^{-2} | [51] |
| 平均手厚 | $h_{\text{han,ave}}$ | m | 2.9×10^{-2} | [51] |

清浄化後に微生物が残存する確率 ($B_{\text{cle}} [-]$) について、 $1.0, 1.0 \times 10^{-3}$ (消毒), 1.0×10^{-6} (除染) の場合を想定した [50]. この時、CPZ 外部微粒子数、つまり SZ の微粒子濃度 ($n_{\text{par}} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$) に対する資材外装由来の製品への微生物混入数 ($n_{\text{bio,mat}} [(\text{batch})^{-1}]$) の変動を算出する式を以下 Eq. (20) に策定した.

$$n_{\text{bio,mat}} = f n_{\text{par}} V_{\text{pac,ave}} B_{\text{cle}} P_{\text{eli,mat}} P_{\text{rec,mat}} P_{\text{con,mat}} n_{\text{pro}} \quad (20)$$

細胞加工の工程数を $n_{\text{pro}} [\text{process} \cdot (\text{batch})^{-1}]$, 微粒子から微生物への相関係数を $f[-]$ とし、代入値を表 3.2 に示した.

表 3.2 計算に用いる細胞加工の工程数及び微粒子数と微生物数の相関係数

| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|----------------------|------------------|--|----------------------|------|
| 工程数 | n_{pro} | $\text{process} \cdot (\text{batch})^{-1}$ | 90 | [45] |
| 微粒子数から微生物 数への相関係数 | f | - | 1.0×10^{-3} | [20] |

資材外装由来の微生物混入数計算に用いる代入値を表 3.3 に示した。資材外装微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{\text{eli,mat}}$) について、残存微粒子は全て外装表面に残存とした ($P_{\text{eli,mat}} = 1.0$)。また、残存微粒子は全て資材に再付着すると設定した ($P_{\text{rec,mat}} = 1.0$)。容器の有効面積率 ($a_{\text{eff}} [-]$) は、培養容器開口部の一方向流に対する直角の有効面積の割合を示す。CPZ 底面から跳ね返る気流による影響を受けない環境下での細胞加工を想定し、一方向流に対して開口部が垂直にある場合を 1.0 とした。

資材から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 ($P_{\text{con,mat}} [-]$)、後述の手から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 ($P_{\text{con,han}} [-]$)、操作者指先から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 ($P_{\text{con,per}} [-]$) は Eq. (21) のように設定した。CPZ 内において微粒子が製品内へ混入する確率は、いずれの経路においても培養容器開口部と CPZ 内作業面積の面積比として計算した。算出に際し、表 3.3 に示す代入値を使用した。

$$P_{\text{con,mat}} = P_{\text{con,han}} = P_{\text{con,per}} = \frac{a_{\text{ves}} a_{\text{eff}}}{d_{\text{CPZ}} w_{\text{per,ave}}} \quad (21)$$

表 3.3 資材外装由来の微生物混入計算に使用したパラメータ値

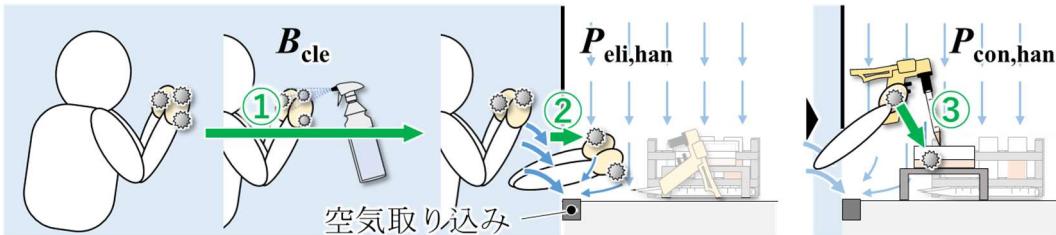
| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|----------------------------|----------------------|--------------|----------------------|------------------------|
| 培養容器開口部面積 | a_{ves} | m^2 | 6.4×10^{-3} | 90 mm プレート |
| 有効面積率 | a_{eff} | - | 1.0 | - |
| 資材周辺空間平均有効体積 | $V_{\text{pac,ave}}$ | m^3 | 2.3×10^{-3} | Eq. (18) |
| 資材外装残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 | $P_{\text{eli,mat}}$ | - | 1.0 | - |
| 資材外装残存微粒子が原料 へ再付着する確率 | $P_{\text{rec,mat}}$ | - | 1.0 | - |
| 作業者平均横幅 | $w_{\text{per,ave}}$ | m | 4.0×10^{-1} | [51] |
| CPZ 奥行 | d_{CPZ} | m | 6.0×10^{-1} | - |
| | | | | 培養容器 |
| | | | | 開口部面 |
| 資材から落下した微粒子が 製品内へ混入する確率 | $P_{\text{con,mat}}$ | - | 2.7×10^{-2} | 積と CPZ 内作業面 積の比率 |

3.2.2 手残存由来の製品への微生物混入評価

細胞加工を手操作で実施する場合、作業者の手は消毒によって付着微生物を一定数低減させた後 ($B_{cle} [-]$)、CPZ 内へ挿入される [8]。残存した微粒子は手を CPZ 内へ挿入する際に、隔壁（エアバリア）によって一定数 ($P_{eli,han} [-]$) が除去されると設定した。閉止式の場合、グローブを装着して挿入するため微粒子が CPZ 内へ侵入する可能性はないと設定した（図 3.3）。一方、開放式について開口部を差圧あるいは気流により遮蔽する場合、手は開口部から挿入される。CPZ 内へ侵入した微粒子は細胞加工時の動作に伴って一定確率 ($P_{con,han} [-]$) で手から落下して製品内へ混入すると設定した。

細胞加工

□エアバリア (例 安全キャビネット)



□物理的バリア (例 アイソレータシステム)

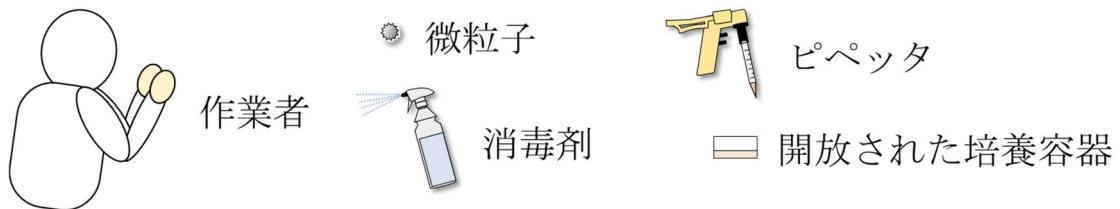
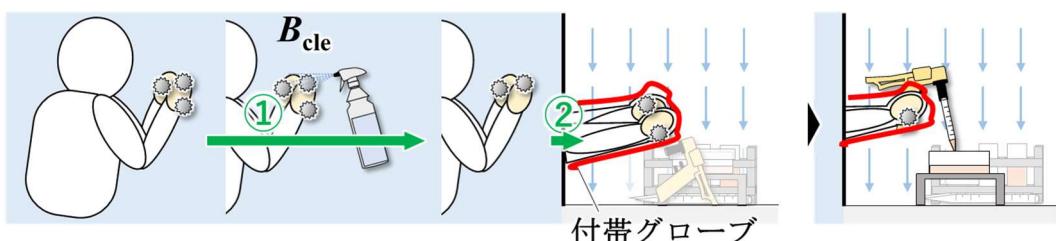


図 3.3 手残存由来の製品への微生物混入推定機序. ①は清浄化後に微生物が残存する確率(B_{cle})を示す. ②は手残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率($P_{\text{eli,han}}$)を示す. ③は手から落下した微粒子が製品内へ混入する確率($P_{\text{con,han}}$)を示す. なお、微粒子は一定確率 (f) で微生物とする.

手から落下した微生物が製品内に混入する数 ($n_{\text{bio,han}} [(\text{batch})^{-1}]$) を算出する式 Eq. (22)を以下に示す.

$$n_{\text{bio,han}} = f n_{\text{par}} v_{\text{han,ave}} B_{\text{cle}} n_{\text{han}} P_{\text{eli,han}} P_{\text{con,han}} n_{\text{pro}} \quad (22)$$

清浄化後に微生物が残存する確率 ($\alpha_{\text{cle}} [-]$) について、1.0, 1.0×10^{-3} (消毒) の場合を想定した [50]. この時、CPZ 外部微粒子数、つまり SZ の微粒子濃度 ($n_{\text{par}} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$) に対する手残存由来の製品への混入微生物数 ($n_{\text{bio,han}} [(\text{batch})^{-1}]$)

の変動を算出した。作業者手数 ($n_{han} [(batch)^{-1}]$) は、細胞加工時に CPZ に対して干渉する作業者は 1 人とした。手残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{eli,han} [-]$) は全て手表面に残存したままであるとした。算出に際し、表 3.4 に示す代入値を使用した。

表 3.4 手残存由来の微生物混入計算に使用したパラメータ値

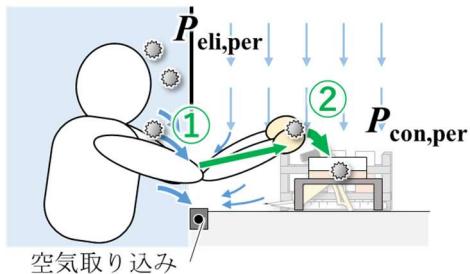
| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|-----------------------|-----------------|----------------|----------------------|-------------------------|
| 手周辺空間平均有効体積 | $\nu_{han,ave}$ | m^3 | 5.7×10^{-4} | Eq. (19) |
| 作業者手数 | n_{han} | $(batch)^{-1}$ | 2 | - |
| 手残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 | $P_{eli,han}$ | - | 1.0 | - |
| 手から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 | $P_{con,han}$ | - | 2.7×10^{-2} | 培養容器開口部面積と CPZ 内作業面積の比率 |

3.2.3 作業者周辺空間由来の製品への微生物混入評価

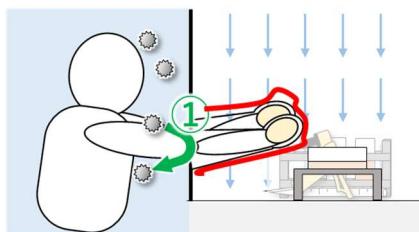
細胞加工を手操作で実施する場合、細胞加工時に作業者は當時 CPZ 内へ手を挿入した状態となり、作業者周辺に存在する微粒子が CPZ 内へ侵入する可能性がある [27]. この時、隔壁（エアバリア）によって一定数 ($P_{eli,per} [-]$) が除去されると考えた。閉止式の場合、作業者と CPZ は隔絶されるため微粒子の侵入はないと設定した（図 3.4). 一方、開口部を気流により遮蔽する場合、手の挿入によって開口部付近の気流バランスが乱れ、CPZ 外部微粒子が作業者側からの流入気流に乗って CPZ 内へ侵入する可能性があると設定した。CPZ 内へ侵入した微粒子は一定確率 ($P_{con,per} [-]$) で指先から落下して製品内へ混入すると設定した。

細胞加工

□エアバリア (例 安全キャビネット)



□物理的バリア (例 アイソレータシステム)



作業者 ● 微粒子 □ 開放された培養容器

図 3.4 作業者周辺空間由来の製品への微生物混入推定機序. ①は作業者周辺空間微粒子が CPZ 内へ侵入する確率($P_{\text{eli,per}}$)を示す. ②は作業者の手周辺から落下した微粒子が製品内へ混入する確率($P_{\text{con,per}}$)を示す. なお、微粒子は一定確率 (f) で微生物とする.

作業者周辺空間微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{\text{eli,per}} [-]$) について、エアバリアが乱れた際の CPZ への微粒子混入率とした. その確率で CPZ 内に吹き込む気流 $v_{\text{int}} [\text{mh}^{-1}]$ に乗り、細胞加工時間 $t_{\text{cp,ave}} [\text{h} \cdot (\text{process})^{-1}]$ に CPZ に入り、製品内する混入する微生物数を算出する式 Eq. (23) を以下に示す.

$$n_{\text{bio,per}} = f n_{\text{par}} v_{\text{int}} t_{\text{cp,ave}} P_{\text{eli,per}} P_{\text{con,per}} n_{\text{pro}} \quad (23)$$

この時、CPZ 外部微粒子数、つまり SZ 内微粒子濃度 ($n_{\text{par}} [\text{m}^{-3}]$) に対する作業

者周辺空間由来の製品への混入微生物数 ($n_{\text{bio,per}} [(\text{batch})^{-1}]$) の変動を算出した。

算出に際し、表 3.5 に示す代入値を使用した。

表 3.5 作業者周辺空間由来の微生物混入計算に使用したパラメータ値

| パラメータ | 表記 | 単位 | 値 | 備考 |
|-------------------------------------|----------------------|--|----------------------|------------------------------------|
| CPZ 内へ吹き込む気流 | v_{int} | mh^{-1} | 1.3×10^3 | - |
| 平均細胞加工時間 | $t_{\text{cp,ave}}$ | $\text{h} \cdot (\text{process})^{-1}$ | 0.6 | [45] |
| エアバリアが乱れた際の CPZ への微粒子混入率 | $P_{\text{eli,per}}$ | - | 8.0×10^{-5} | [52] |
| 作業者の手周辺から落下 した微粒子が製品内へ混 入する確率 | $P_{\text{con,per}}$ | - | 2.7×10^{-2} | 培養容器開 口部面積と CPZ 内作業 面積の比率 |

3.3 結果

3.3.1 SZ 内の微粒子濃度が資材外装、手残存及び作業者周辺由来の微生物混入に与える影響

図 3.6 に SZ における微粒子濃度 ($n_{\text{par}} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$) に対する資材外装、手残存、及び作業者周辺由来の微生物混入数 (それぞれ、 $n_{\text{bio,mat}}$, $n_{\text{bio,han}}$, $n_{\text{bio,per}} [(\text{batch})^{-1}]$) の変動を示した。資材外装由来については、 $\alpha_{\text{cle}} = 1.0$ のとき、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ (第 2 章 図 2.3 における事例 2 の低発塵速度条件下で換気回数 5 [h^{-1}] のときの領域 2(A) の微粒子濃度であり、安全キャビネットの設置環境とした) のときの $n_{\text{bio,mat}} = 1.9 \times 10^{-3} (\text{batch})^{-1}$ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,mat}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ (第 2 章 図 2.3 における事例 3 の高発塵速度条件下で換気回数 5 [h^{-1}] のときの領域 2(A) の微粒子濃度であり、アイソレータシステムの設置環境とした) の $n_{\text{bio,mat}} = 5.6 \times 10^{-1} (\text{batch})^{-1}$ であった。 $\alpha_{\text{cle}} = 1.0 \times 10^{-3}$ のとき、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,mat}} = 1.9 \times 10^{-6} (\text{batch})^{-1}$ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,mat}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,mat}} = 5.6 \times 10^{-4} (\text{batch})^{-1}$ であった。 $\alpha_{\text{cle}} = 1.0 \times 10^{-6}$ のとき、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,mat}} = 1.9 \times 10^{-9} (\text{batch})^{-1}$ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,mat}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,mat}} = 5.6 \times 10^{-7} (\text{batch})^{-1}$ であった。

手残存由来については、清浄化後に微生物が残存する確率 ($\alpha_{\text{cle}} [-]$) が 1.0 のとき、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,han}} = 9.1 \times 10^{-4} (\text{batch})^{-1}$ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,han}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,han}} = 2.7 \times 10^{-1} (\text{batch})^{-1}$ であった。 $\alpha_{\text{cle}} = 1.0 \times 10^{-3}$ のとき、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,han}} = 9.1 \times 10^{-7} (\text{batch})^{-1}$ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,han}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,han}} = 2.7 \times 10^{-4} (\text{batch})^{-1}$ であった。

作業者周辺由来については、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2$ (particle)・m⁻³ で $n_{\text{bio,per}} = 5.0 \times 10^{-2}$ (batch)⁻¹ であり、 n_{par} の増加に伴って、 $n_{\text{bio,per}}$ が増加し、 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5$ (particle)・m⁻³ で $n_{\text{bio,per}} = 1.5 \times 10^1$ (batch)⁻¹ であった。

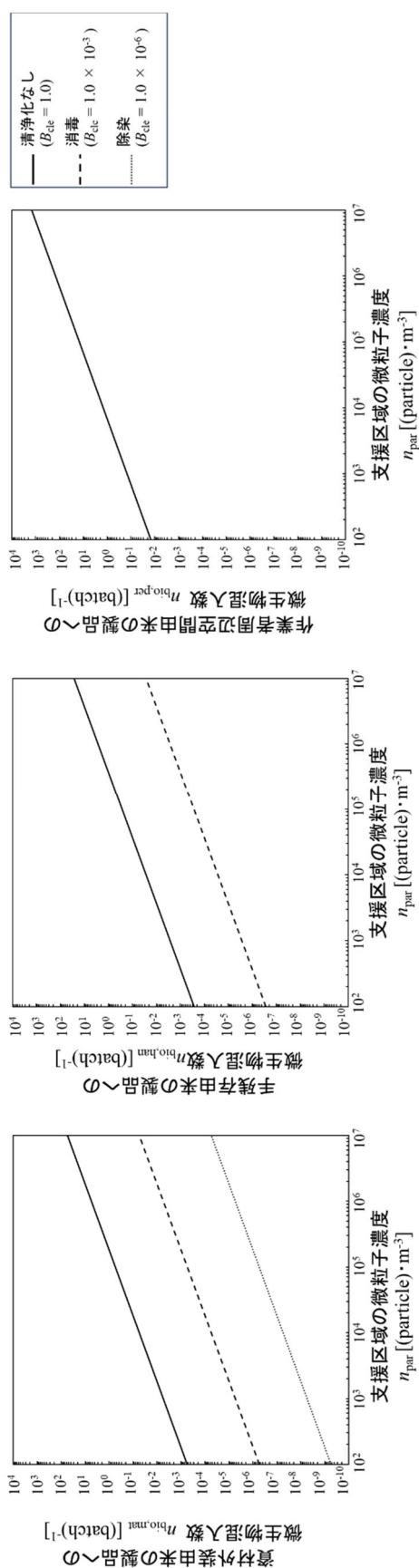


図 3.4 支援区域の微粒子濃度に対する資材外装由来、手残存由来、作業者周辺空間由來の製品への微生物混入数

3.3.2 具体的装置を想定した細胞加工操作による微生物混入

資材外装由来、手残存由来、及び介入操作中に作業者周辺空間から混入する3つ経路を合計し、安全キャビネットとアイソレータシステムを想定した微生物混入数のシミュレーション結果を図3.7に示した。なお、安全キャビネットへの資材及び手の導入の際は消毒を実施、アイソレータシステムへの資材の導入の際は、除染を実施する条件の結果を示した。その結果、安全キャビネットの設置環境とした $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 \text{ (particle) \cdot m}^{-3}$ において、安全キャビネットを使用した細胞加工操作による製品への微生物混入数は、 $5.0 \times 10^{-2} \text{ (batch)}^{-1}$ と示された。アイソレータシステムの設置環境とした $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 \text{ (particle) \cdot m}^{-3}$ において、アイソレータシステムを使用した細胞加工操作による製品への微生物混入数は、 $5.6 \times 10^{-7} \text{ (batch)}^{-1}$ と示された。

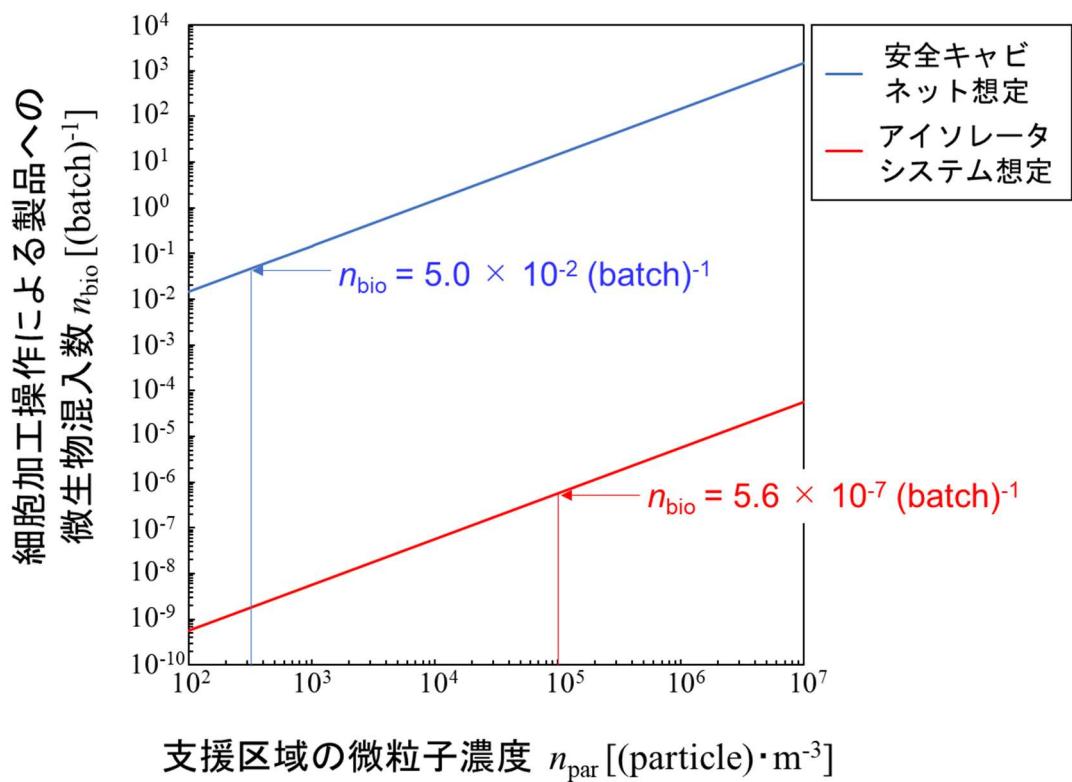


図 3.7 支援区域の微粒子濃度に対する安全キャビネット、アイソレータシステムそれぞれの製品への微生物混入数

3.4 考察

3.4.1 資材外装由来の製品への微生物混入に関する考察

図 3.6において、消毒や除染は資材外装由来の混入微生物数の低減に有効であることが示された。逆に、消毒や除染をしない条件である $B_{\text{cle}} = 1.0$ においては、 $n_{\text{par}} \geq 1.8 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ で $n_{\text{bio,mat}} \geq 1.0 (\text{batch})^{-1}$ となり微生物混入が生じる結果を示し、資材を CPZ に導入する際は、消毒や除染が求められることが分かった。図 2.3 より、SZ 内の微粒子発生速度が高く換気回数が低い条件において、CPZ 外である領域 2(A)の微粒子濃度は、 $1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ レベルであることが示されている。 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ のとき、 $\alpha_{\text{cle}} = 1.0, 1.0 \times 10^{-3}, 1.0 \times 10^{-6}$ それぞれで、 $n_{\text{bio,mat}} = 5.6 \times 10^{-1}, 5.6 \times 10^{-4}, 5.6 \times 10^{-7} (\text{batch})^{-1}$ を示した。この結果は、グレード C, D など比較的微粒子清浄度が低い環境に設置されるアイソレータシステム [27] に資材を導入する際は、除染を行うことで微生物混入のリスクを下げた無菌操作ができるることを示唆する。一方で、本研究において、 $P_{\text{eli,mat}} = 1.0$ 及び $P_{\text{rec,mat}} = 1.0$ とそれぞれ設定した。これらの値は、資材外装由来の製品への微生物数の推定値の変動要素となるため、更なる研究が必要である。また、本研究は製品に混入する微生物のみに着目したが、実際の細胞加工操作時は CPZ に導入した試薬類の蓋も開放されて、これらへの微生物混入リスクも考えられる。そのため、蓋を開放した試薬類も加味した培養容器開口部面積 (a_{ves} [m^2]) 及び有効面積率 ($a_{\text{eff}} [-]$) を算出することで、より正確な製品汚染リスクが算出可能と考える。

3.4.2 手残存由来の製品への微生物混入に関する考察

図 3.6 より、いずれの条件においても SZ 内の微粒子濃度 ($n_{\text{par}} [(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$) の増加に伴って、手残存由来の製品への微生物混入数 ($n_{\text{bio,han}} [(\text{batch})^{-1}]$) が増加することが確認された。資材の CPZ への導入と同様に、消毒は手残存由来の製品への微生物混入数の低減に有効であるといえる。図 2.3 より、SZ 内の微粒子発生速度が高く換気回数が低い条件において、CPZ 外である領域 2(A)の微粒子濃度は、 $1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ レベルであることが示されている。 $n_{\text{par}} = 1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ のとき、 $B_{\text{cle}} = 1.0, 1.0 \times 10^{-3}$ それぞれで、 $n_{\text{bio,han}} = 2.7 \times 10^{-1}, 2.7 \times 10^{-4} (\text{batch})^{-1}$ を示した。この結果は、微粒子清浄度が低い SZ からの手の導入の際は、消毒により製品への微生物混入のリスクを下げた無菌操作ができる음을示唆する。ただし、本研究において、手残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{\text{eli,han}} [-]$) を 1.0 とした。この確率は、手残存由来の製品への微生物混入数の変動となるため、更なる研究が必要である。また、細胞加工中の作業者の動作に伴って製品内へ微生物が落下すると考える。そのため、標準作業手順書の作成や作業者の教育訓練などを通して操作者の動作を厳格に管理することで、製品汚染の可能性を低減するために重要と考えられる [48]。特に、手から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 ($P_{\text{con,han}} [-]$) は、SZ から CPZ にエアバリアを跨いで手を入れた作業者の動作による影響を受けることが報告されている [43]。この確率は細胞加工時の手の位置が培養容器上面にある場合に高まると考えられる。そのため、作業者に対して培養容器上面に極力手を翳さないような動作を教育訓練することは、製品への微生物混入数を低減させることに有効と考えられる。一方、細胞加工操作を機械により、培養容器開放中に CPZ 内へ手を入れないプロセスにすることや、閉止式において、グローブを装着して手を挿入する場合は、

いずれの条件でも $P_{\text{eli,han}} = 0$ となり、手残存由来の製品内への微生物混入による製品汚染リスクをなくすことができると考える。

3.4.3 作業者周辺由来の製品への微生物混入に関する考察

図 3.6 より、 $n_{\text{par}} = 3.3 \times 10^2 (\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}$ のとき、 $n_{\text{bio,per}} = 5.0 \times 10^{-2} (\text{batch})^{-1}$ を示し、 $n_{\text{bio,per}} < 1.0$ となり微生物汚染なく無菌操作ができることが示唆された。ただし、資材外装由来や手残存由来と比較して、最も微生物混入のリスクが高い結果を示した。 n_{par} の増加に伴って、作業者周辺由来の製品への微生物混入数 ($n_{\text{bio,per}} [(\text{batch})^{-1}]$) が増加し、 $1.0 \times 10^5 (\text{particle}) \cdot \text{m}^3$ では、製品混入微生物数が 1.0 を上回っていることから、直接介入操作は、作業者からの微粒子発生速度が高度に抑制された環境が要求されることが分かった。ただし、作業者周辺空間微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 ($P_{\text{eli,per}} [-]$) は、作業者の動作によるエアバリアの乱れ [27] や SZ から CPZ への気流の影響 [52] を受ける報告がされており、教育訓練により作業者の動作を厳格に管理することが、製品汚染の可能性を低減するために重要と考えられる [42,43]。一方、安全キャビネットなどの開放式装置において細胞加工操作を CPZ 内に設置された機械により実施する場合 (機械操作)、作業者による直接介入が不要となり設備開口部の気流バランスが乱れず $P_{\text{eli,per}}$ を 0 に近づけることができる。また、アイソレータシステムなどの閉止装置ではグローブを装着して手を挿入するため、 $P_{\text{eli,per}} = 0$ となり、作業者周辺由来の微生物による製品汚染リスクはなくすことができると考える。

3.4.4 具体的装置を想定した細胞加工操作に関する考察

図 3.7 より、本研究で想定した安全キャビネット、アイソレータシステムいずれの装置を使用した細胞加工操作においても $n_{\text{bio}} < 1.0 (\text{batch})^{-1}$ で無菌操作がで

きることが示された。安全キャビネットにおいては、高度に発塵を抑制する無塵衣を着用し SZ の微粒子濃度を低くすること、及び直接介入操作の際のエアバリアの乱れによる微粒子の混入ができるだけ少なくすることが重要であることが分かった。アイソレータシステムにおいては、既報 [14] の通り SZ の微粒子濃度が比較的高い環境下においても、 $n_{bio} < 1.0 \text{ (batch)}^{-1}$ で無菌操作ができることが示された。資材を CPZ に導入する際は、除染などの清浄化により資材外装の表面に付着した微生物を低減することで微生物混入のリスクを低くできることが分かった。ただし、本研究では備え付けのグローブのピンホールなどによる CPZ への微生物混入の影響は考慮していない。実際の運用では、装置の適切な維持管理についても対応が求められると考える。

3.4.5 作業者の動作特性を踏まえた無菌操作の環境設計の考え方

図 2.3 より、SZ 内の微粒子発生速度が高く換気回数が低い条件において、領域 2(A)の微粒子濃度は、 $1.0 \times 10^5 \text{ (particle) } \cdot \text{m}^{-3}$ レベルであることが示された。この環境下で、資材外装に付着した微生物数は、消毒や除染をしなかった条件では混入微生物数が 1.0 付近になることが示され(図 3.6)，一般的にグレード C, D など比較的 SZ の微粒子濃度が高い環境に設置されるアイソレータシステム[27]に資材を導入する際は、除染パスピックスなどを用いて[23]、付着した微生物を除去することが要求されることが分かった。一方で、作業者周辺由来の製品への微生物混入数は、SZ の微粒子濃度が $1.0 \times 10^3 \text{ (particle) } \cdot \text{m}^{-3}$ オーダーで、1.0 以上になることが示され製品汚染リスクが非常に大きいことが示唆された。SZ から CPZ に作業者がエアバリアを介して、直接手を挿入することが最もコンタミネーションリスクを大きくすると考えられる。安全キャビネットの装置を用いる場合は、作業者が動作によりエアバリアを乱さないよう無菌操作に対する

る教育訓練を厳格に実施することの重要性が示唆された。本研究成果を利用することで、無菌操作の環境内の作業者の作業も含めた新たな設計の考え方を示すことができる。無菌操作の環境に採用されるクリーンルームは、換気のためのエネルギーコストが高いことが課題として挙げられるが [14]、装置による付加的な換気向上効果を取り入れることや、クリーンルーム内の微粒子分布を考慮したCPZの吸気口の位置設定をすることで、換気風量を下げ、エネルギーコストを下げることができる。また、アイソレータシステムのように、作業者によるCPZへの直接介入操作を伴わない装置を用いることでCPZへの微生物混入リスクを大きく低減することができる。アイソレータシステムを使用する際、一般的にCPZ内への資材導入は安全キャビネット使用時と比較して時間を要する課題が挙げられる。そこで、アイソレータシステムの各機能をモジュール化し、個々を自由に脱着可能にしたフレキシブルモジュラープラットフォーム(fMP) [33]を採用することで、各工程を実施する前に予め資材を外装除染してモジュール内に搬入しておくことが可能となり、導入時間を短縮できる。一方で、安全キャビネットを使用する際は、将来的には直接介入操作を作業者ではなく、機械化することで作業者に比べて微粒子発生を顕著に抑制し、且つ動作を一定にすることでエアバリアの乱れを起こさないプロセス設計も可能になると考えられる。

細胞製造における無菌操作の環境の大きな課題の一つは、作業者が介入し得る環境にて長期間無菌の状態を維持し、初期投資コストや運用におけるエネルギーコストを抑制し、安定した作業を実現することである。その中で、本研究は、細胞製造を行う環境であるクリーンルームとクリーンルーム内に設置された装置の両方の気流に着目した環境構築、その環境内で特に介入操作を行う作業者からの微生物混入リスクの2点に着目し、微粒子挙動を定量的に捉えることで、「細胞製造における無菌操作環境の設計とは」という問い合わせに対して、工学的観点

から新たな解釈を与えることを行った。その結果、上述したように、気流を活用した環境設計方針と介入操作の定量評価が示され、プロセス設計段階で、操作環境も合わせて設計可能にする考え方を示すことができた。これらは、作業者による無菌操作を伴う製造プロセスにおいて長期間無菌操作の環境を維持する上で、極めて重要な知見である。

3.5 小括

SZ 内に設置された CPZ での操作のうち, SZ から CPZ への資材の導入の際, 及び SZ から CPZ に作業者が直接手を挿入した際の微粒子及び微生物の持ち込みの可能性を定量的に評価したところ, SZ 内で資材表面や作業者の手に付着した微生物の混入に比べ, 直接介入操作中の作業者の周辺空間からの微生物の混入リスクが顕著に高いことが分かった。製品汚染リスクを低減するためには, 作業者による直接介入操作を要しない装置の採用が有効であることが分かった。具体的には装置にアイソレータシステムを採用し, 除染パスボックス等を用いて, 資材表面に付着した微生物を除去してから資材をアイソレータシステム内の CPZ に導入することで、コンタミネーションリスクを低減した無菌操作を行うことができる分かった。一方, 安全キャビネットを採用する際は, 作業者が微粒子発生速度を高度に抑制する更衣を行い SZ の微粒子濃度を低く維持すること, さらに直接介入操作の動作によりエアバリアを乱さないよう無菌操作に対する教育訓練を厳格に実施することが要求されることが分かった。本研究により示された, 製品内への微生物混入の推定機序に基づいた定量評価により, 無菌操作の環境における作業者の教育訓練を行う際の具体的な指導ポイントが明確となり, 安定した作業の実現に貢献することを期待する。

第4章 総括

本研究では、無菌操作の環境設計に関して、気流と微粒子収支に着目した考え方を示し、また環境中の作業者の動作による製品への微生物混入の定量的評価を行った。細胞製品のように最終滅菌法ができない製品製造における無菌操作法による無菌性確保のための環境構築の基本的な考え方を示した。

第2章では、SZを鉛直方向に2領域に分割し、CPZの吸気口を設置する領域を変えることで、CPZ、SZ双方の微粒子清浄度に違いが生じることを各領域の空気収支計算で示した。その結果、SZ内の微粒子発生の影響を受けないようにダクトを用いてSZの外側の領域からCPZに空気の供給と排気を行う設定に対して、SZ内部からCPZに空気の吸気と排気を行うことで、換気の向上効果が得られ、SZに要求される換気風量を低減できることが示された。また、SZ内で、気流の上流であり、且つ微粒子発生源である作業者が存在しない領域にCPZの吸気口を設置することで、作業者の無塵衣による微粒子発生速度の抑制要求を緩和したAPAの構築が可能になることを示した。

第3章では、CPZへのSZからの微粒子持ち込みについて、HEPAフィルタ通過以外の経路である、資材外装由来の微生物、作業者の手由来の微生物、さらにはSZからCPZに直接、手を挿入し作業する直接介入操作の際の作業者周辺空間からの微生物の3つ混入経路について推定機序に基づく計算式により微生物の製品混入の定量評価を行った。その結果、作業者の直接介入操作による作業者周辺からの微生物の混入数が最も高くなることが示された。また、SZの微粒子濃度が高い環境から資材をCPZ内に導入する際は、除染などの清浄化を行い資材外装の微生物数を低減することが要求されることが示された。このことから、微生物混入の可能性を低く操作するためには、CPZへの作業者の直接的な介入

を伴わない装置であるアイソレータシステムを採用し、資材の導入の際には、除染パスボックス等を用いることが最も有効であることが分かった。一方で、安全キャビネットを採用する際は、作業者が微粒子発生速度を高度に抑制する更衣を行うことで SZ の微粒子濃度をできるだけ低減し、また直接介入操作の動作によりエアバリアを乱さないよう無菌操作に対する教育訓練を厳格に実施することが要求されることが分かった(図 4.1)。

第 1 章で述べたように、細胞製造は、従来の医薬品製造に比べて製造規模が小さく、熟練した作業者の手操作を伴うことがあるなど、工程が多様であり無菌性保証におけるコストが大きくなる可能性がある。その中で本研究は、比較的小さなクリーンルームに CPZ を有する装置が設置された環境における気流、微粒子発生速度、作業者の動作をそれぞれ式化し、微粒子の挙動をシミュレーションすることで、それぞれのパラメータが清浄度に与える影響を明確にした。実際の細胞製造の設計段階において、製造規模や作業者の手操作の有無や作業の複雑などを勘案して、無菌操作区域の大きさ、CPZ として採用する装置を具体的に決めることができると考えられるが、本研究の知見を用いることで、製品に対する微生物汚染リスクに基づいた換気風量の設定、SZ と CPZ の清浄空気の吸気口、排気口の位置設定、さらには、作業者の無塵衣の選定など設備のハード面だけでなく、運用に関するソフト面まで設計に落とし込むことができる。本研究における成果は、今後の無菌操作を必用とする製造プロセスの設計において、過剰な設備投資やエネルギーコストを抑制し、且つ、作業者の作業も含め確実な無菌性を確保する上で極めて重要であり、無菌操作の環境設計において、工学的な側面から発展に寄与し、また細胞製造などその無菌操作の環境を用いた産業の発展に繋がると考えられる。

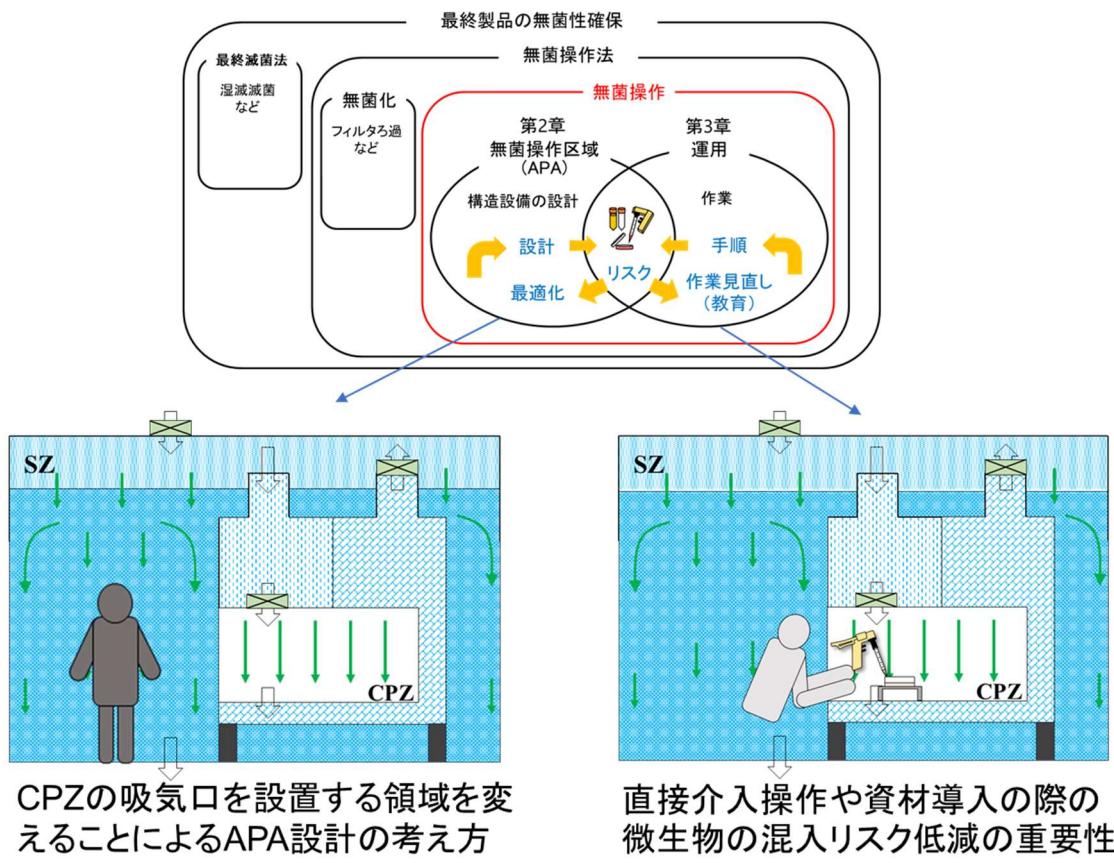


図 4.1 無菌性確保のための無菌操作における APA 設計の考え方と作業者の動作による微生物混入リスクの概念図

本報に関する論文

Furomitsu S, Mizutani M, Kino-oka M. Approach of design for air mass balance in an aseptic processing area for cell-based products. Regen Ther 2025;28:20-9

略語リスト

略号

| | |
|------|---------------------------------|
| APA | aseptic processing area |
| BSC | biological safety cabinet |
| CFD | computational fluid dynamics |
| CPZ | critical processing zone |
| HEPA | high efficiency particulate air |
| SZ | support zone |

変数

| | |
|------------|---|
| α_i | 領域 i の微粒子濃度 $[(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ |
| F_{ij} | 領域 i から領域 j への風量 $[\text{m}^3 \text{h}^{-1}]$ |
| t | 時間 [h] |
| p | 微粒子が HEPA フィルタを通過する率 [-] |
| β | 平均微粒子発生速度（平均発塵速度） $[(\text{particle}) \cdot \text{h}^{-1}]$ |
| v_1 | 領域 1（チャンバー内領域）の清浄空気の線速度 $[\text{ms}^{-1}]$ |
| A_1 | 領域 1（チャンバー内領域）の底面積 $[\text{m}^2]$ |
| A | 領域 2（クリーンルーム内領域）の面積 $[\text{m}^2]$ |
| H | 領域 2（クリーンルーム内領域）の高さ [m] |
| V_i | 領域 i の体積 $[\text{m}^3]$ |
| R_{AC} | 領域 2（クリーンルーム内領域）の換気回数 $[\text{h}^{-1}]$ |
| n_{par} | SZ の微粒子濃度 $[(\text{particle}) \cdot \text{m}^{-3}]$ |
| n_{pro} | 細胞加工の工程数 $[\text{process} \cdot (\text{batch})^{-1}]$ |
| f | 微粒子数から微生物数への相関係数 [-] |

| | |
|----------------------|--|
| n_{bio} | 製品への微生物混入数 $[(\text{batch})^{-1}]$ |
| $n_{\text{bio,mat}}$ | 資材外装由来の製品への微生物混入数 $[(\text{batch})^{-1}]$ |
| $n_{\text{bio,han}}$ | 手残存由来の製品への微生物混入数 $[(\text{batch})^{-1}]$ |
| $n_{\text{bio,per}}$ | 作業者周辺空間由来の製品への微生物混入数 $[(\text{batch})^{-1}]$ |
| a_{ves} | 培養容器開口部面積 $[\text{m}^2]$ |
| a_{eff} | 有効面積率 [-] |
| $v_{\text{pac,ave}}$ | 資材周辺空間平均有効体積 $[\text{m}^3]$ |
| B_{cle} | 清浄化後に微生物が残存する確率 [-] |
| $P_{\text{eli,mat}}$ | 資材外装残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 [-] |
| $P_{\text{rec,mat}}$ | 資材外装残存微粒子が資材へ再付着する確率 [-] |
| $P_{\text{con,mat}}$ | 資材から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 [-] |
| $h_{\text{aro,ave}}$ | 周辺空間高さ [m] |
| $d_{\text{pac,ave}}$ | 資材平均奥行 [m] |
| $w_{\text{pac,ave}}$ | 資材平均横幅 [m] |
| $h_{\text{pac,ave}}$ | 資材平均高さ [m] |
| $d_{\text{han,ave}}$ | 平均手長 [m] |
| $w_{\text{han,ave}}$ | 平均手幅 [m] |
| $h_{\text{han,ave}}$ | 平均手厚 [m] |
| d_{CPZ} | CPZ 奥行 [m] |
| $v_{\text{han,ave}}$ | 手周辺空間平均有効体積 $[\text{m}^3]$ |
| n_{han} | 作業者手数 $[(\text{batch})^{-1}]$ |
| $P_{\text{eli,han}}$ | 手残存微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 [-] |
| $P_{\text{con,han}}$ | 手から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 [-] |
| $w_{\text{per,ave}}$ | 作業者平均横幅 [m] |

$P_{\text{eli,per}}$ 作業者周辺空間微粒子が CPZ 内へ侵入する確率 [-]

$P_{\text{con,per}}$ 作業者の手周辺から落下した微粒子が製品内へ混入する確率 [-]

v_{int} CPZ の吸気口へ吸い込まれる気流の速度 [mh^{-1}]

$t_{\text{cp,ave}}$ 平均細胞加工時間[$\text{h}\cdot(\text{process})^{-1}$]

参考文献

- [1] Agallooco J, Akers J. Sterile product manufacturing. In: Gad SC, editor. Pharmaceutical Manufacturing Handbook: John Wiley & Sons, Inc.; 2008;5. p. 99–135. <https://doi.org/10.1002/9780470259818.ch4>
- [2] Larson E. Innovation in health care: antiseptis as a case study. *Am J Public Health* 1989;79(1):92-9. <https://doi.org/10.2105/AJPH.79.1.92>.
- [3] Galante R, Pint T.J.A, Colaco R, Serro A. P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106(6):2472-92. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34048>.
- [4] Elander R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;61(5-6):385-92. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>.
- [5] Schneider R. K. Clean-facility design, construction, and maintenance issues In: Gad SC, editor. Pharmaceutical Manufacturing Handbook: John Wiley & Sons, Inc.; 2008;5. p. 201–32. <https://doi.org/10.1002/9780470259818.ch7>
- [6] Carl S.M, Lindley D. J, Knipp G. T, Morris K. R, Oliver E, Becker G. W, et al. Biotechnology-derived drug product development In: Gad SC, editor. Pharmaceutical Manufacturing Handbook: John Wiley & Sons, Inc.; 2008;5. p. 3–32. <https://doi.org/10.1002/9780470259818.ch1>
- [7] Katayama H, Toda A, Tokunaga Y, Katoh S. Proposal for a new categorization of aseptic processing facilities based on risk assessment scores. *PDA J Pharm Sci Technol* 2008;62 (4) :235-43. <https://journal.pda.org/content/62/4/235>
- [8] 厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課. 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針 改訂版. 2011 [アクセス日: 2024 年 12 月 2 日]

<https://www.pmda.go.jp/files/000206144.pdf>

- [9] Li P, Wang C, Zhang Y, Wei F. Air filtration in the free molecular flow regime: A review of high-efficiency particulate air filters based on carbon nanotubes. *Small* 2014;10(22):4543-61 <https://doi.org/10.1002/smll.201401553>.
- [10] Whyte W, Hejab M. Particle and microbial airborne dispersion from people. *Eur J Parenter Pharm Sci* 2007;12 (2):39-46.
- [11] Morandi F, Lastra MD, Bandettini R, Tripodi G, Zara F, Airoldi I. Microbes identified from monitoring cell manipulations in 5-year life of the Cell Factory G. Gaslini. *Regen Ther* 2024;27:234-43. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.03.028>.
- [12] Romano F, Milani S, Joppolo CM. Airborne particle and microbiological human emission rate investigation for cleanroom clothing combinations. *Build Environ* 2020;180:106967. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2020.106967>.
- [13] Zhang F, Shiue A, Fan Y, Liu J, Meng H, Zhang J, et al. Dynamic emission rates of human activity in biological cleanrooms. *Build Environ* 2022;226:109777. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109777>
- [14] Zanini C, Severina F, Lando G, Fanizza C, Cesana E, Desidera D, et al. Good design practices for an integrated containment and production system for advanced therapies. *Biotechnol Bioeng* 2020;117(8):2319-30. <https://doi.org/10.1002/bit.27376>
- [15] 厚生労働省医薬品・生活衛生局監視指導・麻薬対策課. 再生医療等製品の無菌製造法に関する指針. 2019 [アクセス日：2024年12月2日] <https://www.pmda.go.jp/files/000271822.pdf>
- [16] Yano K, Watanabe N, Tsuyuki K, Ikawa T, Kasanuki H, Yamato M. Regulatory approval for autologous human cells and tissue products in the United States, the European Union, and Japan. *Regen Ther* 2015;1:45-56.

<https://doi.org/10.1016/j.reth.2014.10.001>.

- [17] Jere D, Sediq AS, Huwyler J, Vollrath I, Kardorff M, Mahler HC. Challenges for cell-based medicinal products from a pharmaceutical product perspective. *J Pharm. Sci* 2021;110:1900-8. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.11.040>.
- [18] Kino-oka M, Mizutani M, Medcalf N. Cell manufacturability. *Cell & Gene Therapy Insights* 2019;5(10):1347-59. <https://doi.org/10.18609/cgti.2019.140>.
- [19] International Organization of Standardization. ISO 18362:2016. Manufacture of cell-based health care products—Control of microbial risks during processing. 2016
- [20] Fedotov A. FDA and EU GMP Annex 1 Differences in Cleanroom Specifications. Is it time to eliminate them? *Regulatory Focus*. July 2019. Regulatory Affairs Professionals Society.
- [21] Ljungqvist B, Reinmüller B. Airborne viable particles and total number of airborne particles: comparative studies of active air sampling. *PDA J Pharm Sci Technol* 2000;54(2):112-6
- [22] Raval J, Koch E, Donnenberg A. Real-time monitoring of non-viable airborne particles correlates with airborne colonies and represents an acceptable surrogate for daily assessment of cell-processing cleanroom performance. *Cyotherapy* 2012;14:1144-50 <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.698728>.
- [23] Kino-oka M, Taya M. Recent developments in processing systems for cell and tissue cultures toward therapeutic application. *J Biosci Bioeng* 2009;108(4):267-76. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.007>.
- [24] PIC/S. Guide to good manufacturing practice for medicinal products part 1, PE 009-17 2023.
- [25] International Organization of Standardization. ISO 14644-1:2015. Cleanrooms

and associated controlled environments—Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration. 2015

- [26] Whyte W, Lenegan N, Eaton T. Calculation of airborne cleanliness and air supply rate for non-unidirectional airflow cleanrooms. *Eur J Parenter Pharm Sci* 2016;21(3):79-88.
- [27] Kruse RH, Puckett WH, Richardson JH. Biological safety cabinetry. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:207-41. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.2.207>.
- [28] Novoselac A, Srebric J. Comparison of Air Exchange Efficiency and Contaminant Removal Effectiveness as IAQ Indices. *ASHRAE Trans* 2003;109:339-49(2).
- [29] Loomans MGLC, Molenaar PCA, Kort HSM, Joosten PHJ. Energy demand reduction in pharmaceutical cleanrooms through optimization of ventilation. *Energy Build* 2019;202:109346. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2019.109346>
- [30] Zhou L, Sun W, Huang C, Li H, Zou Z, Wu C. Studies on Comparison of Particle Concentration Models for Cleanroom. *Procedia Eng* 2017;205:3308-15. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.10.343>.
- [31] Sutherland K. Cleanroom management: Using filters in the cleanroom. *Filtr Sep* 2008;45:20-22. [https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(08\)70088-0](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(08)70088-0)
- [32] British Standards Institution. EN 1822-1:2009. High efficiency air filters (EPA, HEPA and ULPA)—Classification, performance testing, marking. 2009
- [33] Kikuchi T, Kino-oka M, Wada M, Kobayashi T, Kato M, Takeda S, et al. A novel, flexible and automated manufacturing facility for cell-based health care products: Tissue Factory. *Regen Ther* 2018;9:89-99. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2018.08.004>.
- [34] Whyte W, Agricola K, Derkx M. Airborne particle deposition in cleanrooms:

Airborne particle deposition in cleanrooms: Calculation of product contamination and required cleanroom class. Clean Air Contain Rev 2016;26:4-10

[35] Feng X, Zhang Y, Xu Z, Song D, Cao G, Liang L. Aerosol containment by airflow in biosafety laboratories. J Biosaf Biosecur 2019;1(1):63-67.
<https://doi.org/10.1016/j.jobb.2018.12.009>

[36] PIC/S. PIC/S Guide to good practices for the preparation of medicinal products in healthcare establishments, PE 010-4 2014

[37] FDA. Guidance for industry sterile drug products produced by aseptic processing — current good manufacturing practice, September 2004

[38] Behrens D, Schaefer J, Keck MC, Runkel EF. Effects of different air change rates on cleanroom 'in operation' status. Drug Dev Ind Pharm 2021;47(10):1643-55
<https://doi.org/10.1080/03639045.2022.2043352>

[39] Zhang F, Shiue A, Fan Y, Liu J, Meng H, Zhang J, et al. Dynamic emission rates of human activity in biological cleanrooms. Build Environ 2022;226:109777.
<https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2022.109777>

[40] Villafruela JM, Castro F, José JFS, Saint-Martin J. Comparison of air change efficiency, contaminant removal effectiveness and infection risk as IAQ indices in isolation rooms. Energy Build 2013;57:210-19.
<https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2012.10.053>

[41] Mizutani M, Nakajima K, Kino-oka M. Approach of resource expenditure estimation toward mechanization in the manufacturing of cell-based products. Regen Ther 2022;20:9-17. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2022.02.004>

[42] Ogawa Y, Mizutani M, Okamoto R, Kitajima H, Ezoe S, Kino-oka M. Understanding the formation and behaviors of droplets toward consideration of

changeover during cell manufacturing. Regen Ther 2019;12:36-42.

<https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.04.002>

[43] Mizuno M, Abe K, Kakimoto T, Hasebe H, Kagi N, Sekiya I. Operator-derived particles and falling bacteria in biosafety cabinets. Regen Ther 2024;25:264-72.

<https://doi.org/10.1016/j.reth.2024.01.001>

[44] Whyte W, Agricola K, Derk M. Airborne particle deposition in cleanrooms: Airborne particle deposition in cleanrooms: Relationship between deposition rate and airborne concentration. Clean Air Contain Rev 2016;25:4-10

[45] Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sugita S, Kiryu J, Takahashi M. Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application, Stem Cell Rep 2014;2:205-18.

<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.12.007>

[46] Lin H, Li Q, Lei Y. An integrated miniature bioprocessing for personalized human induced pluripotent stem cell expansion and differentiation into neural stem cells. Sci. Rep 2017;7:918-30 <https://doi.org/10.1038/srep40191>

[47] Liu Y, Hourd P, Chandra A, Williams D. J. Human cell culture process capability: a comparison of manual and automated production. J Tissue Eng Regen Med 2009;12(4):45-54 <https://doi.org/10.1002/term.217>

[48] Kim M, Kino-oka M. Bioengineering considerations for a nurturing way to enhance scalable expansion of human pluripotent stem cells. Biotechnol J 2020;1-16 <https://doi.org/10.1002/biot.201900314>

[49] Tanimoto K, Koshida I, Kokukbo M. アイソレータ技術を用いた再生医療等 製 品 の 無 菌 製 造 . PDA J GMP Valid Jpn 2017;19(2):45-55. <https://doi.org/10.11347/pda.19.45>

[50] 厚生労働省 第十八改正日本薬局方 参考情報 消毒法及び除染法. [アクリ
セス日 : 2024年12月2日] 2021

<https://www.mhlw.go.jp/content/11120000/000788362.pdf>

[51] Kouchi M, Mochimaru M, Iwasawa H, Mitani S. Anthropometric database for Japanese Population1997-98. Japanese Industrial Standards Center (AIST, MITI) 2000

[52] Tani H, Takahashi M, Amano K, Chiba Y. バイオクリーン施設への安全キャビネットの適用に関する研究 (その2) 空調気流や扉開閉で生じる気流が安全キャビネット内部の清浄度に及ぼす影響. 空気調和・衛生工学会大会 学術講演論文集 2018; 7(0):17-20. https://doi.org/10.18948/shasetaikai.2018.7.0_17

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 紀ノ岡正博 教授、水谷学 講師に深甚の謝意を表します。また論文作成にあたり、有益なご助言およびご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科 大政健史 教授、内山進 教授に厚く感謝申し上げます。さらに、研究室生活全般にてお世話になりました大阪大学大学院工学研究科 金美海 准教授、山本陸 助教に心から感謝申し上げます。

さらに、大阪大学大学院工学研究科 生物工学専攻 生物プロセスシステム工学領域（紀ノ岡研究室）の事務補佐の方々、そして同じ時期に研究室で過ごし大変有意義なご助言を賜りました橋田礼博氏、中島健太郎氏に心より御礼申し上げます。

また、ご縁を与えて下さった当時の上司である味の素株式会社 柏原孝志 シニアマネージャー及び関係者に深く御礼申し上げます。

最後に、常に応援してくれる父 風呂光勝、社会人として生きていけるよう育ててくれた亡き母 風呂光幹子、私の大学院での研究と会社業務の両立を支えてくれた妻 風呂光さおりと息子、娘に心から感謝の意を表します。