

遺伝子組換えカイコ飼育施設の開発

第2報 浮遊微粒子ならびに微生物のモニタリング結果

麻田 鷹司^{*1}
西谷 善紀^{*1}
田中 幸悦^{*1}

福川 真史^{*1}
湯 懐鵬^{*1}

第1報では遺伝子組換えカイコ飼育施設に必要な施設要件を示した。本報では、医薬品工場で求められている高度な環境管理、つまり遊微微粒子濃度と環境微生物についてモニタリングしたので、その結果を述べる。

前室を除く各室を管理区域とし、生産物である繭（マコ）を無菌医薬品用途にも適用できるよう、清浄度の許容基準を設定した。そして、各室をクリーンアップした後に浮遊微粒子濃度を測定し、さらに飼育室内をホルムアルデヒドガスで除染してから環境微生物をモニタリングした。

モニタリングの結果、浮遊微粒子濃度はすべての測定点において許容基準値以下であった。特に、カイコの大量飼育装置内では浮遊微粒子が少なく、好適な環境で飼育できると考えられる。また、環境微生物も許容基準を満足していたが、飼育室のパスボックス付近で比較的多く検出された。飼育用資材搬入時の影響であると考えられ、搬入時に資材を消毒するとともに、パスボックス内も事前に消毒することにした。

本研究により、本施設の浮遊微粒子濃度・環境微生物はともに許容基準値を満たしており、清浄な衛生環境が実現されていることが分かった。また、飼育室内で汚染されやすい箇所を把握できたので、今後の衛生管理手法の確立に役立てる。

1.はじめに

カイコの繭から得たタンパク質を化粧品や医薬品に利用するため、カイコを工業的に、大量かつ安定的に飼育するシステムが求められている。特に医薬用途では、遺伝子組換えカイコが新たな医薬品原料の生産系として注目されている。一方、医薬品工場では高度な微粒子管理と微生物管理が求められる。

前報¹では、遺伝子組換えカイコの飼育に対応した飼育施設の全体計画について報告した。本報は、竣工時における施設内の浮遊微粒子および環境微生物のモニタリング結果について述べる。

2.モニタリング方法

前室を除く各室を管理区域とし、清浄度区分は生産物である繭を無菌医薬品用途にも適用できるよう、無菌医薬品製造におけるグレードBとした²⁾。浮遊微粒子の測定は清掃後に、環境微生物のモニタリングは除染後に実施した。清掃と除染およびモニタリングの実施日を表1に示す。各室の清掃方法は、飼育室内とカイコ大量飼育装置内は純水拭き、それ以外は純水拭きした後にエタノール拭きとした。

飼育室とカイコ大量飼育装置内の除染は、ホルムアルデヒド濃度を1,200ppmで6時間以上維持し、ケミカル

インジケータによる発色とバイオロジカルインジケータで陰性であることを確認して適正に完了したと判断した。

2-1.浮遊微粒子の測定箇所および測定方法

各室における浮遊微粒子の測定点数はISO14644-1:2015に準拠し、飼育室で6点、カイコ大量飼育装置内で4点、上簇室で6点、収繭・繭切室で6点とした。測定点の高さは、カイコ大量飼育装置内は床上60cm、カイコ大量飼育装置以外は床上1mとした。測定箇所の平面図を図2に示す。測定にはパーティクルカウンタ（Particle Measuring Systems社製、Lasair III 110）を用いた。1回の測定につき28.3L/minの吸引量で1分間吸引し、各測定点で5回測定してそれぞれ平均値を求め、1m³当たりの個数に換算した。なお、粒径測定範囲は0.5μm以上および5.0μm以上の2段階とした。

2-2.微生物のモニタリング箇所およびモニタリング方法

モニタリングの対象微生物は浮遊菌、落下菌、付着菌とし、対象菌種は一般細菌および真菌とした。浮遊菌、落下菌、付着菌のモニタリング箇所を図1および図2に示す。浮遊菌の捕集には1段多孔型エアサンプラ（ミドリ安全製、BIO SAMP MBS-1000）を用い、100L/minの吸引量で10分間吸引した。落下菌は直径90mmのペトリ皿を4時間静置してサンプリングした。浮遊菌および

落下菌のモニタリングの高さは、カイコ大量飼育装置内は床上 60cm、カイコ大量飼育装置以外は床上 1m とした。浮遊菌および落下菌のモニタリングの様子を図3に示す。付着菌のサンプリングには 25cm² のコンタクトプレートを用いた。一般細菌用の培地は SCD 寒天培地、真菌用の培地は CP 添加ポテトデキストロース培地を用い、培養条件は一般細菌は 32°C で 2 日間、真菌は 25°C で 7 日間とした。³⁾

表 1 清掃と除染およびモニタリングの日程

日程	作業内容	対象室
2021/10/25 ～ 2021/10/26	清掃	全室
2021/10/28	浮遊微粒子測定	前室以外
2021/11/6 ～ 2021/11/7	除染	飼育室 カイコ大量飼育装置内
2021/11/11	環境微生物モニタリング	前室以外

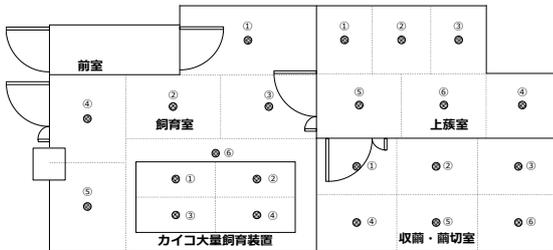


図 1 浮遊微粒子、浮遊菌、落下菌のモニタリング箇所

3.結果および考察

3-1.浮遊微粒子の測定結果

各室における浮遊微粒子濃度の合否判断基準は、無菌医薬品製造におけるグレード B の非作業時の許容基準、

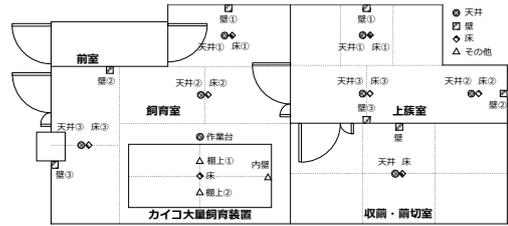


図 2 付着菌のモニタリング箇所



図 3 モニタリングの様子(左:浮遊菌、右:落下菌)

つまり 0.5μm 以上の粒子が 1m³ 中に 3,520 個以下、5μm 以上の粒子が 1m³ 中に 29 個以下とした。各室の浮遊微粒子の測定結果を表 2 に示す。

すべての測定点において清浄度は許容基準値以下であり、高い清浄度が実現されていることがわかった。とくに、カイコ大量飼育装置内は清浄度が高く、浮遊微粒子の顕著な発生がなかったといえる。高い清浄度により、カイコを好適な環境で飼育できると考えられる。

3-2.微生物のモニタリング結果

各室における微生物の合否判断基準は同じく無菌医薬品製造におけるグレード B として、浮遊菌は 1m³ 中に 10CFU 以下、落下菌は 5CFU/plate 以下、付着菌は 5CFU/25cm² 以下とした。各室の微生物のモニタリング結果を表 3、4 に示す。

表 2 各室における浮遊微粒子の測定結果

室名称	飼育室						カイコ大量飼育装置内				上痰室						収穫・菌切室						許容基準
	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	⑤	⑥	
0.5μm以上(個/m ³)	587	643	855	565	763	1922	35	14	42	14	636	826	1773	502	1392	777	650	580	615	1449	1760	919	3520
5μm以上(個/m ³)	14	14	14	7	21	28	0	0	0	0	28	7	14	0	7	0	0	0	0	14	21	7	29

表 3 各室における浮遊菌および落下菌のモニタリング結果

室名称	飼育室						カイコ大量飼育装置内				上痰室						収穫・菌切室						許容基準	
	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	①	②	③	④	⑤	⑥	①	②	③	④	⑤	⑥		
浮遊菌																								
一般細菌(CFU/m ³)	0	0	0	0	4	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	10	
真菌(CFU/m ³)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
落下菌																								
一般細菌(CFU/plate)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	
真菌(CFU/plate)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	

表 4 各室における付着菌のモニタリング結果

室名称	飼育室											カイコ大量飼育装置内				許容基準
	天井①	壁①	床①	天井②	壁②	床②	天井③	壁③	床③	作業台	棚上①	棚上②	床	内壁		
一般細菌(CFU/25cm ²)	0	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	5	
真菌(CFU/25cm ²)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	5	
室名称	上痰室								収穫・菌切室			許容基準				
測定点	天井①	壁①	床①	天井②	壁②	床②	天井③	壁③	床③	天井①	壁①		床①			
一般細菌(CFU/25cm ²)	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5			
真菌(CFU/25cm ²)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5			

各室の環境微生物数は許容基準値以下であり、浮遊微粒子と同様、高い衛生環境が実現されていることがわかった。ただし、飼育室のパスボックス付近で浮遊菌が、床では付着菌が他のモニタリング箇所と比較して多く検出された。この原因は、パスボックスから資材を搬入したときの影響であると考えられる。今後の改善対策として搬入時に資材を消毒するとともに、パスボックス内も事前に消毒することにした。

4.まとめ

本報では、竣工時における施設内の浮遊微粒子および環境微生物をモニタリングした結果、以下に示す事柄が明らかになった。

- 1) 各室の浮遊微粒子清浄度は許容基準値を満たしており、とくにカイコ大量飼育装置内の清浄度が高かったため、カイコを好適な環境で飼育できると考えられる。
- 2) 各室における環境微生物数は許容基準値を満たし

ていた。ただし、飼育室内に設けたパスボックス付近で浮遊菌や付着菌が他のモニタリング箇所と比較して多く検出されたため、対策として資材搬入時に消毒することにした。

謝辞：農研機構 瀬筒秀樹先生、飯塚哲也先生からカイコの飼育条件について貴重なアドバイスを頂いた。ここで謝意を表す。

参考文献

- 1)西谷,麻田ら：遺伝子組換えカイコ飼育施設の開発:(第1報)施設の全体計画,日本建築学会大会学術講演梗概集,環境工学- I ,pp.1949-1950,2022.7
- 2)厚生労働省：無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針(2011)
- 3)日本建築学会：浮遊微生物サンプリング法規準・同解説(2013)