

# 新興生醫產品 無菌操作及品質檢驗

1

臺灣生醫品質保證協會 常務理事

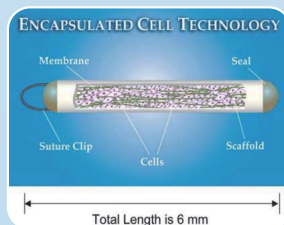
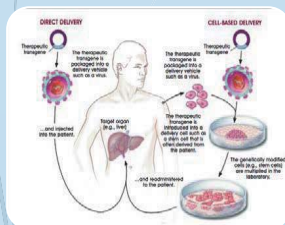
陽明大學 環境衛生研究所/食品安全研究所 教授

臺北榮民總醫院 醫學研究部 特約研究員

劉宗榮 博士

2

## 新興生醫產品 Advanced Therapeutic Medicinal Products, ATMP



### Gene Therapy, GTMPs :

contain genes that lead to a therapeutic, prophylactic or diagnostic effect. They work by inserting recombinant genes into the body to treat cancer, genetic disorders or long-term diseases.

### Somatic Cell, Therapy, SCTMP :

contain cells or tissues that have been manipulated to change their biological characteristics or cells or tissues not intended to be used for the same essential functions of the body. They can be used to cure, diagnose or prevent disease.

### Tissue Engineering Products, TEP :

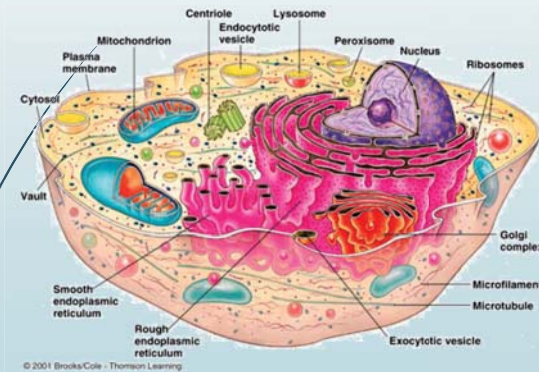
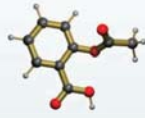
contain cells or tissues that have been modified so they can be used to repair, regenerate or replace human tissue.

### Combined ATMP :

contain one or more medical devices as an integral part of the medicine, such as cells embedded in a biodegradable matrix or scaffold.

## 細胞組織物作為藥品？

Aspirin



Eucaryotic cell

- 屬於注射、輸注或植入之無菌藥品
- 具有生命活性的大複合體
  - 無法過濾除菌
- 對熱、化學品、輻射均不具抗性
  - 無法以加熱、照射輻射及化學品處理法滅菌
- 源頭管制
- 無菌操作

## 無菌藥品的製造

### ■ 原則 ( PRINCIPLE )

- 為使微生物學上之污染，與微粒及熱原污染之風險降到最低，無菌產品之製造應受制於特別之要求。大部分的要求取決於參與人員之技巧、訓練及態度。**品質保證**特別重要，且這種類型之製造應嚴格遵循，謹慎建立經確效的製備方法及程序。**無菌性或其他品質層面之信賴度不得僅仰賴於最終製程或最終產品的檢驗。**

西藥藥品優良製造規範  
附則 1 無菌藥品的製造  
PIC/S GMP Guide

Annex 1 MANUFACTURE OF STERILE MEDICINAL PRODUCTS

## QC vs QA

### Quality Assurance, QA

prevent defects with a focus on the process used to make the product

avoid the defect in the first place

a proactive process

a process based approach

involves processes managing quality

### Quality Control, QC

identify (and correct) defects in the finished product

find defects and correct it

a reactive process

a product based approach

be used to verify the quality of the product

## 無菌藥品

風險較低

### • 最終滅菌法

- 在高品質的環境條件下，進行產品充填及產品容器之密封，盛裝於最終容器之產品需再經過加熱或輻射的滅菌過程加以滅菌。

風險較高

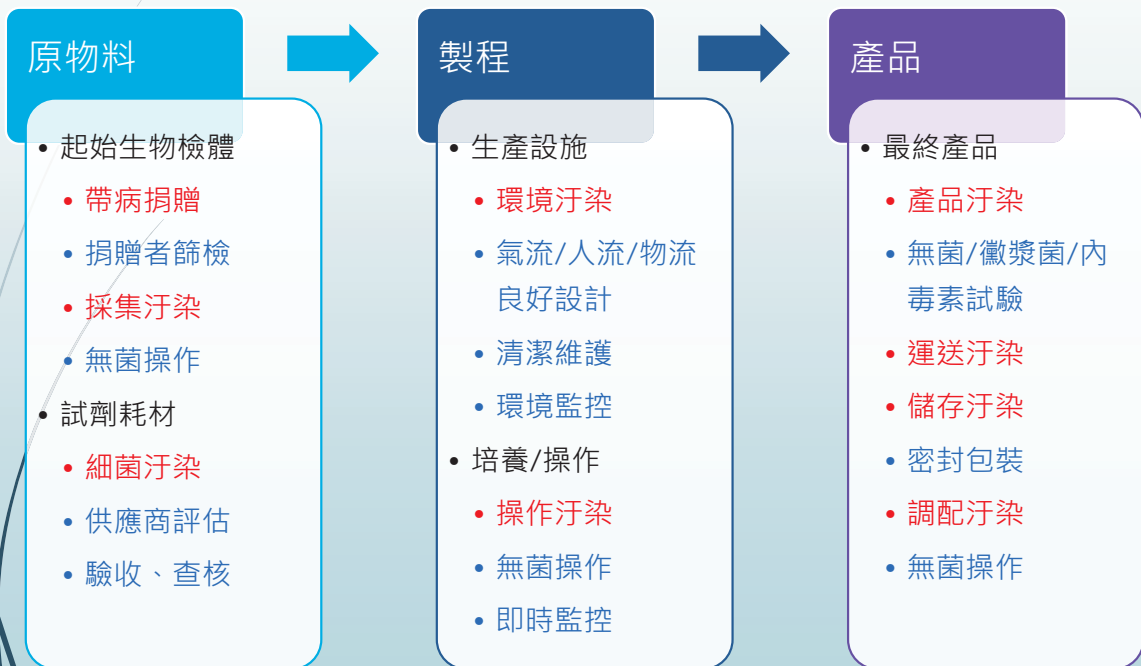
### • 無菌操作法

- 先將藥物、容器、及封蓋分別以適當的滅菌方法滅菌後再予組合。產品盛裝於最終容器後，並不再經滅菌過程處理。

- 只有在最終滅菌法不適宜(not feasible)時，方可採用無菌操作法製造無菌藥物，是一項廣為接受的原則。

**The more manual the process is, the higher the risk!**

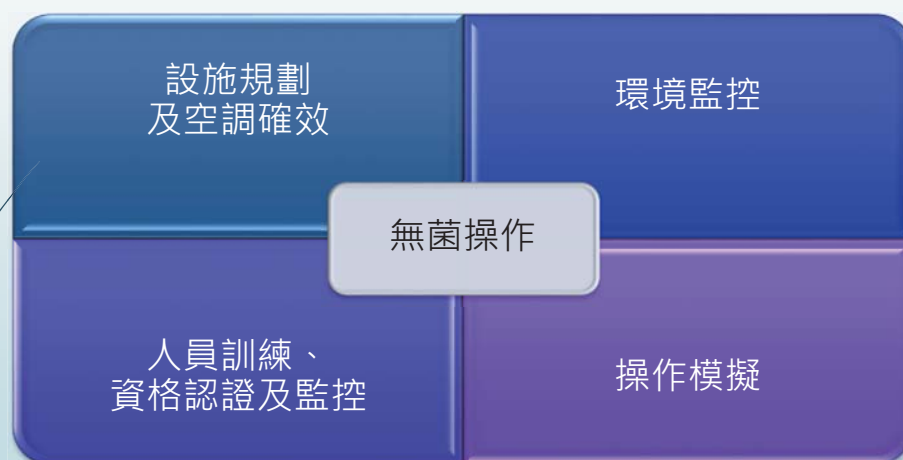
## ATMP製造考量重點



## Aseptic Processing

- Asepsis : A state of control attained by using an aseptic work area and performing activities in a manner that precludes microbiological contamination of the exposed sterile product.
- Aseptic Processing : the processing of drug components (drug, containers, excipients etc.) in a manner that precludes microbiological contamination of the final sealed product.

## Aseptic Processing



## Clean Area/Cleanroom

- 一被定義符合空氣懸浮微粒與微生物潔淨標準的區域。
- 一個被設計、維持與管制的房間以防止藥物產品被微粒子與微生物污染。此被指定的房間可一再地符合適當的清淨度分級。



## 環境監控 潔淨室及潔淨空氣裝置分級

等 級	每立方公尺等於或大於下述粒徑之微粒的最大容許量			
	靜態		動態	
	0.5 $\mu\text{m}$	5.0 $\mu\text{m}$	0.5 $\mu\text{m}$	5.0 $\mu\text{m}$
<b>A</b>	<b>3,520</b>	<b>20</b>	<b>3,520</b>	<b>20</b>
<b>B</b>	<b>3,520</b>	<b>29</b>	<b>352,000</b>	<b>2,900</b>
<b>C</b>	<b>352,000</b>	<b>2,900</b>	<b>3,520 000</b>	<b>29,000</b>
<b>D</b>	<b>3,520,000</b>	<b>29,000</b>	未界定	未界定

靜態：指該生產設施已完成生產設備之安裝並在運轉中，但無操作人員在場的狀態。

動態：指設備已於操作狀態中運轉，且有特定人數執行操作。

WHO GMP	US 209E	US Customary	ISO/TC (209) ISO 14644	EEC GMP
Grade A	M 3.5	Class 100	ISO 5	Grade A
Grade B	M 3.5	Class 100	ISO 5	Grade B
Grade C	M 5.5	Class 10 000	ISO 7	Grade C
Grade D	M 6.5	Class 100 000	ISO 8	Grade D

## 環境監控 各種不同等級從事之作業

等 級	無菌製備作業的實例
A	無菌製備與充填
C	要過濾之溶液的調製
	待過濾溶液之製備
D	洗滌後之組件的處理

## 環境監控 動態潔淨區之微生物監測

等級	微生物污染的建議限量 <sup>(a)</sup>			
	空氣樣品 cfu/m <sup>3</sup>	落菌培養皿 (直徑 90 mm) , cfu/4 時 <sup>(b)</sup>	接觸培養皿 (直徑 55 mm) , cfu/培養皿	手套指印 印 5 根手指/手套 cfu/手套
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

註：(a) 這些都是平均值。

(b) 個別的落菌培養皿暴露時間得少於 4 小時。

## 微生物監測之目的？

- 避免產品汙染
- 雖然大部分汙染屬非病原微生物 (nonpathogenic microorganisms) ，但仍會影響產品的安全性、純度及有效性。
  - 導致產品混濁
  - 造成產品降解
  - 影響產品酸鹼值
  - 產生內毒素或其他毒素
- 可使用微生物試驗(無菌試驗或生物負荷量，bioburden)檢測產品是否被汙染
- 污染的產品除了可能使製造廠蒙受經濟損失(整批回收)，還可能讓病人處於致命的風險之中

## 女子打美容針致死 “僵屍美容” 活人變僵屍

2012-10-15 更新

分享  微博     8+1 < 0

### 女子打美容針致死 “僵屍美容” 活人變僵屍

導語：香港特區政府衛生署日前公布，3名女子在港島銅鑼灣“DR醫學美容集團”接受靜脈輸液療程即“僵屍美容”後，出現敗血性休克，情況危殆。一名46歲女子在接受靜脈輸液療程後，出現敗血性休克，10日證實不治。

## 汙染來源

### ► 人員 (最常見)

- 接觸汙染
- 皮膚 / 頭髮 / 黏膜
- 服裝

### ► 儀器設備

### ► 未適當清潔 / 受汙染的原物料

### ► 空氣

- HVAC / HEPA 失效
- 開關門時擴散進入
- 內部產生 (牆壁、地板、天花板剝落)

## 汙染控制

### 個人衛生

- 沐浴、洗髮、修臉
- 口腔衛生
- 乾淨的衣服與鞋子

### 生病時

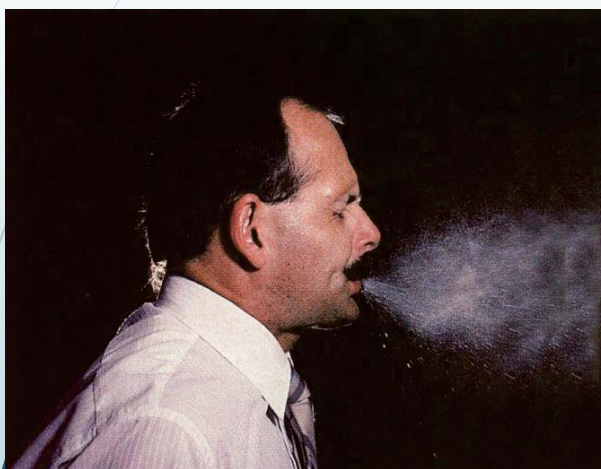
- 生病或有開放性傷口時請告知管理人員
- 可能須被隔離於管制區域外

### 在潔淨區域工作須避免：

- 化妝、配戴首飾、噴香水
- 飲食或嚼食口香糖
- 曬傷

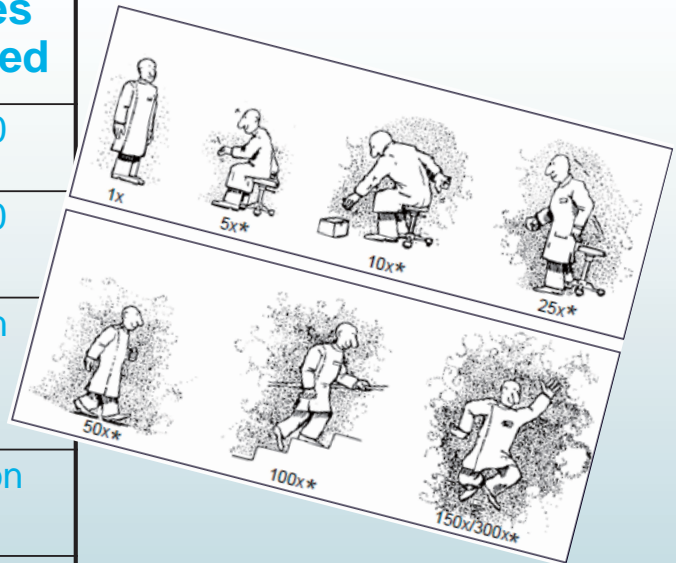


## 汙染控制



人，是潔淨室內最大的污染來源，  
也是無菌操作最大的風險因子！

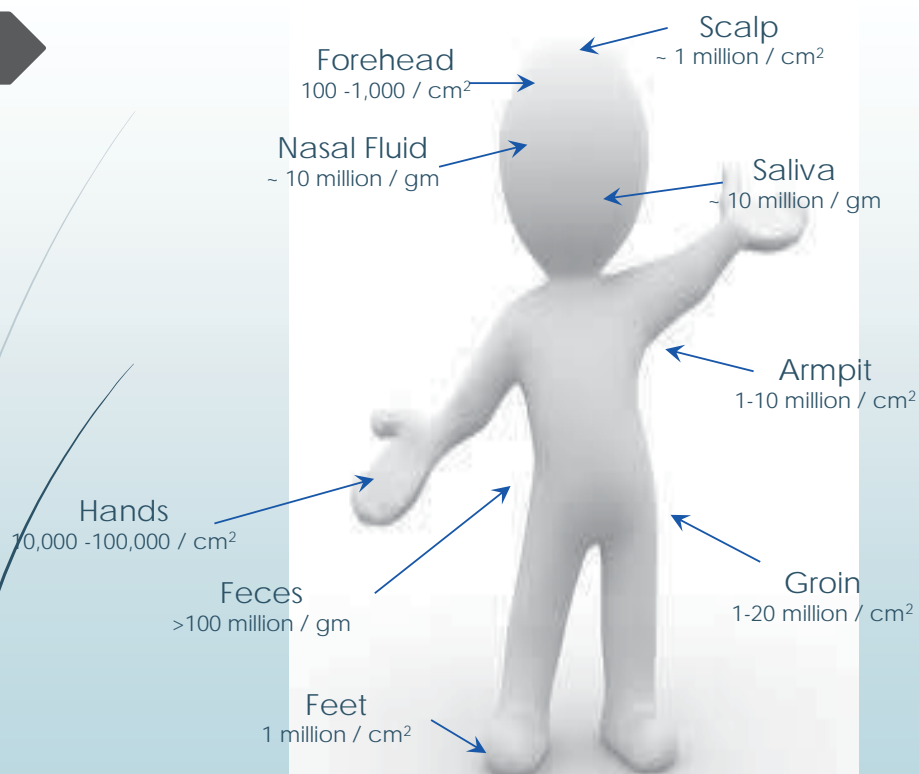
Activity	Particles Generated
Standing or Sitting	100,000
Slight head/hand movement	500,000
Body, arm movement w/ toe tapping	1 million
Changing from sitting to standing	2.5 million
Slow walk	5 million
Running	30 million



NOTE: Men shed more particles than women

靜靜站著都會散發...

20



除此，還會打嗝、放屁、做錯事!

21

## 潔淨室著裝Gowning

22

## 潔淨室著裝



## Scrubbing technique



## 潔淨室著裝

### ■ 概念

- 越乾淨越好，個人潔淨、刷牙、修臉、更衣
- 移除身上鑰匙、筆、手錶、首飾、卸妝
- 避免接觸潔淨室牆面、地面及其他物品
- 避免接觸無菌衣、手套、口罩

### ■ 著裝順序

- 由上而下 (Top-Down)，先把頭髮包住
- 內而外 (Inside-out)，避免接觸衣服外表面
- 下而上 (Bottom-Up)，最後著無塵靴套，完整包覆全身

步驟1：先確定所需穿戴品項是否都已備齊  
 步驟2：穿戴前先取下手錶、項鍊等飾品  
 步驟3：先穿戴非滅菌頭套、面罩與腳套



[http://www.shikee.com.tw/product\\_detail.asp?pro\\_ser=4640139](http://www.shikee.com.tw/product_detail.asp?pro_ser=4640139)<sup>15-17</sup>



<http://www.micronclean.be/bemicon.aspx>

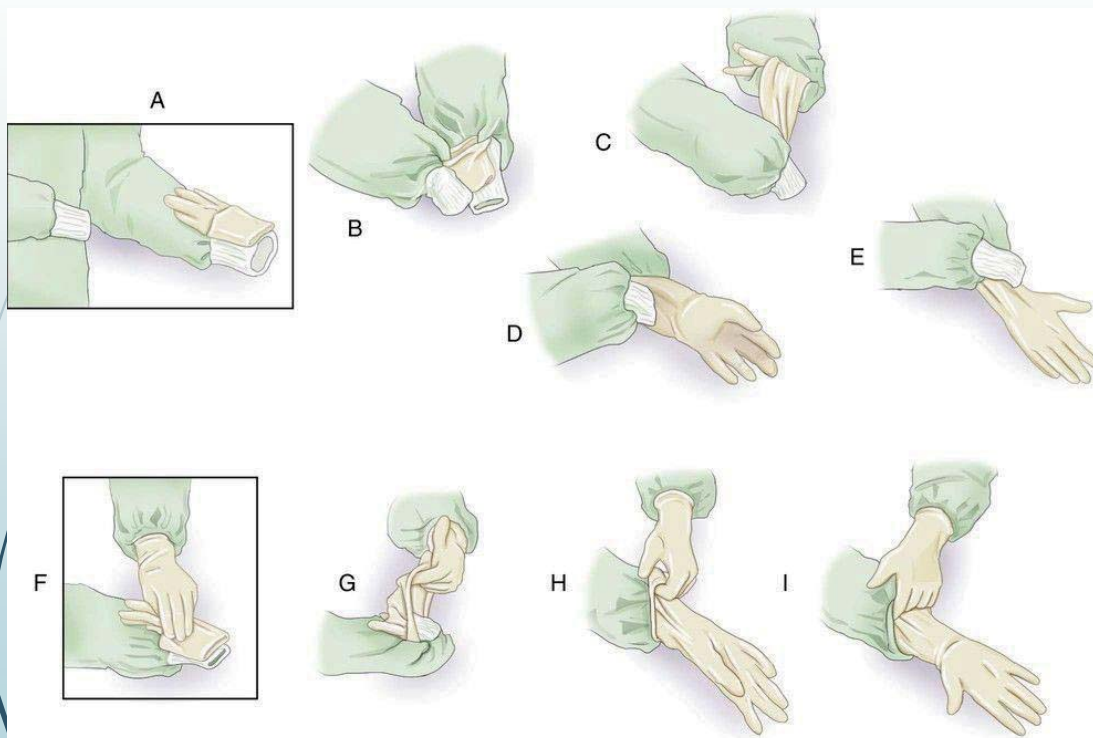
27

## Gowning technique



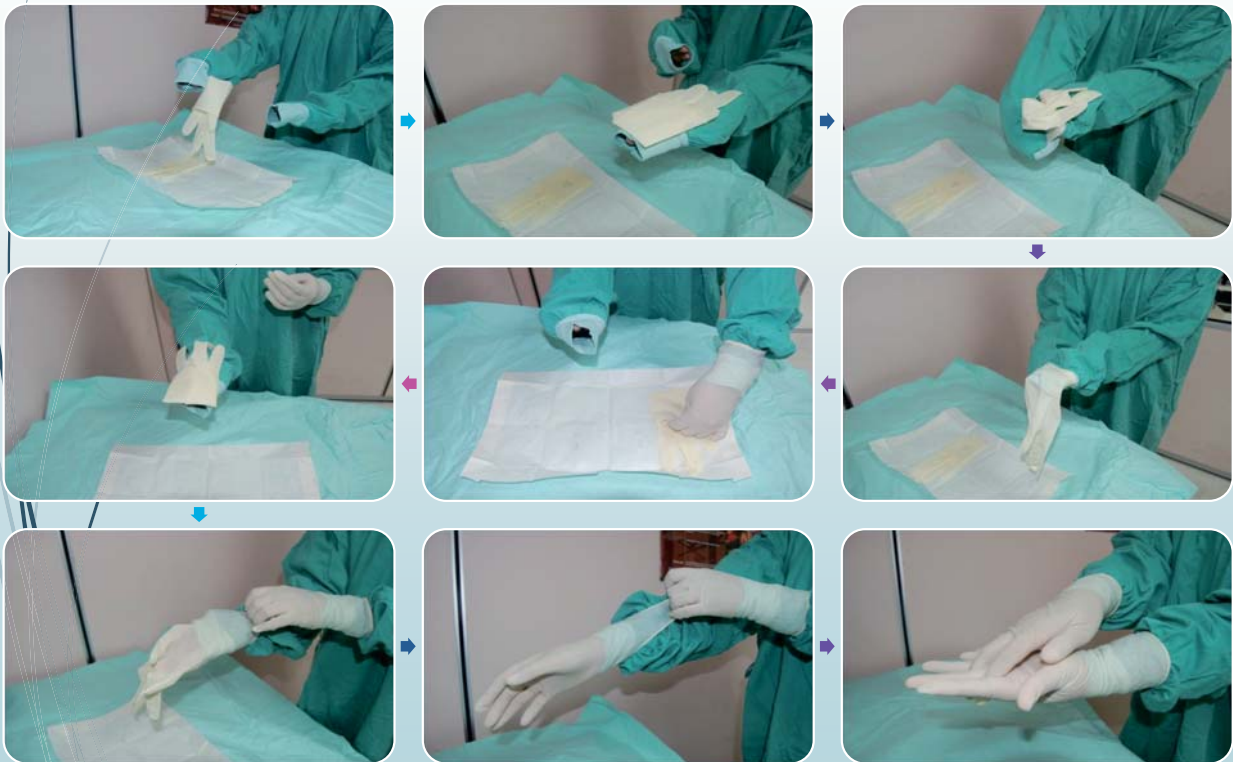
28

## Closed gloving method



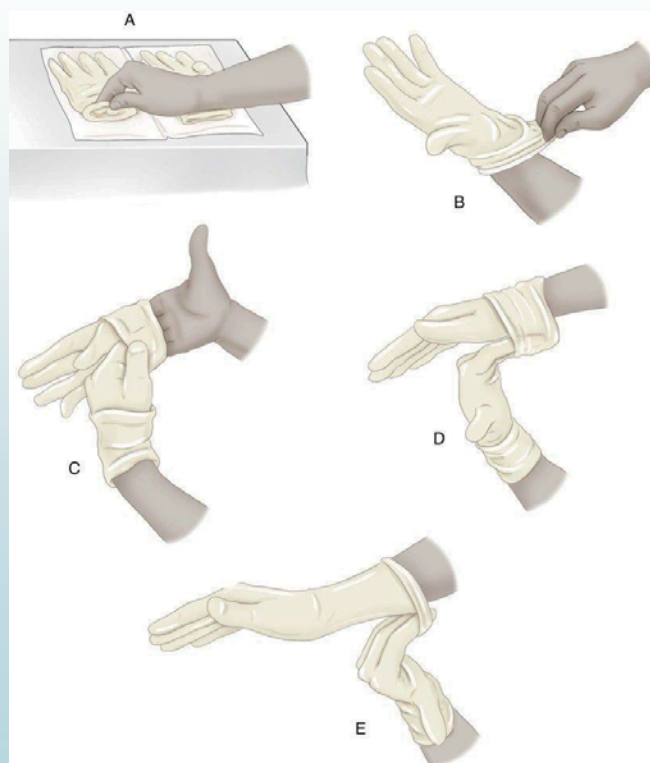
29

## Closed gloving method



30

## Open gloving method



## Open gloving method



## 潔淨室操作注意事項

### ■ 人員

- 須經過完整教育訓練並通過考核，方可進入潔淨室執行作業
  - 潔淨室著裝
  - 無菌操作
  - 了解產品如果受到微生物汙染，可能導致的嚴重後果
- 避免在潔淨室內交談聊天
- 避免激烈快速動作
- 保持體態，不可倚靠牆壁、桌面，或是坐在地板上

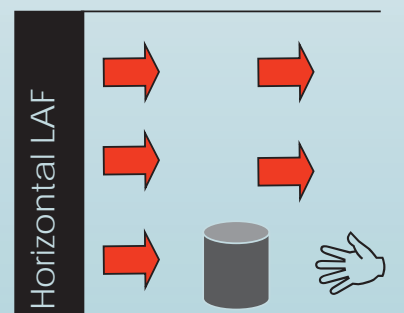
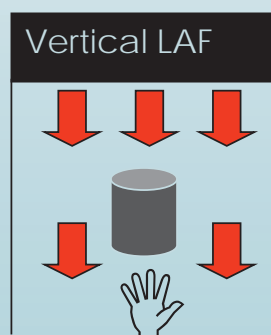
## 潔淨室操作注意事項

- 須定期清潔，維持整齊
- 非必要物品勿置於潔淨室內
- 無菌操作時不可碰觸非無菌物品，例如抓癢
- 掉落地板上之物品須待製程結束後再撿起
- 物品放置不可擋住氣流通道



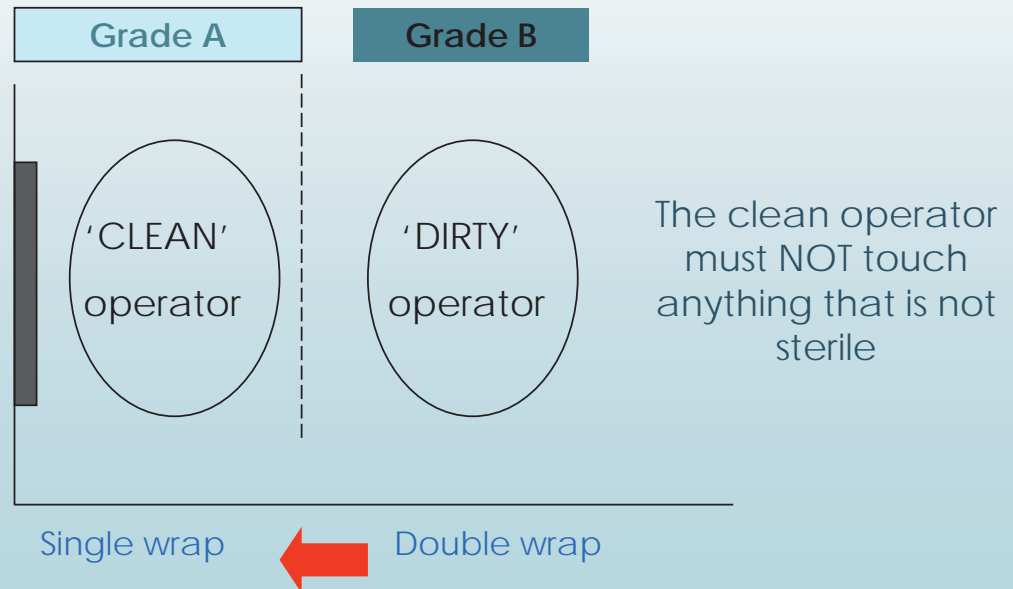
## 'First Air' principle:

- items being protected by air flow must receive clean 'first air' - so all operator manipulations must be done downstream of air flow
- Aseptic manipulations and operator gloves must be restricted to within the protected zone during a critical activity



## 無菌操作

### ■ 'Buddy system'



## ATMP源頭管制

- ➡ 應說明細胞之**種類**
  - ➡ 例如體細胞、成體幹細胞或胚胎幹細胞。
- ➡ 提供細胞**來源**說明
  - ➡ 例如自體細胞或同種異體細胞；造血幹細胞、神經細胞或T細胞...等。
- ➡ 應提供**捐贈者同意書**，以確保來源合法性。
- ➡ 應提供**捐贈者合適性證明**
  - ➡ 例如提供捐贈者之篩檢結果(參考人類細胞治療產品臨床試驗申請作業及審查基準附件十四「**人類細胞治療產品相關特殊傳染病控管**」)

人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準

細胞製程與  
管控(CMC)  
之審查考量

## 產品品質檢驗

### 產品測試

應提供製程中的**中間物(intermediate)**與**最終產品(final product)**的**檢驗規格(包含測試項目、分析方法及允收標準)**及**測試結果**

**產品之放行測試**應包括但不限於：

**微生物測試 (Microbiological Testing)：**  
無菌試驗、黴漿菌測試、外來病原測試  
**鑑別 (Identity)**  
**純度 (Purity)：**殘留污染物(不純物)、  
熱原性 / 內毒素  
**效價 (Potency)**  
**存活率 (Viability)**  
**細胞數量 / 劑量 (Cell Number/Dose)**

人體細胞組織優良操作規範

# 產品品質檢驗

細胞製程與  
管控(CMC)  
之審查考量

## 產品測試

### 產品測試規劃

終產品測試  
製程期間檢測  
快速檢測

### 測試方法

藥典方法  
非藥典方法

人類細胞治療產品臨床試驗申請作業與審查基準

# 產品品質檢驗

細胞製程與  
管控(CMC)  
之審查考量

## ■ 品管試驗

### ■ 產品安全嗎？

#### ■ 純度 ( Purity ) ， 是否有有害不純物？

##### ■ 無菌試驗 ( Sterility Testing )

■ 好氧菌，厭氧菌，黴菌

##### ■ 黴漿菌檢測 ( Mycoplasma Testing )

##### ■ 內毒素試驗 ( Endotoxin Testing )

##### ■ 存活率 ( Viability )

■ 可被接受的最低存活率為70%，如未達標準，計畫主持人應提供數據，以證明死細胞與細胞碎片，並不會影響產品的安全性與療效。

##### ■ 分化 ( Differentiation )

##### ■ 外來病原 ( Adventitious Viruses )

##### ■ 其它，如試劑殘留

# 產品品質檢驗

細胞製程與  
管控(CMC)  
之審查考量

## ► Sterility Testing

- 直接培養法
- 濾膜過濾法
- 血瓶培養法 - 非藥典方法, 7天
- 培養基效能試驗
- 方法確效
  - 專一性
  - 靈敏度 ( 偵測極限 )
  - 再現性

藥典方法, 14天

生物藥品檢驗基準II, 101, 12

42

## 無菌試驗法

- 所有操作應在一級區 ( Class 100 ) 之清淨環境下進行，並應對操作環境進行監測，以確保其操作過程無菌。
- 應對培養基執行適用性試驗 ( Suitability tests )，包含
  - 培養基之無菌性 ( Sterility of media ) — 培養基依規定之溫度培養不少於十四日，培養結束必須無微生物生長，以確定培養基本身為無菌。
  - 培養基效能試驗 ( Growth promotion test ) — 培養基用依賴此培養基生長之微生物，各以約 10 ~ 100CFU 接種之，並於合適條件下培養，若於五日內全部接種之培養現微生物生長，則該培養基適用。
  - 須採用種批培養維持技術 ( Seed lot culture maintenance techniques ) 使試驗用之微生物自菌種供應中心取得後不得超過五次繼代培養。

## 無菌試驗法

- 抑菌性及抑黴菌性之確效試驗方法
  - 檢品是否具抑菌性及抑黴菌性，應於無菌試驗前先作預試驗，以確認受試檢品本身之任何抑菌性及抑黴菌性不影響試驗之可信度，並確認所進行之試驗步驟適用於受試檢品。
  - 當新產品須進行無菌試驗時，或無菌試驗之條件改變時，須進行本項確效試驗。
  - 即使培養過程未添加抗生素，仍應進行此確效試驗，以確認產品中沒有其他干擾因子。

## 無菌試驗法

- 結果之判定
  - 於觀察期間及培養終了，檢視檢品組之每一試管（容器）是否有微生物生長。若觀察結果無微生物生長，則判定該檢品符合無菌試驗之規定。（符合無菌）
  - 若有證據顯示檢品組有微生物生長，
    - 綜觀試驗之環境（設備）監測、使用材料、試驗程序及陰性對照等試驗，若顯示不適或無菌操作有誤，則本試驗無效，須以等數量之原試驗檢品重新進行試驗。  
(重試驗)
    - 若有證據顯示檢品組有微生物生長，但無證據顯示本試驗無效，則判定該檢品不符合無菌試驗之規定。  
(不符合無菌)

測試報告中應附有環境（設備）監測、使用材料、試驗程序及陰性對照等相關資訊，以確認結果判定之正確性。

## 產品品質檢驗

### ■ Mycoplasma Testing

- 培養基培養法 - 28天
- 指示細胞培養法 - 7天
- 經確效之核酸擴增技術 - 數小時
- 經確效之酵素活性測試法 - 約半小時

生物藥品檢驗基準II, 101, 12

## 產品品質檢驗

### ■ 品管試驗

#### ■ 產品是對的嗎?

#### ■ 鑑別 ( Identity )

- 細胞型態 ( Cell Morphology )
- 細胞表面抗原 ( Surface Antigen )
- DNA polymorphism
- Chromosome karyotyping
- Isoenzyme analysis
- Biofunction Assay

## 產品品質檢驗

### ■ 品管試驗

#### ■ 產品有效嗎？

##### ■ 效價 ( Potency )

- 數目 ( Cell Number ) 、存活率 ( Viability )
- Colony Forming Assay
- Paracrine
- Differentiation
- Cytotoxicity
- Antigen Presentation

Guidance for Industry-Potency Tests for Cellular and Gene Therapy Products, 2011

## 產品品質檢驗

### ■ 品管試驗

#### ■ 產品可以貯存多久？

##### ■ 安定性 ( Stability )

- 需反映預計之貯存條件，包裝方式及運送狀況
- 證明完整性，安全性，及效價仍符合要求

#### ■ 我們的產品沒有貯存，所以不必考慮安定性！

- 進行安全性試驗或運送所需的時間也是貯存！

## 產品品質檢驗

- 應以表格方式列出最終產品規格(含測試項目、測試方法及允收標準)，並包含測試方法的敏感度(sensitivity)與特异性(specificity)等相關資訊
- 測試項目應至少包括安全性、純度、效價與鑑別。
- 對每批最終產品應實施放行測試。

### 最終放行測試

- 批次分析結果  
應提供**不同批次產品**的放行測試結果，以確保製程所產出之產品的品質一致性
- 產品的安定性  
**製程中的**安定性測試  
**最終產品**的安定性測試  
**產品運送**的安定性測試
- 產品追蹤、標示

### 其它

## 產品品質檢驗

品名：XXX細胞

批號：141204

製程：AP11

製造日期：141227

分析項目	分析方法	允收標準	(分析結果)
無菌檢測	無菌試驗法(藥典)	陰性	陰性
無菌檢測	革蘭氏染色法	陰性	陰性
細胞數	細胞計數儀	$5 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$	$5.5 \times 10^7$
純度	流式細胞儀	CD90 $\geq$ 95 %	CD90 = 98 %
		CD105 $\geq$ 95 %	CD105 = 98 %
		CD34 $\leq$ 5%	CD34 = 2%
效價	酵素免疫分析法	IDO for information	15 nM/ 5000 cells
.....	.....	.....	.....

51

## Setting

## Surgical Aseptic technical

主操作者  
=主治醫師

我是BSC

鋪單

不鋪單

助手  
=流動護士



52

## Setting

洗手

刷手

穿無塵  
衣

手套

鋪潔淨  
區

上器械

手套

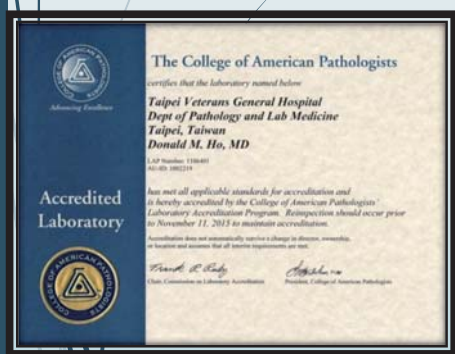


Closed glove technique is the best technique



## QC檢測

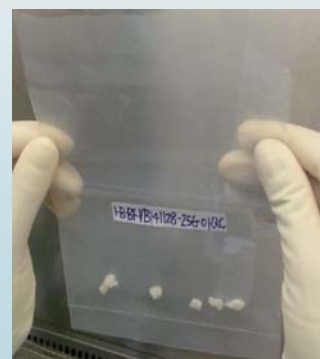
## 委託經過CAP認證通過之檢驗單位執行



## 海綿骨碎片-QC

- Aerobic culture
- Anaerobic culture
- Fungus culture

## 生物指示劑



## 粗脂肪與試劑殘留量

清洗前

清洗後

粗脂肪與試劑殘留量			
檢測項目	粗脂肪(%)	試劑1(mg/g)	試劑2(mg/kg)
檢測極限	0.100	0.200	1.00
清洗前-1	38.1	...	...
清洗前-2	37.9	...	...
清洗前-3	37.1	...	...
清洗前平均值	37.7	...	...
清洗後-1	5.1	< LOD	< LOD
清洗後-2	7.8	< LOD	< LOD
清洗後-3	6.7	< LOD	< LOD
清洗後平均值	6.53	< LOD	< LOD
清除率	82.7%	...	...

\*低於方法偵測極限之測定值以“< LOD”表示。

# 生菌測試-Bioburden Report

清洗前

清洗後

Bioburden Report			
檢體編號	好氧菌總數(CFU)	厭氧菌總數(CFU)	真菌總數(CFU)
清洗前-1	1.2	1.5	0.6
清洗前-2	<3	1.2	<3
清洗前-3	26.7	3.9	3.6
平均Bioburden	12.9		
採用Bioburden	34.2		
SIP	0.3ml(採樣體積)/116ml(總體積)=0.0026		
Total Bioburden	34.2/0.0026=13154(CFU)		
檢體編號	好氧菌總數(CFU)	厭氧菌總數(CFU)	真菌總數(CFU)
清洗後-1	<3	<3	<3
清洗後-2	<3	<3	<3
清洗後-3	<3	<3	<3
平均Bioburden	0		
採用Bioburden	0		
SIP	0.33ml(採樣體積)/90ml(總體積)=0.0037		
Total Bioburden	0/0.0037=0(CFU)		

\*CFU<3：培養基尚無肉眼可辨識之菌落生長。

## Promotion Test

委託經過CAP認證通過之檢驗單位執行

	培養基	測試菌株	Promotion test	Negative control	Positive control
清洗後一	Thioglycollate broth	E. Coli ATCC 25922	Growth well	No growth	Growth well
	Thioglycollate	Cl diffucile ATCC 9689	Growth well	No growth	Growth well
	Trypticase soy broth	C albicans ATCC 10231	Growth well	No growth	Growth well
清洗後二	Thioglycollate broth	E. Coli ATCC 25922	Growth well	No growth	Growth well
	Thioglycollate	Cl diffucile ATCC 9689	Growth well	No growth	Growth well
	Trypticase soy broth	C albicans ATCC 10231	Growth well	No growth	Growth well
清洗後三	Thioglycollate broth	E. Coli ATCC 25922	Growth well	No growth	Growth well
	Thioglycollate	Cl diffucile ATCC 9689	Growth well	No growth	Growth well
	Trypticase soy broth	C albicans ATCC 10231	Growth well	No growth	Growth well

No job is finished till the paper work is done!!

