

4.05 微生物限度試験法

微生物限度試験法を次のように改める。

微生物限度試験法には生菌数試験及び特定微生物試験が含まれる。原料又は製品の任意の異なる数箇所（又は部分）から採取したものを混和し、試料として試験を行う。試料を液体培地で希釈する場合は、速やかに試験を行う。また、本試験を行うに当たっては、バイオハザード防止に十分に留意する。

I. 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

1 序文

本試験は、好氣的条件下で発育可能な中温性の細菌及び真菌を定量的に測定する方法である。

本試験は、原料や製剤が既定の微生物学的品質規格に適合するか否かを判定することを主目的としたものである。採取試料数も含めて指示通りに試験を実施し、結果を判定する。

有効成分として生菌を含む製品には、本試験を適用しない。

局方試験法との同等性が示されている場合は、自動化法を含む別の微生物学的方法を用いてもよい。

2 基本手順

生菌数測定は、被験製品への外部からの微生物汚染を回避するように設計された条件下で行う。汚染を回避するための予防措置は、試験で検出しようとしているいかなる微生物に対しても影響を与えてはならない。

被験製品が抗菌活性を有する場合は、この抗菌活性を可能な限り除去又は中和する。この目的のために不活化剤を用いる場合は、その有効性と微生物に対する毒性がないことを確認する。

試料の調製に界面活性剤を使用する場合は、微生物に対する毒性がないこと、及び用いる不活化剤との間に相互作用がないことを確認する。

3 生菌数測定法

通常はメンブランフィルター法又はカンテン平板法を用いる。最確数（MPN）法は概して精度に欠ける菌数測定法ではあるが、バイオバーデン（汚染菌数）が非常に少ない製品群に対しては最適な方法となることもある。

製品の特性や要求される微生物限度値などに基づいて測定法を選択するが、選択した測定法は、規格に適合していることを判断するのに十分な試料量を試験できるものでなければならない。また、選択した方法の適合性を確認する。

4. 培地性能、測定法の適合性及び陰性対照

4.1. 一般要件

被験製品存在下における微生物検出能力を確認する。

また、試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や製品の処方変更があった場合には、再度、適合性を確認する。

4.2. 試験菌の調製

試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用するか、又は次に示す手順で調製する。

なお、試験に用いる微生物は、最初のマスターシードロットからの継代数5回を超えないように、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を用いて管理する。細菌及び真菌の各試験菌について、表 4.05-I-1 に示す条件でそれぞれ個別に培養する。

試験菌懸濁液の調製には、pH7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH7.2 のリン酸緩衝液を用いる。*Aspergillus niger* の胞子を懸濁させるために、緩衝液にポリソルベート 80 を 0.05% 加えても良い。懸濁液は 2 時間以内、又は 2 ~ 8℃ に保存する場合は 24 時間以内に用いる。*Aspergillus niger* 又は *Bacillus subtilis* の栄養型細胞の新鮮懸濁液を調製して希釈する代わりに、胞子懸濁液又は芽胞懸濁液を調製し、接種菌液として使用できる。それぞれの懸濁液は、保証された期間内は 2 ~ 8℃ で保存できる。

表 4.05- I-1 試験菌の調製と使用法

微生物	試験菌の調製	培地性能		製品存在下での 生菌数測定法の適合性	
		総好気性微生物数	総真菌数	総好気性微生物数	総真菌数
<i>Staphylococcus aureus</i> 例えば, ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 又は NBRC13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30 ~ 35℃ 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 例えば, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 又は NBRC 13275	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30 ~ 35℃ 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間	
<i>Bacillus subtilis</i> 例えば, ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 又は NBRC 3134	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30 ~ 35℃ 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤3 日間	
<i>Candida albicans</i> 例えば, ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 又は NBRC 1594	サブロー・ブドウ糖カンテン培地又はサブロー・ブドウ糖液体培地 20 ~ 25℃ 2 ~ 3 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25℃ ≤5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤5 日間 MPN:適用せず	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25℃ ≤5 日間
<i>Aspergillus niger</i> 例えば, ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 又は NBRC 9455	サブロー・ブドウ糖カンテン培地又はポテト・デキストロースカンテン培地 20 ~ 25℃ 5 ~ 7 日間, 又は良好な孢子形成が認められるまで	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25℃ ≤5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35℃ ≤5 日間 MPN:適用せず	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25℃ ≤5 日間

4.3. 陰性対照

試験状態を確認するために、試料液の代わりに使用した希釈液を用いて陰性対照試験を実施する。微生物の発育があってはならない。微生物の発育が認められた場合には、原因調査が必要である。また、陰性対照試験は5.に記載の製品の試験においても実施する。

4.4. 培地性能

市販培地についてはバッチごとに試験する。また、乾燥粉末培地又は各成分より調製した培地については、調製バッチごとに試験する。

表 4.05-I-1 に示す微生物の少数 (100 CFU 以下) をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の一部、ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びサブロー・ブドウ糖カンテン培地の平板に接種する。菌株ごとに別個の液体培地の一部又は平板を用い、表 4.05-I-1 に示した条件でそれぞれ培養する。

カンテン培地では、接種菌の出現集落数は標準化された菌液の計測値の 1/2 から 2 倍以内でなければならない。新鮮培養菌を用いて試験する場合は、有効性が確認された培地バッチで以前に得られた発育と同等の発育を示さなければならない。

液体培地では、有効性が確認された培地バッチで以前に得られた発育と同等の発育が認められなければならない。

4.5. 製品存在下での測定法の適合性

4.5.1. 試料の調製

試料の調製法は、被験製品の物理学的特性に依存する。以下に記載したいずれの方法も満足できるものでない場合は、別な方法を確立する。

水溶性製品

被験製品を pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 のリン酸緩衝液又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地で溶解又は希釈する (通常は 10 倍希釈液を調製する)。必要ならば、pH6 ~ 8 に調整する。さらなる希釈が必要な場合は同じ希釈液で調製する。

水に不溶の非脂質製品

被験製品を pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 のリン酸緩衝液又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に懸濁させる (通常は 10 倍希釈液を調製する)。分散しやすくするために、例えばポリソルベート 80 (濃度: 1 g/L) のような界面活性剤を加えることができる。必要ならば、pH6 ~ 8 に調整する。さらなる希釈が必要な場合は同じ希釈液で調製する。

脂質製品

被験製品をろ過滅菌したミリスチン酸イソプロピルに溶解するか、又は、必要ならば 40℃以下 (例外的な場合でも 45℃以下) に加温した最少必要量のポリソルベート 80 又は他の非阻害性の界面活性剤を用いて混合する。必要ならば水浴中で温度を保ちながら注意深く混和する。選定した希釈液をあらかじめ加温して加え、被験製品の 10 倍希釈液を調製する。乳化に必要な最短の時間で温度を保ちながら注意深く混和する。適切な濃度のポリソルベート 80、又は他の非阻害性の界面活性剤を含む同じ希釈液を用いて、更に 10 倍段階希釈系列を調製してもよい。

エアゾール状の液体又は固体

製品を無菌的にメンブランフィルター装置内又はさらなる試料採取のために滅菌容器内に移す。各被験容器から、全量あるいは定量噴霧の一定量のいずれかを用いる。

経皮吸収パッチ

経皮吸収パッチの保護被覆 (“剥離ライナー”) を取り除き、粘着面を上向きにして滅菌ガラス又は滅菌プラスチックトレーの上に置く。パッチ同士が付着するのを防ぐために、滅菌した多孔性物質 (例えば滅菌ガーゼ) で粘着面を覆う。ポリソルベート 80 及び/又はレシチンなどの不活化剤を含む適量の選定した希釈液にパッチを移し、少なくとも 30 分間激しく振とうする。

4.5.2. 接種及び希釈

100 CFU 以下の接種菌を得るのに十分な量の試験菌懸濁液を 4.5.1. で調製した試料液及び対照 (試料を含まない) に加える。接種する試験菌懸濁液の量は、試料液量の 1% を超えてはならない。

製品からの許容可能な微生物回収結果を得るために、最も低い希釈率の試料液を用いて試験する。抗菌活性又は低溶解度のために、最も低い希釈率の試験法を使えない場合は、更に適切な試験手順を確立する。

試料による発育阻止が避けられない場合には、中和、希釈又はろ過の後に試験菌懸濁液を加えてもよい。

4.5.3. 抗菌活性の中和/除去

4.5.2.及び 4.5.4.に示した手順に従って試験を行い、試料液から回収された菌数と、対照から回収された菌数とを比較する。

発育が阻害される場合（試料液からの回収菌数が、対照からの回収菌数の 1/2 未満の場合）は、正しい結果を得るために、生菌数測定の方法を変更する。方法の変更には、例えば（1）希釈液又は培地の増量、（2）特異的又は一般的な中和剤の希釈液への添加、（3）膜ろ過、又は（4）上記の手段の組み合わせが含まれる。中和剤：抗菌剤の活性を中和するため、中和剤を用いることができる（表 4.05-I-2）。中和剤は、選定した希釈液又は培地に、可能な限り滅菌前に添加する。中和剤を用いた場合は、その有効性と微生物に対する毒性がないことを、製品を含まずに中和剤のみを加えたブランク試験で確認する。

適切な中和法が確立できない場合には、その製品のもつ殺菌活性のために、接種菌が分離できないと見なす。したがって、その製品が接種菌と同種の菌やその近縁種によって汚染されている可能性は低いと考える。しかし、その製品がこれらの微生物の一部を阻害するだけで、試験菌株以外の菌株は阻害しない可能性もあるので、微生物の発育とその許容基準に見合った最も低い濃度で試験を行う。

表 4.05-I-2 阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法

阻害物質	中和剤/中和法
グルタルアルデヒド、水銀剤	亜硫酸水素ナトリウム（重亜硫酸ナトリウム）
フェノール類、アルコール、アルデヒド類、ソルビン酸塩	希釈
アルデヒド類	グリシン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ビス-ビグアニド類	レシチン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ヨウ素	ポリソルベート
水銀剤	チオグリコール酸塩
水銀剤、ハロゲン類、アルデヒド類	チオ硫酸塩
エデト酸塩 (EDTA)	マグネシウム又はカルシウムイオン

4.5.4. 製品存在下での微生物回収

表 4.05-I-1 に記載されている微生物ごとに個別に試験する。添加した微生物のみを対象に測定する。

4.5.4.1. メンブランフィルター法

メンブランフィルターは、孔径 0.45 μm 以下のものを使用する。フィルターの材質は、被験試料の成分によって細菌捕集能力が影響されないように注意して選択する。表 4.05-I-1 の微生物ごとに 1 枚のメンブランフィルターを用いる。

4.5.1. ~ 4.5.3.の記載どおりに調製した試料の適量（可能であれば製品の 1 g 相当量、又は多数の集落の形成が予測される場合はそれ以下）をメンブランフィルターに移して直ちにろ過し、適量の希釈液でメンブランフィルターを洗浄する。

メンブランフィルターを、総好気性微生物数（total aerobic microbial count ; TAMC）測定用としてソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の表面に、総真菌数（total combined yeasts/moulds count ; TYMC）測定用としてサブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す。表 4.05-I-1 に示した条件で平板を培養後、集落数を測定する。

4.5.4.2. カンテン平板法

カンテン平板法は、各培地に対して少なくとも 2 枚の平板を用いて実施し、結果はそれぞれの平板の測定菌数の平均値を用いる。

4.5.4.2.1. カンテン平板混釈法

直径 9 cm のペトリ皿を使用する場合、4.5.1. ~ 4.5.3.の記載どおりに調製した試料を 1 mL 分注する。これにあらかじめ 45°C 以下に保温した 15 ~ 20 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はサブロー・ブド

ウ糖カンテン培地で混和する。より大きなペトリ皿を用いる場合は、それに応じてカンテン培地量を増加する。表 4.05-I-1 に挙げた微生物ごとに少なくとも 2 枚のペトリ皿を用いる。

表 4.05-I-1 に示した条件で平板培地を培養する。培地ごとに菌数の算術平均をとり、集落数を算出する。

4.5.4.2.2. カンテン平板表面塗抹法

直径 9 cm のペトリ皿を使用する場合は、15 ~ 20 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はサブロー・ブドウ糖カンテン培地を約 45°C で加えて固化させ、例えば、層流式キャビネット又は恒温器の中で平板培地の表面を乾燥させる。より大きなペトリ皿を用いる場合は、それに応じてカンテン培地量を増加する。表 4.05-I-1 に挙げた微生物ごとに少なくとも 2 枚のペトリ皿を用いる。4.5.1. ~ 4.5.3. の記載どおりに試料を調製し、その 0.1 mL 以上を正確に測定して培地表面全体に広げる。4.5.4.2.1. の規定どおりに培養し、測定する。

4.5.4.3. 最確数(MPN)法

MPN 法の精度及び正確さは、メンブランフィルター法又はカンテン平板法よりも劣っている。特にかびの測定に対しては信頼性が低い。これらの理由のために、MPN 法は他に利用できる方法がない状況下での TAMC の測定に用いられる。本法を適用する場合は、以下のように行う。

4.5.1. ~ 4.5.3. の記載どおりに、製品の少なくとも 3 連続の 10 倍段階希釈系列を調製する。各希釈段階からそれぞれ 1 g 又は 1 mL ずつをとり、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地が 9 ~ 10 mL 入っている 3 本の試験管にそれぞれ接種する。必要ならば、ポリソルベート 80 のような界面活性剤、又は抗菌剤の不活化剤を培地に添加することができる。したがって、3 段階の希釈系列を調製した場合には、9 本の試験管に接種することになる。

全ての試験管を 30 ~ 35°C で 3 日間を超えない期間培養する。被験製品の性質によって結果の判定が困難あるいは不確かな場合は、同じ培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地に移植後、同じ温度で 1 ~ 2 日間培養し、これらの結果を用いる。表 4.05-I-3 から被験製品 1 g 又は 1 mL 当たりの微生物の最確数を求める。

4.6. 結果及び判定

メンブランフィルター法又はカンテン平板法の適合性を確認するとき、いずれの試験菌の平均計測値も、4.5.2. で定義した製品が存在しない対照の計測値の 1/2 ~ 2 倍以内でなければならない。MPN 法の適合性を確認するとき、試験菌の計測値は、対照から得られる結果の 95% 信頼限界の範囲内でなければならない。

記述したいずれの方法においても、試験菌のうち 1 菌種でも上記の基準に満たない場合には、基準に最も近くなる方法と試験条件で製品を試験する。

5. 製品の試験

5.1. 試験量

別に規定するもののほか、上記の注意を払って採取した被験製品の 10 g 又は 10 mL を用いる。エアゾール形式の液体又は固体は、10 容器を抜き取る。経皮吸収パッチは、10 パッチを抜き取る。

次のような条件で処方される原薬は、試験量を減らすことができる：投与単位（例えば錠剤、カプセル剤、注射剤）当たりの原薬量が 1 mg 以下、又は 1 g あるいは 1 mL（投与単位では表示されていない製剤）当たりの原薬量が 1 mg 未満。これらの場合、被験試料の採取量は、製品の 10 投与単位又は 10 g あるいは 10 mL に存在する量よりも少なくないようにする。

原薬として使用される物質では、試料の量に限りがあるか又はロットサイズが極度に小さい（すなわち、1000 mL 又は 1000 g 未満）場合には、より小さな量が規定されているか又は正当な理由がない限り、試験量をロットの 1% とする。

ロットを構成しているものの総数が 200 未満（例えば臨床試験で使われる試料）のような製品では、試験量は 2 単位に、又は数量が 100 未満の場合は 1 単位に減らすことができる。

バルク原料又は製剤の収納容器から、無作為に試料を選び出す。必要量の試料を得るために、十分な数の容器の内容物を混合する。

5.2. 製品の試験

5.2.1. メンブランフィルター法

フィルターを培地に移すことができるように設計されているろ過装置を用いる。4. に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製し、適量を 2 枚のメンブランフィルターの各々に移して直ちにろ過する。適合性が確認された方法に従って、各フィルターを洗浄する。

1 枚のメンブランフィルターは、TAMC の測定のためにソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の表面に、他の 1 枚のメンブランフィルターは、TYMC の測定のためにサブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を 30 ~ 35°C で 3 ~ 5 日間、サブロー・ブドウ糖カンテン培地を 20 ~ 25°C で 5 ~ 7 日間培養する。製品 1 g 又は 1 mL 当たりの集落数を算出する。

経皮吸収パッチを試験するときは、4.5.1に記載されている調製液の10%量ずつを2枚の滅菌メンブランフィルターで別々にろ過する。1枚のメンブランフィルターはTAMCの計測のためにソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地に移し、他のメンブランフィルターはTYMCの計測のためにサブロー・ブドウ糖カンテン培地に移す。

5.2.2. カンテン平板法

5.2.2.1. カンテン平板混釈法

4. に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製する。それぞれの培地に対し、希釈段階ごとに少なくとも2枚のペトリ皿を用意する。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地は30～35℃で3～5日間培養し、サブロー・ブドウ糖カンテン培地は20～25℃で5～7日間培養する。集落数がTAMCでは250未満、TYMCでは50未満で、かつ最も多い集落数を示す希釈度のカンテン培地を選び出す。培地ごとに菌数の算術平均をとり、製品1g又は1mL当たりの集落数を算出する。

5.2.2.2. カンテン平板表面塗抹法

4. に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製する。それぞれの培地に対し、希釈段階ごとに少なくとも2枚のペトリ皿を用意する。培養及び集落数の算出は、カンテン平板混釈法に記載されているとおりに行う。

5.2.3. 最確数法

4. に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製し、希釈する。全ての試験管を30～35℃で3～5日間培養する。必要ならば、適合性が示された方法で移植培養する。希釈段階ごとに、微生物の増殖が認められる試験管数を記録する。表4.05-I-3から被験製品1g又は1mL当たりの微生物の最確数を求める。

5.3. 結果の判定

ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を使用して測定される集落数を、総好気性微生物数(TAMC)とする。この培地上に真菌の集落が検出されても、TAMCとして測定する。サブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用して測定される集落数を、総真菌数(TYMC)とする。この培地上に細菌の集落が検出されても、TYMCとして測定する。細菌の発育のためにTYMCが許容基準を超えることが予測される場合には、抗生物質を含むサブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用しても良い。MPN法で計測を行う場合は、算出値はTAMCとする。

微生物学的品質の許容基準が規定されているときは、以下のように判定する。

- 10^1 CFU:最大許容数=20,
- 10^2 CFU:最大許容数=200,
- 10^3 CFU:最大許容数=2000, 以下同様。

推奨される溶液及び培地は、「特定微生物試験」に記載されている。

表 4.05-I-3 微生物の最確数

各セットにおける微生物増殖を示す試験管数の組み合わせ 試験管当たりの製品の g 又は mL 数			製品 1 g 又は 1 mL 当たりの最確数	95%信頼限界
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	<3	0 - 9.4
0	0	1	3	0.1 - 9.5
0	1	0	3	0.1 - 10
0	1	1	6.1	1.2 - 17
0	2	0	6.2	1.2 - 17
0	3	0	9.4	3.5 - 35
1	0	0	3.6	0.2 - 17
1	0	1	7.2	1.2 - 17
1	0	2	11	4 - 35
1	1	0	7.4	1.3 - 20
1	1	1	11	4 - 35
1	2	0	11	4 - 35
1	2	1	15	5 - 38
1	3	0	16	5 - 38
2	0	0	9.2	1.5 - 35
2	0	1	14	4 - 35
2	0	2	20	5 - 38
2	1	0	15	4 - 38
2	1	1	20	5 - 38
2	1	2	27	9 - 94
2	2	0	21	5 - 40
2	2	1	28	9 - 94
2	2	2	35	9 - 94
2	3	0	29	9 - 94
2	3	1	36	9 - 94
3	0	0	23	5 - 94
3	0	1	38	9 - 104
3	0	2	64	16 - 181
3	1	0	43	9 - 181
3	1	1	75	17 - 199
3	1	2	120	30 - 360
3	1	3	160	30 - 380
3	2	0	93	18 - 360
3	2	1	150	30 - 380
3	2	2	210	30 - 400
3	2	3	290	90 - 990
3	3	0	240	40 - 990
3	3	1	460	90 - 1980
3	3	2	1100	200 - 4000
3	3	3	>1100	

II. 非無菌製品の微生物学的試験: 特定微生物試験

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

1. 序文

本試験は、規定の条件下で検出可能な特定微生物が存在しないか、又はその存在が限られているかを判定する方法である。

本試験は、原料や製剤が既定の微生物学的品質規格に適合するか否かを判定することを主目的にしたものである。採取試料数も含めて指示通りに試験を実施し、結果を判定する。

局方試験法との同等性が示されている場合は、自動化法を含む別の微生物学的方法を用いてもよい。

2. 基本手順

試料の調製は、「生菌数試験」に記載されているとおりに行う。

被験製品が抗菌活性を有する場合は、「生菌数試験」に記載されているように可能な限りこの抗菌活性を除去又は中和する。

試料の調製に界面活性剤を使用する場合は、「生菌数試験」に記載されているように、微生物に対する毒性がないこと、及び用いる不活化剤との間に相互作用がないことを確認する。

3. 培地性能、試験の適合性及び陰性対照

被験製品存在下においても微生物を検出する能力があることを確認する。また、試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や製品の処方変更があった場合には、再度、適合性を確認する。

3.1. 試験菌の調製

試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用するか、又は次に示す手順で調製する。

なお、試験に用いる微生物は、最初のマスターシードロットからの継代数5回を超えないように、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を用いて管理する。

3.1.1. 好気性微生物

各細菌試験用菌株を、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中、又はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地上で、それぞれ 30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養する。カンジダ・アルビカンス用の試験菌株は、サブロー・ブドウ糖カンテン培地上、又はサブロー・ブドウ糖液体培地中で、それぞれ 20 ~ 25°C で 2 ~ 3 日間培養する。

Staphylococcus aureus (黄色ブドウ球菌) : 例えば, ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 又は NBRC 13276,

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌) : 例えば, ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 又は NBRC 13275,

Escherichia coli (大腸菌) : 例えば, ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 又は NBRC 3972,

Salmonella enterica subsp.*enterica* serovar Typhimurium (サルモネラ) : 例えば, ATCC 14028

又は代替として

Salmonella enterica subsp.*enterica* serovar Abony (サルモネラ) : 例えば, NBRC 100797, NCTC 6017 又は CIP 80.39,

Candida albicans (カンジダ・アルビカンス) : 例えば, ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 又は NBRC 1594

試験菌懸濁液の調製には、pH7.0 のペプトン・食塩緩衝液又は pH7.2 のリン酸緩衝液を用いる。懸濁液は 2 時間以内、又は 2 ~ 8°C に保存する場合は 24 時間以内に用いる。

3.1.2. クロストリジア

Clostridium sporogenes : 例えば ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) 又は ATCC 19404 (NCTC 532 又は CIP 79.3) を用いる。クロストリジアの試験菌株を強化クロストリジア培地中に接種し、30 ~ 35°C で 24 ~ 48 時間嫌気的条件下で培養する。*Cl. sporogenes* の栄養型細胞の新鮮懸濁液を調製して希釈する代わりに、芽胞懸濁液を接種菌液として使用できる。芽胞懸濁液は、保証された期間内は 2 ~ 8°C で保存できる。

3.2. 陰性対照

試験状態を確認するために、試料液の代わりに使用した希釈液を用いて陰性対照試験を実施する。微生物の発育があってはならない。微生物の発育が認められた場合には、原因調査が必要である。また、陰性対照試験は 4. に記載の製品の試験においても実施する。

3.3. 培地の性能試験

市販培地についてはバッチごとに試験する。また、乾燥培地又は成分から調製した培地については、調製バッチごとに試験する。

表 4.05-II-1 に記載したように、関連培地について適切な特性を確認する。

発育促進特性試験，液体培地：適切な培地の一部に適切な少数の微生物（100 CFU 以下）を接種する。規定された温度で培養し，培養時間は，試験法で規定されている培養期間の最短時間以内とする。有効性が確認された培地バッチで，以前に得られた発育と同等の発育が認められる。

発育促進特性試験，固体培地：各平板培地に適切な少数の微生物（100 CFU 以下）を接種し，カンテン平板表面塗抹法で行う。規定された温度で培養し，培養時間は，試験法で規定されている培養期間の最短時間以内とする。有効性が確認された培地バッチで，以前に得られた発育と同等の発育が認められる。

選択特性試験，液体又は固体培地：適切な培地に適切な微生物を少なくとも 100 CFU 接種する。規定された温度で培養し，培養時間は試験法で規定されている培養期間の最長時間以上とする。試験菌の発育を認めない。

鑑別特性試験：各平板培地に適切な少数の微生物（100 CFU 以下）を接種し，カンテン平板表面塗抹法で行う。規定された温度で培養し，培養時間は試験法で規定されている培養期間の範囲内とする。集落の形状と鑑別反応は，有効性が確認された培地バッチで以前に得られたものと同等である。

3.4. 試験法の適合性

被験製品ごとに，4. の関連段落に記載されたとおりに試料調製する。規定の増菌培地に混合する時に各試験菌を添加する。試験菌は個別に接種する。また，接種した試験液中の菌数が 100 CFU 以下相当となるような数の微生物を使用する。

4. の関連段落に記載されたとおりに試験する。ただし，規定された最短培養期間で試験する。

特定微生物は，4. に記載された鑑別反応と共に検出されなければならない。

製品に抗菌活性が認められる場合には，試験方法の変更が必要になる（「生菌数試験」の 4.5.3. を参照）。

ある特定の製品において，規定された方法ではその微生物に対する抗菌活性を中和することができない場合には，抑制された微生物はその製品中には存在しないと見なしてよい。

4. 製品の試験

4.1. 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌

4.1.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 1 g 以上採り，その 10 倍希釈液を「生菌数試験」に記載したように調製するが，希釈液としてはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用い，混合後，菌を蘇生させるために 20 ～ 25℃で培養する。ただし，増菌を促すほどの時間であってはならない（通例 2 時間であり，5 時間を超えないこと）。

4.1.2. 否定試験

他に規定されない限り，4.1.1. で調製した製品 1 g に相当する量をモーゼル腸内細菌増菌ブイオン培地に接種する。30 ～ 35℃で 24 ～ 48 時間培養後，バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地に移植し，30 ～ 35℃で 18 ～ 24 時間培養する。

集落の発育がみられない場合は，その製品は本試験に適合する。

4.1.3. 定量試験

4.1.3.1. 選択培養

4.1.1. に記載されている調製液及び/又はその希釈液であって，それぞれ被験製品の 0.1 g, 0.01 g, 0.001 g (又は 0.1 mL, 0.01 mL, 0.001 mL) 相当量を，適量のモーゼル腸内細菌増菌ブイオン培地に接種する。30 ～ 35℃で 24 ～ 48 時間培養後，バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地に各培養液を移植し，30 ～ 35℃で 18 ～ 24 時間培養する。

4.1.3.2. 判定

集落の発育が認められた場合は，陽性と判定する。陽性結果を与える製品の最小量と陰性結果を与える最大量に注目し，表 4.05-II-2 から細菌の推定数を求める。

4.2. 大腸菌

4.2.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 1 g 以上採り，「生菌数試験」に記載したように調製した 10 倍希釈液の 10 mL，あるいは 1 g 又は 1 mL 相当量を（3.4. で決定した）適切な量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種し，混合後，30 ～ 35℃で 18～24 時間培養する。

4.2.2. 選択培養

容器を振り，ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の 1 mL をマッコンキー液体培地 100 mL に接種する。42 ～ 44℃で 24 ～ 48 時間培養後，マッコンキーカンテン培地に移植し，30 ～ 35℃で 18 ～ 72 時間培養する。

4.2.3. 判定

集落の発育が認められた場合は陽性を疑い、同定試験により確認する。

集落が存在しないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

4.3. サルモネラ

4.3.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 10 g 又は 10 mL 採り、(3.4.で決定した) 適量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種し、混合後、30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養する。

4.3.2. 選択培養

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 0.1 mL をラポポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地 10 mL に接種する。30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養後、XLD カンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 48 時間培養する。

4.3.3 判定

十分に発育した赤色集落が認められた場合は、中心部の黒点の有無に関わらず陽性を疑い、同定試験により確認する。

記載されている種類の集落が存在しないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

4.4. 緑膿菌

4.4.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 1 g 以上採り、「生菌数試験」に記載したように調製した 10 倍希釈液の 10 mL、あるいは 1 g 又は 1 mL 相当量を (3.4.で決定した) 適量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種して混合し、30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養する。経皮吸収パッチを試験するときは、「生菌数試験 (4.5.1.)」に記載したように調製し、1パッチ相当量を滅菌メンブランフィルターでろ過し、そのメンブランフィルターを 100 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中に投入する。

4.4.2 選択培養

セトリミドカンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 72 時間培養する。

4.4.3. 判定

集落の発育が認められた場合は陽性を疑い、同定試験により確認する。

集落が存在しないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

4.5. 黄色ブドウ球菌

4.5.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 1 g 以上採り、「生菌数試験」に記載したように調製した 10 倍希釈液の 10 mL、あるいは 1 g 又は 1 mL 相当量を (3.4.で決定した) 適量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種して混合し、30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養する。経皮吸収パッチを試験するときは、「生菌数試験 (4.5.1.)」に記載したように調製した 1パッチ相当量を滅菌メンブランフィルターでろ過し、そのメンブランフィルターを 100 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中に投入する。

4.5.2. 選択培養

マンニット・食塩カンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 72 時間培養する。

4.5.3. 判定

黄色の帯に囲まれた黄色又は白色集落の発育が認められた場合は陽性を疑い、同定試験により確認する。

記載されている種類の集落が存在しないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

4.6. クロストリジア

4.6.1. 試料調製及び加熱処理

被験製品を 2 g 又は 2 mL 以上採り、「生菌数試験」に記載したように 10 倍希釈試料液 (最低 20 mL 以上) を調製する。調製した試料液を少なくとも 10 mL ずつ 2 本の容器に分注し、

1 本は 80°C で 10 分間加熱後、速やかに冷却し、他の 1 本は加熱しない。

4.6.2. 選択培養

それぞれから 10 mL あるいは被験製品 1 g 又は 1 mL 相当量を (3.4.で決定した) 適量の強化クロストリジア培地に接種し、嫌気的条件下で 30 ~ 35°C で 48 時間培養する。培養後、コロンビアカンテン培地に各容器から移植し、嫌気的条件下で 30 ~ 35°C で 48~72 時間培養する。

4.6.3. 判定

カタラーゼ反応陰性の桿菌 (芽胞を有するか又は有さない) の嫌氣的発育が認められた場合は、陽性が示唆される。この場合は同定試験を行い確認する。

コロンビアカンテン培地に定型集落の発育がみられないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

4.7. カンジダ・アルビカンス

4.7.1. 試料調製及び前培養

被験製品を「生菌数試験」に記載したように調製する。その 10 mL, あるいは 1 g 又は 1 mL 以上に相当する量を 100 mL のサブロー・ブドウ糖液体培地に接種して混合し、30 ~ 35°C で 3 ~ 5 日間培養する。

4.7.2. 選択培養

サブロー・ブドウ糖カンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 24 ~ 48 時間培養する。

4.7.3. 判定

白色集落の発育が認められた場合は陽性を疑い、同定試験により確認する。

そのような集落が存在しないか、又は同定試験において陰性と判定された場合には、その製品は本試験に適合する。

なお、以下のセクションは情報提供を目的に記載する。

5. 推奨される溶液及び培地

以下の溶液及び培地は、薬局方の微生物試験で規定されている目的にかなったものである。適合性が確認されれば他の培地を用いてもよい。

保存緩衝液

リン酸二水素カリウム 34 g を 500 mL の水で溶解し、水酸化ナトリウム試液で pH7.0~7.4 に調整後、水を加えて 1000 mL とし、混合する。容器に分注して滅菌する。2 ~ 8°C で保存する。

リン酸緩衝液 pH7.2

水と保存緩衝液を混合 (800 : 1) して調製し、滅菌する。

ペプトン食塩緩衝液 pH7.0

リン酸二水素カリウム	3.6 g	
リン酸水素二ナトリウム二水和物	7.2 g	(リン酸塩 0.067mol に相当する)
塩化ナトリウム	4.3 g	
ペプトン (肉製又はカゼイン製)	1.0 g	
水	1000 mL	

確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0 g
ダイズ製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖一水和物	2.5 g
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 7.1 ~ 7.5 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0 g
ダイズ製ペプトン	5.0 g

塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 7.1 ~ 7.5 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ブドウ糖	40.0 g
ペプトン (肉製及びカゼイン製 1:1)	10.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 5.4 ~ 5.8 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

ポテト・デキストロースカンテン培地

ジャガイモ浸出液	200 g
ブドウ糖	20.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 5.4 ~ 5.8 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

サブロー・ブドウ糖液体培地

ブドウ糖	20.0 g
ペプトン (肉製及びカゼイン製 1:1)	10.0 g
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 5.4 ~ 5.8 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地

ゼラチン製ペプトン	10.0 g
ブドウ糖一水和物	5.0 g
乾燥ウシ胆汁	20.0 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	8.0 g
ブリリアントグリーン	15 mg
水	1000 mL

加熱後の pH が 25°C で 7.0 ~ 7.4 になるように pH を調整する。100°C で 30 分間加熱し、直ちに冷却する。

バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地

酵母エキス	3.0 g
ゼラチン製ペプトン	7.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ブドウ糖一水和物	10.0 g
カンテン	15.0 g
ニュートラルレッド	30 mg
クリスタルバイオレット	2 mg
水	1000 mL

加熱後の pH が 25°C で 7.2 ~ 7.6 になるように pH を調整する。煮沸するまで加熱する。オートクレーブで加熱してはならない。

マッコンキー液体培地

ゼラチン製ペプトン	20.0 g
乳糖一水和物	10.0 g
乾燥ウシ胆汁	5.0 g
プロモクレゾールパープル	10 mg
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 7.1 ~ 7.5 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

マッコンキーカンテン培地

ゼラチン製ペプトン	17.0 g
ペプトン (肉製及びカゼイン製)	3.0 g
乳糖一水和物	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
カンテン	13.5 g
ニュートラルレッド	30 mg
クリスタルバイオレット	1 mg
水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 6.9 ~ 7.3 になるように pH を調整する。絶えず振り混ぜながら 1 分間煮沸させてから、確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地

ダイズ製ペプトン	4.5 g
塩化マグネシウム六水和物	29.0 g
塩化ナトリウム	8.0 g
リン酸水素二カリウム	0.4 g
リン酸二水素カリウム	0.6 g
マラカイトグリーン	36 mg
水	1000 mL

若干加温しながら溶かし、115°C を超えない温度で、確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。加熱及び高圧蒸気滅菌後の pH が 25°C で 5.0 ~ 5.4 になるようにする。

XLD (キシロース・リジン・デソキシコール酸) カンテン培地

キシロース	3.5 g
L-リジン	5.0 g
乳糖一水和物	7.5 g
白糖	7.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
酵母エキス	3.0 g
フェノールレッド	80 mg
カンテン	13.5 g
デソキシコール酸ナトリウム	2.5 g
チオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸アンモニウム鉄(III)	0.8 g
水	1000 mL

加熱後の pH が 25°C で 7.2 ~ 7.6 になるように pH を調整する。煮沸するまで加熱し、50°C まで冷却してからペトリ皿に注ぎ込む。オートクレーブで加熱してはならない。

セトリミドカンテン培地

ゼラチン製ペプトン	20.0 g
塩化マグネシウム	1.4 g
硫酸カリウム	10.0 g
セトリミド	0.3 g
カンテン	13.6 g
水	1000 mL
グリセリン	10.0 mL

振り混ぜながら加熱して 1 分間煮沸する。滅菌後の pH が 25°C で 7.0 ~ 7.4 になるように pH を調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

マンニット・食塩カンテン培地

カゼイン製ペプトン	5.0 g
肉製ペプトン	5.0 g

牛肉エキス	1.0 g
D-マンニトール	10.0 g
塩化ナトリウム	75.0 g
カンテン	15.0 g
フェノールレッド	25 mg
水	1000 mL

振り混ぜながら加熱して1分間煮沸する。滅菌後のpHが25°Cで7.2～7.6になるようにpHを調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

強化クロストリジア培地

牛肉エキス	10.0 g
ペプトン	10.0 g
酵母エキス	3.0 g
溶性デンプン	1.0 g
ブドウ糖一水和物	5.0 g
システイン塩酸塩	0.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
酢酸ナトリウム	3.0 g
カンテン	0.5 g
水	1000 mL

カンテンを水和させ、絶えずかき混ぜながら煮沸するまで加熱して溶かす。必要ならば、滅菌後のpHが25°Cでおよそ6.6～7.0になるようにpHを調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

コロンビアカンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
肉浸出物のペプシン消化物	5.0 g
心筋浸出物のパンクレアチン消化物	3.0 g
酵母エキス	5.0 g
トウモロコシデンプン	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン (ゲル強度に従って)	10.0～15.0 g
水	1000 mL

カンテンを水和させ、絶えずかき混ぜながら煮沸するまで加熱して溶かす。必要ならば、滅菌後のpHが25°Cで7.1～7.5になるようにpHを調整する。確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。45～50°Cまで冷却後、必要に応じ、ゲンタマイシン塩基20mgに相当する量のゲンタマイシン硫酸塩(硫酸ゲンタマイシン)を加えてペトリ皿に注ぎ込む。

表 4.05-II-1 培地の発育促進、選択及び鑑別特性

培地	特性	試験菌株
胆汁酸抵抗性グラム陰性菌試験		
モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地	発育促進	<i>E.coli</i> <i>P.aeruginosa</i>
	選択	<i>S.aureus</i>
バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地	発育促進及び鑑別	<i>E.coli</i> 及び <i>P.aeruginosa</i>
大腸菌試験		
マッコンキー液体培地	発育促進	<i>E.coli</i>
	選択	<i>S.aureus</i>
マッコンキーカンテン培地	発育促進及び鑑別	<i>E.coli</i>
サルモネラ試験		
ラポポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地	発育促進	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 又は <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
	選択	<i>S.aureus</i>
XLD (キシロース・リジン・デソキシコール酸) カンテン培地	発育促進及び鑑別	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 又は <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
緑膿菌試験		
セトリミドカンテン培地	発育促進	<i>P.aeruginosa</i>
	選択	<i>E.coli</i>
黄色ブドウ球菌試験		
マンニット・食塩カンテン培地	発育促進及び鑑別	<i>S.aureus</i>
	選択	<i>E.coli</i>
クロストリジア試験		
強化クロストリジア培地	発育促進	<i>Cl.sporogenes</i>
コロンビアカンテン培地	発育促進	<i>Cl.sporogenes</i>
カンジダ・アルビカンス試験		
サブロー・ブドウ糖液体培地	発育促進	<i>C.albicans</i>
サブロー・ブドウ糖カンテン培地	発育促進及び鑑別	<i>C.albicans</i>

表 4.05-II-2 結果の判定

製品の各量に対する結果			製品 1 g 又は 1 mL 当たりの細菌の推定数
0.1 g 又は 0.1 mL	0.01 g 又は 0.01 mL	0.001 g 又は 0.001 mL	
+	+	+	10 ³ より大きい
+	+	-	10 ³ より小さく, 10 ² より大きい
+	-	-	10 ² より小さく, 10 より大きい
-	-	-	10 より小さい

4.06 無菌試験法

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

無菌試験法は、無菌であることが求められている原薬又は製剤に適用される。本試験に適合する結果が得られても、それは単に本試験条件下で調べた検体中に汚染微生物が検出されなかったことを示しているだけである。

1. 微生物汚染に対する予防措置

無菌試験は無菌条件下で行われる。このため、試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない。汚染を避けるためにとられる予防措置は、本試験で検出されるべきいかなる微生物にも影響を与えてはならない。作業区域の適切な環境モニタリング及び適切な汚染防止措置の実施によって、本試験の実施状態が適切であることを定期的に監視する。

2. 培地及び培養温度

2.1. 一般要件

培地は、次のように調製するか、又は培地性能試験に適合する場合は同等の市販培地も使用できる。無菌試験用として適している培地は次のとおりである。液状チオグリコール酸培地は、嫌気性細菌の培養を主目的としているが、好気性細菌も検出できる。ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は、真菌及び好気性細菌の培養に適している。

2.2. 液状チオグリコール酸培地

液状チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
カンテン	0.75g
塩化ナトリウム	2.5g
ブドウ糖（一水和物/無水）	5.5/5.0g
酵母エキス（水溶性）	5.0g
カゼイン製ペプトン	15.0g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5g
又はチオグリコール酸	0.3mL
レザズリン溶液（1→1000）, 用時調製	1.0mL
水	1000mL

（滅菌後のpH7.1±0.2）

L-シスチン、カンテン、塩化ナトリウム、ブドウ糖、酵母エキス（水溶性）及びカゼイン製ペプトンを水と混合し、加熱して溶かした後、チオグリコール酸ナトリウム又はチオグリコール酸を加えて溶かし、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整する。必要ならば、溶液を煮沸しないように加熱し、温かいうちに湿らせたろ紙を用いてろ過する。レザズリン溶液（1→1000）を加え、よく混和した後、培養終了時に培地の淡赤色部分が上部1/2以下にとどまるような表面積と深さの比をもつ容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた条件下で滅菌する。培地を保存する必要がある場合にはあらかじめ気密容器に入れて滅菌し、2～25℃で保存する。培地がその上部1/3を超えて淡赤色となった場合は、その淡赤色が消失するまで培地容器を水浴中又は流通蒸気中で加熱し、容器中への汚染空気の侵入を防ぎながら急速に冷却することで1回だけ使用できる。バリデートされた期間を超えて、保存した培地を使用してはならない。

液状チオグリコール酸培地は、30～35℃で培養する。メンブランフィルター法を適用できない水銀系の防腐剤を含む製品に対しては、培地性能試験に適合するならば、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の代わりに液状チオグリコール酸培地を用い、20～25℃で培養することができる。

別に規定する場合は、次のように調製した変法チオグリコール酸培地を用いることができる。カンテンとレザズリン溶液（1→1000）を除き、液状チオグリコール酸培地と同じ成分で調製し、バリデートされた条件下で滅菌する。滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整し、使用直前に水浴中で加熱する。変法チオグリコール酸培地は嫌気条件下で30～35℃で培養する。

2.3. ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0g
ダイズ製ペプトン	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸水素二カリウム	2.5g
ブドウ糖（一水和物/無水）	2.5/2.3g
水	1000mL

（滅菌後のpH7.3±0.2）

全成分を水に溶かし、若干加温して溶液にする。溶液を室温に冷却し、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.3±0.2になるように調整する。必要ならばろ過をし、適当な容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた条件下で滅菌する。直ちに使用しない場合は、あらかじめ気密容器に入れて滅菌し、2～25℃で保存する。バリデートされた期間を超えて保存した培地を使用してはならない。

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は、20～25℃で培養する。

3. 培地の適合性

培地は、次の試験に適合すること。この試験は、製品の無菌試験実施前に、又は並行して行うことができる。

無菌性

培地の一部を14日間培養するとき、微生物の増殖を認めない。

好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験

市販液体培地及び粉末培地又は各成分から調製した培地の各バッチについて試験を行うこと。適切な微生物株を表4.06-1に示す。

液状チオグリコール酸培地には、次に示す少数（100CFU以下）の微生物を接種する。それぞれの微生物に対しては別々の培地容器を用いる。

Clostridium sporogenes

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地には、次に示す少数（100CFU以下）の微生物を接種する。それぞれの微生物に対しては別々の培地容器を用いる。

Aspergillus niger

Bacillus subtilis

Candida albicans

細菌の場合は3日間、真菌の場合は5日間をそれぞれ超えないで培養する。

接種菌の継代数は、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を採用することにより、マスターシードロットから5代を超えないようにする。

微生物の増殖が肉眼で明らかに観察された場合には、当該培地は基準に適合している。

表4.06-1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株

好気性細菌	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NBRC13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118
嫌気性細菌	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, NBRC 14293, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437
真菌	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NBRC 1594, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404, NBRC 9455, IP 1431.83, IMI 149007

4. 手法の適合性試験

次に述べる変更点以外は、「5. 製品の無菌試験」の項に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。
メンブランフィルター法

試験に供された容器の内容物をろ過した後、最終回の洗浄液に試験用菌株を100CFU以下加えたものをろ過する。

直接法

試験に供された容器の内容物を培地に加えた後、試験用菌株100CFU以下をその培地に接種する。

どちらの接種方法においても、「好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験」の項で示した菌株を用いる。陽性対照として培地性能試験を行う。培地を含むすべての容器は規定の温度で最長5日間培養する。

培養後、陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られれば、被検製品は本試験条件下で抗菌活性を持たないか、又は抗菌活性が十分に除去されたものとみなす。当該手法は適切であり、試験条件を変更する必要はない。

被検製品の存在下で陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られなければ、被検製品は当該試験条件下では十分除去できない抗菌活性を有している。この場合、抗菌活性を除去するために条件を変えて手法の適合性試験を繰り返す。

手法の適合性試験を行うのは、新しい製品に無菌試験を行う場合及び試験の実施条件に変更があった場合である。

手法の適合性試験は被検製品の無菌試験と同時に行うこともできる。

5. 製品の無菌試験

5.1. 一般要件

試験はメンブランフィルター法又は直接法によって行われる。試験には適切な陰性対照を置くこと。メンブランフィルター法は、ろ過可能な製品に適用する。例えば、ろ過可能な水性、アルコール性又は油性の製品及び本試験条件下で抗菌力を有しない水性又は油性の溶剤に混和若しくは溶解する製品に対して用いる。

5.2. メンブランフィルター法

メンブランフィルターは、微生物の捕集効率が確立されている公称孔径が $0.45\mu\text{m}$ 以下のものを用いる。例えば、水溶性、油性又は低濃度のアルコール性溶液にはセルロースナイトレートフィルターを用い、高濃度のアルコール性溶液にはセルロースアセテートフィルターを用いる。抗生物質のような医薬品には、別途適切なフィルターが必要な場合もある。

次に示す手法は、直径約50mmのメンブランフィルターの使用を想定している。もし異なる直径のフィルターを用いる場合には、希釈及び洗浄液の容量はそれに応じて調製すべきである。ろ過器やメンブランフィルターは適切な方法で滅菌する。ろ過装置は、無菌条件下で被検溶液を導入・ろ過でき、メンブランフィルターの無菌的取りはずしと培地への移植ができるか、又はろ過器そのものに培地を加えて培養するのに適するように設計されていなければならない。

水性液剤

1g/Lの肉製又はカゼイン製ペプトン溶液(pH7.1±0.2)のような無菌希釈液の少量をろ過器中のメンブランフィルター上に注ぎろ過する。希釈液には、例えば抗生物質が試験対象の場合には、適切な中和剤や不活化剤を加えることができる。

試験すべき容器の内容物を必要なら手法の適合性試験で選んだ無菌希釈液の量で希釈後、表4.06-2に示した量より少なくならないように、1枚又は複数のメンブランフィルター上に移し、直ちにろ過する。当該製品が抗菌活性を有している場合には、手法の適合性試験で用いた無菌希釈液の量でメンブランフィルターを3回以上洗浄する。手法の適合性試験において抗菌活性を十分に除去できないことが立証されていても、メンブランフィルター当たり100mLの洗浄液で5回を超えては洗浄しないこと。メンブランフィルターをろ過器から外し、半分に切断するか、あらかじめ試料溶液を二等分し、それぞれにつき同一のろ過操作を行うことによって得られた2枚のメンブランフィルターをそれぞれの培地に入れる。各培地の量は、手法の適合性試験で確立した量を用いる。又はメンブランフィルターを装着したろ過器内に試料溶液を二等分ろ過後、それぞれの培地を加える。培地を14日間以上培養する。

水溶性固形剤

各培地に対し、表4.06-2に規定する量以上を用いる。添付の溶剤、注射用水、生理食塩液又は1g/L肉製若しくはカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な溶剤に溶解し、選んだ溶剤に適したメンブランフィルターを用いて「水性液剤」の項に示したように試験を行う。

油及び油性液剤

各培地に対し、表4.06-2に規定する量以上を用いる。粘度の低い油及び油性液剤は、希釈せずに乾いたメンブランフィルターでろ過する。粘稠性の油は、当該試験条件下で抗菌性がないことが立証されたミリスチン酸イソプロピルのような適切な無菌溶剤で希釈できる。油が自重によりメンブランフィルターに浸透した後、徐々に加圧又は吸引することによってろ過する。手法の適合性試験で適切であることが証明されている濃度の適切な乳化剤（例えば10g/Lポリソルベート80）を含む1g/L肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌溶液を用い、メンブランフィルター当たり約100mLずつで少なくとも3回洗浄する。「水性液剤」の項に示したようにメンブランフィルターを培地に移す、又はろ過器に培地を加え、同じ温度で同じ期間培養する。

軟膏剤及びクリーム

各培地に対し、表4.06-2に規定する量以上を用いる。脂肪基剤の軟膏剤や油中水型の乳剤は上述のようにミリスチン酸イソプロピルで1%に希釈する。必要ならば40℃以下で加温する。例外的な場合で44℃以下までの加温が必要なこともある。できるだけ迅速にろ過した後、「油及び油性液剤」の項に示したように操作を進める。

表4.06-2 各培地当たりの最少試料採取量

容器の内容量	他に規定されていない限りそれぞれの培地に接種する最少量
液剤	
1 mL 未満	全量
1 mL 以上 40 mL 以下	半量、ただし1 mL 以上
40 mL 超 100 mL 以下	20 mL
100 mL 超	10%、ただし20 mL 以上
抗生物質の液剤	1 mL
懸濁又は乳化して用いる非水溶性医薬品、クリーム又は軟膏剤	200 mg 以上
固形剤	
50 mg 未満	全量
50 mg 以上 300 mg 未満	半量、ただし50 mg 以上
300 mg 以上 5 g 以下	150 mg
5 g 超	500 mg

5.3. 直接法

別に規定するほか、表4.06-2に示す量の製品を、その容量が培地容量の10%を超えないように培地に直接接種する。被検製品が抗菌活性を有する場合は、適切な中和剤で中和した後に、又は十分な量の培地で希釈することによって試験を行う。大容量の製品を使用する必要があるとき、接種による希釈影響を考慮に入れて高濃度の培地を用いる方が好ましい場合もある。適切な場合は、高濃度培地を容器内の製品に直接加えることも可能である。

油性液剤

手法の適合性試験において適切であることが証明された適切な乳化剤を適切な濃度に加えた（例えば10g/Lポリソルベート80）培地を用いる。

軟膏剤及びクリーム

1g/L肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌希釈液中で、選択された乳化剤で乳化することにより約1:10に希釈する。この希釈物を乳化剤を含まない培地に移植する。

接種した培地は14日間以上培養する。培養を培養期間中に数回観察する。油性製品を含む培養は毎日穏やかに振る。ただし、嫌気性菌の検出のために液状チオグリコール酸培地を用いている場合は、嫌気条件を維持するために振とうや混合は最小限に保つ。

6. 観察と結果の判定

培養期間中及び最終日に、培地に肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べる。被検材料が培地を混濁させ、微生物増殖の有無を肉眼的に容易に判定できない場合には、培養開始から14日後に当該培地の一部（1mL以上）を同じ培地の新たな容器に移し、元の培地と移植した培地の両方を4日間以上培養する。

微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。微生物の増殖が観察された場合は、当該被検製品に無関係な原因により試験が無効であったことを明確に証明できなければ、被検製品は無菌試験に適合しない。以下の条件のうち一つ以上を満たした場合のみ当該試験は無効と考えられる。

- a) 無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータに問題が認められた場合
- b) 無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、問題が認められた場合
- c) 陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合

d) 当該無菌試験から分離された微生物の同定後、この菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料及び手技又はそのいずれかに問題があると明らかに判断される場合

試験が無効であることが判明したら、初回試験と同じ数の容器を用いて再試験を行う。再試験において微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。再試験において微生物の増殖が観察された場合には、被検製品は無菌試験に適合しない。

7. 無菌試験への適合が要求される注射剤及び眼軟膏剤、点眼剤等の非注射剤への試験の適用

メンブランフィルター法を用いる場合は、可能ならいつでも容器内の全量を用いる。ただし、表4.06-2に示す量以上を用いる。必要ならば1g/L肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌溶液で約100mLになるよう希釈する。

直接法を用いる場合は、他に規定されていなければ表4.06-2に示す量を用いる。被検製品の同じ試料について細菌及び真菌に対する無菌試験を行う。1容器中の容量が両試験を行うのに不十分な場合は、異なる培地に接種するのに2容器以上の内容物を用いる。

8. 最少供試個数

最少供試個数は、ロット当たりの製造個数に応じて、表4.06-3に示す個数を用いる。

表4.06-3 最少供試個数

ロット当たりの製造個数*	他に規定されていない限り、それぞれの培地当たりの最少試験個数**
注射剤 100 容器以下 101 容器以上 500 容器以下 501 容器以上	10%又は 4 容器のうち多い方 10 容器 2%又は 20 容器（大容量製剤の場合は、10 容器）のうち少ない方
眼軟膏剤、点眼剤等の非注射剤 200 容器以下 201 容器以上 単回使用製品の場合は、上欄の注射剤についての規定を適用する	5%又は 2 容器のうち多い方 10 容器
固形バルク製品 4 容器以下 5 容器以上 50 容器以下 51 容器以上	各容器 20%又は 4 容器のうち多い方 2%又は 10 容器のうち多い方

* ロット当たりの製造個数が不明の場合には、本欄に示した最大数を用いること。

** 1容器の内容量が二つの培地に接種するのに十分な場合は、本欄は両培地合わせて必要な供試容器数を示す。

6.09 崩壊試験法

装置の項の補助板を次のように改める。

装置

略

補助盤 補助盤は、各条にその使用が規定されている場合にのみ、各ガラス管に入れて使用できる。補助盤は、高さ 9.5 ± 0.15 mm、直径 20.7 ± 0.15 mm の円柱状で、比重 $1.18 \sim 1.20$ の透明なプラスチックからなる。補助盤には、盤の上下を垂直に貫く直径 2 ± 0.1 mm の孔が五つ平行に開いており、一つは補助盤の中心に、他の四つは中心から 6 ± 0.2 mm の距離にそれぞれ等間隔に開いている。補助盤の側面には、盤面とほぼ直角に、同一の台形状の切り込みが4つ等間隔にある。台形は対称形で、上下の平行線は、中心軸から6 mmにある隣接した2つの孔を結ぶ線と平行に位置している。台形の平行線の下線部は長さ 1.6 ± 0.1 mm で円周部から深さ $1.5 \sim 1.8$ mm の位置にあり、上線部は長さ 9.4 ± 0.2 mm で深さ 2.6 ± 0.1 mm の位置にある。補助盤は図 6.09-1 の規格に適合するもので、表面はすべて滑らかである。補助盤の使用が規定されている場合は、それぞれのガラス管に1個の補助盤を入れ、操作法に従い試験する。なお、崩壊を自動的に検出する目的で、加工した特殊な補助盤を用いる場合、その補助盤の比重、サイズは規格に適合するものでなければならない。また、それが使用できるのは各条で規定されている場合に限られる。

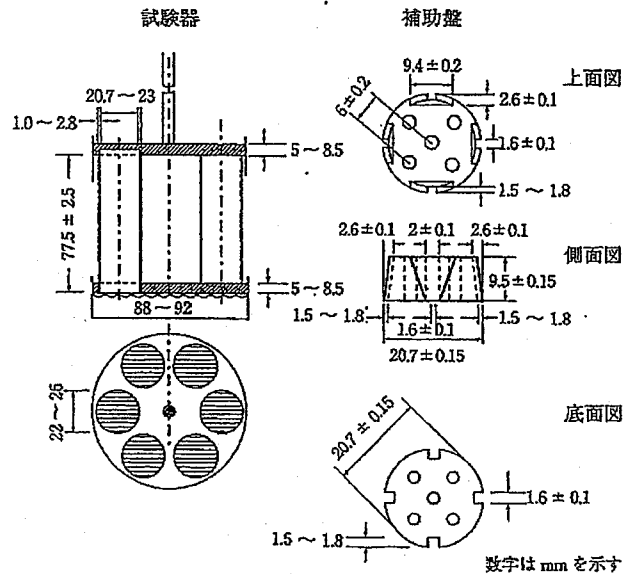


図 6.09-1

6.10 溶出試験法

操作の項の即放性製剤の試験液を次のように改める。

操 作

回転バスケット法及びパドル法

即放性製剤

操作：規定された容器に規定された容量(±1%)の試験液を入れ、装置にセットする。試験液を $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保ち、温度計を取り除く。試料の表面に気泡が付かないように注意しながら各容器に試料を入れ、直ちに規定された回転速度で装置を作動させる。規定された間隔で又は規定された時間に、試験液の上面と回転バスケット又はパドルの攪拌翼の上面との中間で容器壁から10 mm 以上離れた位置から、試験液を採取する。(注：複数回の試験液の採取が規定されている試験では、採取された量と等しい容量の 37°C の試験液を補充するか又は試験液の補充が必要ない場合には計算するとき容量変化を補正する。試験中、容器にはふたをし、適度な間隔で容器内の試験液の温度を確認する。)指示された分析法を用いて溶出した有効成分量を測定する³。他の試料についても同様の操作を行う。

試験液の採取が自動化された装置を用いるか若しくは装置に手を加えて変更する場合には、それらの装置が一般試験法に示されている標準的な装置を用いて得た結果と同等の結果が得られることを確認しなければならない。

試験液：適切な試験液を用いる。規定された液量は、 $20 \sim 25^\circ\text{C}$ での計量値に相当する。試験液が緩衝液の場合、pHを規定値の±0.05以内となるように調整する。(注：試験液に溶存している気体は気泡の原因となることがあり、試験結果に影響を与えることがある。溶存している気体が溶出試験結果に影響を及ぼす場合には、試験の前に脱気する⁴。)

試験時間：1 時点での測定が規定されているときは、規定された溶出率に達した場合には、その時間より早く試験を終了することができる。それ以外では、規定された時間の±2% 以内で試験液を採取する。