

参 考

第十五改正日本薬局方 第一追補

(平成 19 年 9 月 28 日厚生労働省告示第 316 号)

4.05 微生物限度試験法

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、好气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. 培地性能及び測定法の適合性

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、pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH 7.2 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 °C に保存する場合は 24 時間以内を用いる。*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 °C で保存できる。

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。

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 pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH 7.2 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、pH 6 ~ 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 pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH 7.2 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、pH 6 ~ 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ンプロピルに溶解するか、又は、必要ならば 40 °C 以下 (例外的な場合でも 45 °C 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イの上に置く。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。

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あなければならない。

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. カンテン平板混積法

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 °C 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 °C 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 1 g 又は 1 mL 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、カンテン平板混積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 °C 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 1 g 又は 1 mL 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、以下のよう判定する。

- 10¹ CFU: 最大許容数 = 20,
- 10² CFU: 最大許容数 = 200,
- 10³ 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。

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. 培地の性能試験及び試験の適合性

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、pH 7.0 のペプトン・食塩緩衝液又は pH 7.2 のリン酸緩衝液を用いる。懸濁液は 2 時間以内、又は 2 ~ 8℃ 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℃ 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℃ 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。微生物の発育があつてはならない。

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つてはならない (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つて、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 をラバポート・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「生菌数試験」に記載したように調製する。

被験製品 1 g 又は 1 mL 以上に相当する量を 2 本等しく採る。そのうちの 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 1 g 又は 1 mL 相当量を採って、強化クロストリジア培地 100 mL が入っている 2 個の容器 (38 mm × 200 mm) 又は他の容器に移す。嫌氣的条件下で 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試験管から移植し、嫌氣的条件下で 30 ~ 35 °C で 48 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しない) の嫌氣的発育が認められた場合は陽性と判定する。

コロンビアカンテン培地に微生物の嫌氣的発育がみられないか、又はカタラーゼ試験が陽性ならば、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。同様の発育促進及び選択特性があれば、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 pH 7.0 ~ 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 pH 7.2

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 pH 7.0

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 (リン酸塩 0.067 mol に相当する)	7.2 g
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
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压蒸気滅菌する。	
ラバポート・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压蒸気滅菌する。加熱及び高压蒸気滅菌後の 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ まで冷却後、必要に応じ、ゲンタマイシン塩基 20 mg 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 4.05-1-1 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 483又はNBRC 13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤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・ダイジエストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤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・ダイジエストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエスト培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤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 °C 2 ~ 3 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C 30 ~ 35 °C ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤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 °C ≤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 °C 5 ~ 7 日間、又は良好な胞子形成が認められるまで	ソイビーカン・カゼイン・ダイジエストックンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	ソイビーカン・カゼイン・ダイジエストックンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C MPN : 適用せず	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間
---	--	--	--	---	--

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

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			製品 1 g 又は 1 mL 当たりの最確数	95 % 信頼限界
試験管当たりの製品の g 又は mL 数				
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	

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オン培地	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		
ラバポート・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
	鑑別	<i>E.coli</i>
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	
+	+	+	10^4 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

23. 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

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。

なお、三薬局方で調和されていない部分は「*」で囲むことにより示す。

非無菌製剤における、ある特定微生物の存在は、製品の薬効の減少あるいは失効につながる可能性があり、また、患者の健康を損なう可能性もある。したがって、医薬品の製造業者は、製造、貯蔵及び流通に際し、最新のガイドラインにしたがってGMPを実施することにより、最終製品のバイオバーデンを確実に低くしなければならない。*本指針は、非無菌医薬品（原料及び製剤）中に存在する増殖能力を有する微生物（細菌及び真菌）の限度の目安を基準値として示したものである。◆非無菌医薬品の微生物試験は、一般試験法「4.05 微生物限度試験法」の「生菌数試験」及び「特定微生物試験」に準拠して行う。*非無菌医薬品に対して生菌数試験及び特定微生物試験を実施するに当たっては、微生物管理計画を確立し、それを当該医薬品の品質保証システムの重要な一部として位置づけなければならない。また、試験実施者及び責任者は、微生物の取扱い技術、バイオセーフティ対策及びデータ解釈について専門知識を有していなければならない。◆

◆1. 定義

1.1 非無菌医薬品

日本薬局方の医薬品各条に記載されているもので無菌でないもの及び最終製品で無菌でないもの。

1.2 医薬品原料

原薬、添加剤を含む医薬品製造に用いるすべての物質。ただし、医薬品製造用水及びガス類は除く。

1.3 バイオバーデン

非無菌医薬品中に生存する微生物（細菌及び真菌）の数と種類。

1.4 処置基準値

直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置をとらなければならないバイオバーデンに対して設定した基準値。

1.5 警報基準値

予知される問題点を早急に警告するものとして、直ちに是正措置をとる必要はないが、調査は行う必要があるバイオバーデンに対して設定した基準値。

1.6 品質保証システム

品質管理を実施するために必要となる製造業者の組織構造（責任、権限及び相互関係）及び実施手順。

2. 試験の適用除外

生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、通例、生菌数試験を適用しない。

3. 試料の採取方法及び試験の実施頻度

3.1 試料の採取方法

一般に、非無菌医薬品や医薬品原料ロット中の微生物汚染は均一でない。偏りのある試料採取方法では、正確なバイオバーデン値を推測できない場合もある。したがって、回顧的又は同時的バリデーションで得られたバイオバーデンデータの解析に基づいて、非無菌医薬品又は医薬品原料ロットを代表できる採

取方法を確立する必要がある。通例、同一製造番号の非無菌医薬品又は医薬品原料の任意に選択した異なる数箇所（少なくとも3箇所以上）から試料をほぼ同量ずつ採取し、それらを合わせたものを被験試料とする。

また、清浄度管理環境下での試料採取が困難な場合には、採取環境や採取器材に注意を払い、採取した試料のバイオバーデンが不注意による汚染によって影響されないようにしなければならない。乾燥又は非水性の非無菌医薬品や医薬品原料においては、採取試料中のバイオバーデンが変化しないことが確認されている場合、本試験を試料採取直後に行う必要はない。

3.2 試験の実施頻度

試験の実施頻度は、別に規定されている場合を除き、種々の要因を考慮して設定しなければならない。これらの要因には次のものがある。

- 非無菌医薬品の剤形（用法）
- 製造方法
- 製造頻度
- 医薬品原料の特性（天然物より製したもので、化学合成で製したもの等）
- ロットサイズ
- バイオバーデン値のばらつき（ロット間、季節変動等）
- バイオバーデンに影響を及ぼす変更事項（製造工程の変更、医薬品原料の入手先の変更、医薬品原料ロットの変更等）
- その他

医薬品の製造初期段階においては、医薬品原料や当該医薬品の微生物学的品質特性を把握するために、一般に高頻度に微生物限度試験を行う必要がある。しかし、回顧的又は同時的バリデーション等のデータを蓄積することによって、例えば、季節ごと、一定期間ごと、数ロットごと等、試験頻度を少なくすることができる。

4. 微生物管理計画書

非無菌医薬品に「4.05 微生物限度試験法」を適用する場合には、当該医薬品からの微生物の回収法、培養法、計測法の妥当性を検証した上で、次の事項を定めた微生物管理計画書を作成しなければならない。

- 試験対象医薬品名（品目名）
- 試料採取頻度及び試験実施頻度
- 試料の採取方法（採取者、採取量、採取環境等を含む）
- 採取試料の試験室への移動（試験実施までの保存条件を含む）
- 試料の処理方法（微生物の回収方法）
- 生菌数の測定方法（供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法等を含む）
- 特定微生物の検出方法（供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法等を含む）
- 生菌数の算出方法及び検出菌の性状検査
- 微生物許容基準値（警報基準値、処置基準値）の設定
- 微生物許容基準値を超えた場合の対処方法
- 試験実施者、試験責任者等
- その他の必要な事項。

5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値

総好気性微生物数（Total Aerobic Microbial Count：TAMC）及び総真菌数（Total Combined Yeasts/Moulds

Count:TYMC) に対する微生物許容基準値を設定する*ことにより、医薬品原料中の微生物学的品質が維持されているか又は悪化しているかを製造初期段階に判断することができる。また、必要に応じて適切な是正措置をとることも可能となり、医薬品原料の微生物学的品質の維持、改善に役立てることができる。

合成及び鉱物由来原料に対する微生物許容基準値は、別に規定するもののほか、表 1 に従う。*化学合成で製する医薬品原料は製造工程において高温処理、有機溶媒処理などを行うことにより一般に低いバイオバーデン状態にあるが、植物や動物由来の医薬品原料は、一般に合成原料よりかなり高いバイオバーデン状態にある。

非無菌医薬品の製造に用いる水の微生物学的特性は、最終製品の微生物学的品質に直接影響を及ぼすので、これらの微生物管理にも、細心の注意が必要である。

非無菌医薬品の最終製剤に対する微生物許容基準値の判定は、別に規定するもののほか、表 2 に従う。*これらの基準値は、非無菌医薬品の適用法、水との親和性などに基づき規定されている。経口用の液状製剤や水との親和性の高い非無菌医薬品については、一般に低い微生物許容基準値が設定されている。

表 2 には、微生物許容基準値が設定されている製剤において存在してはならない特定微生物も示している。ただし、これら検出されてはならない特定微生物をすべて網羅しているわけではない。ある特定の製剤では原材料の特性や製造工程によっては、他の微生物に対する否定試験も必要である。

また、規定された試験では規定されたレベルでの有効な微生物測定ができない場合には、示された許容基準値に可能な限り近い検出限界を有することがバリデートされた試験方法を用いることができる。

表 2 に挙げた微生物に加えて、検出すべき他の微生物の重要性は次のような見地によって評価される：

- ・製品の用途：危険要素は投与経路（眼球、鼻、呼吸器官）によって異なる
- ・製品の性状：当該製品は微生物の発育を支持するのか、そ

れとも十分な抗菌の活性を有するのか

- ・使用方法：
- ・使用者：新生児、幼児、衰弱した人に対するリスクも異なる
- ・免疫反応抑制剤：皮質ステロイドの使用
- ・疾患、外傷、臓器損傷の有無

必要に応じて、関連した要素のリスク評価は、微生物学を学び、微生物学的データの解釈について特別に訓練された職員によってなされる。

原料に対するリスク評価はその原料が供される工程、最新の試験技術、要望される品質規格の原料であることを考慮に入れる。微生物許容基準値が規定されているときは、以下のように判定する。なお、微生物許容基準値は、個々の試験成績、又は繰り返し測定を行う場合には繰り返し測定値の平均値とする。

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

*6. 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物許容基準値

生薬及び生薬製剤の微生物限度の目安を基準値として表 3 に示す。カテゴリー 1 は、熱湯で処理して用いる生薬及びその製剤、カテゴリー 2 は、その他の生薬及びその製剤である。本指針では、生薬及び生薬製剤に対する特定微生物として、腸内細菌とその他のグラム陰性菌、大腸菌、サルモネラ及び黄色ブドウ球菌を掲げているが、生薬原料の由来や生薬を配合した製剤の製法によっては、これら以外の微生物（例えば *Bacillus cereus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aspergillus* 属や大腸菌群の一部の菌種）についても注意を払わなければならない場合がある。

表 1 非無菌医薬品原料の微生物学的品質に対する許容基準値

医薬品原料	総好気性微生物数 (CFU/g 又は CFU/mL)	総真菌数 (CFU/g 又は CFU/mL)
	10^1	10^2

表 2 非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

投与経路	総好気性微生物数 (CFU/g 又は CFU/mL)	総真菌数 (CFU/g 又は CFU/mL)	特定微生物
経口 (非水性製剤)	10^1	10^2	大腸菌存在せず (1 g 又は 1 mL)
経口 (水性製剤)	10^2	10^1	大腸菌存在せず (1 g 又は 1 mL)
直腸	10^3	10^2	—
口腔粘膜			
歯肉			
皮膚	10^2	10^1	黄色ブドウ球菌存在せず (1 g 又は 1 mL) 緑膿菌存在せず (1 g 又は 1 mL)
鼻			
耳			
腔	10^2	10^1	緑膿菌存在せず (1 g 又は 1 mL) 黄色ブドウ球菌存在せず (1 g 又は 1 mL) カンジダ・アルビカンス存在せず (1 g 又は 1 mL)
経皮吸収パッチ (粘着剤及び支持材を含む 1 パッチに限 定)	10^2	10^1	黄色ブドウ球菌存在せず (1 パッチ) 緑膿菌存在せず (1 パッチ)
吸入 (噴霧用の液状製剤にはより厳しい要件が 適用される)	10^2	10^1	黄色ブドウ球菌存在せず (1 g 又は 1 mL) 緑膿菌存在せず (1 g 又は 1 mL) 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌存在せず (1 g 又は 1 mL)

◆表 3 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

微生物	カテゴリー 1 (CFU/g 又は CFU/mL)	カテゴリー 2 (CFU/g 又は CFU/mL)
好気性細菌	10 ⁷	10 ⁶
真菌	10 ⁴	10 ³
腸内細菌とその他のグラム陰性菌	※	10 ³
大腸菌	10 ²	非検出
サルモネラ	非検出	非検出
黄色ブドウ球菌	※	※

※基準値は設けていない。◆

正誤表

頁	行	正	誤
4 右	↓ 14	本試験法は、三葉局方での調和合意に基づき規定した試験法である。なお、 <u>三葉局方で調和されていない部分は「◆」で囲む</u> ことにより示す。	本試験法は、三葉局方での調和合意に基づき規定した試験法である。
6 右	↓ 14	それぞれから◆1 g又は 1 mL相当量◆を採って、強化クロストリジア培地 100 mLが入っている 2 個の容器 (38 mm × 200 mm) 又は他の容器に移す。	それぞれから 1 g 又は 1 mL 相当量を採って、強化クロストリジア培地 100 mL が入っている 2 個の容器 (38 mm × 200 mm) 又は他の容器に移す。