

薬食監麻発第0630002号

平成18年 6月30日

各都道府県衛生主管部(局)長 殿

厚生労働省医薬食品局監視指導・麻薬対策課長



日本薬局方無菌試験法の培地の管理について

日本薬局方の一般試験法に定める無菌試験法においては、培地の有効期間について「非密封容器に入っている培地は、使用前2週間以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1箇月間使用できる。密封容器に入っている培地は、使用前3箇月以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1年間使用できる。」と規定されているところである。

今般、当該無菌試験法において、培地の性能試験が適切に実施されず、培地の有効期間が日本薬局方の規定に従って管理されていない事例が認められたところである。ついては、貴管下関係業者に対し、無菌試験法に用いる培地について日本薬局方に従い管理するよう周知するとともに、適切な監視指導を行うようお願いする。

[参考]

事務連絡

平成18年6月30日

各都道府県衛生主管部（局）

薬務主管課 御中

厚生労働省医薬食品局審査管理課

日本薬局方の無菌試験法で定める培地の有効期間について

日本薬局方（平成18年3月31日付厚生労働省告示第285号）の一般試験法に定める無菌試験法において培地の有効期間を定めているところであるが、当該規定の趣旨は下記に示すとおりであるので、貴管下関係業者に周知方よろしく御配慮願いたい。

なお、生物学的製剤基準（平成16年3月30日付厚生労働省告示第155号）等の他の基準や規格等にて、日本薬局方の一般試験法に定める無菌試験法を準用している場合にあっても、同様であることを申し添える。

記

1. 日本薬局方に規定されている無菌試験法にて定めている培地の有効期間は、以下のとおりである。

「非密封容器に入っている培地は、使用前2週間以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1箇月間使用できる。密封容器に入っている培地は、使用前3箇月以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1年間使用できる。」

2. この意味するところは、非密封容器に入っている培地の場合、基準を満たしているものならばその製造後1箇月間使用することができるものであるが、使用前の2週間以内に培地の性能試験を行い基準に適合する事を確認する必要があるということである。なお、密封容器に入っている培地の場合、基準を満たしているものならばその製造後1年間使用することができるものであるが、使用前の3箇月以内に培地の性能試験を行い基準に適合する事を確認する必要がある。

[参考]

第十五改正 日本薬局方

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA
FIFTEENTH EDITION

厚生労働省

○厚生労働省告示第285号

薬事法（昭和35年法律第145号）第41条第1項の規定に基づき、日本薬局方（以下「新薬局方」という。）を次のように定め、平成18年4月1日から適用し、平成13年厚生労働省告示第111号（日本薬局方を定める件。以下「旧薬局方」という。）は、平成18年3月31日限り、廃止する。ただし、新薬局方に収められている医薬品（旧薬局方に収められていたものに限る。）であって同年4月1日において現に同法第14条第1項の規定による承認を受けているもの（平成18年3月31日において薬事法第14条第1項の規定に基づき製造販売の承認を要しないものとして厚生労働大臣の指定する医薬品等（平成6年厚生省告示第104号）により製造販売の承認を要しない医薬品として指定されている医薬品（以下「承認を要しない医薬品」という。）を含む。）については、平成19年9月30日までは、旧薬局方で定める名称及び基準（当該医薬品に関する部分に限る。）は新薬局方で定める名称及び基準とみなすことができるものとし、新薬局方に収められている医薬品（旧薬局方に収められていたものを除く。）であって平成18年4月1日において現に同法第14条第1項の規定による承認を受けている医薬品（承認を要しない医薬品を含む。）については、平成19年9月30日までは、新薬局方に収められていない医薬品とみなすことができるものとする。

平成18年3月31日

厚生労働大臣 川崎 二郎

次の題名を付する。

日本薬局方

（「次のよう」は省略し、新薬局方の全文を厚生労働省医薬食品局審査管理課及び地方厚生局並びに都道府県庁に備え置いて縦覧に供する。）

（なお、「次のよう」とは、「通則」から始まり、「参照赤外吸収スペクトル」（1569頁）までをいう。）

一般試験法

一般試験法は、共通な試験法、医薬品の品質評価に有用な試験法及びこれに関連する事項をまとめたものである。別に規定するもののほか、アルコール数測定、アンモニウム試験、液体クロマトグラフィーによる試験、塩化物試験、炎色反応試験、エンドトキシン試験、核磁気共鳴スペクトル測定、かさ密度測定、ガスクロマトグラフィーによる試験、乾燥減量試験、眼軟膏剤の金属性異物試験、凝固点測定、強熱減量試験、強熱残分試験、屈折率測定、蛍光光度法による試験、原子吸光光度法による試験、抗生物質の微生物学的力価試験、鉱油試験、酸素フラスコ燃焼法による試験、残留溶媒試験、紫外可視吸光度測定、重金属試験、消化力試験、生薬の微生物限度試験、蒸留試験、浸透圧測定、水分測定、製剤均一性試験（含量均一性試験、質量偏差試験）、製剤の粒度の試験、制酸力試験、赤外吸収スペクトル測定、旋光度測定、タップ密度測定、窒素定量、注射剤の採取容量試験、注射剤の不溶性異物検査、注射剤の不溶性微粒子試験、注射剤用ガラス容器試験、定性反応、滴定終点検出、鉄試験、点眼剤の不溶性微粒子試験、導電率測定、熱分析、粘度測定、薄層クロマトグラフィーによる試験、発熱性物質試験、pH 測定、比重測定、微生物限度試験、ヒ素試験、ビタミン A 定量、比表面積測定、沸点測定、プラスチック製医薬品容器試験、粉体の粒子密度測定、粉末 X 線回折測定、崩壊試験、密度測定、無菌試験、メタノール試験、有機体炭素試験、融点測定、輸液用ゴム栓試験、溶出試験、硫酸塩試験、硫酸呈色物試験及び粒度測定は、それぞれの試験法により行う。ただし、油脂の融点、脂肪酸凝固点、比重、酸価、けん化価、エステル価、水酸基価、不けん化物及びヨウ素価は、油脂試験法中のそれぞれの項に、生薬の試料の採取、分析用試料の調製、鏡検、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量及び精油含量の試験は、生薬試験法中のそれぞれの項に従う。

それぞれの試験法等に付した番号は、一般試験法を分類し付与した固有のものである。医薬品各条等において、〈 〉を付すものは該当する一般試験法の番号を示す。

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。

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。

本試験法は、培養法によって増殖しうる微生物（細菌又は真菌）の有無を試験する方法であり、別に規定するもののほか、I.メンブランフィルター法若しくはII.直接法により試験を行う。

この試験に使用する水、試薬・試液及び器具、器材など必要なものはすべて滅菌したものをを用い、試験環境は無菌試験の実施に適していなければならない。操作は、無菌状態で厳密な無菌の注意のもとで行う。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ないものとする。試験に際しては、作業領域の適切なサンプリング及び適切な制御によって、試験実施状態が問題ないことを確認する。

培地、洗浄液及びその調製法

培地は、別に規定する場合を除き、通例、液状チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いる。◆試料の混濁又は粘性のために、液状チオグリコール酸培地が使用しにくいときは、変法チオグリコール酸培地を用いてもよい。ただし、変法チオグリコール酸培地を用いるときは、使用直前に水浴上で加熱し、嫌気条件下で培養する。◆また、これらの成分を有する適当な品質の培地を用いてもよい。

(1) 液状チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
カンテン	0.75 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
又はブドウ糖一水和物	5.5 g
酵母エキス	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
又はチオグリコール酸	0.3 mL
レザズリン溶液 (1 → 1000), 用時調製	1.0 mL
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.1±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溶解し、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。必要ならば温かいうちにろ紙を用いてろ過する。レザズリン溶液を加え、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、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。培地の上部 1/3 以上が淡赤色となつたならば、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ぐような注意をしながら急速に冷却することで 1 回だけ使用できる。

* (2) 変法チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
又はブドウ糖一水和物	5.5 g
酵母エキス	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
又はチオグリコール酸	0.3 mL
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.1±0.2)

調製法は、液状チオグリコール酸培地に準ずる。*

(3) 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	2.3 g
又はブドウ糖一水和物	2.5 g
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.3±0.2)

全成分を加え、加温して溶かした後、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。必要ならば紙を用いて過し、適当な試験容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。

(4) 洗浄液

肉製又はカゼイン製ペプトン	1.0 g
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.1±0.2)

水に肉製又はカゼイン製ペプトンを溶かし、滅菌後の pH が 7.1±0.2 になるように調整する。必要ならば紙を用いて過し、適当な容器に必要な量ずつを分注し、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。

抗生物質医薬品又は抗菌剤を含む医薬品に対して用いる洗浄液には、必要に応じてバリデーション試験で適正であることが確認されている適当な中和剤又は不活化剤を加えてもよい。油性成分を含む医薬品や軟膏及びクリームに対して用いる洗浄液には、バリデーション試験で適正であることが確認されている適当な乳化剤を適正な濃度（例えば、10 g/L のポリソルベート 80）になるように加えてもよい。

培地の適合性

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

(1) 培地の無菌性

培地の一部を、液状チオグリコール酸培地及び変法チオグリコール酸培地は 30～35℃で、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は 20～25℃で 14 日間培養したとき、微生物の増殖を認めてはならない。

(2) 培地の性能試験

培地は調製パッチごとに、また、市販液体培地にあつては、製造ロット(パッチ)ごとにその性能を試験する^{*)}。表 4.06-1 に示す各細菌又は真菌、*若しくはこれらと同等と考えられる菌株を、菌種ごとに培地 1 容器当たり、100 個以下を接

種し、規定の培養温度で培養したとき、細菌は 3 日間以内に、真菌は 5 日間以内に各菌が明らかな発育を示さなければならぬ。

表 4.06-1 培地性能試験及びバリデーション試験用菌株

培地	試験菌株	培養
液状チオグリコール酸培地	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538, NBRC 13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518)	好気培養
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118)	
	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, 又は ATCC 11437, NBRC 14293)	
*変法チオグリコール酸培地	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, 又は ATCC 11437, NBRC 14293)	嫌気培養
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054)	好気培養
	<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)	

これらの微生物は、マスターシードロットから継代数が 5 代を超えないように保存管理する。

培地の有効期間

非密封容器に入っている培地は、使用前 2 週間以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後 1 箇月間使用できる。密封容器に入っている培地は、使用前 3 箇月以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後 1 年間使用できる。

バリデーション試験

バリデーション試験は、無菌試験を実施する前に又は無菌試験と並行して、以下の場合に実施する。

- 新たな製品について無菌試験を行う場合
- 試験の実施条件に変更があった場合

以下に述べる改変を別として「製品の無菌試験」の項で述べられている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：I の操作により試料溶液をろ過、洗浄する。最後の洗浄液には表 4.06-1 に示す菌株若しくはこれらと同等と考えられる菌株を菌種ごとに 100 個以下加え、これをろ過し、試料フィルターとする。

直接法：II-2 に定めた試料量を加えた試料培地に表 4.06-1 に示す菌株若しくはこれらと同等と考えられる菌株を菌種ごとに 100 個以下を加える。

いずれの場合においても、陽性対照としては試料溶液を加えない培地性能試験培地を置き、規定の温度で最長 5 日間培養する。培養後に、試料接種容器と陽性対照容器に肉眼的に同等な微生物の増殖が得られれば、この製品は試験条件下において抗菌性を有しないか、又は抗菌活性が十分に除去されているものとみなす。この場合、無菌試験はこれ以上の変更を行うことなく実施できる。もし、接種したいずれかの菌の発育がみられない場合、対照に比べて発育菌量が少ない場合、又は発育が遅延した場合、試料には微生物発育阻止活性があるものと判断す

*ただし、市販の粉末培地にあつては同一ロットの場合、培地の調製法が十分に管理されているなら、調製パッチごとに培地性能試験を実施しなくてもよい。

る。この場合には、抗菌性を除去するために、条件を変更し、バリデーション試験を繰り返す。一般に、メンブランフィルター法においては、メンブランフィルターの材質を吸着しにくいものに変更するか、洗浄液を増量するか、又は洗浄液に適当な不活化剤を加えるなど適当な方法で微生物発育阻止活性の発現を抑制する。メンブランフィルター 1 枚当たり、適当な界面活性剤を適量添加した洗浄液、*各 100 mL で 5 回洗浄しても微生物発育阻止活性を抑制できない場合は、洗浄を追加することなく無菌試験を実施する。直接法においては、菌の発育に影響を及ぼさない適当な不活化剤を加えるか、微生物発育阻止活性がみられなくなるまで II-2 の規定にかかわらず培地量を増やす。

製品の無菌試験

供試個数

無菌試験に供する医薬品の個数は、表 4.06-2 に基づいて当該ロットからロット全体を代表するように採取する。

表 4.06-2 *ロット当たりの抜き取り個数。

ロット当たりの製造容器数	最少抜き取り個数(培地当たり) ^{*)}
注射剤	
100 個以下	10% 又は 4 容器のうち多い方
101 個以上 500 個以下	10 容器
501 個以上	2% 又は 20 容器のうち少ない方
*501 個以上の大容量製品 (表示量が 100 mL 以上)。	*2% 又は 10 容器のうち少ない方。
眼軟膏剤及び点眼剤等の非注射剤	
200 個以下	5% 又は 2 容器のうち多い方
201 個以上	10 容器
単回使用製品の場合は、注射剤に準じた抜き取り個数とする	
固形バルク製品 ^{**)}	
4 容器まで	各バルク容器
5 容器以上 50 容器以下	20% 又は 4 容器のうち多い方
51 容器以上	2% 又は 10 容器のうち多い方
抗生物質のバルク包装製品 (5 g 以上) ^{**)}	6 容器
*抗生物質のバルク包装製品 (5 g 未満)。	*20 容器。

^{*)} 1 容器当たりの内容量が両培地に接種するに十分であるなら、ここに示した容器数とする。

^{**)} 固形バルク製品とは、複数の注射剤の調製が可能な無菌原末製品を指す。

^{**)} 抗生物質のバルク包装製品とは、複数の注射剤の調製が可能な抗生物質を指し、清浄空気下で溶解後は、一度に輸液器材等に分注しなければならない。

試験法

試験は、メンブランフィルター法又は直接法を用いて行う。試験には、適当な陰性対照を置く。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、本試験条件下で抗菌力を有さ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は、メンブランフィルター法を適用する。

1. メンブランフィルター法

本法は、メンブランフィルターを用いて試料をろ過し、洗浄後、そのメンブランフィルターを培地に入れるか、又はろ過器に培地を入れて培養する方法である。メンブランフィルターは、孔径 0.45 μm 以下の適当な材質のものを用いる。ろ過器は、高圧蒸気法又はその他の方法で滅菌が可能であり、メンブランフィルターを装着したとき、漏れや逆流のないものを用いる。以下の方法は、直径約 50 mm のメンブランフィルターを使用することを仮定している。異なった直径のメンブランフィルターを使用するのであれば、希釈及び洗浄の液量はそれに応じて調整する。

て調整する。

I-1. 試料溶液の調製

- 液状医薬品：そのまま試料溶液とする。
- *b) 用時溶解又は懸濁して用いる医薬品：添付の溶剤、生理食塩液、水又は洗浄液で用時の濃度に調製した後、試料溶液とする。
- c) 油及び油性医薬品：粘度の低い油又は油性医薬品は、希釈せずに乾いたメンブランフィルターでろ過する。粘稠性の油及び油性医薬品は、ろ過滅菌によって無菌に製したミリスチン酸イソプロピル又は菌の発育に影響を及ぼさない他の溶剤を加え、ろ過可能な濃度に溶かして試料溶液を調製する。
- d) 軟膏剤：脂肪を基剤とする軟膏剤及び油中水滴型の乳剤は、ろ過滅菌によって無菌に製したミリスチン酸イソプロピル又は菌の発育に影響を及ぼさない他の溶剤を加え、必要ならば 40℃ を超えない加温によってろ過可能な濃度に溶かして試料溶液を調製する。例外的な場合でも加温温度は 44℃ を限度とする。

I-2. 試験に供する試料量

培地当たり容器から採取する試料の最少量は、別に規定するもののほか、表 4.06-3 による。1 容器中の表示容量がこれらの試験を行うのに十分でない場合には、表 4.06-2 に示す容器数の 2 倍又はそれ以上を抜き取り、別々の培地に接種する。メンブランフィルター法を用いる場合には、表 4.06-3 に示す量より少なくならないように、可能ならば容器の全容量を接種する。必要ならば、約 100 mL の洗浄液で希釈してから試験に用いる。

表 4.06-3 各培地当たりの最少試料採取量

製品の表示量	最少採取量(培地当たり)
液剤(抗生物質を除く)	
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(液剤)	1 mL
水溶性又はミリスチン酸イソプロピルで可溶性の他の医薬品	全量、ただし 200 mg 以上
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

I-3. 操作

通例、1 個又は 2 個一組のろ過器で試料溶液のろ過を完了させる。なお、試料溶液がろ過しにくいときは、洗浄液を用いて試料溶液を更に希釈した後、ろ過してもよい。試料溶液をろ過器内に注入してろ過した後、メンブランフィルター 1 枚当たり洗浄液 100 mL ずつでバリデーション試験で確立した回数洗う。ただし、試料が微生物発育阻止活性を有しない場合は、洗浄操作を省くことができる。メンブランフィルターの培養には、下記の 2 法のうちいずれかを用いる。なお、各培地の量は、バリデーション試験で確立した量を使用する。

- (1) 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 2 等分し、それぞれに

つき同一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。

(2) 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 2 等分ろ過後、それぞれの培地を加える。

II. 直接法

本法は、試料の全部又は一部を直接培地に加えて培養する方法であり、通例、メンブランフィルター法を適用できない医薬品及びメンブランフィルター法より本法の適用が合理的である医薬品に適用する。*水銀保存剤を含む医薬品でメンブランフィルター法を適用できない場合は、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。*

II-1. 試料溶液の調製

通例、メンブランフィルター法を準用する。ただし、通常の方法で溶解できない医薬品は、適当な方法で懸濁又は微細化したものを試料とする。

- a) 油性液：バリデーション試験で適正であることが確認されている適当な乳化剤を適正な濃度（例えば、10 g/L のポリソルベート 80）になるように加えた培地を使用する。
- b) 軟膏剤及びクリーム：1 g/L の肉製又はカゼイン製ベプトン溶液のような無菌希釈液に、選定された適当な乳化剤を加え、約 1:10 に希釈し、この希釈した試料を、乳化剤を含まない培地へ移植する。

II-2. 試験に供する試料量

ピペット、注射器又は適当な器具を用い、別に規定するもののほか、表 4.06-3 に示す量を培地に直接移す。この際、別に規定するもののほか、接種量は培地量の 10% を超えてはならない。油性医薬品を含む培地は、観察日ごとに静かに振り混ぜる。しかし、チオグリコール酸培地を嫌気性菌の検出に使用する場合は、嫌気性条件を維持するために、振り混ぜは最小限のものとする。

培養及び観察

液状チオグリコール酸培地*及び変法チオグリコール酸培地*は 30～35℃で、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は 20～25℃で 14 日間以上培養し、培養期間中に数回、及び培養最終日に菌の発育の有無を観察する。試料によって培地が混濁し、判定が困難な場合、そのほか必要な場合には、培養 14 日目に新しい培地に*適量*を移植し、同じ温度で元の培地とともに 4 日間以上培養する。

判定

以上の試験の結果、菌の発育を認めないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。
*ただし、試験に供した検体とは関係なく無菌試験自体に問題があったことが立証された場合には、再試験を行うことができる。*再試験の結果、菌の発育が認められないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。