



事 務 連 絡
平成 20 年 1 月 9 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

日本薬局方における国際調和について

近年、優れた新医薬品の地球規模での研究開発の促進と患者への迅速な提供を図るため、承認申請資料等の国際的ハーモナイゼーション推進の必要性から薬局方の試験法については、薬局方検討会議（PDG）において、日本薬局方、欧州薬局方及び米国薬局方（以下、「三薬局方」という。）間の国際調和の推進が図られているところです。また、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（以下、「ICH」という。）が組織され、品質、安全性及び有効性の各分野でのハーモナイゼーションの促進を図るための活動も行われています。

今般、第十五改正日本薬局方第一追補一般試験法 4.05 微生物限度試験法及び参考情報 23.非無菌医薬品の微生物学的品質特性について、三薬局方間で調和合意がなされましたので、別添のとおり当該英語文を御連絡いたします。

なお、日米 EU の規制当局間における相互受け入れについては、ICHQ4B 専門家会合において検討が進められているところです。

4.05 Microbiological Examination of Non-Sterile Products

This chapter includes microbial enumeration tests and tests for specified micro-organisms. For the test, use a mixture of several portions selected at random from the bulk or from the contents of a sufficient number of containers. If test specimens are diluted with fluid medium, the test should be performed quickly. In performing the test, precautions must be taken to prevent biohazard.

I. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS

These tests are harmonized with the European Pharmacopoeia and the U.S. Pharmacopeia.

1 INTRODUCTION

The tests described hereafter will allow quantitative enumeration of mesophilic bacteria and fungi which may grow under aerobic conditions.

The tests are designed primarily to determine whether a substance or preparation complies with an established specification for microbiological quality. When used for such purposes follow the instructions given below, including the number of samples to be taken and interpret the results as stated below.

The methods are not applicable to products containing viable micro-organisms as active ingredients.

Alternative microbiological procedures, including automated methods, may be used, provided that their equivalence to the Pharmacopoeial method has been demonstrated.

2 GENERAL PROCEDURES

Carry out the determination under conditions designed to avoid extrinsic microbial contamination of the product to be examined. The precautions taken to avoid contamination must be such that they do not affect any micro-organisms which are to be revealed in the test.

If the product to be examined has antimicrobial activity, this is insofar as possible removed or neutralised. If inactivators are used for this purpose their efficacy and their absence of toxicity for micro-organisms must be demonstrated.

If surface-active substances are used for sample preparation, their absence of toxicity for micro-organisms and their compatibility with inactivators used must be demonstrated.

3 ENUMERATION METHODS

Use the membrane filtration method, or the plate-count methods, as prescribed. The most probable number (MPN) method is generally the least accurate method for microbial counts, however, for certain product groups with very low bioburden, it may be the most appropriate method.

The choice of a method is based on factors such as the nature of the product and the required limit of micro-organisms. The method chosen must allow testing of a sufficient sample size to judge compliance with the specification. The suitability of the chosen method must be established.

4 GROWTH PROMOTION TEST AND SUITABILITY OF THE COUNTING METHOD

4-1 GENERAL CONSIDERATIONS

The ability of the test to detect micro-organisms in the presence of product to be tested must be established.

Suitability must be confirmed if a change in testing performance, or the product, which may affect the outcome of the test is introduced.

4-2 PREPARATION OF TEST STRAINS

Use standardised stable suspensions of test strains or prepare as stated below. Seed lot culture maintenance techniques (seed-lot systems) are used so that the viable micro-organisms used for inoculation are not more than 5 passages removed from the original master seed-lot. Grow each of the bacterial and fungal test strains separately as described in Table 4.05-I-1.

Table 4.05-I-1 Preparation and Use of Test Micro-organisms

Micro-organism	Preparation of test strain	Growth promotion		Suitability of counting method in the presence of the product	
		Total aerobic microbial count	Total yeasts and moulds count	Total aerobic microbial count	Total yeasts and moulds count
<i>Staphylococcus aureus</i> such as ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 or NBRC 13276	Casein soya bean digest agar or casein soya bean digest broth 30 – 35°C 18 – 24 h	Casein soya bean digest agar and casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days		Casein soya bean digest agar/ MPN casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> such as ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 or NBRC 13275	Casein soya bean digest agar or casein soya bean digest broth 30 – 35°C 18 – 24 h	Casein soya bean digest agar and casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days		Casein soya bean digest agar/MPN casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days	
<i>Bacillus subtilis</i> such as ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 or NBRC 3134	Casein soya bean digest agar or casein soya bean digest broth 30 – 35°C 18 – 24 h	Casein soya bean digest agar and casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days		Casein soya bean digest agar/MPN casein soya bean digest broth ≤100 CFU 30 – 35°C ≤3 days	
<i>Candida albicans</i> such as ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 or NBRC 1594	Sabouraud-dextrose agar or Sabouraud-dextrose broth 20 – 25°C 2 – 3 days	Casein soya bean digest agar ≤100 CFU 30 – 35°C ≤5 days	Sabouraud-dextrose agar ≤100 CFU 20 – 25°C ≤5 days	Casein soya bean digest agar ≤100 CFU 30 – 35°C ≤5 days MPN: not applicable	Sabouraud-dextrose agar ≤100 CFU 20 – 25°C ≤5 days,
<i>Aspergillus niger</i> such as ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 or NBRC 9455	Sabouraud-dextrose agar or potato-dextrose agar 20 – 25°C 5 – 7 days, or until good sporulation is achieved	Casein soya bean digest agar ≤100 CFU 30 – 35°C ≤5 days	Sabouraud-dextrose agar ≤100 CFU 20 – 25°C ≤5 days	Casein soya bean digest agar ≤100 CFU 30 – 35°C ≤5 days MPN: not applicable	Sabouraud-dextrose agar ≤100 CFU 20 – 25°C ≤5 days,

Use buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or phosphate buffer solution pH 7.2 to make test suspensions; to suspend *A. niger* spores, 0.05 per cent of polysorbate 80 may be added to the buffer. Use the suspensions within 2 h or within 24 h if stored at 2 – 8°C. As an alternative to preparing and then diluting a fresh suspension of vegetative cells of *A. niger* or *B. subtilis*, a stable spore suspension is prepared and then an appropriate volume of the spore suspension is used for test inoculation. The stable spore suspension may be maintained at 2 – 8°C for a validated period of time.

4-3 NEGATIVE CONTROL

To verify testing conditions a negative control is performed using the chosen diluent in place of the test preparation. There must be no growth of micro-organisms.

4-4 GROWTH PROMOTION OF THE MEDIA

Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium, prepared either from dehydrated medium or from the ingredients described

Inoculate portions/plates of *casein soya bean digest broth* and *casein soya bean digest agar* with a small number (not more than 100 CFU) of the micro-organisms indicated in Table 4.05-I-1, using a separate portion/plate of medium for each. Inoculate plates of *Sabouraud-dextrose agar* with a small number (not more than 100 CFU) of the micro-organisms indicated in Table 4.05-I-1, using a separate plate of medium for each. Incubate in the conditions described in Table 4.05-I-1.

For solid media, growth obtained must not differ by a factor greater than 2 from the calculated value for a standardised inoculum. For a freshly prepared inoculum, growth of the micro-organisms comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs. Liquid media are suitable if clearly visible growth of the micro-organisms comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs.

4-5 SUITABILITY OF THE COUNTING METHOD IN THE PRESENCE OF PRODUCT

4-5-1 Preparation of the sample

The method for sample preparation depends on the physical characteristics of the product to be tested. If none of the procedures described below can be demonstrated to be satisfactory, an alternative procedure must be developed.

Water-soluble products—Dissolve or dilute (usually a 1 in 10 dilution is prepared) the product to be examined in *buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0*, *phosphate buffer solution pH 7.2* or *casein soya bean digest broth*. If necessary adjust to pH 6–8. Further dilutions, where necessary, are prepared with the same diluent.

Non-fatty products insoluble in water—Suspend the product to be examined (usually a 1 in 10 dilution is prepared) in *buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0*, *phosphate buffer solution pH 7.2* or *casein soya bean digest broth*. A surface-active agent such as 1 g/L of polysorbate 80 may be added to assist the suspension of poorly wettable substances. If necessary adjust to pH 6–8. Further dilutions, where necessary, are prepared with the same diluent.

Fatty products—Dissolve in isopropyl myristate, sterilised by filtration or mix the product to be examined with the minimum necessary quantity of sterile polysorbate 80 or another non-inhibitory sterile surface-active reagent, heated if necessary to not more than 40°C, or in exceptional cases to not more than 45°C. Mix carefully and if necessary maintain the temperature in a water-bath. Add sufficient of the pre-warmed chosen diluent to make a 1 in 10 dilution of the original product. Mix carefully whilst maintaining the temperature for the shortest time necessary for the formation of an emulsion. Further serial tenfold dilutions may be prepared using the chosen diluent containing a suitable concentration of sterile polysorbate 80 or another non-inhibitory sterile surface-active reagent.

Fluids or solids in aerosol form—Aseptically transfer the product into a membrane filter apparatus or a sterile container for further sampling. Use either the total contents or a defined number of metered doses from each of the containers tested.

Transdermal patches—Remove the protective cover sheets ("release liner") of the transdermal patches and place them, adhesive side upwards, on sterile glass or plastic trays. Cover the adhesive surface with sterile porous material, for example sterile gauze, to prevent the patches from sticking together, and transfer the patches to a suitable volume of the chosen diluent containing inactivators such as polysorbate 80 and/or lecithin. Shake the preparation vigorously for at least 30 min.

4-5-2 Inoculation and dilution

Add to the sample prepared as described above (4-5-1) and to a control (with no test material included) a sufficient volume of the microbial suspension to obtain an inoculum of not more than 100 CFU. The volume of the suspension of the inoculum should not exceed 1 per cent of the volume of diluted product.

To demonstrate acceptable microbial recovery from the product, the lowest possible dilution factor of the prepared sample must be used for the test. Where this is not possible due to antimicrobial activity or poor solubility, further appropriate protocols must be developed. If inhibition of growth by the sample cannot otherwise be avoided, the aliquot of the microbial suspension may be added after neutralization, dilution or filtration.

4-5-3 Neutralization/removal of antimicrobial activity

The number of micro-organisms recovered from the prepared sample diluted as described in 4-5-2 and incubated following the procedure described in 4-5-4, is compared to the number of micro-organisms recovered from the control preparation.

If growth is inhibited (reduction by a factor greater than 2), then modify the procedure for the particular enumeration test to ensure the validity of the results. Modification of the procedure may include, for example, (1) an increase in the volume of the diluent or culture medium, (2) incorporation of a specific or general neutralizing agents into the diluent, (3) membrane filtration or (4) a combination of the above measures.

Neutralizing agents—Neutralizing agents may be used to neutralize the activity of antimicrobial agents (Table 4.05-I-2). They may be added to the chosen diluent or the medium preferably before sterilization. If used, their efficacy and their absence of tox-

icity for micro-organisms must be demonstrated by carrying out a blank with neutralizer and without product.

Table 4.05-I-2 *Common neutralizing agents/method for interfering substances*

Interfering substance	Potential neutralizing agents/method
Glutaraldehyde, Mercurials	Sodium hydrogensulfite (Sodium bisulfite)
Phenolics, Alcohol, Aldehydes, Sorbate	Dilution
Aldehydes	Glycine
Quaternary Ammonium Compounds (QACs), Parahydroxybenzoates (Parabens), Bis-biguanides	Lecithin
QAC, Parabens, Iodine	Polysorbate
Mercurials	Thioglycollate
Mercurials, Halogens, Aldehydes	Thiosulfate
EDTA (edetate)	Mg or Ca ions

If no suitable neutralizing method can be found, it can be assumed that the failure to isolate the inoculated organism is attributable to the microbicidal activity of the product. This information serves to indicate that the article is not likely to be contaminated with the given species of the micro-organism. However, it is possible that the product only inhibits some of the micro-organisms specified herein, but does not inhibit others not included amongst the test strains or for which the latter are not representative. Then, perform the test with the highest dilution factor compatible with microbial growth and the specific acceptance criterion.

4-5-4 Recovery of micro-organism in the presence of product

For each of the micro-organisms listed, separate tests are performed. Only micro-organisms of the added test strain are counted.

4-5-4-1 Membrane filtration

Use membrane filters having a nominal pore size not greater than 0.45 μm . The type of filter material is chosen in such a way that the bacteria-retaining efficiency is not affected by the components of the sample to be investigated. For each of the micro-organisms listed, one membrane filter is used.

Transfer a suitable amount of the sample prepared as described under 4-5-1 to 4-5-3 (preferably representing 1 g of the product, or less if large numbers of CFU are expected) to the membrane filter, filter immediately and rinse the membrane filter with an appropriate volume of diluent.

For the determination of total aerobic microbial count (TAMC), transfer the membrane filter to the surface of *casein soya bean digest agar*. For the determination of total combined yeasts/moulds count (TYMC) transfer the membrane to the surface of *Sabouraud-dextrose agar*. Incubate the plates as indicated in Table 4.05-I-1. Perform the counting.

4-5-4-2 Plate-count methods

Perform plate-count methods at least in duplicate for each medium and use the mean count of the result.

4-5-4-2-1 Pour-plate method

For Petri dishes 9 cm in diameter, add to the dish 1 mL of the sample prepared as described under 4-5-1 to 4-5-3 and 15 - 20 mL of *casein soya bean digest agar* or *Sabouraud-dextrose agar*, both media being at not more than 45°C. If larger Petri dishes are used, the amount of agar medium is increased accordingly. For each of the micro-organisms listed in Table 4.05-I-1, at least 2 Petri dishes are used.

Incubate the plates as indicated in Table 4.05-I-1. Take the arithmetic mean of the counts per medium and calculate the number of CFU in the original inoculum.

4-5-4-2-2 Surface-spread method

For Petri dishes 9 cm in diameter, add 15 - 20 mL of *casein soya bean digest agar* or *Sabouraud-dextrose agar* at about 45°C to each Petri dish and allow to solidify. If larger Petri dishes are used, the volume of the agar is increased accordingly. Dry the plates, for example in a laminar-air-flow cabinet or in an incubator. For each of the micro-organisms listed in Table 4.05-I-1, at least 2 Petri dishes are used. Spread a measured volume of not less than 0.1 mL of the sample prepared as described under 4-5-1 to 4-5-3 over the surface of the medium. Incubate and count as prescribed under 4-5-4-2-1.

4-5-4-3 Most-probable-number (MPN) method

The precision and accuracy of the MPN method is less than that of the membrane filtration method or the plate-count method. Unreliable results are obtained particularly for the enumeration of moulds. For these reasons the MPN method is reserved for the enumeration of TAMC in situations where no other method is available. If the use of the method is justified, proceed as follows.

Prepare a series of at least 3 serial tenfold dilutions of the product as described under 4-5-1 to 4-5-3. From each level of dilution, 3 aliquots of 1 g or 1 mL are used to inoculate 3 tubes with 9 – 10 mL of *casein soya bean digest broth*. If necessary a surface-active agent such as polysorbate 80, or an inactivator of antimicrobial agents may be added to the medium. Thus, if 3 levels of dilution are prepared 9 tubes are inoculated.

Incubate all tubes at 30 – 35°C for not more than 3 days. If reading of the results is difficult or uncertain owing to the nature of the product to be examined, subculture in the same broth, or *casein soya bean digest agar*, for 1 – 2 days at the same temperature and use these results. Determine the most probable number of micro-organisms per gram or millilitre of the product to be examined from Table 4.05-I-3.

4-6 RESULTS AND INTERPRETATION

When verifying the suitability of the membrane filtration method or the plate-count method, a mean count of any of the test organisms not differing by a factor greater than 2 from the value of the control defined in 4-5-2 in the absence of the product must be obtained. When verifying the suitability of the MPN method the calculated value from the inoculum must be within 95 per cent confidence limits of the results obtained with the control.

If the above criteria cannot be met for one or more of the organisms tested with any of the described methods, the method and test conditions that come closest to the criteria are used to test the product.

5 TESTING OF PRODUCTS

5-1 AMOUNT USED FOR THE TEST

Unless otherwise prescribed, use 10 g or 10 mL of the product to be examined taken with the precautions referred to above. For fluids or solids in aerosol form, sample 10 containers. For transdermal patches, sample 10 patches.

The amount to be tested may be reduced for active substances that will be formulated in the following conditions: the amount per dosage unit (e.g. tablet, capsule, injection) is less than or equal to 1 mg or the amount per gram or millilitre (for preparations not presented in dose units) is less than 1 mg. In these cases, the amount of sample to be tested is not less than the amount present in 10 dosage units or 10 g or 10 mL of the product.

For materials used as active substances where sample quantity is limited or batch size is extremely small (i.e. less than 1000 mL or 1000 g), the amount tested shall be 1 per cent of the batch unless a lesser amount is prescribed or justified and authorised.

For products where the total number of entities in a batch is less than 200 (e.g. samples used in clinical trials), the sample size may be reduced to 2 units, or 1 unit if the size is less than 100.

Select the sample(s) at random from the bulk material or from the available containers of the preparation. To obtain the required quantity, mix the contents of a sufficient number of containers to provide the sample.

5-2 EXAMINATION OF THE PRODUCT

5-2-1 Membrane filtration

Use a filtration apparatus designed to allow the transfer of the filter to the medium. Prepare the sample using a method that has been shown suitable as described in section 4 and transfer the appropriate amount to each of 2 membrane filters and filter immediately. Wash each filter following the procedure shown to be suitable.

For the determination of TAMC, transfer one of the membrane filters to the surface of *casein soya bean digest agar*. For the determination of TYMC, transfer the other membrane to the surface of *Sabouraud-dextrose agar*. Incubate the plate of *casein soya bean digest agar* at 30 – 35°C for 3 – 5 days and the plate of *Sabouraud-dextrose agar* at 20 – 25°C for 5 – 7 days. Calculate the number of CFU per gram or per millilitre of product.

When examining transdermal patches, filter 10 per cent of the volume of the preparation described under 4-5-1 separately through each of 2 sterile filter membranes. Transfer one membrane to *casein soya bean digest agar* for TAMC and the other membrane to *Sabouraud-dextrose agar* for TYMC.

5-2-2 Plate-count methods

5-2-2-1 Pour-plate method

Prepare the sample using a method that has been shown to be suitable as described in section 4. Prepare for each medium at least 2 Petri dishes for each level of dilution. Incubate the plates of *casein soya bean digest agar* at 30 – 35°C for 3 – 5 days and the plates of *Sabouraud-dextrose agar* at 20 – 25°C for 5 – 7 days. Select the plates corresponding to a given dilution and showing the highest number of colonies less than 250 for TAMC and 50 for TYMC. Take the arithmetic mean per culture medium of the counts and calculate the number of CFU per gram or per millilitre of product.

5-2-2-2 Surface-spread method

Prepare the sample using a method that has been shown to be suitable as described in section 4. Prepare at least 2 Petri dishes for each medium and each level of dilution. For incubation and calculation of the number of CFU proceed as described for the pour-plate method.

5-2-2-3 Most-probable-number method

Prepare and dilute the sample using a method that has been shown to be suitable as described in section 4. Incubate all tubes for 3 – 5 days at 30 – 35°C. Subculture if necessary, using the procedure shown to be suitable. Record for each level of dilution the number of tubes showing microbial growth. Determine the most probable number of micro-organisms per gram or millilitre of the product to be examined from Table 4.05-I-3.

Table 4.05-I-3 *Most-probable-number values of micro-organisms*

Observed combinations of numbers of tubes showing growth in each set			MPN per g or per mL of product	95 per cent confidence limits
Number of g or mL of product per tube				
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	Less than 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	More than 1100	

5-3 INTERPRETATION OF THE RESULTS

The total aerobic microbial count (TAMC) is considered to be equal to the number of CFU found using *casein soya bean digest agar*; if colonies of fungi are detected on this medium, they are counted as part of TAMC. The total combined yeasts/mould count (TYMC) is considered to be equal to the number of CFU found using *Sabouraud-dextrose agar*; if colonies of bacteria are detected on this medium, they are counted as part of TYMC. When the TYMC is expected to exceed the acceptance criterion due to the bacterial growth, *Sabouraud-dextrose agar* containing antibiotics may be used. If the count is carried out by the MPN method the calculated value is the TAMC.

When an acceptance criterion for microbiological quality is prescribed it is interpreted as follows:

- 10^1 CFU: maximum acceptable count = 20,
- 10^2 CFU: maximum acceptable count = 200,
- 10^3 CFU: maximum acceptable count = 2000, and so forth.

The recommended solutions and media are described in *Tests for specified micro-organisms*.

II. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NON-STERILE PRODUCTS: TESTS FOR SPECIFIED-MICRO-ORGANISMS

These tests are harmonized with the European Pharmacopoeia and the U.S. Pharmacopoeia. The parts of the text that are not harmonized are marked with symbols (♦ ♦).

1 INTRODUCTION

The tests described hereafter will allow determination of the absence of, or limited occurrence of specified micro-organisms which may be detected under the conditions described.

The tests are designed primarily to determine whether a substance or preparation complies with an established specification for microbiological quality. When used for such purposes follow the instructions given below, including the number of samples to be taken and interpret the results as stated below.

Alternative microbiological procedures, including automated methods may be used, provided that their equivalence to the Pharmacopoeial method has been demonstrated.

2 GENERAL PROCEDURES

The preparation of samples is carried out as described in *Microbial enumeration tests*.

If the product to be examined has antimicrobial activity, this is insofar as possible removed or neutralised as described in *Microbial enumeration tests*.

If surface-active substances are used for sample preparation, their absence of toxicity for micro-organisms and their compatibility with inactivators used must be demonstrated as described in *Microbial enumeration tests*.

3 GROWTH PROMOTING AND INHIBITORY PROPERTIES OF THE MEDIA AND SUITABILITY OF THE TEST

The ability of the test to detect micro-organisms in the presence of the product to be tested must be established. Suitability must be confirmed if a change in testing performance, or the product, which may affect the outcome of the test is introduced.

3-1 PREPARATION OF TEST STRAINS

Use standardised stable suspensions of test strains or prepare as stated below. Seed lot culture maintenance techniques (seed-lot systems) are used so that the viable micro-organisms used for inoculation are not more than 5 passages removed from the original master seed-lot.

3-1-1 Aerobic micro-organisms

Grow each of the bacterial test strains separately in containers containing *casein soya bean digest broth* or on *casein soya bean digest agar* at 30 – 35°C for 18 – 24 hours. Grow the test strain for *Candida albicans* separately on *Sabouraud-dextrose agar* or in *Sabouraud-dextrose broth* at 20 – 25°C for 2-3 days.

Staphylococcus aureus such as ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 or NBRC 13276,
Pseudomonas aeruginosa such as ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 or NBRC 13275,
Escherichia coli such as ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 or NBRC 3972,
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium such as ATCC 14028

or, as an alternative,

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Abony such as NBRC 100797, NCTC 6017 or CIP 80.39,
Candida albicans such as ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 or NBRC 1594.

Use buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0 or phosphate buffer solution pH 7.2 to make test suspensions. Use the suspensions within 2 hours or within 24 hours if stored at 2 – 8°C.

3-1-2 Clostridia

Use *Clostridium sporogenes* such as ATCC 11437 (NBRC 14293, +NCIMB 12343, CIP 100651) or ATCC 19404 (NCTC 532 or CIP 79.3). Grow the clostridial test strain under anaerobic conditions in reinforced medium for Clostridia at 30 – 35°C for 24 – 48 hours. As an alternative to preparing and then diluting down a fresh suspension of vegetative cells of *Cl. sporogenes*, a stable spore suspension is used for test inoculation. The stable spore suspension may be maintained at 2 – 8°C for a validated period.

3-2 NEGATIVE CONTROL

To verify testing conditions a negative control is performed using the chosen diluent in place of the test preparation. There must be no growth of micro-organisms.

3-3 GROWTH PROMOTION AND INHIBITORY PROPERTIES OF THE MEDIA

Test each batch of ready-prepared medium and each batch of medium prepared either from dehydrated medium or from ingredients.

Verify suitable properties of relevant media as described in Table 4.05- II -1.

Table 4.05- II -1 Growth promoting, inhibitory and indicative properties of media

Medium	Property	Test strains
Test for bile-tolerant gram-negative bacteria		
<i>Enterobacteria enrichment broth-Mossel</i>	Growth promoting	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
<i>Violet red bile glucose agar</i>	Growth promoting +	<i>E. coli</i>
	Indicative	<i>P. aeruginosa</i>
Test for Escherichia coli		
<i>MacConkey broth</i>	Growth promoting	<i>E. coli</i>
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
<i>MacConkey agar</i>	Growth promoting +	<i>E. coli</i>
	Indicative	
Test for Salmonella		
<i>Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth</i>	Growth promoting	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium or <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
	Inhibitory	<i>S. aureus</i>
<i>Xylose, lysine, deoxycholate agar</i>	Growth promoting +	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium or <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Abony
	Indicative	
	Indicative	<i>E. coli</i>
Test for Pseudomonas aeruginosa		
<i>Cetrimide agar</i>	Growth promoting	<i>P. aeruginosa</i>
	Inhibitory	<i>E. coli</i>

Test for <i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Mannitol salt agar</i>	Growth promoting+ Indicative	<i>S. aureus</i>
	Inhibitory	<i>E. coli</i>
Test for <i>Clostridia</i>		
<i>Reinforced medium for Clostridia</i>	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>
<i>Columbia agar</i>	Growth promoting	<i>Cl. sporogenes</i>
Test for <i>Candida albicans</i>		
<i>Sabouraud dextrose broth</i>	Growth promoting	<i>C. albicans</i>
<i>Sabouraud dextrose agar</i>	Growth promoting + Indicative	<i>C. albicans</i>

Test for growth promoting properties, liquid media: inoculate a portion of the appropriate medium with a small number (not more than 100 CFU) of the appropriate micro-organism. Incubate at the specified temperature for not more than the shortest period of time specified in the test. Clearly visible growth of the micro-organism comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs.

Test for growth promoting properties, solid media: perform surface-spread method, inoculating each plate with a small number (not more than 100 CFU) of the appropriate micro-organism. Incubate at the specified temperature for not more than the shortest period of time specified in the test. Growth of the micro-organism comparable to that previously obtained with a previously tested and approved batch of medium occurs.

Test for inhibitory properties, liquid or solid media: inoculate the appropriate medium with at least 100 CFU of the appropriate micro-organism. Incubate at the specified temperature for not less than the longest period of time specified in the test. No growth of the test micro-organism occurs.

Test for indicative properties : perform surface-spread method, inoculating each plate with a small number (not more than 100 CFU) of the appropriate micro-organism. Incubate at the specified temperature for a period of time within the range specified in the test. Colonies are comparable in appearance and indication reactions to those previously obtained with a previously tested and approved batch of medium.

3-4 SUITABILITY OF THE TEST METHOD

For each product to be tested perform sample preparation as described in the relevant paragraph in section 4. Add each test strain at the time of mixing, in the prescribed growth medium. Inoculate the test strains individually. Use a number of micro-organisms equivalent to not more than 100 CFU in the inoculated test preparation.

Perform the test as described in the relevant paragraph in section 4 using the shortest incubation period prescribed.

The specified micro-organisms must be detected with the indication reactions as described in section 4.

Any antimicrobial activity of the product necessitates a modification of the test procedure (see 4-5-3 of *Microbial Enumeration Tests*).

If for a given product the antimicrobial activity with respect to a micro-organism for which testing is prescribed cannot be neutralised, then it is to be assumed that the inhibited micro-organism will not be present in the product.

4 TESTING OF PRODUCTS

4-1 Bile-tolerant gram-negative bacteria

4-1-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare a sample using a 1 in 10 dilution of not less than 1 g of the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests*, but using *casein soya bean digest broth* as the chosen diluent, mix and incubate at 20 – 25°C for a time sufficient to resuscitate the bacteria but not sufficient to encourage multiplication of the organisms (usually 2 hours but not more than 5 hours).

4-1-2 Test for absence

Unless otherwise prescribed use the volume corresponding to 1g of the product, as prepared in 4-1-1 to inoculate *enterobacteria enrichment broth-Mossel*. Incubate at 30 – 35°C for 24 – 48 hours. Subculture on plates of *violet red bile glucose agar*. Incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

The product complies with the test if there is no growth of colonies.

4-1-3 Quantitative test

4-1-3-1 Selection and subculture

Inoculate suitable quantities of *enterobacteria enrichment broth-Mossel* with the preparation as described under 4-1-1 and/or dilutions of it containing respectively 0.1 g, 0.01 g and 0.001 g (or 0.1 mL, 0.01 mL and 0.001 mL) of the product to be examined. Incubate at 30 – 35°C for 24 – 48 hours. Subculture each of the cultures on a plate of *violet red bile glucose agar*. Incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

4-1-3-2 Interpretation

Growth of colonies constitutes a positive result. Note the smallest quantity of the product that gives a positive result and the largest quantity that gives a negative result. Determine from Table 4.05- II -2 the probable number of bacteria.

Table 4.05- II -2 Interpretation of results

Results for each quantity of product			Probable number of bacteria per gram or mL of product
0.1 g or 0.1 mL	0.01 g or 0.01 mL	0.001 g or 0.001 mL	
+	+	+	more than 10 ³
+	+	—	less than 10 ³ and more than 10 ²
+	—	—	less than 10 ² and more than 10
—	—	—	less than 10

4-2 *Escherichia coli*

4-2-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare a sample using a 1 in 10 dilution of not less than 1 g of the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests* and use 10 mL or the quantity corresponding to 1 g or 1 mL to inoculate a suitable amount (determined as described under 3-4) of *casein soya bean digest broth*, mix and incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

4-2-2 Selection and subculture

Shake the container, transfer 1 mL of *casein soya bean digest broth* to 100 mL of *MacConkey broth* and incubate at 42 – 44°C for 24 – 48 hours. Subculture on a plate of *MacConkey agar* at 30 – 35°C for 18 – 72 hours.

4-2-3 Interpretation

Growth of colonies indicates the possible presence of *E. coli*. This is confirmed by identification tests.

The product complies with the test if no colonies are present or if the identification tests are negative.

4-3 *Salmonella*

4-3-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests* and use the quantity corresponding to not less than 10 g or 10 mL to inoculate a suitable amount (determined as described under 3-4) of *casein soya bean digest broth*, mix and incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

4-3-2 Selection and subculture

Transfer 0.1 mL of *casein soya bean digest broth* to 10 mL of *Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth* and incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours. Subculture on plates of *xylose, lysine, deoxycholate agar*. Incubate at 30 – 35°C for 18 – 48 hours.

4-3-3 Interpretation

The possible presence of *Salmonella* is indicated by the growth of well-developed, red colonies, with or without black centres. This is confirmed by identification tests.

The product complies with the test if colonies of the types described are not present or if the confirmatory identification tests are negative.

4-4 *Pseudomonas aeruginosa*

4-4-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare a sample using a 1 in 10 dilution of not less than 1 g of the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests* and use 10 mL or the quantity corresponding to 1 g or 1 mL to inoculate a suitable amount (determined as described under 3-4) of *casein soya bean digest broth* and mix. When testing transdermal patches, filter the volume of sample corresponding to 1 patch of the preparation described in *Microbial enumeration tests* (4-5-1) through a sterile filter membrane and place in 100 mL of *casein soya bean digest broth*. Incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

4-4-2 Selection and subculture

Subculture on a plate of *cetrimide agar* and incubate at 30 – 35°C for 18 – 72 hours.

4-4-3 Interpretation

Growth of colonies indicates the possible presence of *P. aeruginosa*. This is confirmed by identification tests.

The product complies with the test if colonies are not present or if the confirmatory identification tests are negative.

4-5 *Staphylococcus aureus*

4-5-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare a sample using a 1 in 10 dilution of not less than 1 g of the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests* and use 10 mL or the quantity corresponding to 1 g or 1 mL to inoculate a suitable amount (determined as described under 3-4) of *casein soya bean digest broth* and homogenise. When testing transdermal patches, filter the volume of sample corresponding to 1 patch of the preparation described in *Microbial enumeration tests* (4-5-1) through a sterile filter membrane and place in 100 mL of *casein soya bean digest broth*. Incubate at 30 – 35°C for 18 – 24 hours.

4-5-2 Selection and subculture

Subculture on a plate of *mannitol salt agar* and incubate at 30 – 35°C for 18 – 72 hours.

4-5-3 Interpretation

The possible presence of *S. aureus* is indicated by the growth of yellow/white colonies surrounded by a yellow zone. This is confirmed by identification tests.

The product complies with the test if colonies of the types described are not present or if the confirmatory identification tests are negative.

4-6 *Clostridia*

4-6-1 Sample preparation and heat treatment

Prepare the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests*.

Take 2 equal portions corresponding to not less than 1 g or 1 mL of the product to be examined. Heat 1 portion at 80°C for 10 min and cool rapidly. Do not heat the other portion.

4-6-2 Selection and subculture

Transfer the quantity corresponding to 1 g or 1 mL of the product to be examined from each of the mixed portions to 2 containers (38 mm x 200 mm) or other containers containing 100 mL of *reinforced medium for Clostridia*. Incubate under anaerobic conditions at 30 – 35°C for 48 hours. After incubation, make subcultures from each tube on *Columbia agar* and incubate under anaerobic conditions at 30 – 35°C for 48 hours.

4-6-3 Interpretation

The occurrence of anaerobic growth of rods (with or without endospores) giving a negative catalase reaction indicates the presence of *Clostridia*.

If no anaerobic growth of micro-organisms is detected on *Columbia agar* or the catalase test is positive, the product complies with the test.

4-7 *Candida albicans*

4-7-1 Sample preparation and pre-incubation

Prepare the product to be examined as described in *Microbial enumeration tests* and use 10 mL or the quantity corresponding to not less than 1 g or 1 mL to inoculate 100 mL of *Sabouraud-dextrose broth* and mix. Incubate at 30 – 35°C for 3-5 days.

4-7-2 Selection and subculture

Subculture on a plate of *Sabouraud-dextrose agar* and incubate at 30 – 35°C for 24 – 48 hours.

4-7-3 Interpretation

Growth of white colonies may indicate the presence of *C. albicans*. This is confirmed by identification tests.

The product complies with the test if such colonies are not present or if the confirmatory identification tests are negative.

The following section is given for information.

5 RECOMMENDED SOLUTIONS AND CULTURE MEDIA

The following solutions and culture media have been found satisfactory for the purposes for which they are prescribed in the test for microbial contamination in the Pharmacopoeia. Other media may be used if they have similar growth promoting and inhibitory properties.

Stock buffer solution. Transfer 34 g of potassium dihydrogen phosphate to a 1000 mL volumetric flask, dissolve in 500 mL of purified water, adjust to pH 7.2 ± 0.2 with sodium hydroxide, add purified water to volume and mix. Dispense in containers and sterilize. Store at a temperature of 2 – 8°C.

Phosphate buffer solution pH 7.2

Prepare a mixture of purified water and stock buffer solution (800:1 V/V) and sterilize.

Buffered sodium chloride-peptone solution pH 7.0

Potassium dihydrogen phosphate	3.6 g
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	7.2 g equivalent to 0.067 mol phosphate
Sodium chloride	4.3 g
Peptone (meat or casein)	1.0 g
Purified water	1000 mL

Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Casein soya bean digest broth

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Papaic digest of soya bean	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5 g
Glucose monohydrate	2.5 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 7.3 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Casein soya bean digest agar

Pancreatic digest of casein	15.0 g
Papaic digest of soya bean	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar	15.0 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 7.3 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Sabouraud-dextrose agar

Glucose	40.0 g
Mixture of peptic digest of animal tissue and pancreatic digest of casein (1:1)	10.0 g
Agar	15.0 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 5.6 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Potato dextrose agar

Infusion from potatoes	200 g
Glucose	20.0 g
Agar	15.0 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 5.6 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Sabouraud- dextrose broth

Glucose	20.0 g
Mixture of peptic digest of animal tissue and pancreatic digest of casein (1:1)	10.0 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 5.6 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Enterobacteria enrichment broth-Mossel

Pancreatic digest of gelatin	10.0 g
Glucose monohydrate	5.0 g
Dehydrated ox bile	20.0 g
Potassium dihydrogen phosphate	2.0 g
Disodium hydrogen phosphate dihydrate	8.0 g
Brilliant green	15 mg
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after heating it is 7.2 ± 0.2 at 25°C . Heat at 100°C for 30 min and cool immediately.

Violet red bile glucose agar

Yeast extract	3.0 g
Pancreatic digest of gelatin	7.0 g
Bile salts	1.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Glucose monohydrate	10.0 g
Agar	15.0 g
Neutral red	30 mg
Crystal violet	2 mg
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after heating it is 7.4 ± 0.2 at 25°C . Heat to boiling; do not heat in an autoclave.

MacConkey broth

Pancreatic digest of gelatin	20.0 g
Lactose monohydrate	10.0 g
Dehydrated ox bile	5.0 g
Bromocresol purple	10 mg
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 7.3 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

MacConkey agar

Pancreatic digest of gelatin	17.0 g
Peptones (meat and casein)	3.0 g
Lactose monohydrate	10.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Bile salts	1.5 g
Agar	13.5 g
Neutral red	30.0 mg
Crystal violet	1 mg
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after sterilization it is 7.1 ± 0.2 at 25°C . Boil for 1 min with constant shaking then sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth

Soya peptone	4.5 g
Magnesium chloride hexahydrate	29.0 g
Sodium chloride	8.0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	0.4 g
Potassium dihydrogen phosphate	0.6 g
Malachite green	36 mg
Purified water	1000 mL

Dissolve, warming slightly. Sterilize in an autoclave using a validated cycle, at a temperature not exceeding 115°C . The pH is to be 5.2 ± 0.2 at 25°C after heating and autoclaving.

Xylose, lysine, deoxycholate agar

Xylose	3.5 g
L-Lysine	5.0 g
Lactose monohydrate	7.5 g
Sucrose	7.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Phenol red	80 mg
Agar	13.5 g
Sodium deoxycholate	2.5 g
Sodium thiosulfate	6.8 g
Ammonium iron (III) citrate	0.8 g
Purified water	1000 mL

Adjust the pH so that after heating it is 7.4 ± 0.2 at 25°C . Heat to boiling, cool to 50°C and pour into Petri dishes. Do not heat in an autoclave.

Cetrimide agar

Pancreatic digest of gelatin	20.0 g
Magnesium chloride	1.4 g
Dipotassium sulfate	10.0 g
Cetrimide	0.3 g
Agar	13.6 g
Purified water	1000 mL
Glycerol	10.0 mL

Heat to boiling for 1 min with shaking. Adjust the pH so that after sterilization it is 7.2 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Mannitol salt agar

Pancreatic digest of casein	5.0 g
Peptic digest of animal tissue	5.0 g
Beef extract	1.0 g
D-Mannitol	10.0 g
Sodium chloride	75.0 g
Agar	15.0 g
Phenol red	25 mg
Purified water	1000 mL

Heat to boiling for 1 min with shaking. Adjust the pH so that after sterilization it is 7.4 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Reinforced medium for Clostridia

Beef extract	10.0 g
Peptone	10.0 g
Yeast extract	3.0 g
Soluble starch	1.0 g
Glucose monohydrate	5.0 g
Cysteine hydrochloride	0.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium acetate	3.0 g
Agar	0.5 g
Purified water	1000 mL

Hydrate the agar, dissolve by heating to boiling with continuous stirring. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is about 6.8 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle.

Columbia agar

Pancreatic digest of casein	10.0 g
Meat peptic digest	5.0 g
Heart pancreatic digest	3.0 g
Yeast extract	5.0 g
Corn starch	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Agar, according to gelling power	10.0 g to 15.0 g
Purified water	1000 mL

Hydrate the agar, dissolve by heating to boiling with continuous stirring. If necessary, adjust the pH so that after sterilization it is 7.3 ± 0.2 at 25°C . Sterilize in an autoclave using a validated cycle. Allow to cool to $45 - 50^{\circ}\text{C}$; add, where necessary, gentamicin sulfate corresponding to 20 mg of gentamicin base and pour into Petri dishes.

12. Microbial Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Products

This test is harmonized with the European Pharmacopoeia and the U.S. Pharmacopeia. The parts of the text that are not harmonized are marked with symbols (♦ ◆).

The presence of certain micro-organisms in non-sterile preparations may have the potential to reduce or even inactivate the therapeutic activity of the product and has a potential to adversely affect the health of the patient. Manufacturers have therefore to ensure a low bioburden of finished dosage forms by implementing current guidelines on Good Manufacturing Practice during the manufacture, storage and distribution of pharmaceutical preparations. ♦ This chapter provides guidelines for acceptable limits of viable micro-organisms (bacteria and fungi) existing in raw materials and nonsterile pharmaceutical products. ◆ Microbial examination of non-sterile products is performed according to the methods given in Microbiological Examination of Non-sterile Products <4.05> on *Microbial Enumeration Tests* and *Tests for Specified Micro-organisms*. ♦ When these tests are carried out, a microbial control program must be established as an important part of the quality management system of the product. Personnel responsible for conducting the tests should have specialized training in microbiology, biosafety measures and in the interpretation of the testing results. ◆

♦1. Definitions

- 1.1 Non-sterile pharmaceutical products: Non-sterile drugs shown in monographs of the JP and non-sterile finished dosage forms.
- 1.2 Raw materials: All materials, including raw ingredients and excipients, used for the preparation of drugs, except for water and gases.
- 1.3 Bioburden: Number and type of viable micro-organisms existing in non-sterile pharmaceutical products.
- 1.4 Action levels: Established bioburden levels that require immediate follow-up and corrective action if they are exceeded.
- 1.5 Alert levels: Established bioburden levels that give early warning of a potential drift from normal bioburden level, but which are not necessary grounds for definitive corrective action, though they may require follow-up investigation.
- 1.6 Quality management system: The procedures, operation methods and organizational structure of a manufacturer (including responsibilities, authorities and relationships between these) needed to implement quality management.

2. Scope

In general, the test for total viable aerobic count is not applied to drugs containing viable micro-organisms as an active ingredient.

3. Sampling plan and frequency of testing

3.1 Sampling methods

Microbial contaminants are usually not uniformly distributed throughout the batches of non-sterile pharmaceutical products or raw materials. A biased sampling plan, therefore, cannot be used to estimate the real bioburden in the product. A sampling plan which can properly reflect the status of the product batch should be established on the basis of the bioburden data obtained by retrospective validation and/or concurrent validation. In general, a mixture of samples randomly taken from at least different three portions, almost the same amount for each portion, is used for the tests of the product. When the sampling is difficult in a clean area, special care is required during sampling to avoid introducing microbial contamination into the product or affecting the nature of the product bioburden. If it is confirmed that the product bioburden is stable for a certain period, as in the case of non-aqueous or dried products, it is not necessary to do the tests, immediately after the sampling.

3.2 Testing frequency

The frequency of the tests should be established on the basis of a variety of factors unless otherwise specified. These factors include:

- a) Dosage forms of non-sterile pharmaceutical products (usage);
- b) Manufacturing processes;
- c) Manufacturing frequency;
- d) Characteristics of raw materials (natural raw material, synthetic compound, etc.);
- e) Batch sizes;

- f) Variations in bioburden estimates (changes in batches, seasonal variations, etc.);
- g) Changes affecting the product bioburden (changes in manufacturing process, supplier of raw materials, batch number of raw materials, etc.);
- h) Others.

In general, the tests may be performed at a high frequency during the initial production of a drug to get information on the microbiological attributes of the product or raw materials used for the production. However, this frequency may be reduced as bioburden data are accumulated through retrospective validation and/or concurrent validation. For example, the tests may be performed at a frequency based on time (e.g., weekly, monthly or seasonally), or on alternate batches.

4. Microbial control program

When the “Microbiological Examination of Non-Sterile Products <4.05>” is applied to a non-sterile pharmaceutical product, the methods for the recovery, cultivation and estimation of the bioburden from the product must be validated and a “Microbial control program” covering the items listed below must be prepared.

- a) Subject pharmaceutical name (product name);
- b) Frequency of sampling and testing;
- c) Sampling methods (including responsible person, quantity, environment, etc. for sampling);
- d) Transfer methods of the samples to the testing area (including storage condition until the tests);
- e) Treatment of the samples (recovery methods of microbial contaminants);
- f) Enumeration of viable micro-organisms (including testing quantity, culture media, growth-supporting test of the media, culturing methods, etc.);
- g) Detection of specified micro-organisms (including testing quantity, culture media, growth-supporting test of the media, culturing methods, etc.);
- h) Estimation of the number of and characterization of microbial contaminants;
- i) Establishment of “Microbial acceptance criteria” (including alert level and action level);
- j) Actions to be taken when the levels exceed “Microbial acceptance criteria”;
- k) Persons responsible for the testing and evaluation, etc.;
- l) Other necessary items.

5. Microbial acceptance criteria for non-sterile pharmaceutical products

By establishing “Microbial acceptance criteria” for non-sterile pharmaceutical products based upon the total aerobic microbial count (TAMC) and the total combined yeasts/moulds count (TYMC), it is possible to evaluate at the initial processing stage of the product whether the microbiological quality of the raw materials is adequate or not. Furthermore, it is then possible to implement appropriate corrective action as needed to maintain or improve the microbiological quality of the product. The target limits of microbial levels for raw materials (synthetic compounds and minerals) are shown in Table 1.

In general, synthetic compounds have low bioburden levels due to the high temperatures, organic solvents, etc., used in their manufacturing processes. Raw materials originated from plants and animals in general have higher bioburdens than synthetic compounds.

The microbial quality of the city water or purified water used in the processing of active ingredients or non-sterile pharmaceuticals may have a direct effect on the quality of the finished dosage form. This means it is necessary to keep the level of microbial contaminants in the water as low as possible.

Acceptance criteria for microbiological quality for non-sterile finished dosage forms are shown in Table 2. These microbial limits are based primarily on the type of dosage form, water activity, and so on. For oral liquids and pharmaceutical products having a high water activity, in general, low microbial acceptance criteria are given.

Table 1. Acceptance criteria for Microbiological Quality of Non-Sterile Substances for Pharmaceutical use

	Total Aerobic Microbial Count (CFU/g or CFU/ mL)	Total Combined Yeasts/Moulds Count (CFU/g or CFU/ mL)
Substances for pharmaceutical use	10 ³	10 ²

Table 2 includes a list of specified micro-organisms for which acceptance criteria are set. The list is not necessarily exhaustive and for a given preparation it may be necessary to test for other micro-organisms depending on the nature of the starting materials and the manufacturing process.

Table 2. – Acceptance criteria for microbiological quality of non-sterile dosage forms

Route of administration	Total Aerobic Microbial Count (CFU/g or CFU/ mL)	Total Combined Yeasts/Moulds Count (CFU/g or CFU/ mL)	Specified Micro-organism
Non-aqueous preparations for oral use	10 ³	10 ²	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Aqueous preparations for oral use	10 ²	10 ¹	Absence of <i>Escherichia coli</i> (1 g or 1 mL)
Rectal use	10 ³	10 ²	—
Oromucosal use	10 ²	10 ¹	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL)
Gingival use			Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL)
Cutaneous use			
Nasal use			
Auricular use			
Vaginal use	10 ²	10 ¹	Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Candida albicans</i> (1 g or 1 mL)
Transdermal patches (limits for one patch including adhesive layer and backing)	10 ²	10 ¹	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 patch) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 patch)
Inhalation use (special requirements apply to liquid preparations for nebulization)	10 ²	10 ¹	Absence of <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g or 1 mL) Absence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g or 1 mL) Absence of bile-tolerant gram-negative bacteria (1g or 1 mL)

If it has been shown that none of the prescribed tests will allow valid enumeration of micro-organisms at the level prescribed, a validated method with a limit of detection as close as possible to the indicated acceptance criterion is used.

In addition to the micro-organisms listed in Table 2, the significance of other micro-organisms recovered should be evaluated in terms of:

- the use of the product: hazard varies according to the route of administration (eye, nose, respiratory tract);
- the nature of the product: does the product support growth, does it have adequate antimicrobial preservation?
- the method of application;
- the intended recipient: risk may differ for neonates, infants, the debilitated
- use of immunosuppressive agents, corticosteroids;
- presence of disease, wounds, organ damage.

Where warranted, a risk-based assessment of the relevant factors is conducted by personnel with specialized training in microbiology and the interpretation of microbiological data. For raw materials, the assessment takes account of processing to which the product is subjected, the current technology of testing and the availability of materials of the

desired quality. Acceptance criteria are based on individual results or on the average of replicate counts when replicate counts are performed (e.g. direct plating methods).

When an acceptance criterion for microbiological quality is prescribed it is interpreted as follows:

- 10^1 CFU: maximum acceptable count = 20,
- 10^2 CFU: maximum acceptable count = 200,
- 10^3 CFU: maximum acceptable count = 2000, and so forth.

♦6. Acceptance criteria for herbal drugs

Target limits of microbial contamination for herbal drugs and herbal drug containing preparations are shown in Table 3. Category 1 indicates herbal drugs and their preparations to which boiling water is added before use, and category 2 indicates other herbal drugs and their preparations. In this guideline, enterobacteria and other gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus* are mentioned as specified micro-organisms, but other micro-organisms such as certain species of *Bacillus cereus*, *Clostridia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Aspergillus* and *Enterobacter species* are also necessary to be tested depending on the origin of the herbal drug raw materials or the preparation method of the preparations. ♦

♦Table 3. Acceptance criteria for herbal drugs and their preparations

Micro-organisms	Category 1 (CFU/g or CFU/ mL)	Category 2 (CFU/g or CFU/ mL)
Aerobic bacteria	10^7	10^5
Molds and yeasts	10^4	10^3
Enterobacteria and other gram-negative bacteria	※	10^3
<i>Escherichia coli</i>	10^2	Not detected
<i>Salmonella</i>	Not detected	Not detected
<i>Staphylococcus aureus</i>	※	※

※ : The limits are not specified. ♦

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 °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、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ソ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、希釈又ははる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

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容容器から、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。

経皮吸取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 °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 °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を検出されても、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

集落を検出されても、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。

- 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 °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 時間嫌氣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 °C 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ヨン培地に接種する。30 ~ 35 °C 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 °C 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ヨン培地に接種する。30 ~ 35 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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 °C 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. クロストリジウム

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、強化クロストリジウム培地 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、コロム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。

コロム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・アルビカンズ

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℃ 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-I-1 試験菌の調製と使用方法

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NBRC 13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤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・ダイジエストックカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤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・ダイジエストックカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 30 ~ 35 °C 18 ~ 24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジエストックカンテン培地/MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジエストック培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤3 日間	
<i>Candida albicans</i>	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・ダイジエストックカンテン培地 ≤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・ダイジエストックカンテン培地 ≤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	ソイビーコン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地	サブロー・ブドウ糖カンテン培地	ソイビーコン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地	サブロー・ブドウ糖カンテン培地
	≤100 CFU 20 ~ 25 °C 5 ~ 7 日間, 又は良好な胞子形成が認められるまで	≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤5 日間	≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤5 日間 MPN: 適用せず	≤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, バ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, バ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	
+	+	+	10^3 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

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。

合成及び動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的活性を有するのか

れとも十分な抗菌的活性を有するのか

- ・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。

- 10¹ CFU：最大許容値 = 20,
- 10² CFU：最大許容値 = 200,
- 10³ 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 ³	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 ³	
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			
膣	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 (粘着層及び支持材を含む 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 ⁵
真菌	10 ⁴	10 ³
腸内細菌とその他のグラム陰性菌	※	10 ⁷
大腸菌	10 ³	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、三薬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。