5.02 生薬の微生物限度試験法を次のように改める.

5.02　生薬及び生薬関連製剤の微生物限度試験法

生薬及び生薬関連製剤の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. 生菌数試験

本試験は，好気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．

本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．

1.　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．

2.　生菌数測定法

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．

3.　培地性能，測定法の適合性及び陰性対照

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．

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．細菌及び真菌の各試験菌について，表5.02－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 brasiliensis*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 %加えてもよい．懸濁液は2時間以内，又は2～8 ℃に保存する場合は24時間以内に用いる．*Aspergillus brasiliensis*又は*Bacillus subtilis*の栄養型細胞の新鮮懸濁液を調製して希釈する代わりに，胞子懸濁液又は芽胞懸濁液を調製し，接種菌液として使用できる．それぞれの懸濁液は，保証された期間内は2～8 ℃で保存できる．

表5.02－Ⅰ－1　試験菌の調製と使用法

微生物	試験菌の調製	培地性能		製品存在下での生菌数測定法の適合性	
		総好気性微生物数	総真菌数	総好気性微生物数	総真菌数
Staphylococcus aureus 例えば，ATCC 6538，NCIMB 9518，CIP 4.83 又は NBRC 13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30～35 ℃ 18～24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地* 及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地／MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間	
Pseudomonas aeruginosa 例えば，ATCC 9027，NCIMB 8626，CIP 82.118 又は NBRC 13275	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30～35 ℃ 18～24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地／MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間	
Bacillus subtilis 例えば，ATCC 6633，NCIMB 8054，CIP 52.62 又は NBRC 3134	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 30～35 ℃ 18～24 時間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦3 日間		ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地／MPN ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間	
Candida albicans 例えば，ATCC 10231，NCPF 3179，IP 48.72 又は NBRC 1594	サブロー・ブドウ糖カンテン培地又はサブロー・ブドウ糖液体培地 20～25 ℃ 2～3 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間	抗生物質添加サブロー・ブドウ糖培地 ≦100 CFU 20～25 ℃ ≦5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間 MPN：適用せず	抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≦100 CFU 20～25 ℃ ≦5 日間

Aspergillus brasiliensis 例えば，ATCC 16404，IMI 149007，IP 1431.83 又は NBRC 9455	サブロー・ブドウ糖カンテン培地又はポテト・デキストロースカンテン培地 20～25 ℃ 5～7 日間，又は良好な胞子形成が認められるまで	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間	抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≦100 CFU 20～25 ℃ ≦5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≦100 CFU 30～35 ℃ ≦5 日間 MPN：適用せず	抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≦100 CFU 20～25 ℃ ≦5 日間

* TTC試液又はアムホテリシンB試液を添加する場合は添加剤を加えた培地について確認する．アムホテリシンB試液を添加する場合は *C.albicans* 及び *A.brasiliensis* は実施不要．

3.2. 陰性対照

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

3.3. 培地性能

市販生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5.02－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5.02－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が認められる．

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る．

3.4. 製品存在下での測定法の適合性

3.4.1. 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．以下に記載した方法が満足できるものでない場合は，別な方法を確立する．

試料の分散又は希釈には，pH 7.2のリン酸緩衝液，pH 7.0のペプトン食塩緩衝液又は使用する液体培地を用いる．別に規定するもののほか，通例，試料10 g又は10 mLを量り，上記の緩衝液又は液体培地90 mL中に振り混ぜ分散又は溶解する．分散又は溶解した試料は，更に，10分間混和する．なお，付着菌の回収率の低いものについては同様の操作を繰り返し，試料溶液とする．試料の性質によっては，規定された量よりも大量の緩衝液又は液体培地中に分散させるか，異なる量の試料を使用しなければならない場合がある．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．必要に応じてブレンダーなどで浮遊液を均一に分散させることも可能である．

3.4.2. 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3.4.1.で調製した試料液及び対照(試料を含まない)に加える．

接種する試験菌懸濁液の量は，試料液量の1 %を超えてはならない．

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

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

3.4.3. 抗菌活性の中和／除去

3.4.2.及び3.4.4.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)上記の手段の組合せが含まれる．

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．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，その製品の持つ殺菌活性のために，接種菌が分離できないとみなす．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．

3.4.4. 製品存在下での微生物回収

表5.02－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．

3.4.4.1. 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5.02－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．

3.4.1.～3.4.3.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，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)測定用として抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す．表5.02－Ⅰ－1に示した条件で平板を培養後，集落数を測定する．

3.4.4.2. 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．

（ｉ） 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，3.4.1.～3.4.3.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 ℃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抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地で混和する．ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地には，試料中に混在する生薬の組織片などへの対応や真菌の増殖をできるだけ抑制する目的から，好気性細菌染色色素TTC試液や抗真菌剤アムホテリシンB試液を培地に添加することができる．TTC試液及びアムホテリシンB試液は，滅菌したカンテン培地へ使用直前に1 L当たりTTC試液2.5～5 mL，アムホテリシンB試液2 mLを添加し，混和する．抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地においては，かびがカンテン培地上に拡散する場合は，ローズベンガル試液を培地に添加することができる．ローズベンガル試液は，カンテン培地1 L当たり5 mLを添加し，混和後，確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する．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5.02－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5.02－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．

信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り，定められた培養日数以前の計測値を採用してもよい．

（ⅱ）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抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地を約45 ℃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．使用カンテン培地の添加試薬などは，カンテン平板混釈法と同様である．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5.02－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．3.4.1.～3.4.3.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．3.4.4.2.(ｉ)の規定どおりに培養し，測定する．

3.4.4.3. 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．

3.4.1.～3.4.3.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 ℃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5.02－Ｉ－2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．

表5.02－Ｉ－2　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合せ 試験管当たりの製品のg又はmL数			製品1 g又は1 mL当たりの最確数	95 %信頼限界
0.1	0.01	0.001		
0	0	0	＜3	0 － 9.4
0	0	1	3	0.1－ 9.5
0	1	0	3	0.1－ 10
0	1	1	6.1	1.2－ 17
0	2	0	6.2	1.2－ 17
0	3	0	9.4	3.5－ 35
1	0	0	3.6	0.2－ 17
1	0	1	7.2	1.2－ 17
1	0	2	11	4 － 35
1	1	0	7.4	1.3－ 20
1	1	1	11	4 － 35
1	2	0	11	4 － 35
1	2	1	15	5 － 38
1	3	0	16	5 － 38
2	0	0	9.2	1.5－ 35
2	0	1	14	4 － 35
2	0	2	20	5 － 38
2	1	0	15	4 － 38
2	1	1	20	5 － 38
2	1	2	27	9 － 94
2	2	0	21	5 － 40
2	2	1	28	9 － 94
2	2	2	35	9 － 94
2	3	0	29	9 － 94
2	3	1	36	9 － 94
3	0	0	23	5 － 94
3	0	1	38	9 － 104
3	0	2	64	16 － 181
3	1	0	43	9 － 181
3	1	1	75	17 － 199
3	1	2	120	30 － 360
3	1	3	160	30 － 380
3	2	0	93	18 － 360
3	2	1	150	30 － 380
3	2	2	210	30 － 400
3	2	3	290	90 － 990
3	3	0	240	40 － 990
3	3	1	460	90 －1980
3	3	2	1100	200 －4000
3	3	3	＞1100	

3.5. 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，3.4.2.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．

4. 製品の試験

4.1. 試験試料の採取と調製

生薬又は製剤の収納容器から，無作為に試料を選び出す．必要量の試料を得るために，十分な数の容器の内容物を混合する．

別に規定するもののほか，次の方法によって試料を採取し，測定用の試料を調製する．

（ⅰ） 小形の生薬，切断生薬及び粉末生薬は，よくかき混ぜた後，試料50～250 gを採取する．

（ⅱ） 大形の生薬はよくかき混ぜた後，試料250～500 gを採取し，切断生薬を調製する．

（ⅲ） 1個の質量が100 g以上の生薬は5個以上を採取し，試料とするか，又は生薬を適当な大きさに切断してよくかき混ぜた後，試料500 g以上を採取し，必要に応じて切断生薬を調製する．

（ⅳ） 液状の生薬又は製剤，固形の生薬又は製剤は混和した後採取する．

4.2. 製品の試験

4.2.1. 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．

3.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の測定のために抗生物質添加サブロー・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 ℃で5～7日間，抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地を20～25 ℃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．

4.2.2. カンテン平板法

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

（ⅱ） カンテン平板表面塗抹法：3.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．

4.2.3. 最確数法

1.3.に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製し，希釈する．全ての試験管を30～35 ℃で3～5日間培養する．必要ならば，適合性が示された方法で移植培養する．希釈段階ごとに，微生物の増殖が認められる試験管数を記録する．

表5.02－Ⅰ－2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．

4.3. 結果の判定

ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を使用して測定される集落数を，総好気性微生物数(TAMC)とする．この培地上に真菌の集落が検出されても，TAMCとして測定する．抗生物質添加サブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用して測定される集落数を，総真菌数(TYMC)とする．この培地上に細菌の集落が検出されても，TYMCとして測定する．

MPN法で計測を行う場合は，算出値はTAMCとする．

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. 特定微生物試験

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．

本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．

1. 基本手順

試料の調製は，「Ⅰ.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，「Ⅰ.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，「Ⅰ.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．

なお，試料の発育阻止物質の除去や分散性を考慮して，試料量と培地量を適宜，調整することができる．

2. 培地性能，試験法の適合性及び陰性対照

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

2.1. 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．

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 ℃で18～24時間培養する．

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，

試験菌懸濁液の調製には，pH 7.0のペプトン食塩緩衝液又

はpH 7.2のリン酸緩衝液を用いる．懸濁液は2時間以内，又は2～8 ℃に保存する場合は24時間以内に用いる．

2.2. 陰性対照

試験状態を確認するために，試料液の代わりに使用した希釈液を用いて陰性対照試験を実施する．微生物の発育があってはならない．微生物の発育が認められた場合には，原因調査が必要である．また，陰性対照試験は「3.製品の試験」においても実施する．

2.3. 培地性能

市販生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5.02－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．

(ⅰ) 液体培地の発育促進特性試験：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．

(ⅱ) 固体培地の発育促進特性試験：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．

(ⅲ) 液体又は固体培地の選択特性試験：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．

(ⅳ) 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．

2.4. 試験法の適合性

被験製品ごとに，3.の関連段落に記載されたとおりに試料を調製する．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．

3.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，3.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(「Ⅰ.生菌数試験」の3.4.3.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みなしてよい．

表5.02－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	*E.coli* 及び *P.aeruginosa*
	選択	*S.aureus*
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	*E.coli* 及び *P.aeruginosa*
大腸菌試験		
マッコンキー液体培地	発育促進	*E.coli*
	選択	*S.aureus*
マッコンキーカンテン培地	発育促進及び鑑別	*E.coli*
大腸菌用の酵素基質培地	発育促進及び鑑別	*E.coli*
サルモネラ試験		
ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地	発育促進	*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium 又は *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Abony
	選択	*S.aureus*
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	*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium 又は *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Abony
サルモネラ用の酵素基質培地	発育促進及び鑑別	*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium 又は *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Abony
黄色ブドウ球菌試験		
フォーゲル・ジョンソンカンテン培地	発育促進及び鑑別	*S.aureus*
	選択	*E.coli*
ベアード・パーカーカンテン培地	発育促進及び鑑別	*S.aureus*
	選択	*E.coli*
マンニット・食塩カンテン培地	発育促進及び鑑別	*S.aureus*
	選択	*E.coli*

3. 製品の試験

3.1. 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌

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

3.1.2. 選択培養

3.1.1.に記載されている調製液及び／又はその希釈液であって，それぞれ被験製品の0.1 g，0.01 g，0.001 g，0.0001 g(又は0.1 mL，0.01 mL，0.001 mL，0.0001 mL)相当量を含む4濃度中連続する3濃度の希釈液を目標とする許容限度に応じて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 ℃で24～48時間培養後，バイオレット・レッド・胆汁酸・

ブドウ糖カンテン培地に各培養液を移植し，30～35 ℃で18～24時間培養する．

3.1.3. 判定

通例，赤又は赤味がかった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5.02－Ⅱ－2から胆汁酸抵抗性グラム陰性菌の推定数を求める．

表5.02－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	0.0001 g 又は 0.0001 mL	
＋	＋	＋	＋	10^4より大きい
＋	＋	＋	－	10^4より小さく，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

3.2. 大腸菌

3.2.1. 定性試験

3.2.1.1. 試料調製及び前培養

被験製品を1 g以上採り，「Ⅰ.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(2.4.で決定した)適切な量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種し，混合後，30～35 ℃で18～24時間培養する．

3.2.1.2. 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10 mLに接種する．44±0.5 ℃で24～48時間培養後，マッコンキーカンテン培地に移植し，30～35 ℃で18～72時間培養する．マッコンキーカンテン培地にかえて，CHEカンテン培地やESC培地などの適当な大腸菌試験用の酵素基質培地を用いることができる．酵素基質培地を用いる場合は，培地ごとに指定された条件で培養する．

3.2.1.3. 判定

マッコンキーカンテン培地で，周囲に赤みがかかった沈降線の帯を持つ赤レンガ色の集落の発育が認められた場合，又は酵素基質培地で大腸菌に該当する性状を示す集落又は反応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．

大腸菌に該当する性状を示す集落又は反応が認められないか，又は同定試験において陰性と判定された場合には，その製品は本試験に適合する．

3.2.2. 定量試験

3.2.2.1. 試料調製及び前培養

「Ⅰ.生菌数試験」に記載したように調製した10倍希釈液より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，(2.4.で決定した)適切な量のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に接種し，混合後，30～35 ℃で18～24時間培養する．

3.2.2.2. 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10 mLに接種する．44±0.5 ℃で24～48時間培養後，マッコンキーカンテン培地に移植し，30～35 ℃で18～72時間培養する．マッコンキーカンテン培地にかえて，CHEカンテン培地やESC培地などの適当な大腸菌試験用の酵素基質培地を用いることができる．酵素基質培地を用いる場合は，培地ごとに指定された条件で培養する．

3.2.2.3. 判定

マッコンキーカンテン培地で周囲に赤みがかかった沈降線の帯を持つ赤レンガ色の集落の発育が認められた場合，又は酵素基質培地での大腸菌に該当する性状を示す集落又は反応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．

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5.02－Ⅱ－3から大腸菌の推定数を求める．

表5.02－Ⅱ－3　結果の判定

製品の各量に対する結果			製品1g又は1mL 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

3.3. サルモネラ

3.3.1. 試料調製及び前培養

被験製品を10 g又は10 mL採り，(2.4.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 ℃で18～24時間培養する．

3.3.2. 選択培養

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地0.1 mLをラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地10 mLに接種する．42±0.5 ℃で18～24時間培養後，XLDカンテン培地に移植し，30～35 ℃で18～48時間培養する．XLDカンテン培地にかえて，CHSカンテン培地やESⅡカンテン培地などの適当な酵素基質培地を用いることができる．酵素基質培地を用いる場合は，培地ごとに指定された条件で培養する．

3.3.3. 判定

XLDカンテン培地で中心部の黒点の有無に関わらず十分に発育した赤色集落が認められた場合，又は酵素基質培地でサルモネラに該当する性状を示す集落の反応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又は反応が認められないか，又は同定試験において陰性と判定された場合には，その製品は本試験に適合する．

3.4. 黄色ブドウ球菌

3.4.1. 試料調製及び前培養

被験製品を1 g以上採り，「Ⅰ.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(2.4.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 ℃で18～24時間培養する．

3.4.2. 選択増菌培養

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地1 mLを9 mLの7.5 %食塩加ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地に加え30～35 ℃で24～48時間培養する．

3.4.3. 選択培養

増殖が見られた場合は，培養液から1白金耳をフォーゲル・ジョンソンカンテン培地，ベアード・パーカーカンテン培地又

はマンニット・食塩カンテン培地のいずれかの上に塗抹し，30～35 ℃で24～48時間培養する．

3.4.4. 判定

表5.02－Ⅱ－4に示す特徴を持った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．

表5.02－Ⅱ－4　選択培地上における黄色ブドウ球菌の形態学的特徴

培地	集落の特徴
フォーゲル・ジョンソンカンテン培地	黄色の帯に囲まれた黒色
ベアード・パーカーカンテン培地	透明な帯に囲まれた黒色，光沢あり
マンニット・食塩カンテン培地	黄色の帯に囲まれた黄色

なお、以下のセクションは情報提供を目的に記載する．

4. 推奨される溶液培地及び試薬

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

（ⅰ） 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．

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を加えて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 ℃で保存する．

（ⅱ） 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	7.2 g
(リン酸塩 0.067 mol に相当する)	
塩化ナトリウム	4.3 g
ペプトン(肉製又はカゼイン製)	1.0 g
水	1000 mL

確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する．

（ⅲ） 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 ℃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．

（ⅳ） 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 ℃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．

（ⅴ） 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 ℃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．使用直前に培地1 L当たりベンジルペニシリンカリウム0.10 gとテトラサイクリン0.10 gを滅菌溶液として加える．ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地1 L当たりクロラムフェニコール50 mgを高圧蒸気滅菌前に加えてもよい．

（ⅵ） 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 ℃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．

（ⅶ） 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 ℃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．

（ⅷ） 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
ブリリアントグリン	15 mg
水	1000 mL

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

（ⅸ） 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 ℃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．

（x） 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
ブロモクレゾールパープル	10 mg
水	1000 mL

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．

(xi) 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 ℃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．

(xii) ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地

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

若干加温しながら溶かし，115 ℃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 ℃で5.0～5.4になるようにする．

(xiii) XLD(キシロース・リシン・デソキシコール酸)カンテン培地

キシロース	3.5 g
L－リシン	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．

(xiv) CHEカンテン培地(クロモアガー*E.coli* カンテン培地)又は同等の評価が可能な酵素基質培地

ペプトン ／酵母エキス／肉エキス混合物	8.3g
選択剤と色素混合物	9.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

加熱後のpHが25 ℃で5.8～6.2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．

(xv) ESC培地(ESコリブルー培地)又は同等の評価が可能な酵素基質培地

ペプトン	5.0 g
硝酸カリウム	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ラウリル硫酸ナトリウム	0.1 g
ピルビン酸ナトリウム	1.0 g
イソプロピル－β－チオガラクトピラノシド	0.1 g
リン酸二水素カリウム	1.0 g
リン酸水素二カリウム	4.0 g
5－ブロモ－4－クロロ－3－インドリル－β－D－ガラクトピラノシド	0.1 g
4－メチルウンベリフェリル－β－D－グルクロニド	0.1 g
水	1000 mL

滅菌後のpHが25 ℃で6.9～7.3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．

(xvi) CHSカンテン培地(クロモアガーサルモネラカンテン培地)又は同等の評価が可能な酵素基質培地

ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.0 g
塩化ナトリウム	0.8 g
その他塩類	7.2 g
選択剤と色素混合物	4.9 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

加熱後のpHが25 ℃で7.4～7.8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．

(xvii) ESII カンテン培地(ES サルモネラカンテン培地II) 又は同等の評価が可能な酵素基質培地

ペプトン	10.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム	1.0 g
チオ硫酸ナトリウム	1.0 g
デオキシコール酸ナトリウム	1.0 g
D－マンニトール	15.0 g
ニュートラルレッド	0.03 g
合成酵素基質	0.45 g
ノボビオシン	0.02 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

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．50 ℃まで冷却してからペトリ皿に注ぎ込む．

(xviii)　7.5 %食塩加ソイビーン・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	75.0 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

(iii)のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地(5 g塩化ナトリウム含有)に塩化ナトリウム70.0 gを加え，全成分を混和し，滅菌後のpH 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．

(xix)　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．

(xx)　フォーゲル・ジョンソンカンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
酵母エキス	5.0 g
D－マンニトール	10.0 g
リン酸水素二カリウム	5.0 g
塩化リチウム	5.0 g
グリシン	10.0 g
フェノールレッド	25 mg
カンテン	16.0 g
水	1000 mL

全成分を混和した後，1分間煮沸して溶かす．滅菌後のpH 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後，45～50 ℃に冷却する．これに滅菌亜テルル酸カリウム溶液(1→100) 20 mLを加えて混和する．

(xxi)　ベアード・パーカーカンテン培地

カゼイン製ペプトン	10.0 g
肉エキス	5.0 g
酵母エキス	1.0 g
塩化リチウム	5.0 g
グリシン	12.0 g
焦性ブドウ酸ナトリウム	10.0 g
カンテン	20.0 g
水	950 mL

全成分を混和し，時々激しく振り混ぜながら加熱し，1分間煮沸する．滅菌後のpH 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後，45～50 ℃に冷却する．これに滅菌亜テルル酸カリウム溶液(1→100) 10 mLと卵黄乳濁液50 mLを加えて緩やかに混和した後，ペトリ皿に分注する．卵黄乳濁液は卵黄約30 %，生理食塩液約70 %の割合で混和して調製する．

試薬・試液

(i)　アムホテリシンB試液：アムホテリシンB粉末22.5 mgを滅菌精製水9 mLに溶かす．

アムホテリシンB粉末　アムホテリシンBにデオキシコール酸ナトリウムを加え，γ線滅菌したもの．

(ii)　TTC試液：2,3,5－トリフェニル－2*H*－テトラゾリウム塩酸塩0.8 gを水に溶かし，100 mLとする．小試験管などに小分けした後，確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する．遮光して保存する．

(iii)　ローズベンガル試液：ローズベンガル1 gを水に溶かし，100 mLとする．

ローズベンガル　$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$[特級]赤褐色の粉末で，水に溶けて紫赤色を示す．

調製法

(i)　TTC添加カンテン培地の調製：滅菌したカンテン培地1 L当たりTTC試液2.5～5 mL (20～40 mg/L)を使用直前に添加し，混和する．

(ii)　アムホテリシンB添加カンテン培地の調製：確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌したカンテン培地1 L当たりアムホテリシンB試液2 mL (5 mg/L)を使用直前に添加し，混和する．

(iii)　ローズベンガル試液添加カンテン培地の調製：カンテン培地1 L当たりローズベンガル試液5 mL (50 mg/L)を添加し，混和後，確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する．