

1 保存効力試験法

2 次のように改める。

3 保存効力試験法は、多回投与容器中に充填された製剤自体又
4 は製剤に添加された保存剤の効力を微生物学的に評価する方法
5 である^{1,2)}。製剤に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混
6 合し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力
7 を評価する。

8 汚染微生物の増殖には、製品中の水分活性が重要な役割を果
9 たしている。多回使用される医薬品では、使用される間に微生物
10 の二次汚染による変質・変敗を起こす可能性があり、微生物
11 汚染した医薬品を使用した場合は、薬効の低下のみならず汚染
12 微生物により感染症を引き起こす危険性も高くなる。これらの
13 ことから多回使用される医薬品には、日本薬局方製剤総則にお
14 いて保存剤の配合が認められている。

15 医薬品GMPに対応するために、又は単に生菌数(細菌数及び
16 真菌数)を抑制する目的のためだけに、保存剤を使用してはな
17 らない。保存剤は量によっては毒性を示すことから、ヒトへの
18 安全性に影響を及ぼすような量を製剤に添加してはならず、保
19 存剤の添加量を可能な限り少なくする配慮が必要である。本試
20 験は、一般に製剤の処方設計段階や定期的な保存効力の検証な
21 どに適用され、ロットの出荷判定試験としては行わないが、製
22 剤自体の抗菌作用又は製剤に添加された保存剤の効果は、製剤
23 の有効期間にわたって検証しなければならない。なお、抗菌性
24 保存剤含量の試験は、通常、出荷時に行う必要があるが、場合
25 によっては、出荷判定試験の代わりに製造工程管理試験として
26 行うことも可能である。

27 1. 製剤とそのカテゴリ

28 本試験を行うために、製剤を二つのカテゴリに分類する
29 (表1)。カテゴリⅠは水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られ
30 たもので、水分活性0.5以上の製品と定義する。カテゴリⅡ
31 は非水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られたものである。なお、
32 水中油型基剤を用いて作られたものはカテゴリⅠに、油中水
33 型基剤を用いて作られたものはカテゴリⅡに含まれる。

表1 製剤のカテゴリ

カテゴリー	製剤の種類
ⅠA	・注射剤 ・水性溶剤に溶解又は分散させた無菌の製剤(点眼剤, 点耳剤, 点鼻剤等)
ⅠB	・水性溶剤に溶解又は分散, 若しくは水溶性の基剤に混和させた非無菌の局所投与製剤(点耳剤, 点鼻剤, 吸入剤, その他粘膜に使用される製剤等を含む)
ⅠC	・水性溶剤に溶解又は分散, 若しくは水溶性の基剤に混和させた制酸剤以外の経口投与する製剤及び口腔内に適用する製剤
ⅠD	・水性溶剤又は水溶性の基剤で調製した制酸剤
Ⅱ	・非水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られた製剤で、カテゴリⅠに記載している全ての剤形を含む。

34 2. 試験菌株と培地

35 表2に示す菌株, 若しくはこれらと同等と考えられる菌株を
36 使用する。

表2 試験菌株と培養条件

試験菌株	株名	培地	培養温度	試験菌の培養期間
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 NBRC 3972	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30～35℃	18～24時間
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 NBRC 13275	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30～35℃	18～24時間
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 NBRC 13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30～35℃	18～24時間
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 NBRC 1594	サブロー・ブドウ糖液体培地 サブロー・ブドウ糖カンテン培地	20～25℃	44～52時間
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 NBRC 9455	サブロー・ブドウ糖カンテン培地	20～25℃	6～10日間

37 これらの指定菌株に加えて、製剤の性質により混入して増殖
38 するおそれのある微生物を試験菌株として使用することが望ま
39 しい。例えば、シロップ剤等の高糖濃度製剤には
40 *Zygosacchomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92 ;
41 NBRC1960)を用いて試験することが望ましい。試験菌株は、
42 微生物保存機関から入手後、新鮮培地で植え継ぐごとに1継代
43 と定義し、5継代以内のものを用いる。試験菌は混合せず、そ
44 れぞれ単独に製剤に混入して試験する。試験菌の培養は、カン
45 テン培養又は液体培養のいずれかを採用する。

46 **カンテン培養**：上記5種の菌株をそれぞれカンテン平板培地
47 又はカンテン斜面培地の表面に接種して培養する。カンテン培
48 地としては、細菌の場合はソイビーン・カゼイン・ダイジェス
49 トカンテン培地を、真菌の場合はサブロー・ブドウ糖カンテン
50 培地を使用する。細菌の場合は30～35℃で18～24時間、
51 *Candida albicans*は20～25℃で44～52時間、*Aspergillus*
52 *brasiliensis*は20～25℃で6～10日間又は十分な孢子が形成さ
53 れるまで培養する。細菌及び*C. albicans*は培養菌体を無菌的
54 に採取し、生理食塩液に浮遊させ、約 10^8 CFU/mLの生菌を含
55 む浮遊液を調製する。*A. brasiliensis*の場合には、ポリソルベ
56 ート80を0.05%の割合で添加した生理食塩液に浮遊させ、約
57 10^8 CFU/mLの孢子を含む浮遊液を調製する。必要に応じて胞
58 子浮遊液を、滅菌ガーゼやガラスウールなどでろ過して菌糸を
59 除く。全ての調製菌は必要に応じて遠心洗浄を一度行い、培地
60 成分を取り除くこと。これらの浮遊液を接種菌液として使用する。
61

62 **液体培養**：上記4種(*A. brasiliensis*は除く)の菌株をそれぞれ
63 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地又はサブロー・ブド
64 ウ糖液体培地で培養後、遠心分離して培地を除く。菌体は生理
65 食塩液で洗浄して、同じ溶液で約 10^8 CFU/mLの生菌を含む接
66 種菌液を調製する。

67 上記5種以外の菌株を培養する場合は、当該菌株の生育に適
68 した培地を選んで使用することができる。浮遊液の調製もその
69 菌に適した方法を採用する。カンテン培養法と液体培養法のい
70 ずれにおいても、得られた接種菌液を2時間以内に被検製剤に
71 接種できない場合には、2～8℃の冷蔵庫に保存し、24時間以
72 内に使用する。A. *brasiliensis*の胞子は、通常、7日間までは
73 冷蔵庫に保存できる。接種菌液中の生菌数を使用直前に計測し、
74 得られた菌数値より接種直後における製剤1 mL又は1 g当たり
75 の理論接種菌数を算出する。

76 3. 試験手順

77 3.1. 生菌回収法の妥当性確認

78 9 mLの生理食塩液又は他の適切な中和希釈液に試験製剤を1
79 mL加え(10^1 希釈)、攪拌後、更に連続10倍希釈を行う(10^2 、
80 10^3 希釈)。個々の試験製剤希釈チューブに試験菌を適切な菌
81 数添加し、攪拌し、平板培地当たり250 CFU以下(A.
82 *brasiliensis*の場合は、80 CFU以下)になるように接種する。
83 この平板培地への接種は、計測のバラツキを最小とするために、
84 数回繰り返すこと。本手法の陽性対照として、同じ試験菌を同
85 量、生理食塩液に懸濁し、同じように平板培地に接種する。試
86 験製剤の適切な希釈段階は、陽性対照菌数に比較し、少なくとも
87 も70%程度の菌回収率を示すものとする。試験法の妥当性確
88 認は、試験材料や試験方法に変更があった場合、又は製剤に試
89 験結果に影響を及ぼすような変更があった場合には再度行うこ
90 と。妥当性確認において、接種菌数に対する回収菌数が70%
91 以上の場合は、0日目の接種菌数は理論接種菌数としてもよい。

92 3.2. カテゴリー I 製剤

93 製剤を含む容器5個のそれぞれの中に接種菌液を無菌的に注
94 入し、均一に混合する。製剤の容器中に菌液を無菌的に混合し
95 にくいとき、又は製剤1容器当たりの量が少ない場合には、滅
96 菌した別の容器に試験に必要な十分な量の製剤を無菌的に移し
97 て接種菌液を混合する。非無菌製剤の場合、これらに加えて菌
98 を接種しない製剤を対照として保存し、生菌数を測定する。混
99 合する接種菌液の量は製剤の0.5～1.0%とする。通常、製剤1
100 mL又は1 g当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFUの生菌数になるように
101 接種、混合する。カテゴリー I D製品(制酸剤)の場合は、製品1
102 mL当たり $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ CFUの生菌数となるように接種す
103 る。これらの容器を遮光下で20～25℃に保存し、0、7(カテゴ
104 リー I Aのみ)、14及び28日目に混合試料中の生菌数を測定す
105 る。上記の期間中、混合試料に顕著な変化(例えば、色調の変
106 化、異臭の発生、カビの発生等)が観察されたときは記録し、
107 当該製剤の保存効力について評価検討する。生菌数の経時的な
108 変化は、接種菌数(CFU/mL又はg)からの対数減少値で表され
109 る。生菌数測定は、原則として微生物限度試験法(4.05)に記
110 載されているカンテン平板法(カンテン平板混積法、カンテン
111 平板表面塗抹法)、又はメンブランフィルター法による。なお、
112 この場合、製品存在下での測定法の適合性試験を行い、発育が
113 阻害される場合は、試料液の調製に用いる緩衝液や液体培地並
114 びにカンテン培地に効果的な不活化剤を添加することができる。
115 ただし、不活化剤が微生物の増殖に影響を与えないことを確認
116 する必要がある。保存剤や製剤そのものの存在が生菌数測定に
117 影響し、かつ適当な不活化剤のない場合は、微生物限度試験法
118 (4.05)に記載されているメンブランフィルター法により生菌
119 数を測定する。本試験法との同等性が示されている場合は、カ
120 テゴリー I 及び II 製剤に自動化を含む別の微生物学的方法を用

121 いてもよい³⁾。

122 3.3. カテゴリー II 製剤

123 カテゴリー I で示された手順と同様に行うが、試験菌を製剤
124 と均一に混和する場合及び混合試料中の生菌数を測定する場合
125 に、特別の手法と配慮が要求される。

126 半固形の軟膏基剤製品では、試料を45～50℃に加熱して油
127 状とし、浮遊液を加えて滅菌ガラス棒又はスパーテルで接種菌
128 を均一分散させる。均一に混合されるように、界面活性剤を
129 加えてもよいが、添加される界面活性剤が接種菌の生残性や増
130 殖性に影響を与えず、かつ、製剤の保存効力を増強させないこ
131 とを確認する必要がある。生菌数測定のために混合試料を緩衝
132 液や液体培地に均一に混合するときも、界面活性剤や乳化剤を
133 添加することが望ましいこともある。特に、半固形の軟膏剤や
134 油性製剤などに接種された微生物を緩衝液や液体培地中に均一
135 に分散させるには、ソルビタンモノオレイン酸エステル、ポリ
136 ソルベート80、レシチンなどを使用するとよい。これらは汎
137 用されている保存剤の多くを不活化、又は中和させる作用があ
138 る。

139 3.4. 培地、培養期間等

140 保存効力試験用の培地は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェ
141 ストカンテン培地、サブロー・ブドウ糖カンテン培地の中から
142 適当なものをを用いる。他の培地等でも類似の栄養成分を含み、
143 かつ、試験対象となる微生物に対して類似の増殖性を持つもの
144 は使用して差し支えない。使用する培地は、表2に指定する菌
145 株を用いて培地性能試験を実施する。培養期間は、ソイビー
146 ーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の場合は3～5日間、
147 サブロー・ブドウ糖カンテン培地の場合は5～7日間とする。

148 カンテン培地では、得られる集落数は標準化された菌数の計
149 測値の少なくとも70%でなければならない。新鮮培養菌を用
150 いて試験する場合は、有効性が確認された培地バッチ以前に得
151 られた発育と同等の発育が認められなければならない。

152 4. 判定

153 保存効力の判定は、表3に従う。表3に記されている試験結
154 果が得られた場合、本試験法に適合と判定する。なお、無菌製
155 剤に接種菌以外の菌が発見されたときは、重大な微生物汚染が
156 起こっている可能性が強く、試験操作上又は製造管理上の注意
157 を要する。また、非無菌製剤中の汚染菌数が、参考情報「非無
158 菌医薬品の微生物学的品質特性」に定める菌数を超える場合にも、
159 試験操作上又は製造管理上の注意を要する。“菌数から増
160 加しないこと”とは、先の測定値からの増加が0.5 \log_{10} 以下で
161 あることをいう。

表3 製剤区分別判定基準

カテゴリー	微生物	判定基準
I A	細菌	7日後：接種菌数に比べ1.0 log以上の減少 14日後：接種菌数に比べ3.0 log以上の減少 28日後：14日後の菌数から増加しないこと
	真菌	7日後，14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
I B	細菌	14日後：接種菌数に比べ2.0 log以上の減少 28日後：14日後の菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
I C	細菌	14日後：接種菌数に比べ1.0 log以上の減少 28日後：14日後の菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
I D	細菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
II	細菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと

162 5. 培地等

163 保存効力試験用の培地を以下に掲げる。他の培地等でも類似
164 の栄養成分を含み、かつ、試験対象となる微生物に対して類似
165 の選択性や増殖性を持つものは使用して差し支えない。

166 (i) 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

167 滅菌後のpHが25℃で7.1～7.5になるようにpHを調整する。

168 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

169 (ii) 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

170 滅菌後のpHが25℃で7.1～7.5になるようにpHを調整する。

171 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

172

173 (iii) 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

174 滅菌後のpHが25℃で5.4～5.8になるようにpHを調整する。

175 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

176 (iv) 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

177 滅菌後のpHが25℃で5.4～5.8になるようにpHを調整する。

178 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

179 6. 参考資料

180 1) EUROPEAN PHARMA COEIA, 8 (2014), 5.1.3.

181 EFFICACY OF ANTIMICROBIAL PRESERVATION.

182 2) U S Pharmacopeia, 37(2014), <51> ANTIMICROBIAL

183 EFFECTIVENESS TESTING.

184 3) 参考情報「微生物迅速法」

185