

## 1 微生物迅速試験法〈G4-6-190〉

## 2 次のように改める。

3 従来の培養法を用いた微生物試験は、結果判定に数日間以上  
4 を要し、微生物用培養培地の選択種によっては10日間以上を  
5 要する場合もある。そこで近年の科学技術の進歩により、細菌  
6 の生理活性、菌体成分等を高精度に測定できる方法が数多く開  
7 発され、新たな細菌検出法、計数・計量法が登場している。また  
8 1980年代以降の環境微生物学分野における研究の進展によ  
9 り、環境中の細菌の多くは従来の培地ではコロニー形成能が低  
10 く、培養法のみではそのような細菌を検出、計数・計量、同定  
11 しがたいことが明らかとなってきた。細菌数・細菌量の測定に  
12 当たっては、得られる結果が利用する手法により異なり、最新  
13 の手法を用いても、真値を得ることは難しい点に留意すべきで  
14 ある。また、各手法のバリデーションのための標準菌株は存在  
15 するが、生理活性も含めて標準化することは容易ではない。  
16 新手法は従来法と比較し、必ずしも全ての点において優れて

17 いるわけではないが、迅速性及び精度においては優位であるこ  
18 とが多く、真菌やウイルス等にも応用可能であることより、そ  
19 の積極的な活用は関連分野における微生物管理レベルの向上に  
20 大きく役立ち、微生物汚染に伴うリスクの低減等に貢献する。

21 培養を基本とする従来法ではコロニーや微生物増殖に伴う濁  
22 度の変化などを指標とするのに対し、新手法では測定対象及び  
23 測定原理が従来法とは大きく異なる。また、環境中に生息する  
24 微生物の解析に当たっては、特定の微生物に着目する方法と共  
25 に、微生物群集を網羅的に理解することの重要性が認識されつ  
26 つある。本参考情報では微生物迅速試験法の原理及びバリデー  
27 ションと応用分野を紹介し、また利用に当たっての考慮すべき  
28 点を述べる。

## 29 1. 測定対象及び測定原理

30 微生物迅速試験法には様々な測定原理と、用途に特化した測  
31 定装置が開発されている。各種測定原理、測定対象、特徴、測  
32 定装置の例、想定される用途例を表1に示す。ここに掲載する  
33 ものは事例であり、具体的な用途や装置は個別の事例によって  
34 異なるため、この表によって制限や推奨をするものではない。

35 表1 測定対象及び測定原理

名称	測定対象	原理・特徴	測定装置の例	想定される用途例
1) 直接測定法				
固相サイトメ トリー	菌体	フィルターなどの担体に捕捉した微生物が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の微生物を選択的に検出するため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを含む、種々の光学検出・測定装置を用いる。	蛍光顕微鏡 レーザースキャニングサ イトメーター等	無菌試験 微生物限度試験 原材料受入試験 環境モニタリング 製薬用水の品質管理等
フローサイト メトリー	菌体	流路系を通過する微生物が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の微生物を選択的に検出するため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、種々の光学検出・測定装置を用いる。	フローサイトメーター バイオパーティクルカウ ンター等	環境モニタリング 製薬用水の品質管理等
2) 間接測定法				
免疫学的方法	抗原	微生物がもつ抗原に特異的な抗体を反応させ、発色や蛍光を目視やマイクロプレートリーダーなどで測定する。簡便なものには免疫クロマトグラフィーがある。	免疫クロマトグラフィー マイクロプレートリーダ ー	菌体由来抗原による菌種同 定
核酸増幅法 (NAT)	核酸	微生物がもつ核酸を、対象とする微生物に特異的なプライマーを用いて増幅し、検出する。定量的PCR法を用いることにより、定量も可能である。	電気泳動装置 定量的PCR装置	環境モニタリング 製薬用水の品質管理
生物発光法・ 蛍光法	ATP等	菌体内のATP等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに測定する。	発光測定器 蛍光測定器	無菌試験 微生物限度試験 原材料の品質管理 製薬用水の品質管理 環境モニタリング等
マイクロコロ ニー法	増殖能 (マイクロコ ロニー)	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養条件(培地組成、温度等)を使用できる。	蛍光顕微鏡等	無菌試験 微生物限度試験 原材料の品質管理 製薬用水の品質管理 環境モニタリング等
インピーダン ス法	増殖能 (電気特性)	微生物が増殖の際に培地成分を利用し産生する代謝産物の増加により生じる電気特性の変化を利用する。	電気計測器	保存効力試験等 消毒剤(評価法)
ガス測定法	増殖能 (ガス産生等)	微生物の増殖に伴う二酸化炭素の産生や酸素の消費等のガス量の変化を利用する。	ガス測定器 培地の呈色反応	無菌試験容器完全性試験 等
脂肪酸分析法	菌体脂肪酸	微生物の種類によって菌体脂肪酸組成が異なることを利用する。	ガスクロマトグラフィー	菌体由来脂肪酸による菌種 同定
赤外吸収スペ クトル測定法	菌体成分	菌体に赤外線を照射し、その赤外吸収スペクトルパターンを利用する。	フーリエ変換赤外分光光 度計	菌株識別
質量分析法	菌体成分	菌体成分を質量分析計により測定し、データベースと照合して解析する。	質量分析計	菌種同定
フィンガーブ プリント法	DNA	試料から抽出したDNAを制限酵素で切断し、DNA断片の泳動パターンを利用する。データベースと照合することにより同定が可能である。またT-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms)法では群集構造解析が可能である。	電気泳動装置	菌種同定

ハイスルーブット・シークエンシング	核酸	試料中に存在する多種多様な微生物から抽出した核酸の配列を決定し、その情報をもとに群集構造を解析する。	シークエンサー等	細菌叢解析 真菌叢解析
比濁法	増殖能	特定の波長において、微生物の増殖による培地の濁度の変化を利用する。	分光光度計	保存効力試験等 消毒剤(評価法)

36 注) PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 T-RFLP : 末端標識制限断片長多型分析

## 37 2. バリデーション

38 機器の適格性評価に当たっては、それぞれの測定法で測定対  
39 象とする標準試料を用いて実施する。すなわち、直接測定法に  
40 においては標準菌株、間接測定法においては検出対象となる成分  
41 等とする。

42 試験方法のバリデーションに当たっては、測定対象が微生物  
43 数・微生物量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、日局  
44 で定められている試験法と比較して優位な点と共に、利用に当  
45 たって考慮すべき点についても明らかとすることが望ましい。  
46 また、標準菌株を用いたバリデーションの結果は、日局で定め  
47 られている試験法がある場合は日局で定められている試験法と  
48 比較し同等以上(非劣性)であるべきだが、測定原理が異なること  
49 より必ずしも相関関係を求める必要はない。環境中に生息する  
50 微生物の検出を目的とする場合、より合理的な結果を得るため  
51 には、試験に用いる標準菌株の生理活性を可能な限り環境中  
52 での状態に近似させることが望まれる。

53 微生物迅速試験法のバリデーションには、試験法開発を目的  
54 とした検証と使用用途を想定した検証がある。微生物迅速試験  
55 法を提供する機器の製造業者は通常、前者の検証を行い、使用  
56 条件を想定した後者の検証は、使用者の責任のもとで検証する。  
57 使用者は、微生物迅速試験法を提供する機器の製造業者の試験  
58 法開発時におけるバリデーションの検証方法及び結果の妥当性  
59 を確認することで、バリデーションの一部としてその結果を採  
60 用することができる。

61 微生物迅速試験法のバリデーションにおける検証内容は、定  
62 性試験及び定量試験で異なる。定性試験とは、試験検体に混入  
63 した微生物の有無を判定する試験であり、例として無菌試験が  
64 挙げられる。定量試験とは、試験検体に混入した微生物数・微  
65 生物量を評価する試験であり、例として微生物限度試験の生菌  
66 数試験が挙げられる。各試験に要求されるバリデーションパラ  
67 マーターを表2に示す。バリデーションパラメーターは、参考  
68 情報「分析法バリデーション〈G1-I-130〉」で要求される分析  
69 法バリデーションの分析能パラメーターに加えて、頑健性、適  
70 合性及び非劣性がある。

71 表2 各試験と検証が必要なバリデーションパラメーター

バリデーションパラメーター		定性試験	定量試験
分析法バリデーション における分析能パラメ ーター	真度	—	+
	精度	—	+
	特異性	+	+
	検出限界	+	* <sup>1)</sup>
	定量限界	—	+
	直線性	—	+
頑健性		+	+
適合性		+	+
非劣性		+	+

72 — 通例評価する必要がない。

73 + 通例評価する必要がある。

74 \* 必要な場合がある

75 分析法バリデーションにおける分析能パラメーター及び頑健

76 性については、参考情報「分析法バリデーション〈G1-I-130〉」  
77 に加えて、必要に応じて、医薬品規制調和国際会議ICHで合意  
78 されたガイドラインのうち「分析法バリデーションに関するテ  
79 キスト(実施項目)(平成7年7月20日薬審第755号)」及び「分析  
80 法バリデーションに関するテキスト(実施方法)(平成9年10月28  
81 日薬審第338号)」を参照することができる。

82 適合性については、原材料又は製品試験に微生物迅速試験法  
83 を適用する場合に対象となり、原材料又は製品が微生物の検出  
84 に影響しないことを確認する。日局で定められている試験法  
85 (例えば、4.05 微生物限度試験法や4.06 無菌試験法等)を代替す  
86 る場合は、それら試験法の記載内容を参照することができる。

87 非劣性については、日局で定められている試験法を微生物迅  
88 速試験法で代替する場合に実施する。一つの原材料又は製品に  
89 おいて、微生物迅速試験法が日局で定められている試験法と非  
90 劣性であることが示された場合は、新しい原材料又は製品ごと  
91 に非劣性の評価を繰り返す必要はない。

92 バリデーションパラメーターの定義と評価方法の例を次に示  
93 す。

### 94 2.1. 真度

#### 95 2.1.1. 定義

96 微生物迅速試験法によって得られた測定値の偏りの程度のこと  
97 で、真の値と測定値の総平均との差で表される。日局で定め  
98 られている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、微生  
99 物迅速試験法の試験結果と、日局で定められている試験法によ  
100 って得られた試験結果との差である。

#### 101 2.1.2. 評価方法

102 真度は、実際の試験で対象となる測定範囲を含んだ微生物濃  
103 度で検証する必要がある。例えば、測定範囲の上限で微生物の  
104 懸濁液を調製し、測定範囲の下限まで段階希釈することによ  
105 って評価される。

106 また、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代  
107 替する場合には、適切な統計分析を使用して、日局で定められ  
108 ている試験法より微生物迅速試験法が非劣性であることを示す  
109 必要がある。なお、直線性と合わせて、真度を確認することも  
110 可能である。

### 111 2.2. 精度

#### 112 2.2.1. 定義

113 均質な微生物懸濁液から採取した複数の検体を繰り返し測定  
114 して得られる一連の測定値が、互いに一致する程度のことであ  
115 り、測定値の分散、標準偏差又は相対標準偏差として表される。  
116 精度は、併行精度と室内再現精度の2種類に分類される。

117 (i) 併行精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロ  
118 ットなどの分析条件を変えずに、同一の微生物懸濁液から採  
119 取した複数の検体を短期間に繰り返し評価するときの精度で  
120 ある。

121 (ii) 室内再現精度とは、同一の試験室内で試験者、装置及び試  
122 薬のロットなどの一部又は全ての分析条件を変えて、均質な  
123 微生物懸濁液から採取した複数の検体を繰り返し評価すると

- 124 きの精度である。
- 125 **2.2.2. 評価方法**
- 126 併行精度を検討するために十分な微生物懸濁液を準備し、試  
127 験濃度範囲の中央にある少なくとも一つの微生物懸濁液を評価  
128 する。室内再現精度は、同一の試験室内で考えられる可能な変  
129 動要因について検討する。各検討で得られた結果の分散、標準  
130 偏差又は相対標準偏差を算出する。なお、日局で定められてい  
131 る試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、日局で定めら  
132 れている試験法より非劣性であることを示さなければならない。
- 133 **2.3. 特異性**
- 134 **2.3.1. 定義**
- 135 対象となる微生物のみを検出する能力のことである。対象と  
136 なる微生物とは、製品へ混入するリスクの高い微生物、製造環  
137 境で検出された微生物、日局で定められている試験法を微生物  
138 迅速試験法で代替する場合はその有効性を測定するために適し  
139 た微生物及び生理学的な属性で代表的な微生物等である。
- 140 **2.3.2. 評価方法**
- 141 接種する微生物数・生物量は、検出限界又は定量限界を上  
142 回るが、試験法の有効性を評価することが可能なレベルとする。  
143 培養を必要とする微生物迅速試験法においては、少数の微生  
144 物(100 CFU以下)を添加し、添加した微生物を検出できること  
145 を検証する。
- 146 培養を必要としない微生物迅速試験法においては、適切な陰  
147 性及び陽性対照を用いて、システム内に混入する可能性のある  
148 外来物質(例えば、細胞外ATP、DNA、阻害因子、又は促進因  
149 子)が、対象となる微生物の検出に影響しないことを検証する。
- 150 **2.4. 検出限界**
- 151 **2.4.1. 定義**
- 152 規定された実験条件下で、検出可能な試験検体中の微生物の  
153 最少数・最少量のことである。検出限界では、必ずしも定量で  
154 きるとは限らない。
- 155 **2.4.2. 評価方法**
- 156 検出限界については、日局で定められている試験法を微生物  
157 迅速試験法で代替する場合には、「2.10.2 (3) 判定の非劣性」  
158 を参照し、日局で定められた試験法と代替法で評価する。
- 159 **2.5. 定量限界**
- 160 **2.5.1. 定義**
- 161 許容できる精度及び真度で定量的に評価可能な試験検体中の  
162 微生物の最少数・最少量である。
- 163 **2.5.2. 評価方法**
- 164 定量限界は、定量限界付近を含む複数の検体を用いて評価す  
165 る。直線性及び真度の結果も使用できる。この場合、線形範囲  
166 の最低濃度が試験法の定量限界とみなすことができる。日局で  
167 定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、  
168 日局で定められている試験法の定量限界よりも劣ってはいけな  
169 い。
- 170 **2.6. 直線性**
- 171 **2.6.1. 定義**
- 172 実際の試験で対象となる測定範囲内で、試験検体中に存在す  
173 る微生物の濃度に比例した結果を得られることである。
- 174 **2.6.2. 評価方法**
- 175 微生物迅速試験法の使用目的に対応するように、妥当な範囲  
176 (例えば、 $10^0 \sim 10^6$  CFU/mL)の試料を用意し、試験手順に従  
177 って各試料を繰り返し測定し、結果を得る。各濃度で得られた  
178 結果の回帰式及び相関関数から直線性を評価する。
- 179 **2.7. 範囲**
- 180 **2.7.1. 定義**
- 181 適切な精度、真度及び直線性を与える、下限及び上限の微生  
182 物数又は生物量に挟まれた領域のことである。
- 183 **2.7.2. 評価方法**
- 184 適切な範囲の上限値、下限値及び範囲の中央付近の値の試験  
185 試料について精度、真度及び直線性を検討する。
- 186 **2.8. 頑健性**
- 187 **2.8.1. 定義**
- 188 試験条件を小さい範囲で意図的に変化させるときに、測定結  
189 果が影響を受けない能力の指標である。
- 190 通例、頑健性は、試験法開発者が試験法の開発段階で検討す  
191 べきである。ただし、試験法使用者が重要なパラメーターを変  
192 更する場合は、頑健性への影響を評価する必要がある。
- 193 **2.8.2. 評価方法**
- 194 試験条件(例えば、試薬量、培養時間、周囲温度等)を意図的  
195 に変動させることにより試験結果への影響を評価する。
- 196 **2.9. 適合性**
- 197 **2.9.1. 定義**
- 198 原材料又は製品が微生物の検出に影響しないことの確認であ  
199 る。
- 200 **2.9.2. 評価方法**
- 201 微生物迅速試験法を用いて試験される原材料又は製品につい  
202 て、原材料又は製品存在下及び非存在下で微生物を接種し、そ  
203 れらの結果を比較することによって原材料又は製品による偽陽  
204 性又は偽陰性が発生しないことを確認する。
- 205 **2.10. 非劣性**
- 206 **2.10.1. 定義**
- 207 非劣性は、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法  
208 で代替する場合に対象となり、日局で定められている試験法に  
209 比べて代替法が劣っていないことを統計学的に判定すること  
210 である(非劣性検定)。
- 211 **2.10.2. 評価方法**
- 212 実使用における試験条件を考慮し、ワーストケースを想定し  
213 て行う。また、原材料又は製品試験に適用する場合は、原材料  
214 又は製品を用いて実施する。
- 215 非劣性には三つの異なる判定法がある。
- 216 (1)性能の非劣性
- 217 代替法と日局で定められている試験法の分析能パラメーター  
218 を比較し、比較結果に基づいて非劣性を判定する。
- 219 (2)結果の非劣性
- 220 代替法と日局で定められている試験法で得られた数値結果を  
221 比較し、比較結果に基づいて非劣性を判定する。
- 222 (3)判定の非劣性
- 223 代替法と日局で定められている試験法で陰性(適合)/陽性(不  
224 適合)を判定し、陽性率(不適合率)の比較結果に基づいて非劣性  
225 の判定を行う。
- 226 どの判定法で行うかは、測定原理及び測定対象により異なる  
227 ため、装置の特性を把握し適切な判定法で行う必要がある。
- 228 (1)性能の非劣性
- 229 性能の非劣性は、代替法の単位が日局で定められている試験  
230 法と同一単位であるときに使用できる。分析法バリデーショ  
231 の各パラメーターに対して、代替法が非劣性であることを示す。

232 比較できない場合は、代替法自体の判定基準に対して適合する  
 233 ことを示す。利用者は代替法と日局で定められている試験法を  
 234 比較検討し、特定のパラメーターにおいて非劣性を示せない代  
 235 替法を利用する必要がある場合には、代替法が対象物の品質の  
 236 評価法として適切であることの妥当性を示さなければならない。  
 237 (2)結果の非劣性

238 結果の非劣性は、代替法の単位が日局で定められている試験  
 239 法とは異なるが、得られた結果に定量性があり日局で定められ  
 240 ている試験法との間に相関があると推定される場合に使用でき  
 241 る。精度において、代替法が数値的に非劣性であることを示す。  
 242 次に、適切な製品又は試験試料の規格範囲内で、検量線を用い  
 243 て二つの方法間の相関を示す。

244 微生物の代謝物や生理活性を指標とした測定原理の場合は、  
 245 微生物の生理状態により測定値がCFUで評価する方法より著  
 246 しく高い推定値となることがあるなど、測定原理の違いから相  
 247 関が得られないことがある。その場合は、(3)判定の非劣性評  
 248 価を行う。

#### 249 (3) 判定の非劣性

250 判定の非劣性は、代替法及び日局で定められている試験法が  
 251 同等の試料に対して、それぞれの基準で陰性(適合)/陽性(不適  
 252 合)を判定する場合に使用できる。代替法の陽性率(不適合率)が  
 253 日局で定められている試験法の陽性率より非劣性であることを  
 254 示す。この陽性率に対する非劣性検定は、独立サンプルと対応  
 255 のあるサンプルとで計算方法が異なるので適切な検定法を用い  
 256 る。

257 判定の非劣性のもう一つの方法としては、最確数法を代替法  
 258 と日局で定められている試験法で複数回実施し、各々の測定値  
 259 を対数変換後、平均値の非劣性検定をする。

#### 260 3. 応用分野と考慮すべき点

261 微生物迅速試験法は幅広い分野での応用が期待されるが、測  
 262 定対象及び測定系が従来法とは異なるため、これまでに蓄積し  
 263 たデータとの相関を得られないことがある。従来法と同等以上  
 264 の能力を有することを確認することが原則であるが、微生物迅  
 265 速試験法により新たな管理方法が考案され、従来法がない場合  
 266 には、その妥当性を検証して微生物迅速試験法を用いることが  
 267 できる。

268 微生物迅速試験法を当局に新たに製造販売承認申請(あるい  
 269 は製造販売承認事項一部変更承認申請)し、承認された場合に  
 270 は、局方試験の代わりに微生物迅速試験法の結果に基づき出荷  
 271 可否決定を行うことができる。

272 微生物迅速試験法は短時間のうちに結果を得ることができる  
 273 ので、製品の検査を早期に完了できる点、製造設備や製造用水、  
 274 原材料等の早期の汚染検知や製造室等の清浄度の早期確認が可  
 275 能な点など様々な利点が想定され、製品試験、環境モニタリン  
 276 グ、バイオバーデン試験、原材料管理などをリアルタイムに実  
 277 施でき、工程管理の新たな方法として活用が期待される。警報  
 278 基準値(アラートレベル)、処置基準値(アクションレベル)など  
 279 は得られたデータを元に傾向分析を通じて設定することができ  
 280 る。

281 応用分野の例を表3に示した。

282 表3 微生物迅速試験法の応用分野の例

分類	用途
定量試験	微生物限度試験(生菌数試験)
	保存効力試験

	消毒剤(評価法)
	原材料の品質管理
	製薬用水の品質管理
	環境モニタリング
定性試験	無菌試験
	容器完全性試験
その他	作業員の教育及び適格性評価など (更衣や無菌操作など)

#### 283 4. 用語の定義又は説明

284 本参考情報で用いる用語の定義は、次のとおりである。

- 285 ・培養法：微生物が必要とする栄養分で作られた微生物用培地  
 286 で、適切な環境下(温度、湿度、浸透圧、pH等)で培養し、  
 287 増殖に伴う濁度の変化を目視にて確認することやコロニー数  
 288 を計数する手法。  
 289 ・微生物：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称であり、本参  
 290 考情報では細菌及び真菌を指す。  
 291 ・標準菌株：本参考情報では、公的な機関より管理・分譲され  
 292 る菌株。日局に記載された試験菌株を含む。  
 293 ・従来法：日本薬局方収載微生物試験法(無菌試験法、微生物  
 294 限度試験法、保存効力試験法、遺伝子解析による微生物の迅  
 295 速同定法など)。  
 296 ・微生物迅速試験法：微生物の代謝活性や生理活性又は菌体成  
 297 分等(ATPや抗原、核酸など)でその存在を確認する手法で、  
 298 その検出対象によって様々な手法があり、培養を基本とする  
 299 従来法と比較して測定結果が早い手法。  
 300 ・微生物数：細胞数として定量される微生物の数。  
 301 ・微生物量：微生物の代謝物として定量される物理量。  
 302 ・偽陽性：本参考情報では、微生物が存在しない陰性検体を誤  
 303 って陽性と判定すること。  
 304 ・偽陰性：本参考情報では、微生物が存在する陽性検体を誤っ  
 305 て陰性と判定すること。  
 306 ・直接測定法：微生物が発する自家蛍光などのシグナルを直接  
 307 的に検出する試験法。  
 308 ・間接測定法：特定の菌体成分、酵素反応や微生物代謝物など  
 309 を間接的に検出する試験法。