

1 微生物学的試験法の適合性試験等における留意事項<G4-12-190>

3 本参考情報は、微生物限度試験法(4.05)、無菌試験法
4 (4.06)、生薬及び生薬を主たる原料とする製剤の微生物限度
5 試験法(5.02)及び参考情報「保存効力試験法(G4-3-170)」の
6 適合性試験等における留意事項を示すものである。

7 1. 試験の実施

8 微生物学的試験法の適合性試験は、被験製品について微生物
9 試験を初めて実施する際に、選択した試験法の微生物検出能力
10 を確認するため、微生物試験の実施前又は同時に行うことが望
11 ましい。試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や、製品
12 の処方変更があった場合には、再度確認する。

13 2. 試験菌の選定及び調製

14 微生物には様々な性質を持つものが含まれ、その性質は抗菌
15 活性に対する反応や回収に必要な中和法に影響を及ぼす。試験
16 の目的に応じて、細菌、酵母及びかびの中から、代表する試験
17 菌を選定する。

18 試験菌の発育状態や調製方法は、試験菌の細胞の生理活性に
19 影響を及ぼす。試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用する
20 か、又は規定された液体培地若しくはカンテン培地を用いて調
21 製された新鮮培養菌を使用することで、均質で変動の少ない調
22 製又は再現性のある調製が可能となる。参考情報「保存効力試
23 験法(G4-3-170)」においては、試験菌の生理活性が結果に影
24 響を及ぼす可能性が高いため、新鮮培養菌を使用することが望
25 ましい。

26 3. 試料調製

27 試料調製作業が被験製品に存在する微生物に影響を与える可
28 能性がある場合には、その影響を確認する。試料液を供試する
29 まで放置する場合には、菌数などに変化がないことを確認する。

30 4. 抗菌活性を有する試料に対する一般的な追加手順

31 被験製品に抗菌活性が認められ、その抗菌活性を除去するた
32 めに試験法を変更する場合には、変更後の試験法で適合性試験
33 を繰り返して結果の再現性を確認する。

34 4.1. 希釈

35 被験製品を希釈することで抗菌活性を中和する。有効な希釈
36 倍率は、被験製品によって異なる。中和に必要な希釈倍率が大き
37 きい場合には、他の方法によって中和する。

38 なお、希釈することにより、製品試験において規定された微
39 生物許容基準値(参考情報「非菌薬品の微生物学的品質特
40 性(G4-1-170)」参照)での判定が困難となる場合には、適宜平
41 板の使用枚数や培地の本数を増やすとよい。

42 4.2. 中和剤の使用

43 中和剤の使用については、微生物限度試験法(4.05)「I.非
44 無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験」の3.4.3.を参照する。
45 阻害物質に対する一般的な中和剤は、微生物限度試験法
46 (4.05)表4.05-I-2を参照する。

47 被験製品が抗生物質の場合には、一般的な中和剤による影響
48 を受けにくく、酵素処理(ペニシリナーゼ、β-ラクタマーゼ
49 など)による影響を受けやすい。酵素処理を行う場合は、最小
50 発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)な
51 どの情報を参考とし、適切な濃度で使用するとよい。

52 4.3. 膜ろ過

53 一般的にメンブランフィルターを用いて行う。メンブランフ
54 ilterには様々な材質があるため、被験製品の性質や成分を
55 考慮し、適切な材質を選択する。例えば、抗菌活性のない試料
56 にはセルロース混合エステルなど、水溶性、油性又は低濃度の
57 アルコール性溶液にはセルロースナイトレートなど、高濃度の
58 アルコール性溶液にはセルロースアセテートなどの材質のフィ
59 ルターが用いられる。また、フィルターへの抗菌物質の吸着を
60 低減させるために、ポリビニリデンフロライド(PVDF)などの
61 低吸着性フィルターが用いられることもある。

62 被験製品中の抗菌物質を除去するために、フィルターを適切
63 な溶液で洗浄することができる。適合性が確認できれば、フィ
64 ルター上に残留若しくは吸着した抗菌物質の中和又は試料の懸
65 濁化などを目的として、例えばポリソルベート80(濃度：1
66 g/L)のような界面活性剤を洗浄液に添加しても差し支えない。

67 5. 試験菌の接種

68 微生物限度試験法(4.05)及び生薬及び生薬を主たる原料と
69 する製剤の微生物限度試験法(5.02)の生菌数試験において、
70 試料液を調製する場合には、抗菌活性の影響を確認するため、
71 最初に調製した試料液(最も低い希釈率)に試験菌を接種する。
72 調製した試料液を更に希釈して供試する場合も、最初に調製し
73 た試料液に試験菌を接種する。中和剤を加えた希釈液を使用す
74 る場合にも、最初に調製した試料液に試験菌を接種する。希釈
75 中和剤の使用、膜ろ過などの様々な手段を講じても抗菌活性を
76 除去又は中和できない場合には、調製可能な範囲で最大限に希
77 釈した試料液や膜ろ過後のフィルターの最終洗浄液に試験菌を
78 加えてもよい。なお、被験製品をそのまま膜ろ過に供する場合
79 には、膜ろ過後のフィルターの最終洗浄液に試験菌を接種する。

80 6. 培地の追加

81 原則として、微生物試験で規定された培地の種類を変更する
82 ことはできないが、被験製品の性質や成分又は汚染微生物の種
83 類によっては、規定外の培地を用いる方が適切な場合もある。
84 やむを得ない事情により、規定された培地に追加する場合は、
85 以下の事項に留意する。

86 6.1. 生菌数試験用又は無菌試験用などの非選択培地の場合

87 微生物限度試験法(4.05)や無菌試験法(4.06)などを参考と
88 して培地性能試験を実施し、微生物検出能力を確認する。

89 なお、微生物には発育するために特定の成分を必要とするも
90 のや、逆に、特定の成分の存在下では発育できないものがある。
91 非選択培地であっても、培地成分の違いによって、検出される
92 微生物の数や種類及び発育した集落の外観が異なる可能性がある
93 ことに留意する。

94 6.2. 特定微生物試験用の選択培地の場合

95 微生物限度試験法(4.05)などを参考として培地性能試験を
96 実施し、微生物検出能力を確認する。培地成分の違いにより、
97 鑑別反応が異なることに留意する。

98 7. 培養時間

99 培地性能試験及び適合性試験の培養時間は、それぞれ規定さ
100 れている時間とする。

101 ただし、試験菌の増殖確認及び菌数測定が可能であることが
102 確認された適切な時間を採用する。

103 なお、適合性が確認された試験法で実施する製品試験におい
104 て、規定されている培養時間の中で最短の培養時間を採用する
105 場合には、その妥当性を確認する。

106 8. 製品試験における集落数の計測

107 カンテン平板法での集落数の計測は、適切な希釈倍数で行う。

108 製品試験では一般的に、細菌及び酵母では1平板当たり250

109 CFU未満、かびでは50 CFU未満の集落数を目安として計測す

110 る。計測後、培地ごとに算術平均をとり、希釈倍率を乗じて生

111 菌数を算出する。

112