

6.09 Disintegration Test

Change to read following part under Apparatus:

Disks—The use of disks is permitted only where specified or allowed. Each tube is provided with a cylindrical disk 9.5 ± 0.15 mm thick and 20.7 ± 0.15 mm in diameter. The disk is made of a suitable, transparent plastic material having a specific gravity of between 1.18 and 1.20. Five parallel 2 ± 0.1 mm holes extend between the ends of the cylinder. One of the holes is centered on the cylindrical axis. The other holes are centered 6 ± 0.2 mm from the axis on imaginary lines perpendicular to the axis and parallel to each other. Four identical trapezoidal-shaped planes are cut the wall of the cylinder, nearly perpendicular to the ends of the cylinder. The trapezoidal shape is symmetrical; its parallel sides coincide with the ends of the cylinder and are parallel to an imaginary line connecting the centers of two adjacent holes 6 mm from the cylindrical axis. The parallel side of the trapezoid on the bottom of the cylinder has a length of 1.6 ± 0.1 mm, and its bottom edges lie at a depth of 1.5 – 1.8 mm from the cylinder's circumference. The parallel side of the trapezoid on the top of the cylinder has a length of 9.4 ± 0.2 mm, and its center lies at a depth of 2.6 ± 0.1 mm from the cylinder's circumference. All surfaces of the disk are smooth. If the use of disks is specified, and a desk to each tube, and operate the apparatus as directed under Procedure. The disks conform to dimensions found in Fig.6.09-1. The use of automatic detection employing modified disks is permitted where the use of disks is specified or allowed. Such disks must comply with the requirements for density and dimension given in this chapter.

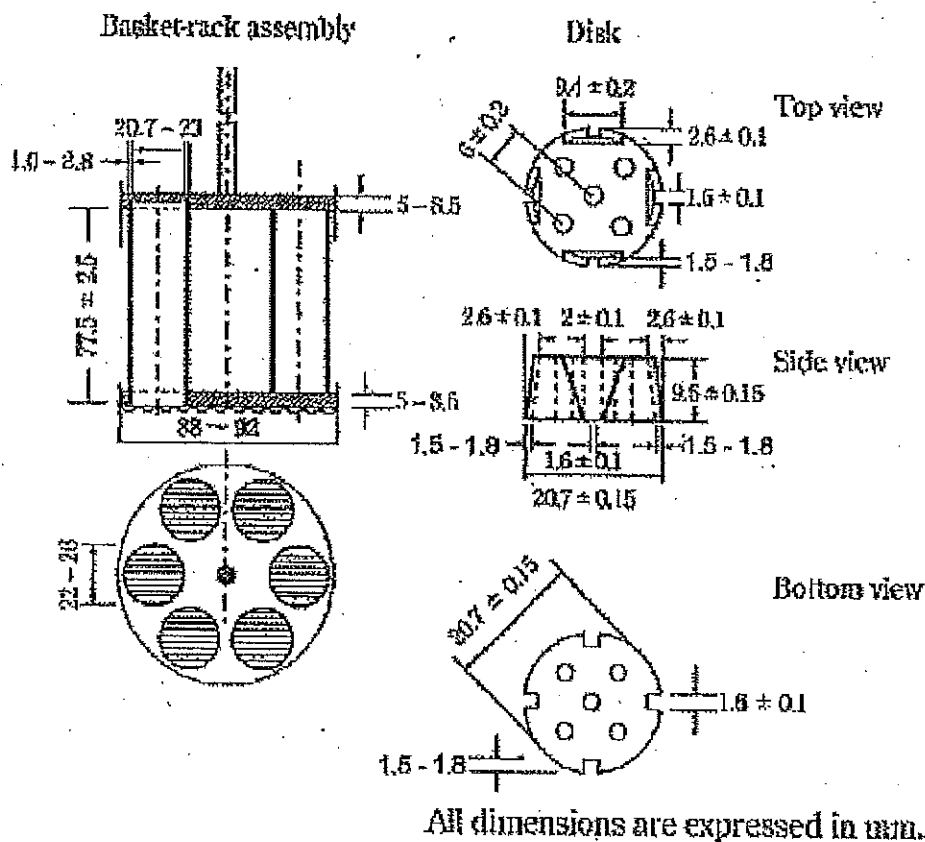


Fig. 6.09-1 Disintegration apparatus

6.10 Dissolution Test

Change to read following part under Procedure for Basket or Paddle Methods:

IMMEDIATE-RELEASE DOSAGE FORMS

Procedure—Place the stated volume of the dissolution medium ($\pm 1\%$) in the vessel of the specified apparatus, assemble the apparatus, equilibrate the dissolution medium to $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, and remove the thermometer. Place 1 dosage unit in the apparatus, taking care to exclude air bubbles from the surface of the dosage unit, and immediately operate the apparatus at the specified rate. Within the time interval specified, or at each of the times stated, withdraw a specimen from a zone midway between the surface of the Dissolution Medium and the top of the rotating basket or blade, not less than 10 mm from the vessel wall. [NOTE—Where multiple sampling times are specified, replace the aliquots withdrawn for analysis with equal volumes of fresh Dissolution Medium at 37°C or, where it can be shown that replacement of the medium is not necessary, correct for the volume change in the calculation. Keep the vessel covered for the duration of the test, and verify the temperature of the mixture under test at suitable times.] Perform the analysis using an indicated assay method.*³ Repeat the test with additional dosage units.

If automated equipment is used for sampling or the apparatus is otherwise modified, verification that the modified apparatus will produce results equivalent to those obtained with the standard apparatus described in this chapter, is necessary.

Dissolution Medium—A specified dissolution medium is used. The volume specified refers to measurements made between 20°C and 25°C . If the dissolution medium is a buffered solution, adjust the solution so that its pH is within 0.05 unit of the specified pH. [NOTE—Dissolved gases can cause bubbles to form, which may change the results of the test. If dissolved gases influence the dissolution results, remove dissolved gases prior testing.*⁴]

Time—Where a single time specification is given, the test may be concluded in a shorter period if the requirement for minimum amount dissolved is met. Specimens are to be withdrawn only at the stated times, within a tolerance of $\pm 2\%$.

4.05 微生物限度試験法

微生物限度試験法を次のように改める。

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、三業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、測定法の適合性及び陰性対照

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、pH7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH7.2 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℃ 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℃ 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5に記載の製品の試験においても実施する。

4.4. 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 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 pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 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、pH6 ~ 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 pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 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、pH6 ~ 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、希釈又はろ過の後に試験菌懸濁液を加えてもよい。

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。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行なければならない。

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。

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。

表 4.05-1-3 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 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	

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℃ 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）。

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 に相当する量をモゼル腸内細菌増菌ブイオン培地に接種する。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移植し，30 ～ 35℃ 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って，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，適量のモゼル腸内細菌増菌ブイオン培地に接種する。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。

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℃ 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℃ 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。

4.6.2. 選択培養

それぞれから 10 mL あるいは被験製品 1 g 又は 1 mL 相当量を (3.4. で決定した) 適量の強化クロストリジア培地に接種し、嫌氣的条件下で 30 ~ 35°C で 48 時間培養する。培養後、コロンビアカンテン培地に各容器から移植し、嫌氣的条件下で 30 ~ 35°C で 48 ~ 72 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さない) の嫌氣的発育が認められた場合は、陽性が示唆される。この場合は同定試験を行い確認する。

コロンビアカンテン培地に定型集落の発育がみられないか、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。

4.7. カンジダ・アルピカンス

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。適合性が確認され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 pH7.0 ~ 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 pH7.2

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 pH7.0

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。

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

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°C で 7.2 ~ 7.6 になるように pH を調整する。煮沸するまで加熱し、50°C 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°C 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

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		
モッ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		
ラポポート・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
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 1g 又は 1mL 当たりの細菌の推定数
0.1g 又は 0.1mL	0.01g 又は 0.01mL	0.001g 又は 0.001mL	
+	+	+	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

4.06 無菌試験法

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。

無菌試験法は、無菌であることが求められている原薬又は製剤に適用される。本試験に適合する結果が得られても、それは単に本試験条件下で調べた検体中に汚染微生物が検出されなかったことを示しているだけである。

1. 微生物汚染に対する予防措置

無菌試験は無菌条件下で行われる。このため、試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない。汚染を避けるためにとられる予防措置は、本試験で検出されるべきいかなる微生物にも影響を与えてはならない。作業区域の適切な環境モニタリング及び適切な汚染防止措置の実施によって、本試験の実施状態が適切であることを定期的に監視する。

2. 培地及び培養温度

2.1. 一般要件

培地は、次のように調製するか、又は培地性能試験に適合する場合は同等の市販培地も使用できる。無菌試験用として適している培地は次のとおりである。液状チオグリコール酸培地は、嫌気性細菌の培養を主目的としているが、好気性細菌も検出できる。ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は、真菌及び好気性細菌の培養に適している。

2.2. 液状チオグリコール酸培地

液状チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
カンテン	0.75g
塩化ナトリウム	2.5g
ブドウ糖 (一水和物/無水)	5.5/5.0g
酵母エキス (水溶性)	5.0g
カゼイン製ペプトン	15.0g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5g
又はチオグリコール酸	0.3mL
レザズリン溶液 (1→1000) , 用時調製	1.0mL
水	1000mL

(滅菌後のpH7.1±0.2)

L-シスチン、カンテン、塩化ナトリウム、ブドウ糖、酵母エキス (水溶性) 及びカゼイン製ペプトンを水と混合し、加熱して溶かした後、チオグリコール酸ナトリウム又はチオグリコール酸を加えて溶かし、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整する。必要ならば、溶液を煮沸しないように加熱し、温かいうちに湿らせたろ紙を用いてろ過する。レザズリン溶液 (1→1000) を加え、よく混和した後、培養終了時に培地の淡赤色部分が上部1/2以下にとどまるような表面積と深さの比をもつ容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた条件下で滅菌する。培地を保存する必要がある場合にはあらかじめ気密容器に入れて滅菌し、2~25℃で保存する。培地がその上部1/3を超えて淡赤色となった場合は、その淡赤色が消失するまで培地容器を水浴中又は流通蒸気中で加熱し、容器中への汚染空気の侵入を防ぎながら急速に冷却することで1回だけ使用できる。バリデートされた期間を超えて、保存した培地を使用してはならない。

液状チオグリコール酸培地は、30~35℃で培養する。メンブランフィルター法を適用できない水銀系の防腐剤を含む製品に対しては、培地性能試験に適合するならば、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の代わりに液状チオグリコール酸培地を用い、20~25℃で培養することができる。

別に規定する場合は、次のように調製した変法チオグリコール酸培地を用いることができる。カンテンとレザズリン溶液 (1→1000) を除き、液状チオグリコール酸培地と同じ成分で調製し、バリデートされた条件下で滅菌する。滅菌後のpHが7.1±0.2になるように調整し、使用直前に水浴中で加熱する。変法チオグリコール酸培地は嫌気条件下で30~35℃で培養する。

表4.06-1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株

好気性細菌	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NBRC13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118
嫌気性細菌	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, NBRC 14293, CIP 79.3, NCTC 532, ATCC 11437
真菌	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NBRC 1594, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404, NBRC 9455, IP 1431.83, IMI 149007

4. 手法の適合性試験

次に述べる変更点以外は、「5. 製品の無菌試験」の項に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。

メンブランフィルター法

試験に供された容器の内容物をろ過した後、最終回の洗浄液に試験用菌株を100CFU以下加えたものをろ過する。

直接法

試験に供された容器の内容物を培地に加えた後、試験用菌株100CFU以下をその培地に接種する。

どちらの接種方法においても、「好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験」の項で示した菌株を用いる。陽性対照として培地性能試験を行う。培地を含むすべての容器は規定の温度で最長5日間培養する。

培養後、陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られれば、被検製品は本試験条件下で抗菌活性を持たないか、又は抗菌活性が十分に除去されたものとみなす。当該手法は適切であり、試験条件を変更する必要はない。

被検製品の存在下で陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られなければ、被検製品は当該試験条件下では十分除去できない抗菌活性を有している。この場合、抗菌活性を除去するために条件を変えて手法の適合性試験を繰り返す。

手法の適合性試験を行うのは、新しい製品に無菌試験を行う場合及び試験の実施条件に変更があった場合である。

手法の適合性試験は被検製品の無菌試験と同時に行うこともできる。

5. 製品の無菌試験

5.1. 一般要件

試験はメンブランフィルター法又は直接法によって行われる。試験には適切な陰性対照を置くこと。メンブランフィルター法は、ろ過可能な製品に適用する。例えば、ろ過可能な水性、アルコール性又は油性の製品及び本試験条件下で抗菌力を有しない水性又は油性の溶剤に混和若しくは溶解する製品に対して用いる。

5.2. メンブランフィルター法

メンブランフィルターは、微生物の捕集効率が確立されている公称孔径が0.45 µm以下のものを用いる。例えば、水溶性、油性又は低濃度のアルコール性溶液にはセルロースナイトレートフィルターを用い、高濃度のアルコール性溶液にはセルロースアセテートフィルターを用いる。抗生物質のような医薬品には、別途適切なフィルターが必要な場合もある。

次に示す手法は、直径約50mmのメンブランフィルターの使用を想定している。もし異なる直径のフィルターを用いる場合には、希釈及び洗浄液の容量はそれに応じて調製すべきである。ろ過器やメンブランフィルターは適切な方法で滅菌する。ろ過装置は、無菌条件下で被検溶液を導入・ろ過でき、メンブランフィルターの無菌的取りはずしと培地への移植ができるか、又はろ過器そのものに培地を加えて培養するのに適するように設計されていなければならない。

水性液剤

1g/Lの肉製又はカゼイン製ペプトン溶液 (pH7.1±0.2) のような無菌希釈液の少量をろ過器中のメンブランフィルター上に注ぎろ過する。希釈液には、例えば抗生物質が試験対象の場合には、適切な中和剤や不活化剤を加えることができる。

手法の適合性試験において適切であることが証明された適切な乳化剤を適切な濃度に加えた（例えば10g/Lポリソルベート80）培地を用いる。

軟膏剤及びクリーム

1g/L肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌希釈液中で、選択された乳化剤で乳化することにより約1:10に希釈する。この希釈物を乳化剤を含まない培地に移植する。

接種した培地は14日間以上培養する。培養を培養期間中に数回観察する。油性製品を含む培養は毎日穏やかに振る。ただし、嫌気性菌の検出のために液状チオグリコール酸培地を用いている場合は、嫌気条件を維持するために振とうや混合は最小限に保つ。

6. 観察と結果の判定

培養期間中及び最終日に、培地に肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べる。被検材料が培地を混濁させ、微生物増殖の有無を肉眼的に容易に判定できない場合には、培養開始から14日後に当該培地の一部（1mL以上）を同じ培地の新たな容器に移し、元の培地と移植した培地の両方を4日間以上培養する。

微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。微生物の増殖が観察された場合は、当該被検製品に無関係な原因により試験が無効であったことを明確に証明できなければ、被検製品は無菌試験に適合しない。以下の条件のうち一つ以上を満たした場合のみ当該試験は無効と考えられる。

- a) 無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータに問題が認められた場合
- b) 無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、問題が認められた場合
- c) 陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合

d) 当該無菌試験から分離された微生物の同定後、この菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料及び手技又はそのいずれかに問題があると明らかに判断される場合

試験が無効であることが判明したら、初回試験と同じ数の容器を用いて再試験を行う。再試験において微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。再試験において微生物の増殖が観察された場合には、被検製品は無菌試験に適合しない。

7. 無菌試験への適合が要求される注射剤及び眼軟膏剤、点眼剤等の非注射剤への試験の適用

メンブランフィルター法を用いる場合は、可能ならいつでも容器内の全量を用いる。ただし、表4.06-2に示す量以上を用いる。必要ならば1g/L肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌溶液で約100mLになるよう希釈する。

直接法を用いる場合は、他に規定されていなければ表4.06-2に示す量を用いる。被検製品の同じ試料について細菌及び真菌に対する無菌試験を行う。1容器中の内容量が両試験を行うのに不十分な場合は、異なる培地に接種するのに2容器以上の内容物を用いる。

8. 最少供試個数

最少供試個数は、ロット当たりの製造個数に応じて、表4.06-3に示す個数を用いる。

6.09 崩壊試験法

装置の項の補助板を次のように改める。

装置

略

補助盤 補助盤は、各条にその使用が規定されている場合にのみ、各ガラス管に入れて使用できる。補助盤は、高さ 9.5 ± 0.15 mm、直径 20.7 ± 0.15 mm の円柱状で、比重 $1.18 \sim 1.20$ の透明なプラスチックからなる。補助盤には、盤の上下を垂直に貫く直径 2 ± 0.1 mm の孔が五つ平行に開いており、一つは補助盤の中心に、他の四つは中心から 6 ± 0.2 mm の距離にそれぞれ等間隔に開いている。補助盤の側面には、盤面とほぼ直角に、同一の台形状の切り込みが4つ等間隔にある。台形の平行線の下線部は長さ 1.6 ± 0.1 mm で円周部から深さ $1.5 \sim 1.8$ mm の位置にあり、上線部は長さ 9.4 ± 0.2 mm で深さ 2.6 ± 0.1 mm の位置にある。補助盤は図 6.09-1 の規格に適合するもので、表面はすべて滑らかである。補助盤の使用が規定されている場合は、それぞれのガラス管に1個の補助盤を入れ、操作法に従い試験する。なお、崩壊を自動的に検出する目的で、加工した特殊な補助盤を用いる場合、その補助盤の比重、サイズは規格に適合するものでなければならない。また、それが使用できるのは各条で規定されている場合に限られる。

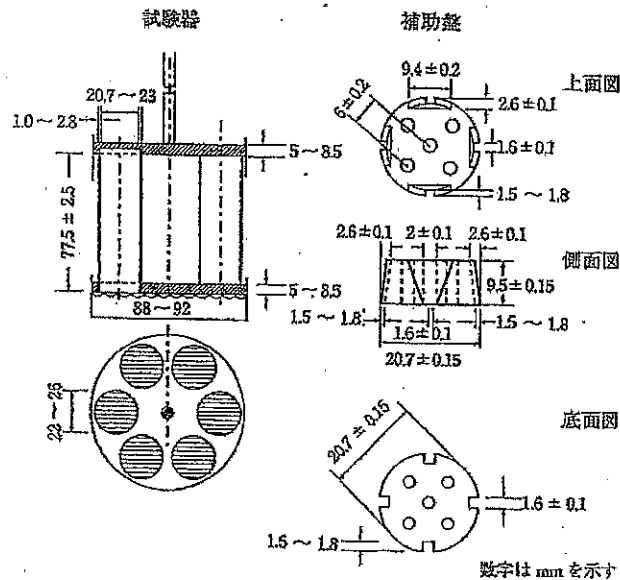


図 6.09-1

6.10 溶出試験法

操作の項の即放性製剤の試験液を次のように改める。

操 作

回転バスケット法及びパドル法

即放性製剤

操作：規定された容器に規定された容量（±1%）の試験液を入れ、装置にセットする。試験液を $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保ち、温度計を取り除く。試料の表面に気泡が付かないように注意しながら各容器に試料を入れ、直ちに規定された回転速度で装置を作動させる。規定された間隔で又は規定された時間に、試験液の上面と回転バスケット又はパドルの攪拌翼の上面との中間で容器壁から10 mm 以上離れた位置から、試験液を採取する。（注：複数回の試験液の採取が規定されている試験では、採取された量と等しい容量の 37°C の試験液を補充するか又は試験液の補充が必要ない場合には計算するときに容量変化を補正する。試験中、容器にはふたをし、適度な間隔で容器内の試験液の温度を確認する。）指示された分析法を用いて溶出した有効成分量を測定する³。他の試料についても同様の操作を行う。

試験液の採取が自動化された装置を用いるか若しくは装置に手を加えて変更する場合には、それらの装置が一般試験法に示されている標準的な装置を用いて得た結果と同等の結果が得られることを確認しなければならない。

試験液：適切な試験液を用いる。規定された液量は、 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ での計量値に相当する。試験液が緩衝液の場合、pHを規定値の±0.05以内となるように調整する。（注：試験液に溶存している気体は気泡の原因となることがあり、試験結果に影響を与えることがある。溶存している気体が溶出試験結果に影響を及ぼす場合には、試験の前に脱気する⁴。）

試験時間：1 時点での測定が規定されているときは、規定された溶出率に達した場合には、その時間より早く試験を終了することができる。それ以外では、規定された時間の±2% 以内で試験液を採取する。