

参考資料 No. 1 - 2

第十五改正日本薬局方第一追補

平成20年12月9日  
医薬食品局審査管理課

## 生薬総則 改正事項

生薬総則の部 1の条を次のように改める。

- 1 医薬品各条の生薬は、動植物の薬用とする部分、細胞内容物、分泌物、抽出物又は鉱物などであり、生薬総則及び生薬試験法を適用する生薬は次のとおりである。

アカメガシワ、アセンヤク、アセンヤク末、アマチャ、アマチャ末、アラビアゴム、アラビアゴム末、アロエ、アロエ末、アンソッコウ、イレイセン、インチンコウ、インヨウカク、ウイキョウ、ウイキョウ末、ウコン、ウコン末、ウヤク、ウワウルシ、エイジツ、エイジツ末、エンゴサク、エンゴサク末、オウギ、オウゴン、オウゴン末、オウセイ、オウバク、オウバク末、オウレン、オウレン末、オンジ、オンジ末、カゴソウ、カシユウ、ガジュツ、カッコン、カノコソウ、カノコソウ末、カロコン、カンキョウ、カンゾウ、カンゾウ末、カンテン、カンテン末、キキョウ、キキョウ末、キクカ、キササゲ、キジツ、キョウカツ、キョウニン、クコシ、クジン、クジン末、ケイガイ、ケイヒ、ケイヒ末、ケツメイシ、ケンゴシ、ゲンチアナ、ゲンチアナ末、ゲンノショウコ、ゲンノショウコ末、コウカ、コウジン、コウブシ、コウブシ末、コウボク、コウボク末、ゴオウ、ゴシツ、ゴシュユ、ゴボウシ、ゴミシ、コメデンブン、コロombo、コロombo末、コンズランゴ、サイコ、サイシン、サフラン、サンキライ、サンキライ末、サンザシ、サンシシ、サンシシ末、サンシュユ、サンシヨウ、サンシヨウ末、サンソウニン、サンヤク、サンヤク末、ジオウ、シゴカ、ジコッピ、シコン、シツリシ、シャクヤク、シャクヤク末、ジャシヨウシ、シャゼンシ、シャゼンソウ、ジュウヤク、シユクシヤ、シユクシヤ末、シヨウキョウ、シヨウキョウ末、シヨウズク、シヨウマ、シンイ、セッコウ、セネガ、セネガ末、センキユウ、センキユウ末、ゼンコ、センコツ、センソ、センナ、センナ末、センブリ、センブリ末、ソウジュツ、ソウジュツ末、ソウハクヒ、ソボク、ソヨウ、ダイオウ、ダイオウ末、タイソウ、タクシャ、タクシャ末、チクセツニンジン、チクセツニンジン末、チモ、チヨウジ、チヨウジ末、チヨウトウコウ、チヨレイ、チヨレイ末、チンピ、テンマ、テンモンドウ、トウガシ、トウガラシ、トウガラシ末、トウキ、トウキ末、トウニン、トウニン末、トウヒ、ドクカツ、トコン、トコン末、トチュウ、トラガント、トラガント末、ニガキ、ニガキ末、ニンジン、ニンジン末、ニンドウ、パイモ、バクモンドウ、ハチミツ、ハッカ、ハマボウフウ、ハンゲ、ビヤクゴウ、ビヤクシ、ビヤクジュツ、ビヤクジュツ末、ビワヨウ、ビンロウジ、ブクリヨウ、ブクリヨウ末、ブシ、ブシ末、ベラドンナコン、ヘンズ、ボウイ、ボウコン、ボウフウ、ボタンビ、ボタンビ末、ホミカ、ボレイ、ボレイ末、マオウ、マクリ、マシニン、モクツウ、モッコウ、ヤクチ、ヤクモソウ、ユウタン、ヨクイニン、ヨクイニン末、リュウコツ、リュウタン、リュウタン末、リョウキョウ、レンギョウ、レンニク、ロジン、ロートコン。

## 一般試験法 改正事項

一般試験法の部 前文を次のように改める。

一般試験法は、共通な試験法、医薬品の品質評価に有用な試験法及びこれに関連する事項をまとめたものである。別に規定するもののほか、アルコール数測定、アンモニウム試験、液体クロマトグラフィーによる試験、塩化物試験、炎色反応試験、エンドトキシン試験、核磁気共鳴スペクトル測定、かさ密度測定、ガスクロマトグラフィーによる試験、乾燥減量試験、眼軟膏の金属性異物試験、凝固点測定、強熱減量試験、強熱残分試験、屈折率測定、蛍光光度法による試験、原子吸光光度法による試験、抗生物質の微生物学的力価試験、鮫油試験、酸素フラスコ燃焼法による試験、残留溶媒試験、紫外可視吸光度測定、重金属試験、消化力試験、生薬の微生物限度試験、蒸留試験、浸透圧測定、水分測定、製剤均一性試験（含量均一性試験、質量偏差試験）、製剤の粒度の試験、制酸力試験、赤外吸収スペクトル測定、旋光度測定、タツ密度測定、窒素定量、注射剤の採取容量試験、注射剤の不溶性異物検査、注射剤の不溶性微粒子試験、注射剤用ガラス容器試験、定性反応、滴定終点検出、鉄試験、点眼剤の不溶性異物検査、点眼剤の不溶性微粒子試験、導電率測定、熱分析、粘度測定、薄層クロマトグラフィーによる試験、発熱性物質試験、pH 測定、比重測定、微生物限度試験、ヒ素試験、ビタミン A 定量、比表面積測定、沸点測定、プラスチック製医薬品容器試験、粉体の粒子密度測定、粉末 X 線回折測定、崩壊試験、密度測定、無菌試験、メタノール試験、有機体炭素試験、融点測定、輸液用ゴム栓試験、溶出試験、硫酸塩試験、硫酸呈色物試験及び粒度測定は、それぞれの試験法により行う。ただし、油脂の融点、脂肪酸凝固点、比重、酸価、けん化価、エステル価、水酸基価、不けん化物及びヨウ素価は、油脂試験法中のそれぞれの項に、生薬の試料の採取、分析用試料の調製、鏡検、純度試験、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量及び精油含量の試験は、生薬試験法中のそれぞれの項に従う。

それぞれの試験法等に付した番号は、一般試験法を分類し付与した固有のものである。医薬品各条等において、〈 〉を付すものは該当する一般試験法の番号を示す。

一般試験法の部 1.09 定性反応の条マンガン塩の項の次に次の一項を加える。

### 1.09 定性反応

#### メシル酸塩

(1) メシル酸塩に 2 倍量の水酸化ナトリウムを加え、穏やかに加熱して融解し、20 ～ 30 秒間加熱を続ける。冷後、少量の水を加えた後、希塩酸を加え、加温するとき、発生するガスは潤したヨウ素カリウムデンプン紙を青変する。

(2) メシル酸塩に 3 倍量の硝酸ナトリウム及び 3 倍量の

無水炭酸ナトリウムを加えてよくかき混ぜ、徐々に加熱する。冷後、残留物を薄めた希塩酸 (1 → 5) に溶かし、必要ならばろ過し、ろ液に塩化バリウム試液を加えるとき、白色の沈殿を生じる。

一般試験法の部 2.01 液体クロマトグラフィーの条を次のように改める。

### 2.01 液体クロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーは、適当な固定相を用いて作られたカラムに試料混合物を注入し、移動相として液体を用い、固定相に対する保持力の差を利用してそれぞれの成分に分離し、分析する方法であり、液体試料又は溶液にできる試料に適用でき、物質の確認、純度の試験又は定量などに用いる。

与えられたカラムに注入された混合物は各成分に固有の比率  $k$  で、移動相と固定相に分布する。

$$k = \frac{\text{固定相に存在する量}}{\text{移動相に存在する量}}$$

この比率  $k$  は、液体クロマトグラフィーでは質量分布比  $k'$  などと呼ばれる。この比率  $k$  と移動相のカラム通過時間  $t_0$  ( $k = 0$  の物質の試料注入時からピークの頂点までの時間) 及び保持時間  $t_R$  (測定試料の注入時からピークの頂点までの時間) との間には次の関係があるので、同一条件では、保持時間は物質に固有の値となる。

$$t_R = (1 + k) t_0$$

#### 装 置

通例、移動相送液用ポンプ、試料導入装置、カラム、検出器及び記録装置からなり、必要に応じて移動相組成制御装置、カラム恒温槽、反応試薬送液用ポンプ及び化学反応槽などを用いる。ポンプは、カラム及び連結チューブなどの中に移動相及び反応試薬を一定流量で送ることができるものである。試料導入装置は、一定量の試料を再現性よく装置に導入するものである。カラムは、一定の大きさにそろえた液体クロマトグラフィー用充てん剤を内面が平滑で不活性な金属などの管に均一に充てんしたものである。なお、充てん剤の代わりに固定相を管壁に保持させたものを用いることができる。検出器は、試料の移動相とは異なる性質を検出するもので、紫外又は可視吸光度計、蛍光光度計、示差屈折計、電気化学検出器、化学発光検出器、電気伝導度検出器及び質量分析計などがあり、通例、数  $\mu\text{g}$  以下の試料に対して濃度に比例した信号を出すものである。記録装置は、検出器により得られる信号の強さを記録するものである。必要に応じて記録装置としてデータ処理装置を用いてクロマトグラム、保持時間、又は成分定量値などを記録あるいは出力させることができる。移動相組成制御装置は、段階的制御 (ステップワイズ方式) と濃度勾配制御 (グラジエント方式) があり、移動相組成を制御できるものである。

#### 操 作 法

装置をあらかじめ調整した後、医薬品各条に規定する操作条件の検出器、カラム、移動相を用い、移動相を規定の流量で流し、カラムを規定の温度で平衡にした後、医薬品各条に規定す

する。遮光して湿気避け、冷所に保存する。

標定 操作法に従い、水分測定用メタノール適量を乾燥測定フラスコにとる。これにあらかじめ水分測定用試液を終点まで滴加してフラスコ内を無水の状態にしておく。次に水約 30 mg を精密に量り、速やかに滴定フラスコに入れ、激しくかき混ぜながら水分測定用試液で終点まで滴定する。水分測定用試液の 1 mL に対応する水 (H<sub>2</sub>O) のミリグラム数  $f$  (mg/mL) を次の式によって求める。

$$f \text{ (mg/mL)} = \frac{\text{水 (H}_2\text{O) の採取量 (mg)}}{\text{水 (H}_2\text{O) の滴定に要した水分測定用試液の量 (mL)}}$$

一般試験法の部 2.49 旋光度測定法の条を次のように改める。

## 2.49 旋光度測定法

旋光度測定法は、試料の旋光度を旋光計によって測定する方法である。

一般に光線の振動は、進行の方向に垂直に起こるが、通常の光線では、その振動方向は限定されない。しかし、一般に偏光といわれる平面偏光では、振動は進行方向を含む一平面内のみ起こり、このような光線は、偏光面を有するという。薬品又はその溶液には、偏光面を右又は左に回転させる性質を持つものがある。この性質を光学活性又は旋光性といい、物質の化学構造に関係がある。

旋光度は、光学活性物質又はその溶液が偏光面を回転する角度で、旋光計によって測定する。この値は測定管の層長に比例し、溶液の濃度、温度及び波長に関係する。旋光の性質は、偏光の進行方向に向き合って、偏光面を右に回転するものを右旋性、左に回転するものを左旋性とし、偏光面を回転する角度を示す数字の前に、それぞれ、記号 + 又は - をつけて示す。例えば、+20° は右に 20°、-20° は左に 20° 回転することを意味する。

旋光度  $\alpha'_t$  とは、特定の単色光  $x$  (波長又は名称で記載する) を用い、温度  $t$  °C で測定したときの旋光度を意味し、その測定は、通例、温度は 20°C 又は 25°C、層長は 100 mm、光線はナトリウムスペクトルの D 線で行う。

比旋光度  $[\alpha]_t$  は、次の式で表す。

$$[\alpha]_t = 100 \alpha / lc$$

$t$  : 測定時の温度

$x$  : 用いたスペクトルの特定の単色光の波長又は名称 (D 線を用いたときは、D と記載する。)

$\alpha$  : 偏光面を回転した角度

$l$  : 試料溶液の層、すなわち、測定に用いた測定管の長さ (mm)

$c$  : 日本薬局方では、溶液 1 mL 中に存在する薬品の  $g$  数である。液状薬品を溶液としないでそのまま用いたときは、その密度である。ただし、別に規定するもののほか、この密度の代わりに、その比重を用いる。

医薬品各条で、例えば  $[\alpha]_D^{20}$  : -33.0 ~ -36.0° (乾燥後、1 g、水、20 mL、100 mm) とは、本品を乾燥減量の項に規定する条件で乾燥し、その約 1 g を精密に量り、水に溶かし正確に 20 mL とし、この液につき、20°C、層長 100 mm で測定するとき、 $[\alpha]_D^{20}$  が -33.0 ~ -36.0° であることを示す。

一般試験法の部 4.01 エンドトキシン試験法の条エンドトキシン標準原液の調製の項を次のように改める。

## 4.01 エンドトキシン試験法

エンドトキシン標準原液の調製

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。なお、エンドトキシン単位は EU で示し、1 EU は 1 エンドトキシン国際単位 (IU) に等しい。

一般試験法の部 4.05 微生物限度試験法の条を次のように改める。

## 4.05 微生物限度試験法

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、三薬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. 培地性能及び測定法の適合性

#### 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、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 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°C 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°C 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。

#### 4.4. 培地性能

市販培地についてはパ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、調製パ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パ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パ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 pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH 7.2 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、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。

#### 水に不溶の非脂質製品

被験製品を pH 7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH 7.2 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、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。

#### 脂質製品

被験製品をろ過滅菌したミリ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。必要ならば水浴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イの上に置く。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当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。

#### 4.5.3. 抗菌活性の中和/除去

4.5.2. 及び 4.5.4. 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)上記の手段の組み合わせが含まれる。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(表 4.05-I-2)。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、その製品のもつ殺菌活性のために、接種菌が分離できないと見なす。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。

#### 4.5.4. 製品存在下での微生物回収

表 4.05-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。

##### 4.5.4.1. 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  $\mu\text{m}$  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 4.05-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。

4.5.1. ~ 4.5.3. 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て直ちにろ過し、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)測定用としてサブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す。表 4.05-I-1 に示した条件で平板を培養後、集落数を測定する。

##### 4.5.4.2. 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。

##### 4.5.4.2.1. 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、4.5.1. ~ 4.5.3. 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°C 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サブロー・ブド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くないようにする。

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。

経皮吸収パッチを試験するときは、4.5.1. に記載されている調製液の 10 % 量ずつを 2 枚の滅菌メンブランフィルターで別々にろ過する。1 枚のメンブランフィルターは TAMC の計測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に移し、他のメンブランフィルターは TYMC の計測のためにサブロー・ブドウ糖カンテン培地に移す。

### 5.2.2. カンテン平板法

#### 5.2.2.1. カンテン平板混釈法

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°C で 3 ~ 5 日間培養し、サブロー・ブドウ糖カンテン培地は 20 ~ 25°C 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。

#### 5.2.2.2. カンテン平板表面塗抹法

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。

### 5.2.3. 最確数法

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、希釈する。全ての試験管を 30 ~ 35°C 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 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。

## 5.3. 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。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。細菌の発育のために TYMC が許容基準を超えることが予測される場合には、抗生物質を含むサブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用しても良い。MPN 法で計測を行う場合は、算出値は TAMC とする。

微生物学的品質の許容基準が規定されているときは、以下のよう判定する。

- $10^1$  CFU: 最大許容数 = 20,
- $10^2$  CFU: 最大許容数 = 200,
- $10^3$  CFU: 最大許容数 = 2000, 以下同様。

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. 非無菌製品の微生物学的試験: 特定微生物試験

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。

### 1. 序文

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。

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

試料の調製は、「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、「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、「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。

### 3. 培地の性能試験及び試験の適合性

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。

#### 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。

##### 3.1.1. 好気性微生物

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°C で 18 ~ 24 時間培養する。カンジダ・アルビカンス用の試験菌株は、サブロー・ブドウ糖カンテン培地上、又はサブロー・ブドウ糖液体培地中で、それぞれ 20 ~ 25°C で 2 ~ 3 日間培養する。

*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌): 例えば、ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 483 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,

*Candida albicans* (カンジダ・アルビカンス) : 例えば, ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 又は NBRC 1594

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°C に保存する場合は 24 時間以内に用いる。

### 3.1.2. クロストリジア

*Clostridium sporogenes* : 例 えば ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) 又 は ATCC 19404 (NCTC 532 又は CIP 79.3) を用いる。クロストリジアの試験菌株を強化クロストリジア培地中に接種し, 30 ~ 35°C で 24 ~ 48 時間嫌気的条件下で培養する。*Cl. sporogenes* 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, 芽胞懸濁液を接種菌液として使用できる。芽胞懸濁液は, 保証された期間内は 2 ~ 8°C で保存できる。

### 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。微生物の発育があつてはならない。

### 3.3. 培地の性能試験

市販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 4.05-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。

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°C で培養する。ただし, 増菌を促すほどの時間であつてはならない (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ヨン培地に接種する。30 ~ 35°C 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°C 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つて, 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ヨン培地に接種する。30 ~ 35°C 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°C 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°C 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°C 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°C で 18 ~ 72 時間培養する。

## 4.2.3. 判定

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。

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。

## 4.3. サルモネラ

## 4.3.1. 試料調製及び前培養

被験製品を 10 g 又は 10 mL 採り、(3.4.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°C で 18 ~ 24 時間培養する。

## 4.3.2. 選択培養

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 0.1 mL をラポポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地 10 mL に接種する。30 ~ 35°C で 18 ~ 24 時間培養後、XLD カンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 48 時間培養する。

## 4.3.3. 判定

十分に発育した赤色集落が認められた場合は、中心部の黒点の有無に関わらず陽性を疑い、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。

## 4.4. 緑膿菌

## 4.4.1. 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°C で 18 ~ 24 時間培養する。経皮吸収パッチを試験するときは、「生菌数試験 (4.5.1.)」に記載したように調製し、1 パッチ相当量を滅菌メンブランフィルターでろ過し、そのメンブランフィルターを 100 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中に投入する。

## 4.4.2. 選択培養

セトリミドカンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 72 時間培養する。

## 4.4.3. 判定

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。

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。

## 4.5. 黄色ブドウ球菌

## 4.5.1. 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°C で 18 ~ 24 時間培養する。経皮吸収パッチを試験するときは、「生菌数試験 (4.5.1.)」に記載したように調製した 1 パッチ相当量を滅菌メンブランフィルターでろ過し、そのメンブランフィルターを 100 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中に投入する。

## 4.5.2. 選択培養

マンニット・食塩カンテン培地に移植し、30 ~ 35°C で 18 ~ 72 時間培養する。

## 4.5.3. 判定

黄色の帯に囲まれた黄色又は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。

記載されている種類の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。

## 4.6. クロストリジア

## 4.6.1. 試料調製及び加熱処理

被験製品を「生菌数試験」に記載したように調製する。被験製品 1 g 又は 1 mL 以上に相当する量を 2 本等しく採る。そのうちの 1 本は 80°C で 10 分間加熱後、速やかに冷却し、他の 1 本は加熱しない。

## 4.6.2. 選択培養

それぞれから 1 g 又は 1 mL 相当量を採って、強化クロストリジア培地 100 mL が入っている 2 個の容器 (38 mm × 200 mm) 又は他の容器に移す。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試験管から移植し、嫌氣的条件下で 30 ~ 35°C で 48 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しない) の嫌氣的発育が認められた場合は陽性と判定する。

コロンビアカンテン培地に微生物の嫌氣的発育がみられないか、又はカタラーゼ試験が陽性ならば、その製品は本試験に適合する。

## 4.7. カンジダ・アルビカンス

## 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。同様の発育促進及び選択特性があれば、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 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°C で保存する。

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。

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 (リン酸塩 0.067 mol に相当する)	7.2 g	酵母エキス	3.0 g
塩化ナトリウム	4.3 g	ゼラチン製ペプトン	7.0 g
ペプトン (肉製又はカゼイン製)	1.0 g	胆汁酸塩	1.5 g
水	1000 mL	塩化ナトリウム	5.0 g
確認されたサイクルで高压蒸気滅菌する。		ブドウ糖一水和物	10.0 g
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地		カンテン	15.0 g
カゼイン製ペプトン	17.0 g	ニュートラルレッド	30 mg
ダイズ製ペプトン	3.0 g	クリスタルバイオレット	2 mg
塩化ナトリウム	5.0 g	水	1000 mL
リン酸水素二カリウム	2.5 g	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。煮沸するまで加熱する。オートクレーブで加熱してはならない。	
ブドウ糖一水和物	2.5 g	マッコンキー液体培地	
水	1000 mL	ゼラチン製ペプトン	20.0 g
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压蒸気滅菌する。		乳糖一水和物	10.0 g
ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地		乾燥ウシ胆汁	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g	プロモクレゾールパープル	10 mg
ダイズ製ペプトン	5.0 g	水	1000 mL
塩化ナトリウム	5.0 g	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压蒸気滅菌する。	
カンテン	15.0 g	マッコンキーカンテン培地	
水	1000 mL	ゼラチン製ペプトン	17.0 g
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压蒸気滅菌する。		ペプトン (肉製及びカゼイン製)	3.0 g
サブロー・ブドウ糖カンテン培地		乳糖一水和物	10.0 g
ブドウ糖	40.0 g	塩化ナトリウム	5.0 g
ペプトン (肉製及びカゼイン製 1:1)	10.0 g	胆汁酸塩	1.5 g
カンテン	15.0 g	カンテン	13.5 g
水	1000 mL	ニュートラルレッド	30 mg
滅菌後の pH が 25°C 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压蒸気滅菌する。		クリスタルバイオレット	1 mg
ポテト・デキストロースカンテン培地		水	1000 mL
ジャガイモ浸出液	200 g	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压蒸気滅菌する。	
ブドウ糖	20.0 g	ラバポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地	
カンテン	15.0 g	ダイズ製ペプトン	4.5 g
水	1000 mL	塩化マグネシウム六水和物	29.0 g
滅菌後の pH が 25°C 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压蒸気滅菌する。		塩化ナトリウム	8.0 g
サブロー・ブドウ糖液体培地		リン酸水素二カリウム	0.4 g
ブドウ糖	20.0 g	リン酸二水素カリウム	0.6 g
ペプトン (肉製及びカゼイン製 1:1)	10.0 g	マラカイトグリーン	36 mg
水	1000 mL	水	1000 mL
滅菌後の pH が 25°C 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压蒸気滅菌する。		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压蒸気滅菌する。加熱及び高压蒸気滅菌後の pH が 25°C で 5.0 ~ 5.4 になるようにする。	
モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地		XLD (キシロース・リジン・デンキシコール酸) カンテン培地	
ゼラチン製ペプトン	10.0 g	キシロース	3.5 g
ブドウ糖一水和物	5.0 g	L-リジン	5.0 g
乾燥ウシ胆汁	20.0 g	乳糖一水和物	7.5 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g	白糖	7.5 g
リン酸水素二ナトリウム二水和物	8.0 g	塩化ナトリウム	5.0 g
ブリリアントグリーン	15 mg	酵母エキス	3.0 g
水	1000 mL	フェノールレッド	80 mg
加熱後の pH が 25°C で 7.0 ~ 7.4 になるように pH を調整する。100°C で 30 分間加熱し、直ちに冷却する。		カンテン	13.5 g
バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地			

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。

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℃ 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  
 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。

強化クロストリジア培地

牛肉エキス 10.0 g  
 ペプトン 10.0 g  
 酵母エキス 3.0 g  
 溶性デンプン 1.0 g  
 ブドウ糖一水和物 5.0 g  
 システイン塩酸塩 0.5 g  
 塩化ナトリウム 5.0 g  
 酢酸ナトリウム 3.0 g  
 カンテン 0.5 g  
 水 1000 mL

カンテンを水和させ、絶えずかき混ぜながら煮沸するまで加熱して溶かす。必要ならば、滅菌後の pH が 25℃ でおよそ 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する。

コロンビアカンテン培地

カゼイン製ペプトン 10.0 g  
 肉浸出物のペプシン消化物 5.0 g  
 心筋浸出物のパンクレアチン消化物 3.0 g  
 酵母エキス 5.0 g  
 トウモロコシデンプン 1.0 g  
 塩化ナトリウム 5.0 g  
 カンテン (ゲル強度に従って) 10.0 ~ 15.0 g  
 水 1000 mL

カンテンを水和させ、絶えずかき混ぜながら煮沸するまで加熱して溶かす。必要ならば、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。45 ~ 50℃ まで冷却後、必要に応じ、ゲンタマイシン塩基 20 mg に相当する量のゲンタマイシン硫酸塩 (硫酸ゲンタマイシン) を加えてペトリ皿に注ぎ込む。

表 4.05-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
<i>Staphylococcus aureus</i> 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 °C	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 30 ~ 35 °C	30 ~ 35 °C CFU 18 ~ 24 時間 ≤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 °C ≤3 日間	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 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 °C	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 30 ~ 35 °C	30 ~ 35 °C CFU 18 ~ 24 時間 ≤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 °C ≤3 日間	
<i>Bacillus subtilis</i> 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 °C	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 30 ~ 35 °C	30 ~ 35 °C CFU 18 ~ 24 時間 ≤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 °C ≤3 日間	
<i>Candida albicans</i> 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 °C	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C 30 ~ 35 °C	30 ~ 35 °C CFU 2 ~ 3 日間 ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C 30 ~ 35 °C ≤5 日間 MPN : 適用せず	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間

<i>Aspergillus niger</i> 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 °C 5 ~ 7 日間、又は良好な孢子形成が認められるまで	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジエストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35 °C ≤5 日間 MPN：適用せず	サブロー・ブドウ糖カンテン培地 ≤100 CFU 20 ~ 25 °C ≤5 日間
---	--	--	--	--	--

表 4.05-I-2 阻害物質に対する一般的な中和剤/中和法

阻害物質	中和剤/中和法
グルタルアルデヒド、水銀剤	亜硫酸水素ナトリウム (重亜硫酸ナトリウム)
フェノール類、アルコール、アルデヒド類、ソルビン酸塩	希釈
アルデヒド類	グリシン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ビスビグアニド類	レシチン
四級アンモニウム化合物、パラオキシ安息香酸エステル類、ヨウ素	ポリソルベート
水銀剤	チオグリコール酸塩
水銀剤、ハロゲン類、アルデヒド類	チオ硫酸塩
エデト酸塩 (EDTA)	マグネシウム又はカルシウムイオン

表 4.05-I-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			製品 1 g 又は 1 mL 当たりの最確数	95 % 信頼限界
試験管当たりの製品の g 又は mL 数	0.1	0.01		
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	

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		
モーゼル腸内細菌増菌 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		
ラバポート・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・デオキシコール酸) 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
	鑑別	<i>E.coli</i>
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		
マンニット・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>
コロニアカンテン培地	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 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	
+	+	+	10 <sup>2</sup> より大きい
+	+	-	10 <sup>2</sup> より小さく、10 <sup>2</sup> より大きい
+	-	-	10 <sup>2</sup> より小さく、10 より大きい
-	-	-	10 より小さい

一般試験法の部 6.01 眼軟膏剤の金属性異物試験法の条試料の調製の項及び操作法の項を次のように改める。

### 6.01 眼軟膏剤の金属性異物試験法

#### 試料の調製

本剤 10 個につき、できるだけ清潔な場所で、5 g ずつを取り出し、それぞれを直径 60 mm の平底ペトリ皿に入れる。平底ペトリ皿にふたをし、85 ~ 110 °C で 2 時間加熱して基剤を完全に溶かした後、揺り動かさないように注意しながら室温で放置し、固まらせる。内容量が 5 g 未満の場合には、全量をなるべく完全に取り出し、同様に操作する。

#### 操作法

平底ペトリ皿を反転し、マイクロメーターの付いた 40 倍以上の倍率の顕微鏡を用い、光源を上方 45° の角度より照射し、それぞれの平底ペトリ皿の底の 50 μm 以上の金属性異物の数を数える。

注意：試験に用いる平底ペトリ皿は、泡、きずなどがなく、内面の周縁と底面の角度がなるべく直角のものを用いる。

同条操作法の項の次に次の一項を加える。

#### 判定

本剤 10 個の 50 μm 以上の金属性異物の合計数は 50 個以下であり、かつ個々の平底ペトリ皿のうち金属性異物が 8 個を超えるものが 1 枚以下のときは適合とする。これに適合しないときは、更に 20 個について同様に試験し、本剤 30 個の金属性異物の合計が 150 個以下であり、かつ個々の平底ペトリ皿のうち金属性異物が 8 個を超えるものが 3 枚以下のときは適合とする。

一般試験法の部 6.08 点眼剤の不溶性微粒子試験法の条操作法の項の次に次の一項を加える。

### 6.08 点眼剤の不溶性微粒子試験法

#### 判定

本剤 1 mL 中の個数に換算するとき、300 μm 以上の不溶性微粒子が 1 個以下であるときは適合とする。

一般試験法の部 6.10 溶出試験法の条装置の項パドル法の装置（装置 2）の目を次のように改める。

### 6.10 溶出試験法

パドル法の装置（装置 2）：装置は、装置 1 と同様のものを用いるが、攪拌部には攪拌翼と回転軸からなるパドルを用いる。回転軸は、どの部分でも容器の垂直方向の中心軸からの隔たりが 2 mm 以内とし、滑らかに回転させ、結果に影響を及ぼすような揺動及び振動が生じないようにする。パドルの仕様は図 6.10-2 に示す通りで、攪拌翼の垂直方向の軸が回転軸の中心を貫通し、攪拌翼の底部は回転軸の下端と同一平面となるようにする。試験中は、容器の内底と攪拌翼の下端との距離は 25 ± 2 mm に固定する。攪拌翼と軸は金属又は化学的に不活性で堅牢な材質の一体化したものを用いる。試験中に攪拌翼と回転軸をしっかり固定できるならば、両者が取り外せるパドルを用いることができる。攪拌翼と回転軸は、化学的に不活性にするために適当な被覆剤で覆うことができる。試料は、攪拌翼の回転を始める前に、通例容器の底部に沈める。試料が浮く場合には、らせん状に数回巻いた針金のような、化学的に不活性な材質でできた小型の締め付けないシンカー又は例として図 6.10-2 a に示したシンカーを試料に取り付けることができる。また、それら以外のバリエーションされたシンカーを用いることもできる。\*シンカーを使用することが規定されている場合、シンカーは別に規定するもののほか、図 6.10-2 a に示したものをを用いる。