

表 試験法のタイプと検討が必要な分析能パラメータ

分析能 パラメータ	タイプ	タイプII		タイプIII
		定量試験	限度試験	
真度	-	+	-	+
精度				
併行精度	-	+	-	+
室内再現精度	-	-*	-	-*
室間再現精度	-	+*	-	+*
特異性**	+	+	+	+
検出限界	-	-	+	-
定量限界	-	+	-	-
直線性	-	+	-	+
範囲	-	+	-	+

- 通例評価する必要がない。

＋ 通例評価する必要がある。

* 分析法及び試験法が実施される状況に応じて、室内再現精度又は室間再現精度のうち一方の評価を行う。日本薬局方に採用される分析法のバリデーションでは、通例、後者を評価する。

** 特異性の低い分析法の場合には、関連する他の分析法により補うこともできる。

分析法バリデーションで用いられる用語

頑健性 (Robustness)

頑健性とは、分析条件を小さい範囲で故意に変化させるとときに、測定値が影響されにくい能力のことである。反応液の pH、反応の温度、反応時間又は試薬の量などの分析条件を適当な範囲で変化させ、測定値の安定性を検討する。測定値が分析条件に対して不安定な場合には、安定な測定値が得られるように分析法に改良を加える。また、頑健性の結果は、最終的な分析法において分析条件を示す数値の有効数字又は留意事項として反映させる。

試験室

試験室とは、試験を行う部屋、施設を意味する。本分析法バリデーションでは、試験室を変えるということは、試験者、装置及び試薬ロットなどの分析条件が変化することを意味する。

試験法

試験法とは、一般試験法及び医薬品各条における試験方法、例えば、純度試験、定量法などを意味する。試験法には、試料の採取方法、規格値、分析法などが含まれる。

生産者危険

規格を満たしている製品が、試験を行うことにより、誤って不合格と判断される確率のこと。通例、 α で表す。第 1 種の過誤とも言い、限度試験の場合には偽陽性率に相当する。

消費者危険

規格外の製品が、試験を行うことにより、誤って合格と判断される確率のこと。通例、 β で表す。第 2 種の過誤とも言い、限度試験の場合には偽陰性率に相当する。

測定回数

分析法の手順の中に含まれる回数。分析法の精度を上げるために、分析法の中であらかじめ測定回数を 2 回以上に指定することがある。分析法バリデーションでは、分析法の中で定められた測定回数も含めた分析法を評価する。

分析法の精度を評価するために繰り返し分析を行うときの繰

り返し数とは別のものである。

測定値

一回の分析により得られる一個の値。

分析法

本文が対象としている分析法は、試料中に存在する分析対象物の量又は濃度に依存する測定値を与える分析法及び確認試験に用いられる分析法である。本文における分析法とは、試験法の分析過程を意味する。

15. 保存効力試験法

本試験法は、製剤の保存効力を微生物学的に評価する試験方法である。製剤の中に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力を評価する。

製剤の保存効力は、有効成分自体の作用によるものであれ、添加されたものであれ、多回投与容器中につめられたすべての注射剤で証明する。また、点眼剤及び点鼻・点耳剤などでも保存性を証明する。更に多回投与の制酸剤など経口剤でも保存性の証明が必要である。本試験の目的により、製剤を水溶性基剤で作られたものとそれ以外のものの 2 つのカテゴリーに分ける。前者は剤形により 4 群に細分類する。

本試験で使用することが指定されている微生物菌種は、いずれも製剤の製造、使用若しくは保存中に環境から混入するおそれのあるものの代表である。これらの指定被検微生物に加えて、被検製剤の特殊な性質や特定の製造工程から混入した、若しくは混入して増殖するおそれがある微生物を、保存効力を評価するための被検菌として使用することが可能である。なお、医薬品 GMP に対応するために、又は単に生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らない。保存剤は、それ自体毒性のある物質である。それ故、ヒトへの安全性がおびやかされるような量を製剤に添加してはならない。保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。

製剤とそのカテゴリー

本試験を行うために、製剤を 2 つのカテゴリーに分類する。カテゴリー I に含まれるものは水溶性基剤で作られたもの、カテゴリー II に含まれるものは非水溶性基剤で作られたものである。なお、水中油型乳剤 (oil-in-water emulsion) はカテゴリー I に、油中水型乳剤 (water-in-oil emulsion) はカテゴリー II に含まれる。カテゴリー I は、剤形によって 4 群に細分類する。

カテゴリー IA : 注射剤及び点耳・点眼剤を含む非経口剤。

カテゴリー IB : 粘膜に投与される外用剤で、点鼻用液剤や吸入剤などが含まれる。

カテゴリー IC : 制酸剤を除く経口液剤。

カテゴリー ID : 制酸剤 (溶解後投与される固形の制酸剤を含む)。

カテゴリー II : 非水溶性基剤で作られた製剤で、カテゴリー I に記載しているすべての剤形を含む。

被検菌株と培地

以下の菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を使用する。

Escherichia coli ATCC 8739, NCIMB 8545

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027, NCIMB 8626

Staphylococcus aureus ATCC 6538, NCTC 10788

Candida albicans ATCC 10231, NCPF 3179

Aspergillus niger ATCC 16404, IMI 149007

上記 5 種の指定菌株に加えて、製剤の性質により混入して増殖するおそれのある微生物や製造工程の中で混入するおそれのある微生物を被検菌株として使用することができる（例えば、高濃度の糖分を含む製剤の場合は、耐浸透圧性酵母 *Zygosaccharomyces rouxii* などを使用できる）。被検微生物は混合せず、それぞれ単独に製剤に混入して試験する。接種菌の培養は、カントン平板培養若しくは液体培養のいずれかを採用する。

カントン平板培養：上記 5 種の菌株をそれぞれカントン平板培地又はカントン斜面培地の表面に接種して培養する。カントン培地としては、細菌の場合はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカントン培地を、真菌の場合はサブローカントン培地、GP（グルコース・ペプトン）カントン培地又はボテト・デキストロースカントン培地のいずれかを使用する。培養条件は、細菌の場合は 30 ~ 35 °C, 18 ~ 24 時間, *C. albicans* では 20 ~ 25 °C, 48 時間, *A. niger* では 20 ~ 25 °C, 1 週間である。これらの培養菌体を白金耳等で無菌的に採取し、滅菌生理食塩液若しくは 0.1 % ペプトン食塩液に浮遊させ、約 10⁸ 個/mL の生菌を含む浮遊液を調製する。*A. niger* の場合には、ポリソルベート 80 を 0.05 % の割合で添加した滅菌生理食塩液又は 0.1 % ペプトン食塩液に浮遊させ、約 10⁸ 個/mL の胞子を含む浮遊液を調製する。これらの浮遊液を接種菌液として使用する。

液体培養：上記 4 種 (*A. niger* は除く) の菌株をそれぞれ適当な液体培地に培養後、遠心分離して培地を除く。菌体は滅菌生理食塩液若しくは 0.1 % ペプトン食塩液で洗浄して、同じ溶液で約 10⁸ 個/mL の生菌若しくは胞子を含む接種菌液を調製する。

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菌に適した方法を採用する。カントン平板法と液体培養法のいずれにおいても、得られた接種菌液中の菌数は使用直前に計測する。得られた菌数値より接種直後における製剤 1 mL (g) 当たりの菌数を算出する。浮遊液は 1 時間以上室温に放置しない。

試験手順

(1) カテゴリー I 製剤

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入し、均等に混合する。上記の容器中に菌液を無菌的に混合し難いときは、滅菌した同じ容器若しくは同じ材質の容器 5 個のそれぞれに製剤 10 ~ 20 mL ずつを無菌的に移し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 2 個の製剤を含む容器を菌無接種対照として使用する。菌液を製剤中に均等に混合するために、滅菌した注射針、スパーテル、ガラス棒などを使用できる。混合する接種菌液の量が製剤の $\frac{1}{100}$ 量を超えてはならない。通常製剤 1 mL 当たり 10⁸ ~ 10⁹ 個の生菌数になるように接種、混合する。ただし、制酸剤の場合は製剤 1 mL 当たり 10⁸ ~ 10⁴ 個の生菌数が適当である。これらの容器を 20 ~ 25 °C で保存し、7, 14, 21 及び 28 日目に生菌数を測定する。上記の期間中、混合試料に顕著な変化（例えば、色調の変化や異臭の

発生）が観察されたときは記録する。生菌数の経時的な変化は、試験開始時の菌数を 100 とした百分率で表される。生菌数測定は、原則として「微生物限度試験法」に記載されているカントン平板混合法による。なお、この場合、保存剤に効果的な不活化剤が知られている場合は、カントン平板中に添加することができる。ただし、不活化剤が微生物の増殖に影響を与えないという確認が必要である。保存剤や製剤そのものの存在が生菌数測定に影響し、かつ適当な不活化剤のない場合は、「微生物限度試験法」に記載されているメンブランフィルター法により生菌数を測定する。

(2) カテゴリー II 製剤

カテゴリー I で示された手順と同様に行うが、被検菌を製剤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に、特別の手技と配慮が要求される。

半固体の軟膏基剤製品では、試料を 45 ~ 50 °C に加熱して油状とし、温度を下げた後、浮遊液を加えて滅菌ガラス棒又はスパーテルで接種菌を均一に分散させる。均一に分散されていることを肉眼で確認するために、接種菌の生残性や増殖性に影響を与えないことが知られている指示薬（例えばフェノールレッド試液）を加えてもよい。均一に混合されるように、界面活性剤を加えてもよいが、添加される界面活性剤が接種菌の生残性や増殖性に影響を与えること、かつ、製剤の保存効力を増強させないことを確認する必要がある。生菌数測定のために被検材料を回収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添加することが望ましいこともある。特に、半固体軟膏剤や油性剤などに接種された微生物を液体培地中に均一に分散させるには、ソルビタンモノオレイン酸エステル、ポリソルベート 80、レシチンなどを使用するとよい。これらは頻繁に使用される保存剤の多くを不活化したり、中和させる作用がある。

判定

判定の基準は、当該製剤の属するカテゴリーと剤形のタイプによって異なる。以下に個別に記されている試験結果が得られた場合、保存効力があると判定する。なお、無菌製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を要する。

カテゴリー IA：混合試料中の細菌の生菌数が最初の 14 日の試験期間内に、接種した菌数に比べて 0.1 % 以下に減少し、その後 28 日間までの試験終了時まで、そのレベルと同等若しくはそれ以下の生菌数にとどまっていた場合；及び、混合試料中の真菌の生菌数が接種後 14 日目と 28 日目で、接種した菌数と同レベル若しくはそれ以下にとどまっていた場合。

カテゴリー IB：混合試料中の細菌の生菌数が最初の 14 日の試験期間内に、接種した菌数に比べて 1 % 以下に減少し、その後 28 日間までの試験終了時まで、そのレベルと同等若しくはそれ以下の生菌数にとどまっていた場合；及び、混合試料中の真菌の生菌数が接種後 14 日目と 28 日目で、接種した菌数と同レベル若しくはそれ以下にとどまっていた場合。

カテゴリー IC：混合試料中の細菌の生菌数が最初の 14 日の試験期間内に、接種した菌数に比べて 10 % 以下に減少し、その後 28 日間までの試験終了時まで、そのレベルと同等若しくはそれ以下の生菌数にとどまっていた場合；及び、混合試料中の真菌の生菌数が接種後 14 日目と 28 日目で、接種した菌数と同レベル若しくはそれ以下にとどまっていた場合。

カテゴリーⅠD：混合試料中の細菌と真菌のそれぞれの生菌数が接種後14日目と28日目で、接種した菌数と同レベル若しくはそれ以下にとどまっていた場合。

カテゴリーⅡ：混合試料中の細菌と真菌のそれぞれの生菌数が接種後14日目と28日目で、接種した菌数と同レベル若しくはそれ以下にとどまっていた場合。

上記の判定基準を表1に示す。なお、これらに加えて、菌無接種対照試料として使用された非無菌製剤中の細菌と真菌のそれぞれ生菌数が、試験開始後14日目と28日目において、試験開始時のそれに比べて、同レベル若しくはそれ以下にとどまっているなければならない。

表1 製剤別判定基準

製剤	微生物	判定基準	
		14日後	28日後
カテゴリーⅠA	細菌	接種菌数の 0.1%以下	14日後のレベルと同等 若しくはそれ以下
	真菌	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下
カテゴリーⅠB	細菌	接種菌数の 1%以下	14日後のレベルと同等 若しくはそれ以下
	真菌	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下
カテゴリーⅠC	細菌	接種菌数の 10%以下	14日後のレベルと同等 若しくはそれ以下
	真菌	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下
カカテゴリーアⅡ及び	細菌	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下
	真菌	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下	接種菌数と同レベル 若しくはそれ以下

培地等

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

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

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH:7.1～7.5

サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ペプトン(肉製及びカゼイン製)	10.0 g
ブドウ糖	40.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH:5.4～5.8。抗生素質を添加する必要はない。

GP(グルコース・ペプトン)カンテン培地

ブドウ糖	20.0 g
酵母エキス	2.0 g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5 g
ペプトン	5.0 g
リン酸二水素カリウム	1.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH:5.6～5.8。抗生素質を添加する必要はない。

ポテト・デキストロースカンテン培地

ポテトエキス	4.0 g
ブドウ糖	20.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH:5.4～5.8。抗生素質を添加する必要はない。

0.1%ペプトン食塩液

ペプトン	1.0 g
塩化ナトリウム	8.9 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH:7.2～7.4

16. 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法

本試験法は、無菌医薬品の製造区域における微生物管理方法及びその評価法について示す。無菌医薬品の製造区域は、清浄空気の要求特性により、重要区域及び清浄区域に分類される。重要区域とは、清浄度管理が行われている限られた空間であって、空気中における浮遊微粒子数及び浮遊微生物数がグレードAに管理され、その空間を形成する設備・機器の表面及び供給される材料、薬品、水などについても要求される清潔度が保持され、必要に応じて温度、湿度、圧力などの環境条件についても管理が行われている区域を指す。清浄区域とは、空気、ガス又は液体中の汚染物について清潔度管理が行われ、要求される清潔度が保持されている空間を指すが、無菌操作を行う区域を意図したものではない。無菌医薬品の製造に当たっては、微生物学的管理が適切に維持されていることを保証するために、環境、設備及び作業員に対する微生物学的モニタリングを適切な頻度で行う必要がある。汚染微生物の検出は、予め定めたサンプリング計画に従い、適切なサンプリング装置を用い、原則として通常の作業形態下で行わなければならない。空中微生物及び表面付着微生物の捕集、培養、計数、評価方法は、モニタリング目的、対象物、検出対象微生物等によって異なるので、目的、対象物等に応じた適切な方法の選択が必要である。なお、本法に示すサンプリング装置及び測定方法、培地及び培養温度、モニタリング頻度、並びに環境微生物の評価基準値は飽くまで