

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

も参考情報であり、絶対的なものではない。

1. 定義

本試験法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。

1) 製造区域：培養、抽出・精製、原料秤量、容器・栓等の洗浄・乾燥、薬剤の調製・充てん作業、閉塞、包装等の作業を行う場所、及び更衣を行う場所をいう。

2) 処置基準：微生物の数（及び必要に応じて種）に対して設定した基準値をいい、この値を超えた場合には直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置をとる。

3) 警報基準：微生物の数（及び必要に応じて種）に対して設定した基準値をいい、この値は予知される問題点を早期に警告するものであり、その設定レベルを超えた場合には直ちに是正措置を必要とはしないが、調査は行う必要がある。

4) 汚染物：対象物に付着、混入することなどによって汚染を引き起こす空中微粒子及び環境微生物をいう。

5) 清浄度：対象物の清浄状態を示す量をいい、一定面積又は一定体積中に含まれる汚染物の数又は質量によって表す。

6) 清浄度管理：限られた空間又は表面について、要求される清浄度を保持するために必要とされるあらゆることがらについて、計画をたて、組織し、実施することをいう。

7) 作業シフト：同じ作業員又はグループによってなされる一定の作業又は作業時間をいい、通常、1シフトは12時間以内である。

8) 性状検査：汚染菌を識別できる程度に区分するための手段をいい、日常管理では、属レベルまでの分類でよいが、必要に応じて種レベルの同定を行う。

2. 無菌医薬品製造区域の空気清浄度

医薬品製造環境の空中微粒子は、物理的には製品に侵入して不溶性微粒子の原因の一つになりえる。また、生物学的には微生物の媒体として作用するため、空気中の微粒子数を最小限にし、存在する微粒子を効果的に排除することが必要である。無菌医薬品の製造において、各作業別に要求される空気清浄度を表1に示す。

表1 無菌医薬品製造のための空気の清浄度

空気の清浄度レベル グレード*	最大許容微粒子数/ m^3	
	非作業時 0.5 μm 以上	作業時 0.5 μm 以上
A (層流作業区域)	3,530	3,530
B (非層流作業区域)	3,530	353,000
C	353,000	3,530,000
D	3,530,000	—**

* 1 作業時における最大許容微粒子数は、USP<1116>の規格と次のように対応している。グレードAはクラス100(M3.5)、グレードBはクラス10,000(M5.5)、グレードCはクラス100,000(M6.5)、グレードDについては対応する規格はない。

* 2 作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

2.1 最終滅菌法を適用できる無菌医薬品

溶液の調製は、通例、グレードCの環境で行う。密封容器を使うなど、汚染を極力少なくするための追加措置が講じられている場合には、グレードDでの溶液調製も許容される。注射剤の充てん作業は、グレードC以上の環境内に設置されたグレードAの環境で行う。注射剤以外の無菌医薬品の調製及び充てんも、通例、注射剤に準じる。

2.2 ろ過滅菌後、一連の無菌操作法で製造される無菌医薬品

出発原料の秤量及び溶液調製は、グレードC以上の環境で行う。これらの作業は、ろ過の前まで密封容器を使うなど、汚染を極力少なくするための追加措置が講じられている場合には、グレードDの環境で行なうことが許容される。無菌ろ過後、閉塞までの全ての無菌操作は、グレードAの環境で取り扱わなければならない。

2.3 原料段階から一連の無菌操作法で製造される無菌医薬品

出発原料の取扱い及び閉塞までの全ての無菌操作をグレードAの環境で行わなければならない。

3. 環境モニタリングによる環境微生物の管理

環境モニタリングは、無菌操作法で製造される無菌医薬品においては、特に重要な無菌性保証要素である。環境モニタリングの主目的は、製造区域への環境悪化を事前に予知し、製品の品質に悪影響を及ぼすことを防ぐとともに、適切な清浄度管理により、高度な無菌医薬品の製造を行うことにある。

3.1 環境微生物のモニタリング

a) 無菌医薬品の製造区域における環境微生物のモニタリングプログラムの手順書を各施設ごとに作成すること。手順書に含まれる項目としては、1) モニタリング対象物、2) モニタリング対象微生物、3) モニタリング頻度、4) モニタリング方法、5) モニタリング対象物に対する警報及び処置基準値、6) 設定基準値に達した際の具体的な処置手順などがある。

b) 無菌操作、無菌管理を行う環境とその周辺では、環境微生物の定期的なモニタリングが必要であり、無菌医薬品が環境空気と直接接触する重要区域においては、作業シフトごとのモニタリングが必要である。モニタリング対象物としては、空気、床、壁、機械表面、作業員の着衣や手袋などがある。微生物のモニタリングの参考頻度を表2に示す。

c) 環境微生物のモニタリングに使用するサンプリング装置、方法及び培地は、検出しようとする微生物（好気性細菌、嫌気性細菌、カビ、酵母など）に適したものでなければならない。また、検出対象微生物に適切な培養温度及び培養期間等の培養条件を選択すべきである。通例、環境微生物試験に用いられている培地及び培養条件を表3に示す。

d) サンプリングしたものは、微生物限度試験法のメンブレンフィルター法、カンテン平板混釀法、カンテン平板表面塗抹法及び液体培地段階希釀法（最確数法）等によって生菌数を計測する。

e) 環境微生物の参考評価基準を表4に示す。各モニタリング対象物の警報基準値と処置基準値は、じゅうぶんなデータが収集された後、必要に応じて調整することができる。環境モニタリングにおいて重要なことは、モニタリング対象物が一定の清浄度を維持していることを恒常に監視することである。

f) 分離された微生物については、必要に応じて性状検査を行う。また、微粒子数についてもその経時的又は経日的推移を

分析し、無菌医薬品の製造区域の環境評価データとする。

3.2 環境モニタリングデータの評価

a) 環境モニタリングデータは、定期的に評価し、各区域又は場所において予知される環境上の問題点を推論する。また、問題が発生したときには、直ちに原因調査を開始し、調査結果を報告書にまとめる。再モニタリングは、問題区域が再び元の管理された状態に戻ったことを立証できる方法で実施しなければならない。

b) 調査報告書は、予め定めた責任者あるいは品質管理責任者により評価及び承認され、その後、当該製造区域に従事する主な関係者に配付する。

4. サンプリング装置及び測定方法

空中微生物又は表面付着微生物の捕集や測定に関しては、種々のサンプリング装置及び方法がある。モニタリングの目的及び対象物によって、適切なサンプリング装置及び方法を選定しなければならない。

4.1 空中微生物の測定方法

a) 落下菌測定法

寒天培地を入れた一定の大きさのペトリ皿を、測定場所でふたをとり、一定時間放置後、表面に落下した微生物を培養し、集落数を計数する方法である。本法は、静置した培地の表面に沈降しなかった微生物を検出できないこと、微生物凝集物の沈降速度は気流の影響を受けることから、微生物の総数を定量的にモニタリングする際には有効でない。本法は、得られる結果が定性又は半定量的であるが、製品又は装置が空中に浮遊する微生物によって汚染される可能性を、長時間モニタリングするのに適切な方法である。

表2 微生物のモニタリングの参考頻度

製造区域	モニタリングの参考頻度
重要区域（グレードA）	作業シフト毎
重要区域に隣接する清浄区域（グレードB）	作業シフト毎
他の清浄区域（グレードC, D）	週2回
製品や容器と接触する区域	週1回

表3 培地及び培養条件

検出対象 微生物	培地 ^{*1}	培養条件
好気性 細菌	ソイビーン・カゼイン・ダイジェ スト カンテン（又は液体）培地 ブレインハートインフュージョン カンテン（又は液体）培地 ニュートリエント カンテン（又 は液体）培地	30～35°C ^{*2} 5日間以上 ^{*3}
酵母及び カビ	ソイビーン・カゼイン・ダイジェ スト カンテン（又は液体）培地 サブローデキストロース カンテ ン（又は液体）培地 ポテト・デキストロース カンテ ン（又は液体）培地 グルコースペプトン カンテン (又は液体) 培地	20～25°C ^{*2} 5日間以上 ^{*3}
嫌気性 細菌 ^{*4}	ソイビーン・カゼイン・ダイジェ スト カンテン培地 クックドミート液体培地 強化クロストリジウム カンテン (又は液体) 培地 無菌試験用チオグリコール酸培地 I (又はカンテン培地)	30～35°C 5日間以上 ^{*3}

*1 培地には、必要に応じて適切な濃度の抗生物質を添加してもよい（微生物限度試験法参照）。また、被検面に消毒剤の存在する恐れがあり、それが試験時に混入する可能性のある場合には、それを不活化する物質を添加する。

*2 好気性細菌と酵母及びカビをソイビーン・カゼイン・ダイジェスト カンテン培地で検出する場合には、25～30°Cで5日間以上の培養も許容される。

*3 信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後5日以前の計測値を採用してもよい。

*4 通例、微生物モニタリングに、嫌気性細菌は含まれない。嫌気性細菌の検出にカンテン培地を用いる場合には、適当な装置を用いて嫌気培養を行うこと。

表4 環境微生物の評価基準¹⁾

グレード	空中微生物数 ²⁾ (CFU/m ³)	最小空気採取量 (m ³)	表面付着微生物数	
			機器、設備	手袋
A	<1	0.5	<1	<1
B	10	0.5	5	5
C	100	0.2	25	—
D	200	0.2	50	—

¹⁾ 各条件における平均許容上限値を示す。²⁾ スリットサンプラー法又は同等の微生物捕集性能を有する方法を用いての値。³⁾ コンタクトプレート（直径約 5.4～6.2 cm）当たりに現れる生菌数を示す。拭き取り法を用いる場合には、25 cm²当たりの表面積の換算値とする。手袋の場合は、通常、5指をプレートに押捺。

b) 浮遊菌測定法

1) 測定法

一定量の空気を吸引する方法で、サンプリング方法によってろ過型サンプリング装置及び衝突型サンプリング装置がある。ろ過型サンプリング装置は、吸引力及びフィルターサイズを適切に変えることによって、希望する空気量を捕集することができるが、フィルターを無菌的にホールダーに取り付けたり、取り出すときに注意を要する。重要区域で使用する場合、空気の流れを乱し、無菌医薬品の製造に悪影響を及ぼさないように注意を払うこと。フィルターには、ゼラチンフィルター等を用いたウエットタイプ及びメンブランフィルターを用いたドライタイプのものがある。ドライタイプのフィルターは、静電気の影響により微生物粒子をフィルター上に定量的に捕集できないことがある。

衝突型サンプリング装置の選択及び使用に当たっては、捕集される空気の培地への衝突速度が捕集された微生物粒子に悪影響を及ぼさず、かつ微生物を捕集するのにじゅうぶんな速度であること。また、空気の吸引量は、それぞれの微生物汚染限度に応じ微生物汚染を検出するのにじゅうぶんな量であり、かつ培地の物理的・化学的特性を大きく変えるものであってはならない。重要区域で使用する場合、空気の流れを乱し、無菌医薬品の製造に悪影響を及ぼさないように注意を払うこと。

2) 測定装置

一般的に使用される浮遊菌測定装置には、①スリットサンプラー、②アンダーセンサンプラー、③ピンホールサンプラー、④遠心型サンプラー及び⑤ろ過型サンプラーがある。スリットサンプラーは、回転するカンテン培地に一定サイズのスリットを通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、培地の回転速度及びスリットと培地表面との距離を調節して測定し、最大1時間まで時系列的に微生物の推移を把握することができる。アンダーセンサンプラーは、多孔板とカンテン培地を数段組み合わせ、培地に多孔板を通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、空気中の微生物の粒子分布を測定するに適している。ピンホールサンプラーは、スリットサンプラーのスリット部分がピンホールになった装置で、回転するカンテン培地に数個のピンホールを通して一定流量の空

気を吹きつけて微生物を捕集する。遠心型サンプラーは、回転羽根を回転し、一定流量で吸引した空気を周囲に固定したカンテン培地のストリップに吹きつけて微生物を捕集する装置で、機器の持ち運びが容易で局所の測定に適している。ろ過型サンプラーの特性については、1) 項の測定法を参照。

4.2 表面付着微生物の測定方法

a) コンタクトプレート法

適切な接触表面を有するコンタクトプレートを使用する。サンプリング箇所に、コンタクトプレート全体を均等に数秒間接触させる。この際、回転させたり直線的に動かしてはならない。接触後、プレートに覆いをし、できるだけ速やかに適切な培養条件で培養する。なお、コンタクトプレート使用後は、接触箇所に付着した培地成分を無菌的に拭き取ること。

b) 拭き取り法

無菌のガーゼ、脱脂綿、綿棒等を適切なリンス液に浸し、予め規定された表面積をゆっくりと回転、又は平行線状に拭き取ることによってサンプリングを行う。サンプリング後、ガーゼ、脱脂綿、綿棒等を適切な一定量のリンス液に入れて攪拌後、適切な方法で微生物数を測定する。

5. 浮遊菌測定サンプリング装置の捕集性能試験

浮遊菌測定サンプリング装置の捕集性能試験は、JIS K 3836（空中浮遊菌測定器の捕集性能試験法）又は ISO 14698-1（クリーンルームの生物汚染管理、一般原則）によって行う。

6. 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

微生物限度試験法の1. 生菌数試験の「培地の性能試験及び発育阻止物質確認試験」を準用する。

培地

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト カンテン（又は液体）培地

微生物限度試験法を参照。

サブローデキストロース カンテン（又は液体）培地

微生物限度試験法を参照。ただし、抗生物質は必要に応じて添加する。

ポテトデキストロース カンテン（又は液体）培地

微生物限度試験法を参照。ただし、抗生物質は必要に応じて添加する。

グルコースペプトン カンテン（又は液体）培地

微生物限度試験法を参照。ただし、抗生物質は必要に応じて添加する。

液状チオグリコール酸培地（又はカンテン培地）

無菌試験法を参照。ただし、カンテン培地のカンテン濃度は約 1.5 % とする。

ブレインハートインフュージョン カンテン（又は液体）培地

子ウシ脳 200 g からの浸出物	
ウシ心臓 250 g からの浸出物	
ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	2.5 g
カンテン	15.0 g
水	1,000 mL

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 7.2 ~ 7.6

ニュートリエント カンテン（又は液体）培地

牛肉エキス	3.0 g
ペプトン	5.0 g
カンテン	15.0 g
水	1,000 mL

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 6.6 ~ 7.0

クックドミート液体培地

ウシ心臓 450 g からの浸出物	
ペプトン	20.0 g
ブドウ糖	2.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
水	1,000 mL

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 7.2 ~ 7.6

強化クロストリジウム カンテン（又は液体）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	5.0 g
L-システィン塩酸塩	0.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
酢酸ナトリウム三水和物	3.0 g
カンテン	15.0 g
水	1,000 mL

液体培地の場合、カンテンを 0.5 g 加える。

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 6.7 ~ 6.9

リンス液

リン酸緩衝液 (pH 7.2)
微生物限度試験法を参照。

ペプトン食塩緩衝液 (pH 7.0)
微生物限度試験法を参照。

リングル溶液 $\frac{1}{4}$ 濃度

塩化ナトリウム	2.25 g
塩化カリウム	0.105 g
塩化カルシウム二水和物	0.16 g
水	1,000 mL

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 7.0

チオ硫酸リングル溶液

チオ硫酸ナトリウム五水和物	0.8 g
リングル溶液 $\frac{1}{4}$ 濃度	1,000 mL
121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌	
後の pH 6.6	

LP 希釀液

カゼイン製ペプトン	1.0 g
大豆レシチン	0.7 g
ポリソルベート 80	1.0 ~ 20.0 g
水	1,000 mL

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 7.2

液体培地の場合、カンテンを 0.5 g 加える。

121 °C で 15 ~ 20 分間高压蒸気滅菌する。滅菌
後の pH 6.7 ~ 6.9