

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℃ 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 4.05-1-3 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℃ で 3 ～ 5 日間、サブロー・ブドウ糖カンテン培地を 20 ～ 25℃ 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℃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℃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1g又は1mL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、カンテン平板混濁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℃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1g又は1mL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を検出されても、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を検出されても、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、以下のように判定する。

- － 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℃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・ブドウ糖培地中で、それぞれ 20 ～ 25℃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 4.83 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 I00797, 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、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。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。

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℃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℃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。微生物の発育があってはならない。

3.3. 培地の性能試験

市販生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1g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1gに相当する量をモーゼル腸内細菌増菌培地に接種する。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0.1g, 0.01g, 0.001g（又は0.1mL, 0.01mL, 0.001mL）相当量を、適量のモーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地に接種する。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1g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10mL、あるいは1g又は1mL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1mLをマッコンキー液体培地100mL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。

4.2.3. 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10g又は10mL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℃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 をラパポート・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℃で 18 ～ 24 時間培養後、XLD カンテン培地に移植し、30 ～ 35℃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℃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℃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℃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℃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℃ 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 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 0.067mol に相当する)
又はリン酸水素二ナトリウム十二水和物	14.5g
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	2.3 g
又はブドウ糖一水和物	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
塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン	15.0 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。

サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ブドウ糖	40.0 g
ペプトン（肉製及びカゼイン製）	10.0 g
カンテン	15.0 g
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圧蒸気滅菌する。

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
又はジャガイモ浸出液	200 g
ブドウ糖	20.0 g
カンテン	15.0 g
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圧蒸気滅菌する。

サブロー・ブドウ糖液体培地

ブドウ糖	20.0 g
ペプトン（肉製及びカゼイン製）	10.0 g
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圧蒸気滅菌する。

モーゼル腸内細菌増菌ブイヨン培地

ゼラチン製ペプトン	10.0 g
ブドウ糖	4.5 g
又はブドウ糖一水和物	5.0 g
乾燥した牛胆汁	20.0 g
リン酸二水素カリウム	2.0 g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	16.1 g
又はリン酸水素二ナトリウム二水和物	8.0 g
ブリリアントグリーン	15 mg
水	1000 mL

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。

バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地

酵母エキス	3.0 g
ゼラチン製ペプトン	7.0 g
胆汁酸塩	1.5 g
塩化ナトリウム	5.0 g
ブドウ糖一水和物	10.0 g
カンテン	15.0 g
ニュートラルレッド	30 mg
クリスタルバイオレット	2 mg
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。煮沸するまで加熱する。オートクレーブで加熱してはならない。

マッコンキー液体培地

ゼラチン製ペプトン	20.0 g
ラクトース一水和物	10.0 g
乾燥ウシ胆汁	5.0 g
プロモクレゾールパープル	10 mg
精製水	1000 mL

滅菌後の pH が 25°C で 7.3 ± 0.2 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。

マッコンキーカンテン培地

ゼラチン製ペプトン	17.0 g
カゼイン製ペプトン	1.5 g
肉製ペプトン	1.5 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

大豆製ペプトン	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
デオキシコール酸ナトリウム	2.5 g
チオ硫酸ナトリウム五水和物	10.7 g
又はチオ硫酸ナトリウム	6.8 g
クエン酸鉄アンモニウム(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
塩化マグネシウム六水和物	3.0 g
又は塩化マグネシウム	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
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	4.5 g
又はブドウ糖一水和物	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°C でおよそ 6.8 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°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。45 ~ 50°C 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 NBRC13276	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 18 ~ 24 時間	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 ≤100 CFU 30 ~ 35°C ≤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 18 ~ 24 時間	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 ≤100 CFU 30 ~ 35°C ≤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 18 ~ 24 時間	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 ≤100 CFU 30 ~ 35°C ≤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・ブドウ糖培地 20 ~ 25°C 2 ~ 3 日間	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35°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・ダイジェストカンテン培地 ≤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
<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・ダイジェストカンテン培地 ≤100 CFU 30 ~ 35°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・ダイジェストカンテン培地 ≤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-ピグアニド類	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 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	

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 <i>Typhimurium</i> 又は <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i>
	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 <i>Typhimurium</i> 又は <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Abony</i>
	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 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 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

一般試験法の部 6. 0 1 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℃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. 0 8 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. 1 0 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を図 6.10 - 2a に示した