



# 日本薬局方・微生物限度試験法の解説

国立衛生試験所

三瀬勝利

## 1. 序言

1991年に刊行された第12版改正日本薬局方(JPⅫ)までは、エンドトキシン試験を除くと、無菌試験法と滅菌法の二つの試験法しか収載されていなかった。米国薬局方(USP)や英国薬局方(BP)と比較すると、いくつかの重要な微生物試験法が欠落しており、JPの大きな欠陥とされていた。また上記二つの試験法も国際調和の観点から問題が多く、記載も相当古典的なものが多かった。こうした欠点を是正した、諸外国にも通用する微生物試験法の改訂・追加は、中央薬事審議会、薬局方部会、一般試験法委員会の重要なテーマとなっている。1994年末に発刊されたJPⅫの第二追補版では、全面的に改訂された「無菌試験法」と新たに設定された「微生物限度試験法」が収載されている。前者は無菌製剤に、後者は主として非無菌製剤に適用されるものである。これらはUSPやBPと出来る限りハーモナイズさせて作製されている。このほか、下記の微生物試験法を1996年に発刊予定のJPⅫⅢ 収載するために、現在、一般試験法委員会で討論中である(タイトルはいずれも仮題であり、将来変更される可能性もある)。

1. 保存効力試験法(新設)
2. 滅菌法及び滅菌指標体(改訂)
3. 無菌操作法(新設)
4. 培地充填試験法(新設)
5. 非無菌製剤の微生物限度基準ガイドライン(新設)

## 2. 試験法の内容とJPTI収載項目

微生物限度試験法の詳細はJPⅫ第二追補にゆずり、以下に内容の概略を記したい。本試験法は生菌数試験と特定微生物に大別されている。生菌数試験は細菌数と真菌数試験に別けられ、特定微生物試験には大腸菌、サルモネラ、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌の4試験法が含まれる。生菌数はメンブランフィルター法、カンテン平板混釈法、カンテン平板表面塗抹法及び液体培地段階希釈法(最確数法)のいずれかを用いて計数する。ただし最確数法は細菌数だけにかかわる試験法である。これらに加えて、試料液の調製、培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験、再試験、緩衝液と培地が規定されている。これらの試験操作や使用される薬品、培地類は、USP、BPに代表されるヨーロッパ系の薬局方のいずれとも、出来る限り調和させるという思想のもとに規定されている。しかし、USPとBPとの間でも、使用培地や実験条件が必ずしも調和していない場合があり、そうした場合は日本にとってより良いと思われる方法が採用されている。具体的な試験操作等の詳細やノウハウは、種々の理由から薬局方では規定されていない。これをおぎなうために、日本薬局方技術情報(JPTI)が、近日中に日本公定書協会より発行される予定となっている。

微生物限度試験法に関してJPTIに含まれる項目は以下の通りである。これらはある意味で、微生物限度試験法そのものの解説となっている。

1. 微生物限度試験法と生菌数試験の概説
2. 生菌数測定のための自動化測定法

3. バイオハザード防止
4. 試料の採取量と試料液の調製
5. 最確数法(その長所と欠点についての解説)
6. 培地の同一性及び培地の性能試験に使用される菌株について
7. 枯草菌孢子液の調製法
8. 特定微生物の増菌培養と増殖判定
9. 大腸菌のIMViC試験、サルモネラの血清学的試験、及び黄色ブドウ球菌のコアグララーゼ試験の操作法
10. 抗生物質溶液の調製法

微生物限度試験法では、食品衛生関連の通知や基準、または食品衛生検査指針などとは異なり、生菌数測定のための自動化測定法を、一定の条件下で認めていることが特記される。例えばバイオルミネッセンス法などが、生菌数計測のための迅速簡易法として報告されているが、「ここに示した方法(即ち、微生物限度試験法に記載されている従来法)と同等以上の検出感度と精度を有する場合は、自動化測定法の適用も可能である」とされている。

また、培地の同一性については、それぞれの試験法で使用される培地が指定されているものの、それらとpHや組成中の化学物質やペプトンの量的または質的な差異があっても、その差異が小さく、かつ指定されているバリデーション試験で、指定されている培地と同様の増殖性と選択性が認められれば使用してさしつかえないとし、幅を持たせている。

### 3. 試験法の設定の目的と判定基準

微生物限度試験法は、最終製剤としての非無菌製剤だけでなく原料、成分、医薬品添加剤等における微生物汚染の実態を評価、判定し、安全かつ安定した製剤を供給することを目的としている。本試験法では試験操作法と実験条件が記載されているだけで、判定基準は医薬品各条、またはJPXⅢ 収載予定の「非無菌製剤の微生物限度基準ガイドライン」等に記載される予定である。

微生物限度試験法に対応する基準や通知が、今日まで我が国で存在しなかったわけではない。即ち日本でも、昭和51年4月1日に出された薬発297号、薬務局長通知「内用液剤及びX線造影剤の菌数限度及び試験法について」があり、【表1】に示す内容を含んでいた。この通知は重視すべきものではあるが、薬事法第42条の基準ではなく、あくまでも指導基準である。また、対象物は内用液剤とX線造影剤に限定されており、例えば生薬原料や医薬品添加剤などは対象外となっている。これらの微生物汚染やその防止対策は、非常に重要であるにもかかわらず、薬局方の一般試験法の対象とはなっていなかった。

今回収載された微生物限度試験法は上記の薬発297号を参考として規定されているが、USPなど諸外国との薬局方と調和させることに、より多くの力点がおかれていることもあって、試験項目や試験方法が、かなり異なった所がある。例えば、微生物限度試験では薬発297号に収載されていないサルモネラ試験法が収載されている。動物臓器由来の生薬等におけるサルモネラ汚染による事故等が諸外国で報告されているだけに<sup>1)</sup>、サルモネラ試験法の収載は絶対に必要である。また、大腸菌群ではなく、大腸菌の試験が課せられている(脚注参照)。真菌数試験用の培地や黄色ブドウ球菌用の培地では、より多くの培地の中から適当なものを選択して良いことになっている。また試料希釈液は薬発297号の生理食塩液ではなく、使用培地、リン酸緩衝液、又はペプトン食塩緩衝液が指定されている。薬発297号では、内用液剤とX線造影剤の真菌数を最確数法で計測することになっている。一方、本試験法ではUSPなどとの調和のほかに、真菌数を液体培地で計測する場合は、環境などからの汚染の問題や増殖判定が困難な場合があるなどの真菌学の専門家の意見により、真菌数の計測には採用されていない。

先述したごとく、微生物限度試験法は試験操作のみを記述したものであり、判定基準はまず第一に医薬品各条に従い、そこで記載されていないものは、現在討論中の「非無菌製剤の微生物限度基準ガイドライン」に従うことになる。このガイドラインに対応するものがUSP Forum(18(4), 3596-3600, 1992)に発表されており、参考までにその内容の一部を【表2】と【表3】に示す。USP Forumでは原料の微生物限度試験の判定は二段階法であり、警報基準値(X)とその5倍量にあたる処置基準値(5X)が設定されている。【表2】と【表3】に示される警報基準値以下の細菌のものは合格、処置基準値以上のものは不合格となる。X~5Xの間の細菌数、即ち警報基準値と処置基準値の中間の数値を示すものは、第二段階試験として真菌数や特定微生物試験が課せられ、【表3】で示した判定基準で合否が決定される。最終製品についても適用別微生物限度基準値が設定される可能性がある。日本薬局方の判定基準にいかなる数値が最終的に設定されるかは不確定の要素が強いが、上記USP Forumで示された数値が一つの参考資料を提供することになるかも知れない。

ふり返って今日までのJPの現状をみると、JPはUSPなど諸外国の薬局方に比して、微生物試験に大きな欠陥を持っていた。とりわけ非無菌製剤や原料、医薬品添加剤の微生物面からの品質管理と安全性を確保する試験法が欠落していたことは、大きな問題であった。無菌製剤は言うに及ばず、非無菌製剤においても、品質、安全性、安定性を確保するために、微生物汚染を可能な限り少なく抑えこむ努力は必要である。医薬品は当然のことながら、健康状態が万全ではない人々に投与されるものであり、その品質管理と微生物汚染防止には細心の注意が払われねばならない。今回の微生物限度試験法の設定に関係した者の一人として、本試験法が医薬品の品質管理や微生物面からの安全性確保に重要な役割をはたすことを切望している。

(脚注)大腸菌の試験の中間過程として、大腸菌群の試験が行われることは言うまでもない。

参考文献 1)川村邦夫:微生物管理の必要性, GMP微生物試験法, 講談社, p.1~31, 1993.

**表1 内容液剤及びX線造影剤の菌数の限度及び試験法**  
(昭和51年4月1日 薬発297号 厚生省薬務局長から各都道府県知事宛)

(1)細菌	1. 内用液剤(用時溶解して用いるものを含む。以下同じ。)及びX線造影剤は、生菌数が液状の製品の場合1mL当たり、固形の製品の場合1g当たり $1.0 \times 10^3$ 未満でなければならない。 2. 内用液剤及びX線造影剤は、大腸菌群、緑膿菌及び黄色ブドウ球菌のいずれの菌も検出してはならない。
(2)真菌	内用液剤及びX線造影剤は、生菌数が液状の製品の場合1mL当たり、固形の製品の場合1g当たり $1.0 \times 10^2$ 未満でなければならない。

**表2 原料(原薬又は添加剤)に適用する微生物限度基準値**

第一段階評価	細菌数	判定
	5X/g以上	不適
	X/g未満	適合
	5X/g未満、X/g以上	第二段階評価試験を遂行
第二段階評価	真菌数	
	基準値以上	不適
	基準値未満	適合
	特定指標微生物	
	存在	不適
	非存在	適合

**表3 原料の由来別微生物限度基準値**

原料の由来	第一段階評価		第二段階評価 <sup>4)</sup>	
	細菌数(CFU/g又はmL)		真菌数(CFU/g又はmL)	特定微生物の非存在
	警報基準値(○)	処置基準値(5×)		
合成原料 <sup>1)</sup>	200	1,000	100	大腸菌 緑膿菌 黄色ブドウ球菌
天然原料 <sup>2)</sup>	1,000	5,000	500	大腸菌 サルモネラ 緑膿菌 黄色ブドウ球菌
汚染除去操作の可能な原料 <sup>3)</sup>	20	100	10	大腸菌 サルモネラ 緑膿菌 黄色ブドウ球菌

1) 植物、動物、鉱物に由来しないもの。2) 植物、動物、鉱物に由来するもの。3) 汚染除去操作をした後の値を示す。  
4) 細菌数が警報基準値(○)以上、処置基準値(5×)未満のときには、真菌数の測定及び特定微生物の非存在試験を行う。