

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

ICH 調和文書 事項別附属文書案

Q4B－事項別附属文書 (ANNEX) 8

薬局方テキストを ICH 地域において相互利用するための評価及び勧告

無菌試験法

ステップ 2 文書

ICH Step2 プロセスにおいて、ICH 専門家会合で合意された事項別附属文書案又はガイドラインは、ICH 運営委員会から日米 EU 三極の規制当局へ配布され、国又は地域ごとの手順に従い、意見聴取にかけられる。

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

無菌試験法に関する
薬局方テキストを ICH 地域において相互利用するための評価及び勧告

Q4B—事項別付属文書 (ANNEX) 8

ICH 調和文書案

目次

51	1. 序文.....	1
52	2. Q4B 評価結果.....	1
53	2.1. 試験方法.....	1
54	2.2. 規格値/判定基準.....	1
55	3. 施行時期.....	1
56	4. 施行に当たっての留意事項.....	1
57	4.1 全般的な事項.....	1
58	4.2 米国 (FDA) の場合.....	1
59	4.3 EU の場合.....	1
60	4.4 日本 (厚生労働省) の場合.....	2
61	5. Q4B 評価に用いた参照資料.....	2

62 1. 序文

63 本事項別付属文書（以下「本文書」という）は、無菌試験法（以下「本試験法」という）
64 について Q4B 専門家作業部会で評価された結果を示したものである。

65 本試験法は三極薬局方検討会議（PDG）から提出されたものである。

66

67 2. Q4B 評価結果

68 2.1. 試験方法

69 ICH 運営委員会は、Q4B 専門家作業部会の評価に基づき、欧州薬局方収載の 2.6.1
70 Sterility、日本薬局方収載の 4.06 無菌試験法、及び米国薬局方収載の <71> Sterility
71 Tests は、ICH 地域内において下記の事項を考慮の上で相互利用できるものとして勧告す
72 る。

73

74 2.1.1 各地域の局方に「◆ ◆」で囲まれ独自に記載された部分については、三地域内
75 で相互利用できない。

76

77 2.1.2 無菌試験において品目を溶解、希釈、又は洗浄するための希釈液及び洗浄液は、
78 抗細菌活性又は抗真菌活性を示さないこと。

79

80 2.2. 規格値／判定基準

81 規格値／判定基準は三極薬局方で調和されている。

82

83 3. 施行時期

84 本文書は各々の規制地域で施行された時点（ICH ステップ 5）で、当該地域で使用可能
85 となる。施行時期は各地域で異なる場合がある。

86

87 4. 施行に当たっての留意事項

88 4.1 全般的な事項

89 本文書の施行後、製造販売業者等が、従前の方法を Q4B 専門家作業部会が評価し
90 た本文書の第 2.1 章に参照されている薬局方テキストに変更する場合、いかなる変更
91 届出、変更申請及び／又は事前承認の手続きも、各規制地域の薬局方の改正に関する
92 取扱いに従う。

93

94 4.2 米国（FDA）の場合

95 上記の勧告に基づき、そして、本文書に示された条件に従い、第 2.1 章に参照され
96 ている薬局方テキストは相互利用できるものとみなされる。しかしながら、どの薬局方を
97 用いるかにかかわらず、FDA は企業が選択した試験方法が個別の品目に対して適切
98 で、適用できるかどうか説明を求める場合がある。

99

100 4.3 EU の場合

101 欧州連合では、欧州薬局方の各条を適用する義務がある。規制当局は、上記の相互
102 利用の宣言に基づき、本文書に示される条件に従い、欧州薬局方収載の 2.6.1 Sterility
103 の適合性の必要条件を満たしているとして、販売承認申請、更新、変更申請において
104 本文書の第 2.1 章で参照されている他の薬局方テキストを利用することを受け入れ
105 ることができる。

106

107 4.4 日本（厚生労働省）の場合

108 本文書の第 2.1 章に参照されている薬局方テキストは、本文書に示される条件に従
109 い、相互利用が可能なものとして利用することができる。施行の要件については、本
110 文書を施行する際に厚生労働省より通知される。

111

112 5. Q4B 評価に用いた参照資料

113 5.1 PDG 調和文書 (PDG ステージ 5B 合意署名文書) : 日本薬局方フォーラム Vol.16,
114 No. 4 (2007 年 12 月発行)

115

116 5.2 三極薬局方における無菌試験法についての参照資料

117 5.2.1. 欧州薬局方 : Supplement 6.3 2009 年 1 月発効
118 Sterility (reference 01/2009: 20601)

119

120 5.2.2. 日本薬局方 : 2009 年 3 月厚生労働省告示予定
121 一般試験法 4.06 無菌試験法
122 (改正案を添付)

123

124 5.2.3. 米国薬局方 : Pharmacopeial Forum Vol.34, No. 6, Interim Revision
125 Announcement No. 6 2008 年 12 月 1 日発効
126 <71> Sterility Test

127

128 訳注 : 正しくは 2009 年 5 月 1 日発効予定。

日本薬局方の一部改正（案）

一般試験法の部 4.06 無菌試験法の条を次のように改める。

4.06 無菌試験法

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。

無菌試験法は、無菌であることが求められている原薬又は製剤に適用される。本試験に適合する結果が得られても、それは単に本試験条件下で調べた検体中に汚染微生物が検出されなかったことを示しているだけである。

1. 微生物汚染に対する予防措置

無菌試験は無菌条件下で行われる。このため、試験環境は無菌試験の実施に適したものでなければならない。汚染を避けるためにとられる予防措置は、本試験で検出されるべきいかなる微生物にも影響を与えてはならない。作業区域の適切な環境モニタリング、及び適切な汚染防止措置の実施によって、本試験の実施状態が適切であることを定期的に監視する。

2. 培地と培養温度

2.1. 一般要件

培地は、次のように調製するか、又は培地性能試験に適合する場合は同等の市販培地も使用できる。無菌試験用として適している培地は次のとおりである。液状チオグリコール酸培地は、嫌気性細菌の培養を主目的としているが、好気性細菌も検出できる。ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は、真菌及び好気性細菌の培養に適している。

2.2. 液状チオグリコール酸培地

液状チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
カンテン	0.75 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖（一水和物/無水）	5.5/5.0 g
酵母エキス（水溶性）	5.0 g
カゼイン製ペプトン	15.0 g
チオグリコール酸ナトリウム	0.5 g
又はチオグリコール酸	0.3 mL
レザズリン溶液（1→1000）、用時調製	1.0 mL
水	1000 mL

（滅菌後の pH 7.1±0.2）

L-シスチン、カンテン、塩化ナトリウム、ブドウ糖、水溶性酵母エキス及びカゼイン製ペプトンを水と混合し、加熱して溶かした後、チオグリコール酸ナトリウム又はチオグリコール酸を加えて溶かし、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後の pH が 7.1±0.2 になるように

調整する。必要ならば、溶液を煮沸しないように加熱し、温かいうちに湿らせたろ紙を用いてろ過する。レザズリン溶液（1 → 1000）を加え、よく混和した後、培養終了時に培地の淡赤色部分が上部 1/2 以下にとどまるような表面積と深さの比をもつ容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた条件下で滅菌する。培地を保存する必要がある場合にはあらかじめ気密容器に入れて滅菌し、2 ～ 25℃で保存する。培地がその上部 1/3 を超えて淡赤色となった場合は、その淡赤色が消失するまで培地容器を水浴上又は流通蒸気中で加熱し、容器中への汚染空気の侵入を防ぎながら急速に冷却することで1回だけ使用できる。バリデートされた期間を超えて、保存した培地を使用してはならない。

液状チオグリコール酸培地は、30 ～ 35℃で培養する。メンブランフィルター法を適用できない水銀系の防腐剤を含む製品に対しては、培地性能試験に適合するなら、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の代わりに液状チオグリコール酸培地を用い、20 ～ 25℃で培養することができる。

別に規定されているか、使用を規制当局が認める場合には、次のように調製した変法チオグリコール酸培地も使用可能である。カンテンとレザズリン溶液（1 → 1000）を除き、液状チオグリコール酸培地と同じ成分で調製し、バリデートされた条件下で滅菌する。滅菌後の pH が 7.1 ± 0.2 になるように調整し、使用直前に水浴上で加熱する。変法チオグリコール酸培地は嫌気条件下で 30 ～ 35℃で培養する。

2.3. ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

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（一水和物/無水）	2.5/2.3 g
水	1000 mL

（滅菌後の pH 7.3 ± 0.2）

全成分を水に溶かし、若干加温して溶液にする。溶液を室温に冷却し、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後の pH が 7.3 ± 0.2 になるように調整する。必要ならばろ過をし、適当な容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた条件下で滅菌する。直ちに使用しない場合は、あらかじめ気密容器に入れて滅菌し、2 ～ 25℃で保存する。バリデートされた期間を超えて保存した培地を使用してはならない。

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は、20～25℃で培養する。

3. 培地の適合性

培地は、次の試験に適合すること。この試験は、製品の無菌試験実施前に、又は並行して行うことができる。

無菌性

培地の一部を 14 日間培養するとき、微生物の増殖を認めない。

好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験

市販液体培地及び粉末培地又は各成分から調製した培地の各バッチについて試験を行うこと。適切な微生物株を表 4.06 -1 に示す。

液状チオグリコール酸培地には、次に示す少数（100 CFU 以下）の微生物を接種する。それぞれの微生物に対しては別々の培地容器を用いる。

Clostridium sporogenes

Pseudomonas aeruginosa

Staphylococcus aureus

ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地には、次に示す少数（100 CFU 以下）の微生物を接種する。それぞれの微生物に対しては別々の培地容器を用いる。

Aspergillus niger

Bacillus subtilis

Candida albicans

細菌の場合は 3 日間、真菌の場合は 5 日間をそれぞれ超えないで培養する。

接種菌の継代数は、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を採用することにより、マスターシードロットから 5 代を超えないようにする。

微生物の増殖が肉眼で明らかに観察された場合には、当該培地は基準に適合している。

表 4.06 -1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株

好気性細菌	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NBRC 13276, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118
嫌気性細菌	
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 又は ATCC 11437, NBRC 14293
真菌	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NBRC 1594, IP 48.72, NCPF 3179
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404, NBRC 9455, IP 1431.83, IMI 149007

4. 手法の適合性試験

次に述べる変更点以外は、「5. 製品の無菌試験」の項に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。

メンブランフィルター法

試験に供された容器の内容物をろ過した後、最終回の洗浄液に試験用菌株を 100 CFU 以下加えたものをろ過する。

直接法

試験に供された容器の内容物を培地に加えた後、試験用菌株 100 CFU 以下をその培地に接種

する。

どちらの接種方法においても、「好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験」の項で示した菌株を用いる。陽性対照として培地性能試験を行う。培地を含む全ての容器は規定の温度で最長 5 日間培養する。

培養後、陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られれば、被検製品は本試験条件下で抗菌活性を持たないか、又は抗菌活性が十分に除去されたものとみなす。当該手法は適切であり、試験条件を変更する必要はない。

被検製品の存在下で陽性対照に匹敵する肉眼的に明瞭な増殖が得られなければ、被検製品は当該試験条件下では十分除去できない抗菌活性を有している。この場合、抗菌活性を除去するために条件を変えて手法の適合性試験を繰り返す。

手法の適合性試験を行うのは、新しい製品に無菌試験を行う場合及び試験の実施条件に変更があった場合である。

手法の適合性試験は被検製品の無菌試験と同時に行うこともできる。

5. 製品の無菌試験

5.1. 一般要件

試験はメンブランフィルター法又は直接法によって行われる。試験には適切な陰性対照を置くこと。メンブランフィルター法は、ろ過可能な製品に適用する。例えば、ろ過可能な水性、アルコール性あるいは油性の製品、及び本試験条件下で抗菌力を有さない水性あるいは油性の溶剤に混和又は溶解する製品に対して用いる。

5.2. メンブランフィルター法

メンブランフィルターは、微生物の捕集効率が確立されている公称孔径が $0.45 \mu\text{m}$ 以下のものを用いる。例えば、セルロースナイトレートフィルターは水溶性、油性、低濃度のアルコール性溶液に、セルロースアセテートフィルターは高濃度のアルコール性溶液に用いられる。抗生物質のような医薬品には、別途適切なフィルターが必要な場合もある。

次に示す手法は、直径約 50 mm のメンブランフィルターの使用を想定している。もし異なる直径のフィルターを用いる場合には、希釈及び洗浄液の容量はそれに応じて調整すべきである。ろ過器やメンブランフィルターは適切な方法で滅菌する。ろ過装置は、無菌条件下で被検溶液を導入・ろ過でき、メンブランフィルターの無菌的取りはずしと培地への移植ができるか、又はろ過器そのものに培地を加えて培養するのに適するように設計されていなければならない。

水性液剤

1 g/L の肉製又はカゼイン製ペプトン溶液 (pH 7.1 ± 0.2) のような無菌希釈液の少量をろ過器中のメンブランフィルター上に注ぎろ過する。希釈液には、例えば抗生物質が試験対象の場合には、適切な中和剤や不活化剤を加えることができる。

試験すべき容器の内容物を必要なら手法の適合性試験で選んだ無菌希釈液の量で希釈後、表 4.06-2 に示した量より少なくならないように、1 枚又は複数のメンブランフィルター上に移し、直ちにろ過する。当該製品が抗菌活性を有している場合には、手法の適合性試験で用いた無菌希釈液の量でメンブランフィルターを 3 回以上洗浄する。手法の適合性試験において抗菌活性を十分に除去できないことが立証されていても、メンブランフィルター当たり 100 mL の洗浄液で 5 回を超えては洗浄しないこと。メンブランフィルターをろ過器から外し、半分に切断するか、

あらかじめ試料溶液を二等分し、それぞれにつき同一のろ過操作を行うことによって得られた2枚のメンブランフィルターをそれぞれの培地に入れる。各培地の量は、手法の適合性試験で確立した量を用いる。又はメンブランフィルターを装着したろ過器内に試料溶液を二等分ろ過後、それぞれの培地を加える。培地を14日間以上培養する。

表 4.06-2 各培地当たりの最少試料採取量

容器の容量	他に規定されていない限りそれぞれの培地に接種する最少量
液剤	
1 mL 未満	全量
1 mL 以上 40 mL 以下	半量, ただし 1 mL 以上
40 mL 超 100 mL 以下	20 mL
100 mL 超	10%, ただし 20 mL 以上
抗生物質の液剤	1 mL
懸濁又は乳化して用いる非水溶性医薬品, クリーム又は軟膏剤	200 mg 以上
固形剤	
50 mg 未満	全量
50 mg 以上 300 mg 未満	半量, ただし 50 mg 以上
300 mg 以上 5 g 以下	150 mg
5 g 超	500 mg

水溶性固形剤

各培地に対し、表 4.06-2 に規定する量以上を用いる。添付の溶剤、注射用水、生理食塩液、又は 1 g/L 肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な溶剤に溶解し、選んだ溶剤に適したメンブランフィルターを用いて「水性液剤」の項に示したように試験を行う。

油及び油性液剤

各培地に対し、表 4.06-2 に規定する量以上を用いる。粘度の低い油及び油性液剤は、希釈せずに乾いたメンブランフィルターでろ過する。粘稠性の油は、当該試験条件下で抗菌性がないことが立証されたミリスチン酸イソプロピルのような適切な無菌溶剤で希釈できる。油が自重によりメンブランフィルターに浸透したのち徐々に加圧又は吸引することによってろ過する。手法の適合性試験で適切であることが証明されている濃度の適切な乳化剤（例えば 10 g/L ポリソルベート 80）を含む 1 g/L 肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌溶液を用い、メンブランフィルター当たり約 100 mL ずつで少なくとも 3 回洗浄する。「水性液剤」の項に示したようにメンブランフィルターを培地に移すか又はろ過器に培地を加え、同じ温度で同じ期間培養する。

軟膏剤及びクリーム

各培地に対し、表 4.06-2 に規定する量以上を用いる。脂肪基剤の軟膏剤や油中水型の乳剤は上述のようにミリスチン酸イソプロピルで 1% に希釈する。必要ならば 40°C 以下で加温する。例外的な場合で 44°C 以下までの加温が必要なこともある。できるだけ迅速にろ過したのち「油及

び油性液剤」の項に示したように操作を進める。

5.3. 直接法

別に規定するほか、表 4.06-2 に示す量の製品を、その容量が培地容量の 10%を超えないように培地に直接接種する。被検製品が抗菌活性を有する場合は、適切な中和剤で中和した後に、又は十分な量の培地で希釈することによって試験を行う。大容量の製品を使用する必要があるとき、接種による希釈影響を考慮に入れて高濃度の培地を用いる方が好ましい場合もある。適切な場合は、高濃度培地を容器内の製品に直接加えることも可能である。

油性液剤

手法の適合性試験において適切であることが証明された適切な乳化剤を適切な濃度に加えた（例えば 10 g/L ポリソルベート 80）培地を用いる。

軟膏剤とクリーム

1 g/L 肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌希釈液中で、選択された乳化剤で乳化することにより約 1:10 に希釈する。この希釈物を乳化剤を含まない培地に移植する。

接種した培地は 14 日間以上培養する。培養を培養期間中に数回観察する。油性製品を含む培養は毎日穏やかに振る。しかし嫌気性菌の検出のために液状チオグリコール酸培地を用いている場合は、嫌気条件を維持するために振とうや混合は最小限に保つ。

6. 観察と結果の判定

培養期間中及び最終日に、培地に肉眼的な微生物の増殖があるかどうかを調べる。被検材料が培地を混濁させ、微生物増殖の有無を肉眼的に容易に判定できない場合には、培養開始から 14 日後に当該培地の一部（1 mL 以上）を同じ培地の新たな容器に移し、元の培地と移植した培地の両方を 4 日間以上培養する。

微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。微生物の増殖が観察された場合は、当該被検製品に無関係な原因により試験が無効であったことを明確に証明できなければ、被検製品は無菌試験に適合しない。以下の条件のうち一つ以上を満たした場合のみ当該試験は無効と考えられる。

- a) 無菌試験施設の微生物学的モニタリングデータに問題が認められた場合
- b) 無菌試験中に用いた試験方法を調査した結果、問題が認められた場合
- c) 陰性対照中に微生物の増殖が認められた場合
- d) 当該無菌試験から分離された微生物の同定後、この菌種の増殖が無菌試験実施中に用いた材料及び手技、又はいずれかに問題があると明らかに判断される場合

試験が無効であることが判明したら、初回試験と同じ数の容器を用いて再試験を行う。再試験において微生物の増殖が観察されない場合は、被検製品は無菌試験に適合する。再試験において微生物の増殖が観察された場合には、被検製品は無菌試験に適合しない。

7. 無菌試験への適合が要求される注射剤、眼軟膏剤及び点眼剤並びに他の非注射剤への試験の適用

メンブランフィルター法を用いる場合は、可能ならいつでも容器内の全量を用いる。ただし、表 4.06-2 に示す量以上を用いる。必要ならば 1 g/L 肉製又はカゼイン製ペプトン中性溶液のような適切な無菌溶液で約 100 mL になるよう希釈する。

直接法を用いる場合は、他に規定されていなければ表 4.06-2 に示す量を用いる。被検製品の

同じ試料について細菌及び真菌に対する無菌試験を行う。1 容器中の容量が両試験を行うのに不十分な場合は、異なる培地に接種するのに 2 容器以上の内容物を用いる。

8. 最少供試個数

最少試験個数は、ロットサイズに応じて、表 4.06-3 に示す個数を用いる。

表 4.06-3 最少供試個数

ロット当たりの製造個数*	他に規定されていない限り、それぞれの培地当たりの最少試験個数**
注射剤	
100 個以下	10%又は 4 容器のうち多い方
101 個以上 500 個以下	10 容器
501 個以上	2%又は 20 容器(大容量製剤の場合は, 10 容器)のうち少ない方
眼軟膏剤及び点眼剤等の非注射剤	
200 個以下	5%又は 2 容器のうち多い方
201 個以上	10 容器
単回使用製品の場合は、上欄の注射剤についての規定を適用する	
固形バルク製品	
4 容器以下	各容器
5 容器以上 50 容器以下	20%又は 4 容器のうち多い方
51 容器以上	2%又は 10 容器のうち多い方

* ロットサイズが不明の場合には、ここに示した最大数を用いること。

** 1 容器の容量が二つの培地に接種するのに十分な場合は、本欄は両培地合わせて必要な供試容器数を示す。