

無菌試験法

平成25年9月26日（告示第2480号） 一部改正

平成28年9月30日（告示第1889号） 一部改正

別に規定する場合を除き、検体等に次の試験又は日本薬局方一般試験法に規定する無菌試験法によって検出できる微生物（細菌又は真菌）が存在しないことを調べる方法である。

1 細菌否定試験

1.1 培地

別に規定する場合を除き、次の組成の液状チオグリコール酸培地を用いる。培地の液量は通常1本当たり15mL以上とする。

1.1.1 液状チオグリコール酸培地

1.1.1.1 組成

L-シスチン	0.5 g
寒天	0.75 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
酵母エキス	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
0.1w/v%レザズリン液	1.0mL
水	1,000mL

滅菌後のpHが6.9～7.3となるように調整し、121℃で15分間高圧滅菌し、2～25℃の暗所に保存する。培地の淡赤色の層が上部1/3を超えたものは使用しない。適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

1.1.1.2 適合性

培地は、次に掲げる試験に適合しなければならない。

1.1.1.2.1 発育試験

Clostridium sporogenes、*Pseudomonas aeruginosa*及び*Staphylococcus aureus*のそれぞれ100CFU以下又は*Streptococcus equi subspecies zooepidemicus*及び*Clostridium sporogenes*のそれぞれ100CFU以下を接種し、30～35℃で72時間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

1.1.1.2.2 無菌性試験

培地の一部を30～35℃で14日間培養するとき、微生物の増殖を認めない。

1.2 培養材料

検体及び試験品を用いる。なお、溶解用液が非添付の凍結乾燥製剤では、リン酸緩衝食塩液等の適当な溶解用液で用法及び用量に記載された規定量に溶解したものを用いる。

1.3 検体等の数量

検体の試験を行う場合は、別に規定する場合を除き、全ての容器から試験を行うに十分な量を採る。試験品の試験を行う場合は、別に規定する場合を除き、7本以上の容器について試験を行う。

1.4 培地への接種量

検体の場合は、各材料ごとに培地4本を用い、2本には1mLずつ、他の2本には0.5mLずつ材料を接種する。

試験品の試験では、小分容器の表示液量と培地への接種量は、表1による。

表1 小分容器の表示液量及び1容器当たりの接種量及び培地数（細菌否定試験）

表示液量	1容器当たりの 接種量	1容器当たりの 培地数	培地への接種
3mL 未満	1/4 量	1 本	1/4量 1本
3mL以上5mL未満	1 mL	2 本	0.5mL 2本
5mL以上10mL未満	1.5 mL	2 本	{ 1 mL 1本 0.5mL 1本
10mL以上	3 mL	2 本	{ 2 mL 1本 1 mL 1本

1.5培養及び観察

検体等を培地に接種後、十分に混和し、30～35℃で14日間以上培養し、その間3～5日目、7～9日目及び14日目に菌の発育の有無を観察する。

ただし、製剤により培地が混濁した場合その他必要な場合は、7日目に新しい培地に植継ぎ、同じ温度で8日間以上培養して観察する。

1.6判定

試験の結果、菌の発育を認めないときは、この試験に適合とする。

2 真菌否定試験

2.1培地

別に規定する場合を除き、液状チオグリコール酸培地を用いる。チメロサルを含まない検体等には、別に規定する場合を除き、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地を用いる。

培地の液量は、通常1本当たり15mL以上とする。

2.1.1 液状チオグリコール酸培地

2.1.1.1 組成

1.1.1.1を準用する。

2.1.1.2 適合性

培地は、次に掲げる試験に適合しなければならない。

2.1.1.2.1 発育試験

Aspergillus brasiliensis、*Bacillus subtilis*及び*Candida albicans*のそれぞれ100CFU以下又は*Streptococcus equi* subspecies *zooeidemicus*、*Aspergillus brasiliensis*及び*Candida albicans*のそれぞれ100CFU以下を接種し、20～25℃で5日間培養するとき、十分に増殖しなければならない。

2.1.1.2.2 無菌性試験

1.1.1.2.2を準用する。ただし、培養温度は20～25℃とする。

2.1.2ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト液状培地

2.1.2.1 組成

カゼイン製ペプトン	17.0 g
大豆製ペプトン	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
水	1,000mL

滅菌後のpHが7.1～7.5となるように調整し、121℃で15分間高压滅菌し、2～25℃の暗所に保存する。適当な品質の乾燥製品を用いてもよい。

2.1.2.2 適合性

2.1.1.2を準用する。

2.2 培養材料

1.2を準用する。

2.3 検体等の数量

1.3を準用する。

2.4 培地への接種量

検体の場合は、各材料ごとに培地4本を用い、1mLずつ材料を接種する。

試験品の試験では、小分容器の表示液量と培地への接種量は、表2による。

表2 小分容器の表示液量及び1容器当たりの接種量及び培地数（真菌否定試験）

表示液量	1 容器当たりの 接 種 量	1 容器当たりの 培 地 数	培地への接種
3mL 未満	1/2 量	2 本	1/4量 2本
3mL以上5mL未満	1 mL	2 本	0.5mL 2本
5mL以上	2 mL	2 本	1 mL 2本

2.5 培養及び観察

検体等を培地に接種後、十分に混和し、20～25℃で14日間以上培養し、その間3～5日目、7～9日目及び14日目に菌の発育の有無を観察する。

ただし、製剤により培地が混濁した場合その他必要な場合には、7日目に新しい培地に植継ぎ、同じ温度で8日間以上培養して観察する。

2.6 判定

1.6を準用する。

3再試験

試験1 及び 2の結果が疑わしい場合は、新たに 2倍量以上の検体等を用いて試験を反復しなければならない。