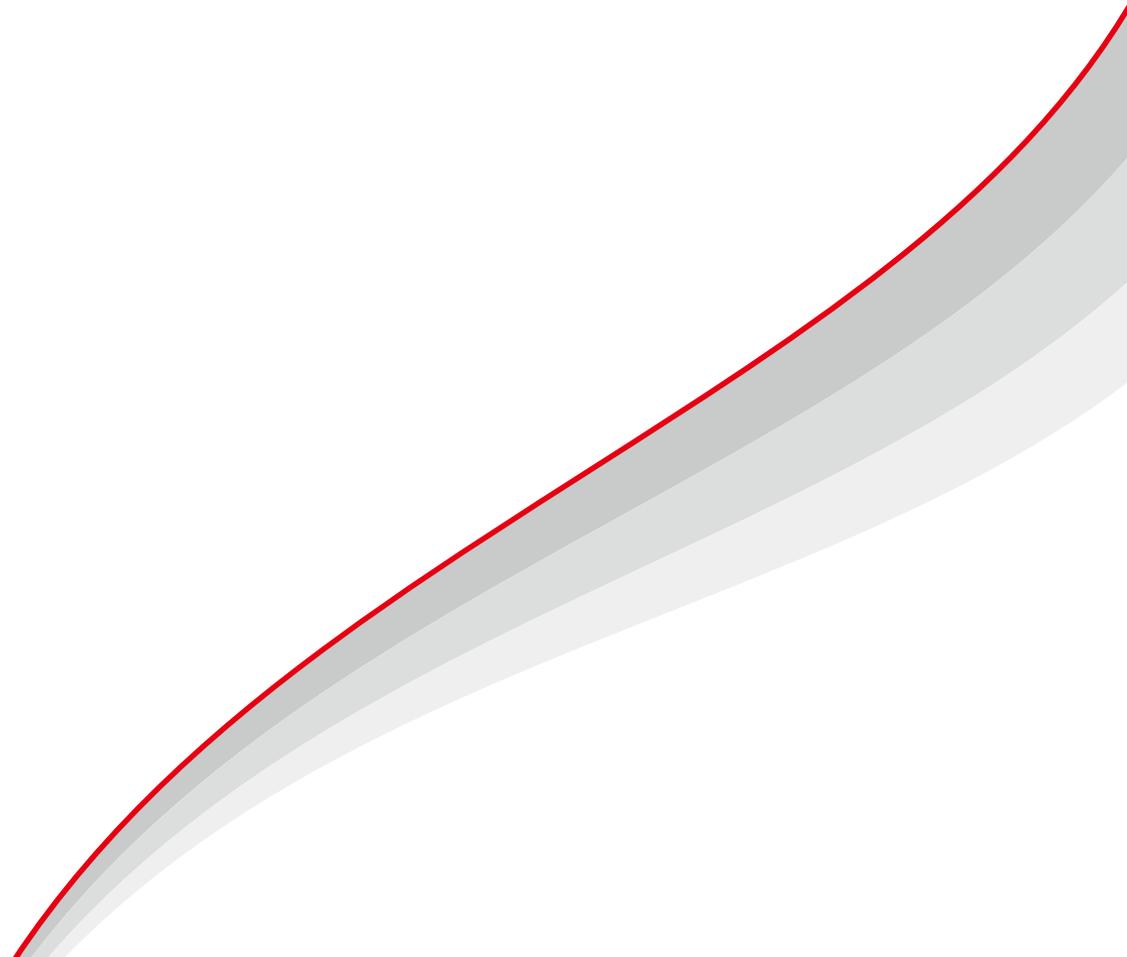


無菌試験について

2025年 6月 11日

島津ダイアグノスティクス株式会社

国内営業部 CC営業グループ



本日のトピックス

1. 日本薬局方 無菌試験 (4.06)
2. 迅速無菌試験の必要性
3. 当社無菌試験試薬について
4. 必要な資材類
5. まとめ

日本薬局方における無菌試験

日本薬局方(JP):日本薬局方は、医薬品や医療機器の品質、有効性、安全性を確保するための規格基準書であり、厚生労働大臣が薬事・食品衛生審議会の意見を基に定めている。

基本的な無菌試験法については一般試験法の中の4.06に記載されている。
製品の無菌試験法として培養法(直接法 or メンブランフィルター法)が記載されているが、この方法は試験終了までに14日間の培養が必要である。

<無菌試験法の概要>

対象: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。

方法:**培養法**(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)

メンブランフィルター法・・・ろ過可能な製品に適用でき、公称孔径が0.45 μm 以下のものを用いる。

直接法・・・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

観察と結果の判定:いずれの方法も**培地を14日間以上培養**する。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。微生物の増殖が観察されない場合は、被験製品は無菌試験に適合する。

日本薬局方 無菌試験法 (4.06)

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。

2. 培地及び培養温度

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。

5. 製品の無菌試験

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、アルコール性又は油性の製品及び本試験条件下で抗菌力を有しない水性又は油性の溶剤に混和若しくは溶解する製品に対して用

無菌試験用として適している培地

- ・液体チオグリコール酸培地：嫌気性細菌の培養を主目的とするが、好気性細菌も検出。30～35℃で培養
- ・ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地（SCD培地）：真菌、および好気性細菌の培養に適している。20～25℃で培養

試験は「メンブランフィルター法（MF法）」、または「直接法」で行われる。

- ・MF法：製品をろ過したフィルターを培地中に直接投入する
- ・直接法：検体の容量が培地容量の10%を超えないように直接接種する

日本薬局方 無菌試験法 (4.06)

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。被験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。

14日間以上培養して、肉眼的に微生物の増殖があるかどうか調べる。微生物の増殖が観察されない場合は、被験製品は無菌試験に適合する。

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」に示した方法と、厳密に同じ方法で試験を行う。

(i) 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。

(ii) 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。

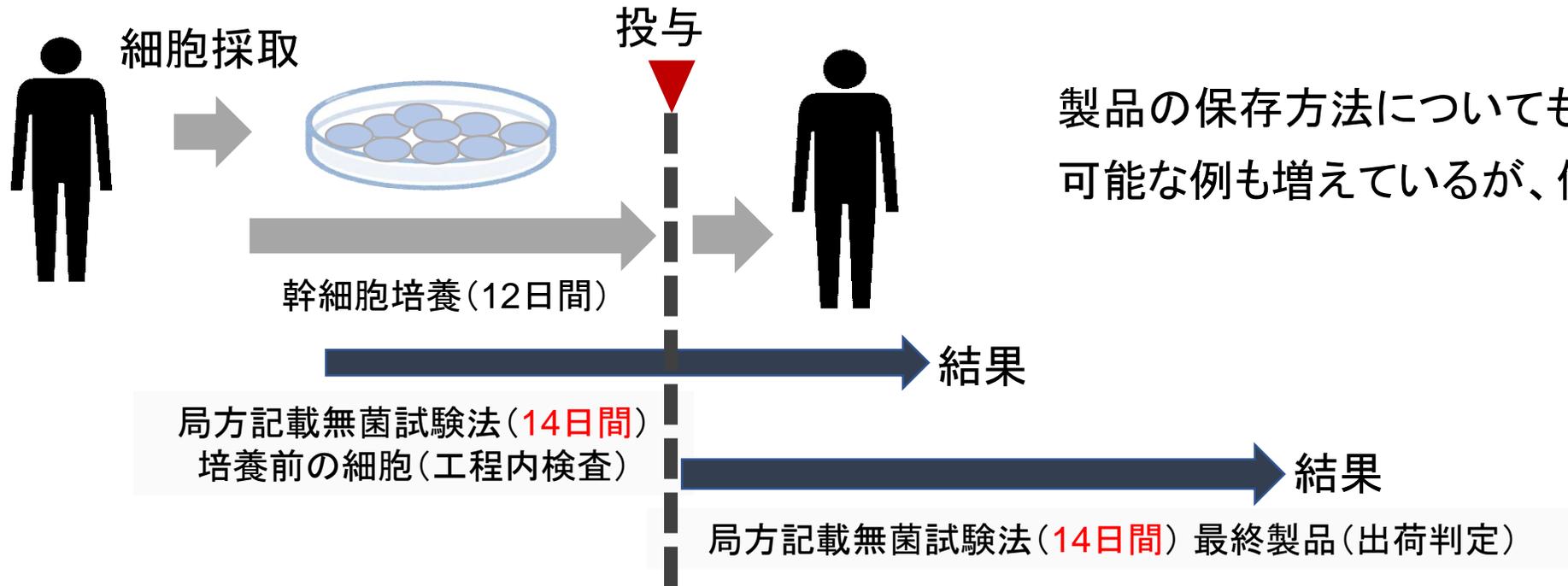
どちらの接種方法においても、「3.2.好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験」に示した菌株を用いる。陽性対照として培地性能試験を行う。培地を含む全ての容器は規定の温度で最長5日間培養する。

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、被験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。

本試験を行う前、もしくは本試験と同時に、被検検体に対して手法の適合性試験を行うことが必要



再生医療における無菌試験の課題



製品の保存方法についても研究が進み、凍結保存が可能な例も増えているが、保存が困難な事例も残る

再生医療等製品は早期の投与が望ましく、従来の局方に準じた無菌試験法(培養法)では投与時期に判定が間に合わない事例がある

⇒ 迅速無菌試験法の導入が必要

微生物迅速試験法の開発に向けた検出技術の選択

日本、欧州、米国の薬局方内では微生物迅速試験法の例として様々な検出技術が挙げられている。これらの手法は従来の培養法とは測定対象や測定原理が大きく異なるものもあるため、使用する手法の特徴に合わせた評価を行う必要がある。

微生物迅速試験法の例

- ✓ 固相サイトメトリー
- ✓ フローサイトメトリー
- ✓ 免疫学的方法
- ✓ 生物発光法・蛍光法(ATPなど)
- ✓ マイクロコロニー法
- ✓ **核酸増幅法(NAT)**
-
-
-

当社ではDNAを標的とした微生物検出のためのリアルタイムPCR試薬を開発

Real-time PCR

- 感度が高く、特異性に優れる
- 市販のリアルタイムPCR装置の利用が可能
- 細胞を含む検体への適用が可能

再生医療の安全性確保に関する当社製品

当社ではリアルタイムPCRを用いた安全性試験の各種試薬を販売中。

Myco Finder™



- ✓ マイコプラズマ否定試験用PCR試薬
- ✓ EP、USP、JPに対応
- ✓ 試薬がチューブに固相化されており4ステップで簡単に測定可能

VirFinder™



- ✓ ウイルス否定試験用PCR試薬
- ✓ ユーザーが試験するウイルスの項目に応じた2つのバージョンがある

NEW

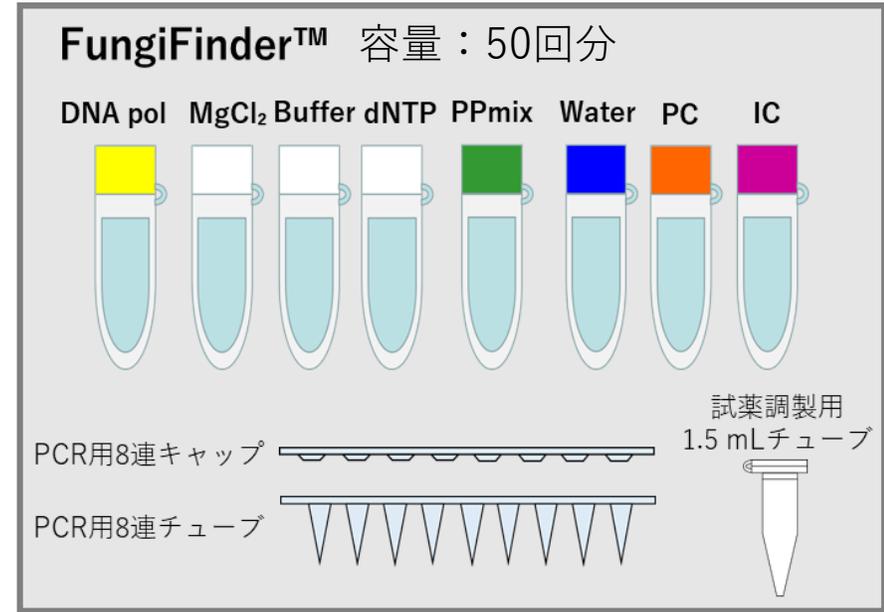
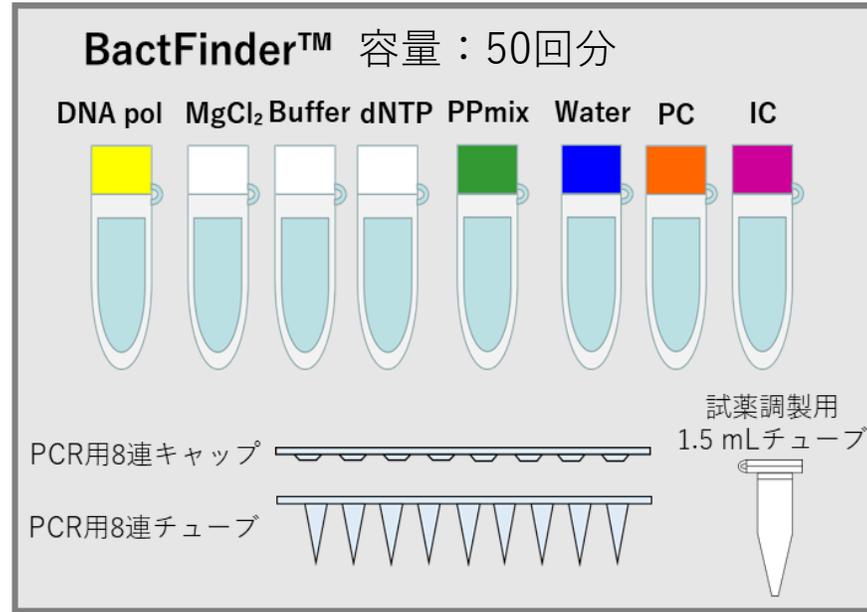
BactFinder™ / FungiFinder™



- ✓ 微生物迅速試験用PCR試薬
- ✓ ユーザーの用途に合わせて2つの試験法を選択可

BactFinder™ / FungiFinder™の特徴

微生物核酸をターゲットとしたPCR試薬

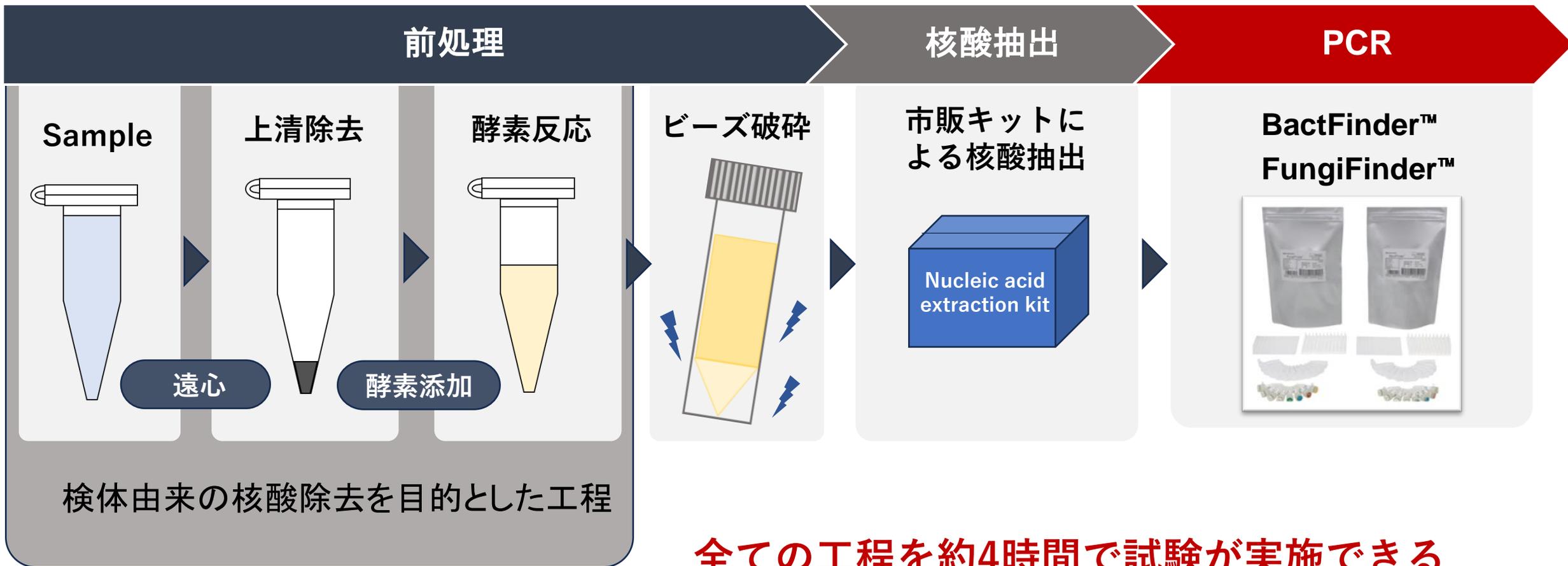


- ✓ 偽陽性の原因となる微生物由来の混入を低減したクリーンなPCR試薬
- ✓ 資材からのコンタミネーションを防ぐため、PCR試薬調製用および反応用のチューブをキットに同封
- ✓ 特異性と網羅性（*in silico* 細菌32属、真菌27属）に優れた試薬

二つのプロトコール

	迅速試験系	高感度試験系
想定される使用目的	検体の簡易的なスクリーニング	出荷試験、工程内検査
試験系の構成	—	前培養
	前処理 & 核酸抽出	
	リアルタイムPCR (BactFinder™/FungiFinder™)	
検出感度	100 CFU	1 CFU (< 10 CFU) 
試験時間	~4時間 	前培養 + 4時間
試験系の利点	試験当日に判定できる 	偽陽性が発生しにくい 死菌の影響を受けない判定

迅速試験プロトコールの検体調製



全ての工程を約4時間で試験が実施できる

高感度試験プロトコルの検体調製

前培養

非培養群



次の工程へ(培養なし)

好気用、嫌気用の培地に
検体を接種する

培養群

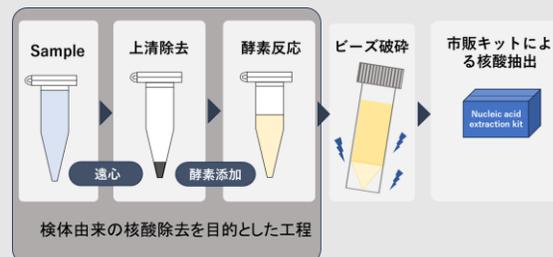


48 – 72時間
培養 → 濁りなし

好気用、嫌気用の培地に
検体を接種する → 濁りあり

前処理 & 核酸抽出

迅速試験系と同じ
前処理・核酸抽出



陽性(試験終了)

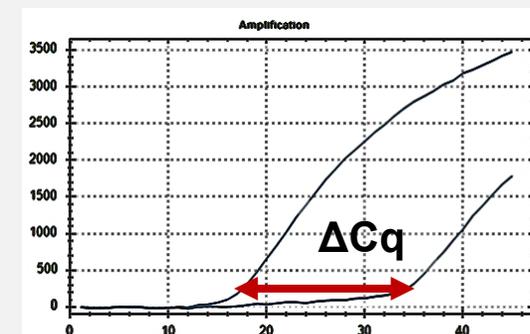
PCR



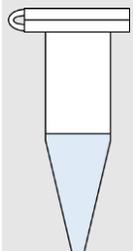
BactFinder™
FungiFinder™

培養群の Cq値 –
非培養群の Cq値 = ΔCq

ΔCq の値に基準を設定し、
陰性/陽性を判定



Sample



前培養培地の紹介

高感度試験系では感度改善および偽陽性リスク低減のために下記の培地を用いて前培養を実施する



好気用培地（青いフタ）

- ・培養条件: $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- ・好気性菌の発育に適した組成

嫌気用培地（赤いフタ）

- ・ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- ・嫌気性菌の発育に適した組成
- ・バイアル内が嫌気状態に保たれているため、嫌気培養用の設備不要

- ◆ 好気培養用、嫌気培養用の培地がセットになっている
- ◆ 培地はバイアル瓶に封入されており、検体は注射針で接種する
- ◆ 接種部位の火炎滅菌が可能のため、コンタミネーションリスクが低減される



↑検体接種の様子

資材類必要なもの

機器・資材	メーカー	型番	準備いただくもの	当社が販売するもの
クリーンベンチ	—	—	○	
遠心機	—	—	○	
恒温槽	—	—	○	
破碎機	例) TAITEC	例) μ T-12	○	
マイクロピペット	—	—	○	
1.5mLチューブ (サンプリング用)	ザルスタット	72.706.400	○	
1.5mLチューブ (溶出用)	ザルスタット	72.706.200	○	
リアルタイムPCR装置	—	—	○	○



CFX Opus 96 リアルタイムPCRシステム

試薬類必要なもの

試薬名	メーカー	型番	準備いただくもの	当社が販売するもの
D-PBS(-)	富士フィルム和光純薬	045-29795	○	
エタノール	富士フィルム和光純薬	054-07225	○	
QIAamp UCP DNA Micro Kit	QIAGEN	56204	○	
塩化ナトリウム 溶液	Sigma-Aldrich	S8776	○	
TurboNuclease 250units/ μ L	Accelagen	N0103M	○	
1M MgCl ₂	ニッポンジーン	310-90361	○	
破碎ビーズ	島津ダイアグノスティクス	69247	-	○
BactFinder™ / FungiFinder™	島津ダイアグノスティクス	69245/69246	-	○



BactFinder
FungiFinder



破碎ビーズ

まとめ

BactFinder™/FungiFinder™ を用いた2つの試験プロトコール

迅速試験系

- 約4時間程度で100 CFU～の微生物を検出できる迅速な試験系である
- 微生物核酸混入のリスクを評価の上、カットオフなどを設定して使用することが望ましい

高感度試験系

- 幅広い菌種を48時間以内に数CFU～生菌を検出する高感度な試験系
- 検体やサンプル調製過程で混入する微生物核酸の影響を受けにくく、偽陽性リスクが少ない

試験の目的や要求感度によって
2つの試験系から適切なものを選択可能

5月20日より販売を開始しました！

製品名	製品コード	包装	希望納入価	貯蔵方法	使用期限
BactFinder	69245	50テスト	280,000円	-30~-15℃	製造後6か月
FungiFinder	66246	50テスト	280,000円	-30~-15℃	製造後6か月
破砕ビーズ	69247	50回用	32,000円	室温	製造後24か月



迅速試験系、高感度系については5月開催のユーザー向けセミナーにて解説しています
(アーカイブ公開中)



※高感度試験系に使用前培養培地についてはお問い合わせください