

Frequently Asked Questions (FAQs) USP

「よくある質問」 米国薬局方 (非無菌医薬品の微生物試験関係)

<https://www.usp.org/frequently-asked-questions> 2021.03.30 アクセス

注： この対訳資料は、Pharma-bio Futakami が調査研究用に所有していたものである。薬局方記載の微生物試験を実施する担当者にとって、JPでの類似通知（*）と同様に、非常に参考となる内容が述べられている。この資料の公開を多くの人たちから要望された Pharma-bio Futakami からの依頼を受けて、当社（ファルマソリューションズ）が著作権について検討した。その結果、問題ないと判断し、記述内容の現状に合わせての更新版を受領して、技術資料のHPに掲載したものである。なお、原文の技術的事項の英単語は、訳文においては可能な限りJPの標記と一致させた状態となっている。

（*：厚生労働省医薬品食品局審査管理課、「第十五改正日本薬局方第一追補制定に伴う試験法等に関する質疑応答集（Q&A）について」、事務連絡 平成21年9月21日） <https://www.pmda.go.jp/files/000158609.pdf> 2021.03.31 アクセス

—————***—————

USP provides answers to Frequently Asked Questions (FAQs) as a service to stakeholders and others who are seeking information regarding USP's organization, standards, standards-setting process, and other activities. These are provided for informational purposes only, and should not be construed as an official interpretation of USP text, or be relied upon to demonstrate compliance with USP standards or requirements. USP does not endorse any specific brand or product. For questions not answered here, USP provides multiple routes of support by which the public may seek additional information. Questions on specific standards should be directed to the appropriate contact listed on the Scientific Support page.

USP (米国薬局方) は、よくある質問 (Frequently Asked Questions : FAQs) への回答を提供している。これは、USP の組織、規格、規格設定プロセス、およびその他の活動に関する情報を求める利害関係者やその他の人々へのサービスとして行っているものである。これらは情報の提供のみを目的としており、USP テキストの公式な理解と解釈すべきものではなく、USP 規格または要件への適合を証明するために頼られるべきものではない。USP は如何なるブランドや製品を推奨するものでもない。ここに記載されていない質問については、USP は一般の方が追加情報を求めるための複数のサポートルートを提供している。特定の規格に関する質問は、“Scientific Support” のページに記載されている該当する適切な連絡先にお問い合わせをされたい。

FAQs: <61> Microbial Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests

よくある質問：<61>非無菌製品の微生物試験：生菌数試験

<http://www.usp.org/frequently-asked-questions/microbial-examination-nonsterile-products-microbial-enumeration-tests>

1. Can I use strains other than those that are cited in the USP?

USP に引用されている以外の菌株を使用することは、可能であるか？

You should use the strains that are cited in General Chapter <61> or equivalent strains from other culture collections. For example, if *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is indicated, you should use this strain or strains from other culture collections claiming equivalence to ATCC 9027. Other strains such as ATCC 14149 are not appropriate.

General Chapter <61>で引用されている菌株、または他の菌株保存機関からの入手した同等の菌株 (equivalent strains) を使用されたい。例えば、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 が記載されている場合、この菌株または、ATCC 9027 との同等性を主張出来る他の菌株保存機関からの培養菌を使用すべきである。ATCC 14149 のような他の菌株は適切ではない。

2. Is there a method that provides verification that there is 100 CFU in the inoculum?

接種液中に 100 CFU があることを確認できる方法はあるか？

You may establish a turbidimetric calibration curve or use another suitable method and then you will be able to get an estimate of the concentration of your inoculum. This can be later confirmed by standard plating methods, such as described in USP General Chapter <51>. You can also use ready-to-use certified strains.

濁度に基づく (訳注: 濁度と生菌数の関係) 検量線を確立するか、あるいはその他の適当な方法を使用する。そうすることで、接種液中の菌濃度の推定値を得ることが可能となる。この液はその後で、USP General Chapter <51>に述べられているような、標準的なカンテン平板混釈法 (standard plating methods) によって確認が出来る。また、ready-to-use certified strains (訳注: バイオボール™ の様な市販品) を使用することもできる。

3. When are you supposed to do the negative control: when testing the suitability of the method, when testing the product, or both?

陰性対照試験を実施することを考えた場合: 試験方法の適合性を試験する時、製品の試験をする時、その両方で行うのか？

You are supposed to include the negative control at the same time you test the product.

製品を試験と同時点で、陰性対照試験を行うことを考えることになる。

4. What is the purpose of the negative control?

陰性対照の目的は何か？

The purpose of this negative control is to show that there is no contamination during the testing of the product. If a positive result is obtained with a negative control, the test can be regarded as invalid and may be repeated.

この陰性対照の目的は、製品の試験中に汚染がないことを示すことである。もし陰性対照で陽性結果が得られたならば、当該試験は無効と見なされ、再試験を行うことになるであろう。

5. Does it have to be done every time the product is tested or during the method validation or is it possible to do it periodically?

陰性対照試験は、製品を試験するたびにを行うのか、あるいは当該試験方法のバリデーション中に行うのか、あるいは定期的に行うことでも可能なのか？

Negative controls should be included every time the product is tested.

陰性対照試験は、製品を試験するたびに含めるべきである。

6. Is it necessary to test the growth promotion on all received batches or does it serve just for microbiological validation? Do we have to test the growth promotion of diluted broth?

受入れを行った全ての培地のバッチで、培地性能 (growth promotion) を試験することが必要であるのか？ あるいは微生物学的なバリデーションのためだけに、役立つものか？ 希釈した液体培地の培地性能を試験する必要があるか？ (訳注参照)

訳注：この最後の文章の質問の意図は、「液体培地であれば、培地を薄めて試験をすれば、培地性能がより厳しく評価できるのでは？」ということと、推測される。培地は規定濃度で評価を行うことでより正しく評価が出来るものであり、「薄めればより厳しく評価」できるというものではない。

その理由は、培地処方成分の濃度間の微妙なバランスで、培地性能が維持しているからである。培地を薄めることは、ある菌にとっては生長促進性にマイナスの影響となるが、他の菌にとってはプラスとなる環境を出現させる可能性は否定できない。

Growth promotion must be tested for each new batch of medium. Growth promotion must be checked on agar media and nutritive broth but not on diluted broth.

培地の新しいバッチごとに培地性能を試験する必要がある。カンテン培地や液体培地では培地性能を確認する必要があるが、希釈した液体培地では確認しない (上記訳注参照)。

7. Do we have to test systematically in parallel a previous and approved batch in order to compare with the new batch?

新規培地のバッチを比較するために、以前の、そして受入れ済みのバッチを並行してさせて系統的に試験する必要があるか？

You do not have to test a previous batch in parallel. You can do the comparison 'on paper' if growth was clearly described.

以前の (訳注：受け入れた) バッチを並行してテストする必要は無い。もし (訳注：培地性能試験で規定された接種した菌種全体の) 生長が明確に述べられるのであれば、'on paper' (訳注参照) で比較することが可能である。

訳注：'on paper'とは、“in theory rather than in reality”の意味である。すなわち「実際に並行試験をしなくても、これまでの実績と論理的な判断で」という意味である。

8. Why do growth promotion tests have to be performed on sabouraud-dextrose agar (SDA) and casein soya bean digest agar (CSA) for *C. albicans* and *A. niger*?

Is it because colonies of fungi detected on CSA are counted as part of TAMC?

C. albicans と *A. niger* (訳注参照) の培地性能試験は、何故、サブロー・ブドウ糖カンテン培地 (sabouraud-dextrose agar : SDA) とソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・カンテン培地 (casein soya bean digest agar : CSA) で行わなければならないのか? CSA で検出されたカビのコロニーが TAMC (総好気性微生物数) の一部としてカウント (計数) されるという理由からか?

訳注 : *A. niger* は、名称が変更されており、現在は *Aspergillus brasiliensis* の菌名となっている。詳細は次のサイトを参照のこと。

<https://www.nite.go.jp/nbrc/information/110408.html> 2021.03.31 アクセス

<https://www.researchgate.net/publication/6155814> *Aspergillus brasiliensis* sp nov a biseriolate black *Aspergillus* species with world-wide distribution 2021.03.31 アクセス

This is a matter of definition. TAMC by definition includes yeast and molds. Therefore the media have to be checked with these micro-organisms.

これは、定義の問題である。TAMC (総好気性微生物数) の定義によれば、酵母やカビを含んでいる。それゆえ、これらの微生物で培地をチェックする必要がある。

9. As bacteria growing on SDA are also counted as part of TYMC, why aren't the growth promotion tests required to be performed on SDA with the bacterial strains?

SDA 上で生育した細菌も TYMC (総真菌数) の一部としてカウントされるのに、なぜ SDA で細菌の菌株を用いた性能試験を行う必要がないのか?

TYMC is by definition yeasts and molds count so growth promotion with bacteria is not essential. SDA with antibiotics may be used as an alternative when the TYMC is expected to exceed the acceptance criterion due to the bacterial growth.

TYMC (総真菌数) はその定義 (definition : 訳注参照) により酵母とカビの菌数測定用となっている。そのため、細菌での性能試験は必須のものではない。抗生物質を添加した SDA は、細菌の増殖により TYMC (訳注 : での出現菌数) が許容基準を超えることが予想される場合、代替として使用することができる。

訳注 : SDA は培地組成中の栄養成分がペプトンとブドウ糖であり、かなり単純な組成を持つ培地である。しかし、そのような培地組成であっても細菌が生育する可能性が存在する。SDA は細菌の抑制手段として、pH の範囲を 5.4~5.8 の酸性側としている。細菌用の培地の pH は原則として 7.1~7.5 となっている。しかし、この 2 つの条件を組み合わせても、細菌を完全に抑制することは期待出来ない。このため、そのような条件下での細菌の出現菌数が多いと予想される時は、抗生物質添加の SDA の使用を認めている。

10. What does the factor of 2 mean? How is this factor calculated?

平均値の係数 2 (factor of 2 mean) とは何か? この係数はどのように計算を行うのか?

It means that the result can be twice that of the inoculum. For example with an inoculum of 100 CFU, acceptable counts are: $100/2 = 50$ CFU to $100 \times 2 = 200$ CFU. The factor is introduced to take account of the variability of the method.

結果が接種菌液の (訳注: 推定値の) 2 倍になる可能性があるということを意味する。例えば、接種菌数が 100 CFU の場合、(訳注: 測定によって得られた) 許容できる菌数は $100/2 = 50$ CFU から $100 \times 2 = 200$ CFU となる。この係数は、その方法のばらつきを考慮して導入されている (訳注参照)。

訳注: この説明では、なぜ“2”であるかの記述がなされていない。この考え方の背景には、細菌学的手法で培養法に基づく場合は、「対数に基づく科学 (logarithmic science)」に従うものとなるとの考え方がある。この概念は重要であるので、Tim Sandle 氏が IVT (Institute of Validation Technology) の雑誌に投稿した“Approaching Microbiological Method Validation”の査読付き論文“Microbiology”から、このことに関する説明の参考訳を転載する。

Tim Sandle, “Peer Reviewed: Microbiology,”(Approaching Microbiological Method Validation | IVT) Dec 4, 2015 10:21 am EST, <https://www.ivtnetwork.com/article/approaching-microbiological-method-validation> Accessed 03/08, 2021.

Types of microbiological methods 微生物学的方法の種類

Microbiological methods fall into one of three major categories (although this categorization is not always exclusive) (3):

微生物学的方法は、大きく3つのカテゴリーのいずれかに分類される (この分類は必ずしも全てを包括するものではない) 。 :

a) Qualitative tests for the presence or absence of microorganisms, e.g. the pharmacopoeia sterility test.

Commonly, qualitative tests are assessed through the use of turbidity or other growth related changes in a culture medium, as evidence of the presence of viable microorganisms in a test sample.

微生物の存在の有無を調べる定性的試験 (Qualitative tests)。例えば薬局方の無菌試験。

一般的に定性試験は、試験サンプル中の生菌の存在の証拠として、培地中の濁度又はその他の増殖に関連する変化を使用して評価する。

b) Quantitative tests for the enumeration of microorganisms, e.g. a total viable count test or flow cytometry.

微生物を計数するための定量的試験 (Quantitative tests)、例えば、総生菌数測定法またはフローサイトメトリー。

c) Identification tests, e.g. the speciation of bacteria using a biochemical test. This includes morphological and biochemical characterization such as biochemical reactions, carbon substrate utilization, characterization of

fatty acid composition, restriction endonuclease banding patterns and use of 16S or DNA sequence analysis (4).

同定試験 (Identification tests)、例えば生化学的試験を用いた細菌の菌種分類。

これには、形態的および生化学的反応(morphological and biochemical reactions)、炭素基質利用能(carbon substrate utilization)、脂肪酸組成の特徴付け(characterization of fatty acid composition)、制限エンドヌクレアーゼのバンディングパターン(restriction endonuclease banding patterns)、及び 16S または DNA 配列解析 (16S or DNA sequence analysis) の使用などが含まれる。

Variability with microbiological methods 微生物学的方法の変動性

Methods that fall within the three described categories have a degree of variability, and with these variations microbiological methods are inherently different from analytical ones (5). Not least in the lack of agreed demonstrative criteria. The wide variability is acknowledged in Ph. Eur. 5.1.6, the chapter relating to alternative microbiological methods (6). This is particularly with regards to relative broad ranges.

上記の3つのカテゴリーに分類される方法は、ある程度のバラツキがあり、そのバラツキがあるために、微生物学的方法は、分析的方法とは本質的に異なる。少なくとも合意された実証基準がないという点では、その様にいえる。この幅広い変動の存在は、欧州薬局方 (Ph. Eur.) 5.1.6 において同意されている。このPh. Eur. 5.1.6の章は、代替微生物試験法に関わる章である。これは特に、かなり広い範囲に関係する事項である。

The reason for the variation is because microbiology is a **logarithmic science**. Microbiological methods are capable of distinguishing between 100 and 1000 cells (1 log), but not smaller differences, such as 0.3 or 0.5 of a log. This means that 18 CFU is technically no different than 10 CFU; and 1 CFU is different than 10 CFU but not 5 CFU. Therefore cultural based methods in particular provide estimates rather than exact cell counts.

このばらつき理由は、微生物学が「対数に基づく科学 (logarithmic science)」だからである。微生物学的方法は、100 と 1000 個の細胞 (1 log)の間の差異は識別する能力を持つが、logで0.3 や 0.5 の様な、より小さな差異は識別する能力を持たない。これは、18 CFUは技術的10 CFUと異ならないことを意味している；1 CFUは、10 CFUとは異なるが、5 CFUとは変わらないことを意味する。それゆえ、特に、増殖に基づく方法(cultural based methods)は、正確な微生物細胞数ではなく、それは推定値を提供するものである。

Variability may result in difficulties in comparing two methods. In general, only a 50% comparison is achievable for culture methods. With rapid and alternative microbiological methods greater comparability can be achieved, however levels of precision remain in the order of 15 to 35% relative standard deviation (obtained by multiplying the standard deviation by 100 and dividing this product by the average).

バラツキがあると、2つの方法を比較することが困難になる場合がある。一般的に培養法 (culture methods) では、50%程度の比較しかできない。迅速で、かつ代替的な微生物学的方法では、より大きな可能性を達成することが出来る。しかしながら、その精度レベルは、15 ~ 35%の相対標準偏差のオーダーにとどまっている (相対標準偏差は、標準偏差に100を乗じ、この積を平均値で割った値である)。(Tim Sandle 氏の文献の引用終わり)

11. What is the sufficient volume of the microbial suspension of not more than 100 CFU?

What does 100 CFU refer to?

「100 CFU 以下の微生物の懸濁液の十分な量」とは何を意味するのか？

「100 CFU」とは何を基準とする (refer to) のか？

The micro-organisms are to be added to the diluted/suspended product at the end of the preparation (usually a 1 in 10 dilution is prepared) or after the neutralization (in the last fraction of the rinsing fluid in the case of filtration or simultaneously with the preparation in/on the Petri dish in the case of the plate count method) if inhibition of growth by the sample cannot otherwise be avoided. The 100 CFU refers to the inoculum (e.g., what will be on the filter or on the plate).

微生物は、(訳注：試験用の希釈液の) 調製の最後の時点で、その希釈した／懸濁した製品 (通常は 10 倍の希釈液を調製する) に添加される。あるいは、サンプルによる生長抑制が他の方法で避けることが出来ないのであれば、中和後に添加される。この「中和後」とは、ろ過法の場合は洗浄液の最後のフラクション (the last fraction of the rinsing fluid) であり、カンテン平板測定法の場合では、その希釈液 (訳注 1 参照：10 倍希釈液) か、そのペトリ皿に (in/on: 訳注 2 参照) 加えることを指す。“100 CFU” は、(例えば、そのフィルターに加えた、あるいは培地平板に加えた) 接種量 (訳注：接種液中の接種菌数) を基準としている。

訳注 1： JP では、「3.4 製品存在下での試験法の適合性」の項に記載がある。「通常は 10 倍希釈液を調製する」とあり、更に「最も低い希釈率の試料液を用いて試験する」とある。従って、資料懸濁液の pH 調整や、抗菌活性の不活化処理が終わった直後に、試料液量の 1 % を超えない範囲で試験菌の接種を行う必要がある。

訳注 2： この原文は、“in/on the Petri dish” との表現であり、カンテン培地混釈法の他に、塗抹法も適用可能な表現となっている。

FAQs:

<62> Microbial Enumeration of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms

よくある質問：<62>非無菌製品の微生物試験：特定微生物試験

<https://www.usp.org/frequently-asked-questions/microbial-enumeration-nonsterile-products-tests-specified-microorganisms> 2021.03.31 アクセス

1. Can I use other strains than those that are cited in the USP?

USP に引用している以外の菌株を使用してもよいか？

You should use the strains that are cited in this chapter, or equivalent strains from other culture collections. For example, if *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is indicated, you should use this strain or strains from other culture collections claiming equivalence to ATCC 9027. Other strains such as ATCC 14149 are not appropriate.

本章で引用されている菌株、または他の菌株保存機関からの入手した同等の菌株 (equivalent strains) を使用されたい。General Chapter <61>で引用されている菌株、または他の例えば、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 が記載されている場合、この菌株または、ATCC 9027 との同等性を主張出来る他の菌株保存機関からの培養菌を使用すべきである。ATCC 14149 のような他の菌株は適切ではない。

2. When are you actually supposed to do the negative control: when testing the suitability of the method, or when testing the product, or in both situations?

実際には、どのような場合に陰性対照を行うことになっているのか？ 試験方法の適合性試験時か？ 製品の試験時か、あるいはその両方の場合か？

You are supposed to do the negative control at the same time as when you are testing the product.

製品の試験と同時に陰性対照試験を行うことになっている。

3. What is the purpose of the negative control?

陰性対照の目的は何であるか？

The purpose of the negative control is to show that there is no contamination during the testing of the product. If a positive result is obtained with a negative control, the test can be regarded as invalid and may be repeated.

陰性対照の目的は、製品の試験中に汚染がないことを示すことである。陰性対照試験で陽性の結果が得られた場合、その試験は無効であるとみなされ、再試験が行われることがある。

4. Does it have to be done every time the product is tested or during the method validation or is it possible to do it periodically?



陰性対照は、製品試験時は毎回、あるいは試験方法のバリデーション中に行うべきであるのか？ あるいは、それを定期的に行うことは可能であるのか？

Negative controls should be included every time that the product is tested.

陰性コントロールは、製品を試験するたびにを行う必要がある。

5. Is it necessary to test the growth promotion on all received batches or does it serve just for microbiological validation?

培地性能試験は、入荷した全ての（訳注：培地の）ロットについて行う必要があるのか？ あるいは、微生物学的なバリデーションに関してだけに行うものであるか？

Growth promotion must be checked for each new batch of medium.

培地の新たなバッチごとに、培地性能を確認する必要がある。

6. Do we have to test systematically in parallel a previous and approved batch in order to compare with the new batch?

新しい（訳注：培地の）バッチと比較するために、以前の適合したバッチを並行させて、系統的に試験する必要があるか？

You do not have to test a previous batch in parallel. You can do the comparison 'on paper' if growth was clearly described

以前の（訳注：受け入れた）バッチを並行してテストする必要は無い。もし（訳注：培地性能試験で規定された接種した菌種全体の）生長が明確に述べられるのであれば、'on paper'（訳注参照）で比較することが可能である。

訳注：'on paper'とは、“in theory rather than in reality”の意味である。すなわち「実際に並行試験をしなくても、これまでの実績と論理的な判断で」という意味である。

7. What are the specifications when we compare a fresh batch with a previous batch for growth promotion properties? Do we need to take a factor of 2 into account?

成長促進性（培地性能）について、新しいバッチと以前のバッチを比較する場合、どのような規定になるか？ また、“2”のファクターを考慮する必要があるか？

The factor of 2, as described in USP <61> can be used. No strict requirement was deliberately given in this chapter because the test is qualitative, not quantitative. You can define the comparability criterion yourself. For example, colony size at the shortest incubation time prescribed.

USP <61> に記載されているファクター2（訳注：の概念）を使用することができる。この章 <62> は、意図的に厳密な要件は示していない。というのは、この試験は定量的なものではなく、定

性的なものだからである。“comparability criterion” (訳注：同等であると判断する基準) は、各組織 (yourself) で規定することが出来る。例えば、規定された最も短い培養時間でのコロニーサイズなどである。

訳注：本項については、前記の<61>の項の Q “10” の項も参照のこと。

8. You should not incubate more than the « incubation time prescribed ». How exactly are the given times (e.g. 18 – 24 h) to be followed?

「規定された培養時間」 超えて培養すべきではない。どの様にして、決められた時間 (例えば、18~24 時間) を守ればよいであろうか?

For growth promoting properties of media you must incubate not more than 18 h (worst case conditions).

培地の成長促進効果については、(最悪の場合でも) 18 時間を超えないように培養する必要がある。

For inhibitory properties of media you must incubate not less than 24 h (worst case conditions). For indicative properties of the media you could incubate within the specified range (here, from 18 h to 24 h).

培地の (訳注：目標とする以外の菌に対する) 抑制特性は、(最悪の場合であっても) 24 時間以上の培養が必要である。当該培地の指標となる特性については、規定された範囲 (この場合では、18 時間から 24 時間) の培養をすることが出来る。

9. In the growth promotion test of Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth there is no visible growth after the incubation time, but after subculturing on selective agar there is typical growth. Is this the case only in our laboratory?

Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth (ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地) の生長促進性試験で、培養時間後に肉眼的生長が無いが、選択培地に二次培養後では典型的な生長が認められる。この事例は我々のラボだけのことであるか?

This can be observed, since for Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth, we inoculate low numbers of Salmonella sp (usually the inoculum is around 20 CFU per 10 mL Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth).

ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地には、このような現象が見受けられる。というのは、低い菌数のサルモネラ菌を接種しているからである (通常、接種菌量は、ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地の 10 mL あたり約 20 CFU である)

Even if the enrichment broth seems clear, you must confirm recovery of Salmonella by subculturing the Rappaport Vassiliadis Salmonella enrichment broth to solid agar.

増菌用の液体培地が澄んでいるように見えても、ラパポート・バシリアジス・サルモネラ増菌液体培地を、固形培地に二次培養することで、サルモネラの回収を確認しなければならない。

10. Does it mean that for each test strain, individual suitability tests have to be performed, or is it possible to use a mixed inoculum of all 4 strains?

試験菌株ごとに個別に適合性試験を実施しなければならないということの意味しているのか？
それとも、4菌種全てを混合した接種菌液を使用することが可能であるか？

The method states that the strains are inoculated individually. No mixed inoculum is permitted.

この方法は、各菌株を個別に接種すると述べている。混合接種菌液は、許されていない。

11. Test strains must be inoculated individually using a number of micro-organisms equivalent to not more than 100 CFU, could you clarify if this means that only the specific micro-organism under detection in the test method is inoculated into the growth medium or if each of the 4 microorganisms are added individually to the growth medium for each of the specific test methods?

試験菌株は、100 CFU 以下に相当する数の微生物を用いて個別に接種しなければならないとあるが、これは、「該当する試験法で検出対象となっている特定の微生物のみを、生育培地に接種する」ことを意味するのか、それとも、「4種類の各微生物を、その特定の試験法で規定されている培地に個別に添加するのか」を明確にして頂きたい。

It is only the specified micro-organism under detection which is inoculated.

接種するのは、(訳注: 当該試験の) 検出対象の特定微生物だけである。

12. Which test micro-organisms should one use? Just the same micro-organisms as used for testing the growth promoting properties of the respective media, or also the microorganisms used for testing inhibitory properties of the media?

どのような試験菌を使用すべきであろうか？ それぞれの培地の増殖促進特性の試験に使用したのと同じ微生物を使用するのか、それとも培地の阻害特性の試験に使用した微生物を使用するのか？

You do not have to use an inhibitory strain in order to test the suitability of the method. For example, if you test the suitability of the method for *E. coli*, you should use only *E. coli* as test micro-organism for growth promotion.

試験方法の適合性を試験するために、阻害特性を持つ菌株を使用することはない。例えば、*E. coli* (大腸菌) の試験の適合性を試験するのであれば、増殖促進性の試験微生物としては大腸菌のみを使用すべきである。

13. Must all products be tested?

すべての製品を (訳注: 試験方法の適合性の) 試験しなければならないのか?

Not always. For products differing only in amount of active ingredient a bracketing approach may be applied.

必ずしもそうではない。有効成分の量が異なるだけの製品には、ブラケット法 (訳注参照) を適用することができる。

訳注: ブラケット法の “bracketing” とは、幾つかのものを「括弧でくくる」との意味である。すなわち、両端の条件のみを評価する方法である。上記の文章の関わり合いでは、有効成分の量が最大と最小の処方製品の2つの試験をすれば良いとの意味である。

14. What is meant by "at the time of mixing"? Bile-tolerant gram-negative bacteria: At the time of sample preparation, or at the time of addition to the resuscitation broth, or at the time of inoculation of the Mossel Broth? *E.coli* : At the time of sample preparation, or at the time of addition to pre- broth, or at the time of inoculation of the MacConkey broth etc.?

「混合時」とはどういう意味であるか? 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌 (Bile-tolerant gram-negative bacteria) : サンプル (訳注 試料液) 調製時、または蘇生用液体培地 (訳注: 試験手順から考えて、ソビーン・カゼイン・ダイジェスト培地と思われる) への添加時、モーゼル液体培地への添加時? 大腸菌 (*E.coli* : *Escherichia coli*) : サンプル (訳注 試料液) 調製時、または、pre- broth (訳注: 前段階の液体培地 試験手順から考えると、ソビーン・カゼイン・ダイジェスト培地と思われる) への添加時、またはマッコンキー液体培地への添加時 などか?

In both cases, the micro-organisms should be added at the time of mixing with the preincubation or resuscitation broth. If Bile-tolerant gram-negative bacteria are taken as an example it refers to the sub-section "Sample Preparation and Pre-Incubation". The micro-organisms are added to the casein soy bean digest broth (SCDB) immediately before or after the product to be examined is added. The micro-organisms are therefore present during the whole resuscitation period of 2 – 5 hours.

いずれの場合も、前培養用液体培地や蘇生用液体培地との混合時に、微生物を添加する必要がある。胆汁酸抵抗性グラム陰性菌を例にとると、"Sample Preparation and Pre-Incubation" (「サンプルの準備と前培養」) の項目になる。微生物は、検査対象の製品を加える直前または直後に、ソビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 (SCDB) に加えられる。したがって、微生物は、2~5 時間の蘇生期間 (訳注: JP では「通例 2 時間であり、5 時間を超えないこと」と記載する) 全体に存在する。

15. What does "100 cfu in the inoculated test preparation" mean? How should this be done?

「接種した試験調製物中に 100 cfu」とはどういう意味であるか？
これはどのように行うべきか。

This is to simulate the situation that 100 cfu's are present in the sample to be examined, usually 1 g of the product but 10 g for *Salmonella* (cf. section *Salmonella*), resp.

これは、試験対象のサンプル中に、100 cfu が存在するという状況をシミュレートするためである。通常は、それぞれ製品 1g、ただしサルモネラ菌の場合は 10g を試験する (*Salmonella* の項参照)。

Example: Suppose 10 g of product is diluted in 100 ml of CSDB. Then less than 100 cfu's are added to this suspension.

事 例： 10g の製品を 100 mL の CSDB で希釈したとする。その後、この懸濁液に 100 cfu 以下の菌が加えられる。

16. Should the test organism (<100 cfu) be added to the 1:10 diluted test solution (with 10g Product) and then the inoculated test solution be inoculated into the selective medium? If the inactivators (see Table 2, USP<61>) cannot inactivate the antimicrobial activity of the product, can we proceed as in USP<61> to add the test organisms to a higher dilution of the product (<100cfu in 1g product) or at a later time in the test?

(製品 10g での) 1:10 に希釈した試験液に、試験菌 (100 cfu 未満) を添加し、次いで、菌接種した試験液を選択培地に接種するべきであるか？ 不活化剤 (USP <61> の表 2 参照) が製品の抗菌活性を不活化できない場合、USP <61> のように、より高い希釈率の製品に試験菌を添加する (1g の製品で 100 cfu 未満) のか、試験のもっと後のタイミングで試験手順を行うことができるか？

The test organisms should be added at the time of mixing with the medium for pre-incubation. Inactivation of antimicrobial activity should be attempted as far as possible. Addition at a later time of the test is not a reasonable measure. If inactivation cannot be achieved, the test can be abandoned for the product because it is assumed that the specified micro-organism will not be able to survive in the product.

試験菌の添加は、前培養用培地との混合時点で行う必要がある。抗菌作用の不活化は、出来る限り早い時点で行うべきである。試験の後半に添加することは合理的な方法ではない。もし不活化が達成できない場合は、その製品については試験を放棄することができる。というのは、特定微生物 (the specified micro-organism) が当該製品内で生存できないことが想定されるからである。

17. Why shall I use the shortest incubation period?

なぜ、最も短い培養期間を使わなければならないのか？

You have to show that the worst conditions work. Moreover you are working with healthy cells and these should give the required response in the shortest time.

最悪の条件でも機能することを示さなければならない。さらに、貴方は健全な（訳注：実験においてダメージを受けていない）細胞を使っているので、これらは最短の時間で必要な応答を与えるはずである。

18. What does "The specified micro-organisms must be detected with the indication reactions as described under 'Testing of Products'" mean?

「'Testing of Products' (製品のテスト) の項に述べられているような indication reactions (表示反応?) をもって特定菌が検出せねばならない」とはどういう意味であるか？

Characteristic colonies are observed on the selective agar, and no such colonies are observed with a non-inoculated product, examined simultaneously as a negative blank.

選択用カンテン培地上に特徴的なコロニーが観察され、そして陰性対照 (negative blank) として同時に検査した菌未接種の製品ではそのようなコロニーが観察されないことである。

19. What do I have to show to be able to proceed as stated: "If for a given product the antimicrobial activity with respect to a micro-organism for which testing is prescribed cannot be neutralized, then it is to be assumed that the inhibited micro-organism will not be present in the product."

何を示せば、記載されているように進めることができるのか： "もし、ある製品について、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"

(訳注：試験法は三極調和しているので、この文章（“ ” で囲まれた部分）は、JP の記述を転記した。)

Once you demonstrate that you have tried all possible approaches, then you can refer to the clause cited in your question.

すべての可能なアプローチを試したことを証明したら、質問に引用されている条項を参照したことになる。

20. What are "the Bile-tolerant Gram-negative bacteria"?

「胆汁酸抵抗性のグラム陰性菌」とは何であるか？

There is no strict definition of this group of micro-organisms. They are defined operationally as those micro-organisms that show growth in the stated conditions on Violet Red Bile Glucose Agar medium. They include, Gram negative bacteria that grow in the

presence of bile salts, non-lactose fermenting but able to utilize glucose, e.g., some Bile Tolerant Gram Negative Bacteria includes members of the family Enterobacteriaceae, Pseudomonads and Aeromonas.

この微生物のグループの厳密な定義は存在していない。運用上の定義としては、バイオレット・レッド・胆汁酸・ブドウ糖カンテン培地上で規定された条件で増殖を示す微生物とされている。胆汁酸塩の存在下で生育をして、乳糖発酵はしないがブドウ糖を利用できるグラム陰性菌が含まれている。例えば、一部の胆汁酸抵抗性グラム陰性菌 (Bile Tolerant Gram Negative Bacteria) には、腸内細菌科 (family Enterobacteriaceae)、シュードモナス科 (family Pseudomonads)、アエロモナス科 (family Aeromonas) のメンバーが含まれている。

21. In the sub-section Selection and Subculture under *Escherichia coli*, what is the purpose of the elevated temperature 42 – 44°C? Can one utilize an alternative temperature range, e.g. 35 – 37°C provided that one demonstrates the recovery of *E. coli* during qualification?

“the sub-section Selection and Subculture under *Escherichia coli*” (大腸菌の存在下での選択と二次培養)の項で、42~44°Cの昇温は何のためにあるのか? 適格性評価時に大腸菌の回復が得られることを証明するという条件に、35~37°Cなどの別の温度範囲を利用することはできるか?

The purpose of the elevated temperature, 42 – 44°C is to allow for selective conditions for fecal *E. coli*. The selected temperature is usually a compromise between sensitivity and specificity as not all strains of *E. coli* will grow, or grow and produce gas, at these higher incubation temperatures.

42~44°Cという昇温の目的は、糞便由来の大腸菌 (fecal *E. coli*) を選択的に培養するためである。全ての大腸菌がこれらのより高い培養温度で増殖したり、増殖してガスを発生したりするわけではないので、選択された温度は通常、感度と特異性の間の妥協点となっている。

An alternative temperature range would depart from the USP method, but you can always use alternatives methods as described in the General Notices of the USP and USP<1223>.

別の温度範囲では USP 法から乖離することになるが、USP および USP <1223> の General Notices に記載されているようにして、代替法を常に使用することができる。

22. With accumulation of the minimal incubation (3 x 18h) for pre-culture, enrichment culture, and sub-culture, it is unavoidable to work at night-hours to perform the validation. How can we avoid these awkward working hours for our personnel?

前培養、増菌培養、二次培養についての最小限の培養 (18 時間×3 回) の積み重ねで、バリデーションを行うためには夜間の作業が避けられない。どうすれば、このような不都合な労働時間を避けることができるか?

You have to confirm that the test works for the minimum time for routine testing. In fact, should a company find during suitability testing, that the minimum incubation time is not sufficient for a given product but a longer incubation time is needed, prolongation would be a necessary variation of the test.

日常試験に必要な最小限の時間で、その試験が機能することを確認しなければならない。実際には、適合性試験中に、ある製品に対して最小の培養時間では十分ではなく、より長い培養時間が必要であることがわかった場合、その延長は試験の必要なバリエーション (訳注参照) となる。

訳注：原文は“necessary variation”の表現である。“variation”は「変更申請」という意味もあるので、この記載を「一部変更申請が必要」との意味の可能性に注意が必要である。

23. If 10 g of sample is added to the initial broth for a test such as *E. coli* (4.2), but an amount is immediately sub-cultured into a second broth that is only representative of 1g of actual product and this broth is incubated. At the end of testing, can this test be classified, for a negative result, as "none detected per 10 g" or as "none detected per g".

大腸菌 (4.2 項) などの検査のために、最初の液体培地に 10g のサンプルを加えたが、実際の製品 1g を代表するだけの量を直ちに 2 番目の液体培地へと二次培養し、この (訳注：二次培養の) 液体培地を培養した場合。試験終了時に、この試験結果が陰性の場合、「10g 当たり検出されず」または「1g 当たり検出されず」と分類できるか。

The quantity that is pre-incubated is 1 g therefore the outcome of the test is "absence in 1 g". For Salmonella, you will note that an "absence in 10 g" test has been implemented.

前培養した (pre-incubated) 量は 1g なので、検査の結果は「1g 中に不検出」 ("absence in 1 g") となる。サルモネラ菌については、「10g 中に検出されない」という試験を実施することに、注意が必要である。

24. It is observed that on selective media of *S. aureus*, yellow colonies of gram-positive cocci in chains are seen, but the yellow colonies are without clear zones in the test sample. Whereas positive culture shows yellow colonies of gram-positive cocci in clusters surrounded by yellow zones.

S. aureus の選択培地では、連鎖したグラム陽性球菌の黄色のコロニーが見られるが、試験サンプルでは黄色のコロニーが明確なゾーンを持たないことが観察される。しかしながら、陽性培養菌 (positive culture : 訳注 陽性対照として使用する *S. aureus* の意味であろう) では、黄色のゾーンに囲まれた塊状 (クラスタ状) のグラム陽性球菌の黄色のコロニーが見られる。

Your product can be contaminated, maybe not by the species described in the USP but by another micro-organism. Good laboratory practice should make you think that there is a

problem and that you should investigate (e.g. identify the species and find out where it comes from). Probably the product cannot be released, but it is up to the QC laboratory manager to decide.

あなたの製品は、USPに記載されている菌種ではなく、別の微生物に汚染されている可能性がある。Good laboratory practice (適切な実験室規範)があるか、そしてその事を調査すべきである(例えば、菌種を特定し、どこから由来したかを調べる)。多分、その製品は出荷できないと思うが、それを決めるのはQCラボのマネージャーである。

25. For which pharmaceutical products or raw materials is it prescribed to search for *Clostridia* ?

Clostridia の存在を調べるのが規定されている医薬品や原材料は、どのようなものがあるか？

For powdered animal organs, products with risk of fecal contamination by *Clostridia* and possible proliferation, natural raw materials, possible telluric contamination. However it has not been introduced in any monograph yet. The test is particularly relevant where a preparation is exposed to anaerobic or low-oxygen conditions during use.

粉末化した動物臓器、「*Clostridia* による糞便由来汚染のリスクがある製品」および「(訳注：*Clostridia* による) 増殖の可能性がある製品、テルル汚染の可能性がある天然物の原料」である(訳注参照)。しかしながら、まだどのモノグラフにも紹介されていない。この試験は、調べようとする調製品が、使用中に嫌気状態に置かれている場合や低酸素状態にさらされる場合に特に関連性を持つ。

訳注：この下線で示した文章の訳は問題がある。意味が正確に理解できない。また“telluric contamination”は化学物質による汚染と考えられるが、*Clostridia* との関連性が不明である。インターネットでの調査では、*Clostridia* による感染症の勃発の時に、“telluric contamination”との関連性が示唆されているようである。

26. Are there alternative media that are acceptable?

代替の培地を使用することはできるか？

Methods using alternative media are considered as alternative methods, which may be used when consistent with General Notices 6.30.

代替メディアを使用する方法は、代替試験方法 (alternative methods) と見做され、USP の General Notices の 6.30 項に一致する場合は、それを使用することが可能となる場合がある。

27. How can we do the pH measurement for culture media? It is written to measure the pH at 25°C. At this temperature, agar is solid. Therefore, how can we adjust the pH?

培地の pH 測定はどのように行えばよいのであろうか？ pH の測定は 25°Cで行うように書かれ

ている。この温度では、寒天は固体である。それ故、どのようにして pH を調整すればよいのであろうか。

You may use a robust electrode. There are electrodes for measurement in semisolid samples such as meat, cheese and fruit. These electrodes are certainly suitable for measurements in solid agar. Adjustment of pH must be made during preparation of the medium for ensuring that the criterion for pH is met in the final medium.

堅牢な電極 (robust electrode) を使用するとよいであろう。肉、チーズ、果物などの半固形サンプルの測定用の電極がある。これらの電極は、確実に固体の寒天での測定に適している。pH の判断基準は、最段階での培地で適合していることを保証するために、当該培地の調製中での pH 調整をしなければならない。

28. If we have growth problems of *S. aureus* and inhibitory problems of *E. coli* with mannitol salt agar medium that is recommended in the harmonized method, what is the cause?

三極調和法で推奨されているマンニット食塩カンテン培地で、*S.aureus* の増殖や、*E.coli* の抑制に関わる問題が発生した場合、その原因は何であるか？

The composition of mannitol salt agar has been optimized to recover *S. aureus* and inhibit *E. coli* (pH, nutritive qualities...). You should verify that the temperature of incubation is correct. Moreover there could be a problem of stability of the medium and you should therefore verify that the medium has been stored in adequate conditions. Lastly, you could try to use different media suppliers, which may give better results.

マンニット食塩カンテン培地の組成は、*S. aureus* を回収し、*E. coli* を阻害するように最適化されている (pH、栄養性...などにより)。培養温度が正しいかどうか確認すべきである。更に、培地の安定性に問題がある可能性が考えられるので、培地が適切な条件で保存されていることを確認する必要がある。最後に、より良い結果が得られるかも知れない、別の培地供給者を使用してみてもどうか。

(EOF : 2021.04.01 了)