

第十四改正  
日本薬局方  
第二追補

第一部

反応温度、反応時間及びゲル化判定は、(1) 予備試験 (i) ライセート試薬の表示感度確認試験を準用する。

## 一般試験法 改正事項

第一部一般試験法の部 前文を次のように改める。

一般試験法は、共通な試験法及びこれに関連する事項をまとめたものである。別に規定するもののほか、アルコール数測定、アンモニウム試験、液体クロマトグラフ法による試験、エタノール中の揮発性混在物試験、塩化物試験、炎色反応試験、エンドトキシン試験、核磁気共鳴スペクトル測定、かさ密度測定、ガスクロマトグラフ法による試験、乾燥減量試験、眼軟膏剤の金属性異物試験、含量均一性試験、吸光度比法による試験、凝固点測定、強熱減量試験、強熱残分試験、屈折率測定、蛍光光度法による試験、原子吸光光度法による試験、抗生物質の微生物学的力価試験、鉱油試験、酸素フラスコ燃焼法による試験、残留溶媒試験、紫外可視吸光度測定、質量偏差試験、重金属試験、消化力試験、生薬の微生物限度試験、蒸留試験、浸透圧測定、水分測定、製剤の粒度の試験、制酸力試験、赤外吸収スペクトル測定、旋光度測定、タップ密度測定、窒素定量、注射剤の不溶性異物検査、注射剤の不溶性微粒子試験、注射剤用ガラス容器試験、定性反応による試験、滴定終点検出、鉄試験、点眼剤の不溶性微粒子試験、導電率測定、熱分析法による試験、粘度測定、薄層クロマトグラフ法による試験、発熱性物質試験、pH 測定、比重測定、微生物限度試験、ヒ素試験、ビタミン A 定量、比表面積測定、沸点測定、プラスチック製医薬品容器試験、粉体の粒子密度測定、粉体粒度測定、粉末 X 線回折測定、崩壊試験、密度測定、無菌試験、メタノール試験、メトキシル基の定量、有機体炭素試験、融点測定、輸液用ゴム栓試験、溶出試験、硫酸塩試験、硫酸呈色物試験及びびろ紙クロマトグラフ法による試験は、それぞれの試験法により行う。ただし、油脂の融点、脂肪酸凝固点、比重、酸価、けん化価、エステル価、水酸基価、不けん化物及びヨウ素価の試験は、油脂試験法中のそれぞれの項に、生薬の異物、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量、精油含量及び鏡検の試験は、生薬試験法中のそれぞれの項に従う。

第一部一般試験法の部 7. エンドトキシン試験法の条ゲル化法の項 (2) の目を次のように改める。

### 7. エンドトキシン試験法

#### ゲル化法

##### (2) 限度試験法

本法は、試料溶液に規格値を超えるエンドトキシンが含まれるか否かを、ライセート試薬の表示感度を指標とし、ゲル化反応により判定する方法である。

##### (i) 操作法

表 7-2 に従い、A、B、C 及び D 液を調製し、これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の試料溶液は、(1) 予備試験 (ii) 反応干渉因子試験に適合する溶液を用いる。

表 7-2

液	エンドトキシン添加濃度/被添加液	試験の回数
A	0/試料溶液	2
B	2 λ/試料溶液	2
C	2 λ/エンドトキシン試験用水	2
D	0/エンドトキシン試験用水	2

##### (ii) 判定

B 及び C 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性で、D 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、試験は有効とする。

A 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン規格に適合とし、いずれも陽性のとき、不適とする。

A 液の 2 回の試験結果において、1 回が陰性で他の 1 回が陽性のとき、この 2 回の試験を繰り返し行う。その 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき、被検試料はエンドトキシン規格に適合とする。両方若しくは一方が陽性の場合には不適とする。

ただし、陽性の結果が得られたいずれの場合でも、試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合、最大有効希釈倍数あるいはそれを越えない希釈倍数で試験をやり直すことができる。

第一部一般試験法の部 8. 核磁気共鳴スペクトル測定法 (1H) の条を次のように改める。

### 8. 核磁気共鳴スペクトル測定法

核磁気共鳴 (以下「NMR」という。) スペクトル測定法は、静磁場に置かれた物質の構成原子核がその核に特有の周波数のラジオ波に共鳴して低エネルギーの核スピン状態から高エネルギーの核スピン状態に遷移することに伴ってラジオ波を吸収する現象を利用したスペクトル測定法であり、測定対象とする核は主に  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{31}\text{P}$  などである。

原子核の核スピン  $I$  は、 $0$ 、 $\frac{1}{2}$ 、 $1$ 、 $\frac{3}{2}$ 、 $\dots$ 、 $\frac{n}{2}$  (ただし、 $n$  は整数) などの値 ( $^1\text{H}$  及び  $^{13}\text{C}$  では  $I = \frac{1}{2}$ ) をとる。核を磁場の中に置くと、核モーメントは磁気量子数  $m_I$  に従って  $2I + 1$  ( $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  などでは 2) 個の方向に配向する。配向したエネルギー準位間に遷移を起こさせるには次式の周波数  $\nu$  のラジオ波を与える必要がある。すなわち、磁気回転比  $\gamma$  の核を外部磁場  $H_0$  の中に置いたとき

$$\nu = \gamma \cdot \frac{H_0}{2\pi}$$

$\gamma$ : 磁気回転比

$H_0$ : 外部磁場

であるから、周波数  $\nu$  のラジオ波の照射によって共鳴条件が満たされ、その周波数のラジオ波の吸収 (NMR シグナル) が

観測される。どのような環境の核に対しても吸収の係数（遷移の確率）は一定であるので、得られた NMR シグナル強度は基本的に共鳴核の数に比例する。このような遷移によって高エネルギー準位に偏った核スピンは、一定時間後に再び熱平衡分布にもどる（緩和する）が、これに要する時間を緩和時間という。

分子を磁場の中に置くと分子内の電子が核を外部磁場から遮へいする。分子内での核の環境が異なるとその遮へいの度合も異なるので、それぞれの異なる環境の核の共鳴周波数も異なることになり、別々のシグナルとして観測される。このシグナルの位置は化学シフト  $\delta$  として表現される。共鳴周波数は磁場に比例して変化するので、磁場によらない量として、化学シフトを次式のとおり定義する。

$$\delta = \frac{\nu_s - \nu_R}{\nu_R} + \delta_R$$

$\nu_s$ : 試料核の共鳴周波数

$\nu_R$ : 基準核の共鳴周波数

$\delta_R$ : 基準核の化学シフト (0 でない場合)

化学シフトは、通例、基準物質（基準核）のシグナルの位置を 0 とした ppm 単位で表すが、基準物質のシグナル位置が 0 とできない場合は、その基準物質の予め定められている化学シフトを用いて補正する。

分子内の各核における磁場は、周囲の電子の寄与（核遮へい）だけでなく分子中の他の核磁石（核スピンをもっている核は、それ自身が一つの磁石である）の影響下にもあるので、核磁石間の化学結合によるカップリングによってシグナルは分裂する。この分裂の間隔をスピン-スピン結合定数  $J$  という。 $J$  はヘルツ (Hz) 単位で表す。 $J$  は外部磁場の大きさに依存せず、分裂のパターンは相互作用する核の数が増すにつれ複雑になる。

NMR スペクトルからは基本的には化学シフト、スピン-スピン結合定数、シグナル面積強度 (H 核では数に比例するが、 $^{13}\text{C}$  核などでは核オーバーハウザー効果 (NOE) 及び緩和などの影響を受ける)、緩和時間の 4 つのパラメータが得られ、これらを利用して物質の構造解析、確認又は定量を行うことができる。

構造解析のために、デカップリング、NOE、二次元 NMR などの種々の手法を用いることができる。

#### 装置

NMR スペクトルの測定は次のいずれかの装置による。

##### (1) パルスフーリエ変換 NMR (FT-NMR) スペクトル測定装置

強力なラジオ周波数パルスで観測核を全周波数領域にわたって同時に励起する。パルスを切った後の FID (free induction decay, 自由誘導減衰) を観測し、強度の時間関数である FID をフーリエ変換により周波数関数に変換してスペクトルを得る (図 8-1)。FT-NMR では、観測周波数に応じたデータポイント数、パルス角、取り込み時間、遅延時間及び積算回数などを適切に設定する。

最近では、(2) に示す連続波 NMR スペクトル測定装置よりも、高感度及び高度な測定が可能である FT-NMR が通常使用される。

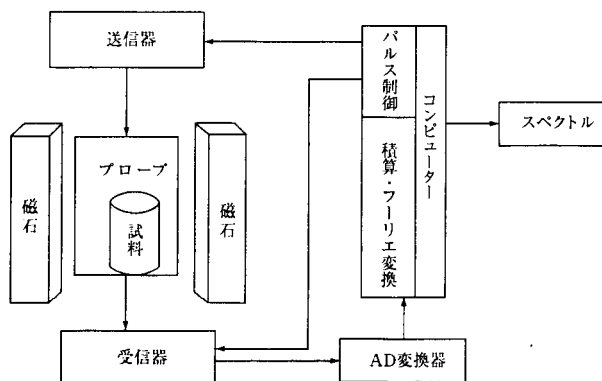


図 8-1 FT-NMR 装置

##### (2) 連続波 NMR (CW-NMR) スペクトル測定装置

CW 法は、磁場又はラジオ周波数を連続的に変化させて、観測核の化学シフトの範囲を掃引する (図 8-2)。

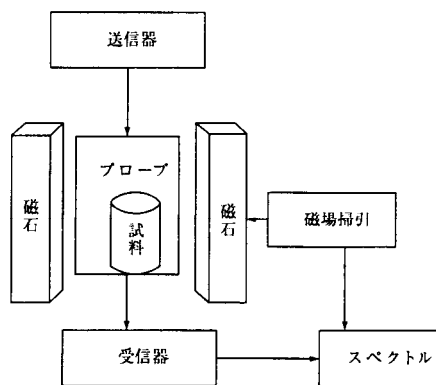


図 8-2 CW-NMR 装置

#### 操作法

装置の感度及び分解能をエチルベンゼン、1,2-ジクロロベンゼン又はアセトアルデヒドの NMR 測定用重水素化溶媒溶液などを用いて至適条件に調整した後、通例、次の方法でスペクトルを測定する。

(1) 試料を溶媒に溶かし、少量の基準物質を加え、その溶液を NMR 試験管に注入する内部基準法、又は基準物質の溶液を封入した細管を試料溶液とともに NMR 試験管に入れる外部基準法のいずれかの方法で用意した試験管を NMR プローブに設置して測定する。試料溶液は完全に均一な溶液であることが望ましい。特に、固形の異物の混入があると良いスペクトルが得られない。測定溶媒としては、通例 NMR 測定用重水素化溶媒を用いる。溶媒の選択に当たっては、(i) 試料のシグナルと重なるシグナルを示さないこと、(ii) 試料をよく溶かすこと、(iii) 試料と反応しないことなどを考慮する必要がある。更に、溶媒の種類、溶液の濃度、重水素イオン濃度などにより化学シフトが変化することがあり、また、試料溶液の粘度が高い場合には分解能が低下するので注意する。

(2) 基準物質としては、NMR 測定用試薬を用いる。通例、 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  いずれも測定溶媒として有機溶媒を用いた場合はテトラメチルシラン (TMS) を、重水を用いた場合は 3-

トリメチルシリルプロパンスルホン酸ナトリウム (DSS) 又は 3-トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム-d<sub>4</sub> (TSP) を用いる。その他の核では、<sup>15</sup>N はニトロメタン、<sup>19</sup>F はトリクロロフルオロメタン、<sup>31</sup>P はリン酸などを用いる。また、基準物質を入れずに、重水素化溶媒中の残留プロトンや測定溶媒の <sup>13</sup>C の化学シフトを用いることもできる。

#### 装置及び測定条件の記載

測定条件の違いによりスペクトルは異なるので、スペクトルの比較などを適切に行うために、測定に用いた装置名、装置の周波数、測定溶媒、測定温度、試料濃度、基準物質、測定手法などの測定条件を記載する。

#### 確認方法

医薬品各条に規定する方法により試料溶液を調製し、操作法の項に規定する方法により試験を行う。通例、<sup>1</sup>H NMR の場合、次に示す方法により確認を行う。

##### (1) 化学シフト、多重度及び面積強度比による確認

確認しようとする物質の化学シフト、多重度、各シグナルの面積強度比が医薬品各条で定められている場合、規定されたすべてのシグナルの化学シフト、多重度及び各シグナルの面積強度比が適合するとき、試料と確認しようとする物質の同一性が確認される。

##### (2) 標準品による確認

同一測定条件での試料スペクトルと標準品スペクトルを比較し、両者のスペクトルが同一化学シフトのところに同様の多重度のシグナルを与え、同様の各シグナルの面積強度比を与えるとき、試料と標準品の同一性が確認される。

#### <sup>1</sup>H NMR 及び <sup>13</sup>C NMR の各種測定法

NMR 測定法には一次元 NMR 及び二次元 NMR 更には三次元以上の多次元 NMR があり、種々の目的に応じて使われている。

一次元 <sup>1</sup>H NMR では、カップリングの相関を帰属できるスピンドカップリング及び空間的に近接する <sup>1</sup>H 間の相関が観測され、立体配置や立体配座を解析できる NOE がある。

一次元 <sup>13</sup>C NMR では、スペクトルを単純化するとともに、NOE による感度向上を得ることができる広帯域デカップリング、観測核に直接結合している磁気モーメントの大きい <sup>1</sup>H からの分極移動を利用して感度を向上させる INEPT (分極移動による低感度核の感度増大法) 及び DEPT (分極移動による無歪感度増大法) が通常用いられ、1 級、2 級、3 級及び 4 級炭素の決定に利用できる。

二次元 NMR では、スピン結合又は NOE により相関している核間の相関ピークを一度の測定ですべて観測することが可能であり、同核種間、異核種間で多くの測定法がある。代表的な測定法を以下に示す。

COSY (相関分光法)、HOHAHA (Hartmann-Hahn 効果分光法) 又は TOCSY (全相関分光法) : スピン結合している <sup>1</sup>H 間の相関が得られ、分子内の水素の化学結合関係がわかる。

NOESY (二次元 NOE 及び化学交換分光法) : NOE 効果を二次元で測定し、空間的に近い距離にある水素原子間のおおよその距離が得られ、立体構造の知見を得ることができる。

INADEQUATE (天然存在比での二量子遷移分光法) : 天然存在比での <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C のスピン結合による二量子遷移によるので、感度が非常に悪いが、隣接した <sup>13</sup>C 核間の相関が得られ、炭素骨格を直接解析できる。

HMQC (異核種間多量子コヒーレンス分光法) : 直接スピン結合した <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C 間の相関を <sup>1</sup>H 検出で高感度に観測する測定法であり、分子内の水素と炭素の直接の化学結合がわかる。

HMBC (異核種間遠隔相関分光法) : 遠隔スピン結合している <sup>1</sup>H と <sup>13</sup>C 間の相関を <sup>1</sup>H 検出で高感度に観測でき、水素と炭素の化学結合関係がわかる。

その他に、J 分解二次元スペクトル、DQF-COSY (二量子フィルター相関分光法)、HSQC (異核種間一量子コヒーレンス分光法) 等数多くの手法があり、更に、高分子化合物では多次元 NMR も利用される。

第一部一般試験法の部 16. 強熱残分試験法の条操作法の項を次のように改める。

## 16. 強熱残分試験法

### 操作法

あらかじめ、適切なるつぼ (シリカ製、白金製、石英製又は磁製) を 600±50℃ で 30 分間強熱し、デシケーター (シリカゲル又は他の適切な乾燥剤) 中で放冷後、その質量を精密に量る。

医薬品各条に規定する量の試料を採取してこのつぼに入れ、その質量を精密に量る。ただし、採取量が容量で示されているときは医薬品各条に規定する量を正確に量り、前記のつぼに入れる。蒸発後と規定されているものは、そのまま適度に加熱して、液を蒸発させる。

次に、試料に硫酸少量、通例、1 mL を加えて潤し、なるべく低温で徐々に加熱して、試料を完全に炭化させる。いったん放冷した後、再び硫酸少量、通例、1 mL で潤して、白煙が生じなくなるまで徐々に加熱し、更に 600±50℃ で強熱して、残留物を灰化する。操作中は、炎をあげて燃焼しないように注意する。つぼをデシケーター (シリカゲル又は他の適切な乾燥剤) 中で放冷し、その質量を精密に量り、残分の百分率を計算する。

上記の操作によって得た残分の百分率が各条中に規定された限度値を超える場合には、別に規定するもののほか、上記と同様の硫酸による湿潤、加熱並びに強熱の操作を残分が恒量に達するか、残分の百分率が各条中に規定された限度値に適合するまで続ける。

第一部一般試験法の部 47. 発熱性物質試験法の条を次のように改める。

## 47. 発熱性物質試験法

発熱性物質試験法は、発熱性物質の存在をウサギを用いて試験する方法である。

### 試験動物

体重 1.5 kg 以上の健康なウサギで、使用前 1 週間以上は一定飼料で飼育し、体重の減少を見なかったものを試験動物として使用する。ウサギは個別ケージに入れ、興奮させないよう刺激のない環境で飼育する。試験前 48 時間以上及び試験中は

室温を 20 ~ 27℃ の範囲内で一定に保つ。初めて試験に用いるウサギは、試験前 1 ~ 3 日間以内に注射を除く全操作を含む偽試験を行い、試験に馴化する。試験に用いたウサギを再使用する場合には、48 時間以上休養させる。ただし、発熱性物質陽性と判定された試料を投与されたウサギ、又は以前に被検試料と共通な抗原物質を含む試料を投与されたウサギは再使用しない。

#### 装置及び器具

(1) 温度計 測定精度 ±0.1℃ 以内の直腸体温計又は体温測定装置を用いる。

(2) 注射筒及び注射針 発熱性物質除去処理として、通例 250℃ で 30 分間以上乾熱処理したものを用いる。又は滅菌済みの注射針を含むプラスチック製の注射筒で、発熱性物質が検出されないこと及び発熱性物質試験に対する干渉作用のないことが確認されたものを用いることができる。

#### 操作法

(1) 試験用量 別に規定するもののほか、試験動物体重 1 kg につき試料 10 mL を投与する。

(2) 方法 試験は、飼育室と同じ室温に保った部屋で、刺激のない環境で行う。飼料は対照体温測定の数時間前から試験終了まで与えない。試験動物は、通例、自然な座姿勢のとれる緩やかな首枷固定器に固定する。体温は、直腸体温計又は測定装置の測温部分を直腸内に 60 ~ 90 mm の範囲内で一定の深さに挿入して測定する。試料注射の 40 分前から注射までの間に、30 分の間隔をとって 2 回測温し、それらの平均値を対照体温とする。これら 2 回の体温測定値の間に 0.2℃ を超える差がある動物、又は対照体温が 39.8℃ を超える動物は試験に用いない。

試料は 37±2℃ に加温し、試験動物の耳静脈に緩徐に注射する。ただし 1 匹への注射は 10 分以内に完了させる。低張な試料には、発熱性物質を含まない塩化ナトリウムを加えて等張としてもよい。注射後 3 時間まで、30 分以内の間隔で体温を測定する。対照体温と最高体温との差を体温上昇度とする。体温が対照体温より低下した場合、体温上昇度を 0℃ とする。

#### 判定

3 匹の試験動物を用いて試験を行い、3 匹の体温上昇度の合計により判定する。ただし、試験結果により試験動物を 3 匹単位で追加する。初めの 3 匹の体温上昇度の合計が 1.3℃ 以下のとき発熱性物質陰性、2.5℃ 以上のとき発熱性物質陽性とする。体温上昇度の合計が 1.3℃ と 2.5℃ の間にあるとき、3 匹による試験を追加する。計 6 匹の体温上昇度の合計が 3.0℃ 以下のとき発熱性物質陰性、4.2℃ 以上のとき発熱性物質陽性とする。6 匹の体温上昇度の合計が 3.0℃ と 4.2℃ の間にあるとき、更に 3 匹による試験を追加する。計 9 匹の体温上昇度の合計が 5.0℃ 未満のとき発熱性物質陰性、5.0℃ 以上のとき発熱性物質陽性とする。

発熱性物質陰性のとき、被検試料は発熱性物質試験に適合する。

第一部一般試験法の部 53. 比表面積測定法の条第 1 法流動法の項の前までを次のように改める。

### 53. 比表面積測定法

比表面積測定法は、気体吸着法により粉末医薬品の比表面積（単位質量当たりの粉体の全表面積）を算出する方法である。なお、気体吸着法は、粉末試料に吸着する気体量を吸着気体の圧力の関数として測定する方法であり、通例、測定は液体窒素の沸点（-196℃）において行う。

粉末試料に、気体を物理吸着させたとき、吸着した気体量  $V_a$  と吸着平衡にある吸着気体の圧力  $P$  との間には、 $P/P_0$  の値が 0.05 ~ 0.30 の範囲内で、次式の関係がある。

$$\frac{1}{V_a \left( \frac{P_a}{P} - 1 \right)} = \frac{(C - 1)}{V_m C} \times \frac{P}{P_0} + \frac{1}{V_m C}$$

$P$ : 吸着平衡圧 (kPa)

$P_0$ : 測定温度における吸着気体の蒸気圧 (kPa)

$V_a$ : 吸着平衡時の吸着量 (mL)

$V_m$ : 単分子層吸着量 (mL)

$C$ : 吸着熱、凝縮熱などによる定数

粉末試料の比表面積  $S$  は、吸着気体の単分子層吸着量  $V_m$  から求められる。

$$S = \frac{V_m \times N \times a}{m \times 22400}$$

$S$ : 比表面積 (m<sup>2</sup>/g)

$N$ : アボガドロ数 6.022 × 10<sup>23</sup>/mol

$a$ : 吸着気体分子 1 個の有効断面積 (m<sup>2</sup>)

$N_2$ : 0.162 × 10<sup>18</sup>

$Kr$ : 0.195 × 10<sup>18</sup>

$m$ : 粉末試料の質量 (g)

比表面積の単位は、通例、m<sup>2</sup>/g の単位を用いて示す。

気体吸着は、次に記載する方法のいずれかにより測定する。

第一部一般試験法の部 59. 無菌試験法の条を次のように改める。

### 59. 無菌試験法

本試験法は、培養法によって増殖しうる微生物（細菌又は真菌）の有無を試験する方法であり、別に規定するもののほか、I. メンブランフィルター法若しくは II. 直接法により試験を行う。

この試験に使用する水、試薬・試液及び器具、器材など必要なものはすべて滅菌したものを用い、試験環境は無菌試験の実施に適していなければならない。操作は、無菌状態で厳密な無菌的注意のもとで行う。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ないものとする。試験に際しては、作業領域の適切なサンプリ

ング及び適切な制御によって、試験実施状態が問題ないことを確認する。

#### 培地、洗浄液及びその調製法

培地は、別に規定する場合を除き、通例、液状チオグリコール酸培地及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いる。試料の混濁又は粘性のために、液状チオグリコール酸培地が使用しにくいときは、変法チオグリコール酸培地を用いてもよい。ただし、変法チオグリコール酸培地を用いるときは、使用直前に水浴上で加熱し、嫌気条件下で培養する。また、これらの成分を有する適当な品質の培地を用いてもよい。

##### (1) 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	5.0 g
又はブドウ糖一水和物	5.5 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
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、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溶解し、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。必要ならば温かいうちにろ紙を用いてろ過する。レザズリン溶液を加え、よく混和した後、培養終了時に培地の淡赤色部分が上部  $\frac{1}{2}$  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、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。培地の上部  $\frac{1}{3}$  以上が淡赤色となったならば、その淡赤色が消失するまで培地容器を水浴中又は流通蒸気中で加熱し、容器中への汚染空気の入りを防ぐような注意をしながら急速に冷却することで 1 回だけ使用できる。

##### (2) 変法チオグリコール酸培地

L-シスチン	0.5 g
塩化ナトリウム	2.5 g
ブドウ糖	5.0 g
又はブドウ糖一水和物	5.5 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
又はチオグリコール酸	0.3 mL
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.1±0.2)

調製法は、液状チオグリコール酸培地に準ずる。

##### (3) 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	2.3 g
又はブドウ糖一水和物	2.5 g
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.3±0.2)

全成分を加え、加温して溶かした後、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。必要ならばろ紙を用いてろ過し、適当な試験容器に所定量ずつ分注し、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。

##### (4) 洗浄液

肉製又はカゼイン製ペプトン	1.0 g
水	1000 mL

(滅菌後の pH 7.1±0.2)

水に肉製又はカゼイン製ペプトンを溶かし、滅菌後の pH が 7.1±0.2 になるように調整する。必要ならばろ紙を用いてろ過し、適当な容器に必要量ずつを分注し、バリデートされた方法で滅菌した後、2～25℃で保存する。

抗生物質医薬品又は抗菌剤を含む医薬品に対して用いる洗浄液には、必要に応じてバリデーション試験で適正であることが確認されている適当な中和剤又は不活化剤を加えてもよい。油性成分を含む医薬品や軟膏及びクリームに対して用いる洗浄液には、バリデーション試験で適正であることが確認されている適当な乳化剤を適正な濃度 (例えば、10 g/L のポリソルベート 80) になるように加えてもよい。

#### 培地の適合性

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

##### (1) 培地の無菌性

培地の一部を、液状チオグリコール酸培地及び変法チオグリコール酸培地は 30～35℃で、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は 20～25℃で 14 日間培養したとき、微生物の増殖を認めてはならない。

##### (2) 培地の性能試験

培地は調製バッチごとに、また、市販液体培地にあつては、製造ロット (バッチ) ごとにその性能を試験する<sup>\*)</sup>。表 59-1 に示す各細菌又は真菌、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を菌種ごとに培地 1 容器当たり、100 個以下を接種し、規定の培養温度で培養したとき、細菌は 3 日間以内に、真菌は 5 日間以内に各菌が明らかな発育を示さなければならない。

<sup>\*)</sup> ただし、市販の粉末培地にあつては同一ロットの場合、培地の調製法がじゅうぶん管理されているなら、調製バッチごとに培地性能試験を実施しなくてもよい。

表 59-1 培地性能試験及びバリデーション試験用菌株

培地	試験菌株	培養
液状チオグリコール酸培地	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538, NBRC 13276, CIP 483, NCTC 10788, NCIMB 9518) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027, NBRC 13275, NCIMB 8626, CIP 82.118) <i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, 又は ATCC 11437, NBRC 14293)	好気培養
変法チオグリコール酸培地	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532, 又は ATCC 11437, NBRC 14293)	嫌気培養
ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633, NBRC 3134, CIP 52.62, NCIMB 8054) <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)	好気培養

これらの微生物は、マスターシードロットから継代数が5代を越えないように保存管理する。

#### 培地の有効期間

非密封容器に入っている培地は、使用前2週間以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1箇月間使用できる。密封容器に入っている培地は、使用前3箇月以内に培地の性能試験を行い、基準を満たしているならば、製造後1年間使用できる。

#### バリデーション試験

バリデーション試験は、無菌試験を実施する前に又は無菌試験と並行して、以下の場合に実施する。

- 新たな製品について無菌試験を行う場合
- 試験の実施条件に変更があった場合

以下に述べる変更を別として「製品の無菌試験」の項で述べられている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：Iの操作により試料溶液をろ過、洗浄する。最後の洗浄液には表59-1に示す菌株若しくはこれらと同等と考えられる菌株を菌種ごとに100個以下加え、これをろ過し、試料フィルターとする。

直接法：II-2に定めた試料量を加えた試料培地に表59-1に示す菌株若しくはこれらと同等と考えられる菌株を菌種ごとに100個以下を加える。

いずれの場合においても、陽性対照としては試料溶液を加えない培地性能試験培地を置き、規定の温度で最長5日間培養する。培養後に、試料接種容器と陽性対照容器に肉眼的に同等な微生物の増殖が得られれば、この製品は試験条件下において抗菌性を有しないか、又は抗菌活性がじゅうぶんに除去されているものと見なす。この場合、無菌試験はこれ以上の変更を行うことなく実施できる。もし、接種したいずれかの菌の発育がみられない場合、対照に比べて発育菌量が少ない場合、又は発育が遅延した場合、試料には微生物発育阻止活性があるものと判断する。この場合には、抗菌性を除去するために、条件を変更し、バリデーション試験を繰り返す。一般に、メンブランフィルター法においては、メンブランフィルターの材質を吸着しにくいものに変更するか、洗浄液を増量するか、又は洗浄液に適当な不活化剤を加えるなど適当な方法で微生物発育阻止活性の発現を抑制する。メンブランフィルター1枚当たり、適当

な界面活性剤を適量添加した洗浄液、各100mLで5回洗浄しても微生物発育阻止活性を抑制できない場合は、洗浄を追加することなく無菌試験を実施する。直接法においては、菌の発育に影響を及ぼさない適当な不活化剤を加えるか、微生物発育阻止活性がみられなくなるまでII-2の規定にかかわらず培地量を増やす。

#### 製品の無菌試験

##### 供試個数

無菌試験に供する医薬品の個数は、表59-2に基づいて当該ロットからロット全体を代表するように採取する。

表 59-2 ロット当たりの抜き取り個数

ロット当たりの製造容器数	最少抜き取り個数*
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容器のうち少ない方
501個以上の大容量製品 (表示量が100mL以上)	2%又は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、注射剤に準じた抜き取り個数とする	
固形バルク製品 <sup>22)</sup>	
4容器まで	各バルク容器
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
抗生物質のバルク包装製品 (5g以上) <sup>23)</sup>	6容器
抗生物質のバルク包装製品 (5g未満)	20容器

\*1容器当たりの内容量が両培地に接種するにじゅうぶんであるなら、ここに示した容器数とする。

#### 試験法

試験は、メンブランフィルター法又は直接法を用いて行う。試験には、適当な陰性対照を置く。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、本試験条件下で抗菌力を有さ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は、メンブランフィルター法を適用する。

##### I. メンブランフィルター法

本法は、メンブランフィルターを用いて試料をろ過し、洗浄後、そのメンブランフィルターを培地に入れるか、又はろ過器に培地を入れて培養する方法である。メンブランフィルターは、孔径0.45µm以下の適当な材質のものを用いる。ろ過器は、高圧蒸気法又はその他の方法で滅菌が可能であり、メンブランフィルターを装着したとき、漏れや逆流のないものを用いる。以下の方法は、直径約50mmのメンブランフィルターを使用することを仮定している。異なった直径のメンブランフィルターを使用するのであれば、希釈及び洗浄の液量はそれに応じて調整する。

##### I-1. 試料溶液の調製

- 液状医薬品：そのまま試料溶液とする。
- 用時溶解又は懸濁して用いる医薬品：添付の溶剤、生理食塩液、水又は洗浄液で用時の濃度に調製した後、試

<sup>22)</sup> 固形バルク製品とは、複数の注射剤の調製が可能な無菌末製品を指す。

<sup>23)</sup> 抗生物質のバルク包装製品とは、複数の注射剤の調製が可能な抗生物質を指し、清浄空気下で溶解後は、一度に輸液器材等に分注しなければならない。

料溶液とする。

- c) 油及び油性医薬品：粘度の低い油又は油性医薬品は、希釈せずに乾いたメンブランフィルターでろ過する。粘稠性の油及び油性医薬品は、ろ過滅菌によって無菌に製したミリスチン酸イソプロピル又は菌の発育に影響を及ぼさない他の溶剤を加え、ろ過可能な濃度に溶かして試料溶液を調製する。
- d) 軟膏剤：脂肪を基剤とする軟膏剤及び油中水滴型の乳剤は、ろ過滅菌によって無菌に製したミリスチン酸イソプロピル又は菌の発育に影響を及ぼさない他の溶剤を加え、必要ならば 40℃ を超えない加温によってろ過可能な濃度に溶かして試料溶液を調製する。例外的な場合でも加温温度は 44℃ を限度とする。

#### I-2. 試験に供する試料量

培地当たり容器から採取する試料の最少量は、別に規定するもののほか、表 59-3 による。1 容器中の表示容量がこれらの試験を行うのにじゅうぶんでない場合には、表 59-2 に示す容器数の 2 倍又はそれ以上を抜き取り、別々の培地に接種する。メンブランフィルター法を用いる場合には、表 59-3 に示す量より少なくならないように、可能ならば容器の全容量を接種する。必要ならば、約 100 mL の洗浄液で希釈してから試験に用いる。

表 59-3 各培地当たりの最少試料採取量

製品の表示量	最少採取量 (培地当たり)
液剤 (抗生物質を除く)	
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 (液剤)	1 mL
水溶性又はミリスチン酸イソプロピルで可溶性の他の医薬品	全量、ただし 200 mg 以上
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

#### I-3. 操作

通例、1 個又は 2 個一組のろ過器で試料溶液のろ過を完了させる。なお、試料溶液がろ過しにくいときは、洗浄液を用いて試料溶液を更に希釈した後、ろ過してもよい。試料溶液をろ過器内に注入してろ過した後、メンブランフィルター 1 枚当たり洗浄液 100 mL ずつでバリデーション試験で確立した回数洗う。ただし、試料が微生物発育阻止活性を有しない場合は、洗浄操作を省くことができる。メンブランフィルターの培養には、下記の 2 法のうちいずれかを用いる。なお、各培地の量は、バリデーション試験で確立した量を使用する。

- (1) 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 2 等分し、それぞれにつき同一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。
- (2) 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 2 等分してろ過後、それぞれの培地を加える。

#### II. 直接法

本法は、試料の全部又は一部を直接培地に加えて培養する方法であり、通例、メンブランフィルター法を適用できない医薬品及びメンブランフィルター法より本法の適用が合理的である医薬品に適用する。水銀保存剤を含む医薬品でメンブランフィルター法を適用できない場合は、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。

##### II-1. 試料溶液の調製

通例、メンブランフィルター法を準用する。ただし、通常の方法で溶解できない医薬品は、適当な方法で懸濁又は微細化したものを試料とする。

- 油性液：バリデーション試験で適正であることが確認されている適当な乳化剤を適正な濃度 (例えば、10 g/L のポリソルベート 80) になるように加えた培地を使用する。
- 軟膏剤及びクリーム：1 g/L の肉製又はカゼイン製ペプトン溶液のような無菌希釈液に、選定された適当な乳化剤を加え、約 1:10 に希釈し、この希釈した試料を、乳化剤を含まない培地へ移植する。

##### II-2. 試験に供する試料量

ピペット、注射器又は適当な器具を用い、別に規定するもののほか、表 59-3 に示す量を培地に直接移す。この際、別に規定するもののほか、接種量は培地量の 10% を超えてはならない。油性医薬品を含む培地は、観察日ごとに静かに振り混ぜる。しかし、チオグリコール酸培地を嫌気性菌の検出に使用する場合は、嫌気性条件を維持するために、振り混ぜは最小限のものとする。

#### 培養及び観察

液状チオグリコール酸培地及び変法チオグリコール酸培地は 30 ~ 35℃ で、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は 20 ~ 25℃ で 14 日間以上培養し、培養期間中に数回、及び培養最終日に菌の発育の有無を観察する。試料によって培地が混濁し、判定が困難な場合、そのほか必要な場合には、培養 14 日目に新しい培地に適量を移植し、同じ温度で元の培地とともに 4 日間以上培養する。

#### 判定

以上の試験の結果、菌の発育を認めないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。ただし、試験に供した検体とは関係なく無菌試験自体に問題があったことが立証された場合には、再試験を行うことができる。再試験の結果、菌の発育が認められないときは、無菌試験に適合とする。菌の発育が認められたときは、不適と判定する。