

は、必要な長さのカラムを収容できる容積があり、カラム温度を一定の温度に保つための温度制御機構を持つものである。検出器は、カラムで分離された成分を検出するもので、アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度検出器、質量分析計、水素炎イオン化検出器、電子捕獲検出器、熱伝導度検出器などがある。記録装置は検出器により得られる信号の強さを記録するものである。

#### 操作法

別に規定するもののほか、次の方法による。装置をあらかじめ調整した後、医薬品各条に規定する操作条件の検出器、カラム及びキャリアーガスを用い、キャリアーガスを一定流量で流し、カラムを規定の温度で平衡にした後、医薬品各条に規定する量の試料溶液又は標準溶液を試料導入装置を用いて系内に注入する。分離された成分を検出器により検出し、記録装置を用いてクロマトグラムとして記録させる。

#### 確認及び純度の試験

確認は、試料の被検成分と標準被検成分の保持時間が一致すること又は試料に標準被検成分を添加しても、試料の被検成分のピークの形状が崩れないことにより試験を行う。

純度は、通例、試料中の混在物の限度に対応する濃度の標準溶液を用いる方法又は面積百分率法により試験を行う。別に規定するもののほか、試料の異性体比は面積百分率法により求める。

面積百分率法は、クロマトグラム上に得られた各成分のピーク面積の総和を100とし、それに対するそれぞれの成分のピーク面積の比から組成比を求める。ただし、正確な組成比を得るためには、

は、必要な長さのカラムを収容できる容積があり、カラム温度を一定の温度に保つための温度制御機構を持つものである。検出器は、カラムで分離された成分を検出するもので、アルカリ熱イオン化検出器、炎光光度検出器、質量分析計、水素炎イオン化検出器、電子捕獲検出器、熱伝導度検出器などがある。記録装置は検出器により得られる信号の強さを記録するものである。

#### 操作法

別に規定するもののほか、次の方法による。装置をあらかじめ調整した後、医薬品各条に規定する操作条件の検出器、カラム及びキャリアーガスを用い、キャリアーガスを一定流量で流し、カラムを規定の温度で平衡にした後、医薬品各条に規定する量の試料溶液又は標準溶液を試料導入装置を用いて系内に注入する。分離された成分を検出器により検出し、記録装置を用いてクロマトグラムとして記録させる。

#### 確認及び純度の試験

確認は、試料の被検成分と標準被検成分の保持時間が一致すること又は試料に標準被検成分を添加しても、試料の被検成分のピークの形状が崩れないことにより試験を行う。

純度は、通例、試料中の混在物の限度に対応する濃度の標準溶液を用いる方法又は面積百分率法により試験を行う。別に規定するもののほか、試料の異性体比は面積百分率法により求める。

面積百分率法は、クロマトグラム上に得られた各成分のピーク面積の総和を100とし、それに対するそれぞれの成分のピーク面積の比から組成比を求める。ただし、正確な組成比を得るためには、

混在物の主成分に対する感度係数によるピーク面積の補正を行う。

#### 定 量

通例、内標準法によるが、適当な内標準物質が得られない場合は絶対検量線法による。定量結果に対して被検成分以外の成分の影響が無視できない場合は標準添加法による。

##### (1) 内標準法

内標準法においては、一般に、被検成分になるべく近い保持時間を持ち、いずれのピークとも完全に分離する安定な物質を内標準物質として選ぶ。医薬品各条に規定する内標準物質の一定量に対して標準被検試料を段階的に加えて数種の標準溶液を調製する。この一定量ずつを注入して得られたクロマトグラムから、内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する標準被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求める。この比を縦軸に、標準被検成分量、又は内標準物質量に対する標準被検成分量の比を横軸にとり、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法で同量の内標準物質を加えた試料溶液を調製し、検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、その内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求め、検量線を用いて被検成分量を求める。

医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件でガ

混在物の主成分に対する感度比に基づくピーク面積の補正を行う。

#### 定 量

通例、内標準法によるが、適当な内標準物質が得られない場合は絶対検量線法による。定量結果に対して被検成分以外の成分の影響が無視できない場合は標準添加法による。

##### (1) 内標準法

内標準法においては、一般に、被検成分になるべく近い保持時間を持ち、いずれのピークとも完全に分離する安定な物質を内標準物質として選ぶ。医薬品各条に規定する内標準物質の一定量に対して標準被検試料を段階的に加えて数種の標準溶液を調製する。この一定量ずつを注入して得られたクロマトグラムから、内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する標準被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求める。この比を縦軸に、標準被検成分量、又は内標準物質量に対する標準被検成分量の比を横軸にとり、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法で同量の内標準物質を加えた試料溶液を調製し、検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、その内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求め、検量線を用いて被検成分量を求める。

医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件でガ

スクロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。

(2) 絶対検量線法

標準被検試料を段階的にとり、標準溶液を調製し、この一定量ずつを正確に再現性よく注入する。得られたクロマトグラムから縦軸に標準被検成分のピーク面積又はピーク高さ、横軸に標準被検成分量をとって、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法で試料溶液を調製する。次に検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク面積又はピーク高さを測定し、検量線を用いて被検成分量を求める。

医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件でガスクロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。この方法は全測定操作を厳密に一定の条件に保って行う。

スクロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。通例、標準溶液などの規定量を繰り返し注入し、得られたそれぞれのクロマトグラムから内標準物質のピーク面積又はピーク高さに対する標準被検成分のピーク面積又はピーク高さの比を求め、その相対標準偏差(変動係数)を求めて再現性を確かめる。

(2) 絶対検量線法

標準被検試料を段階的にとり、標準溶液を調製し、この一定量ずつを正確に再現性よく注入する。得られたクロマトグラムから縦軸に標準被検成分のピーク面積又はピーク高さ、横軸に標準被検成分量をとって、検量線を作成する。この検量線は、通例、原点を通る直線となる。次に医薬品各条に規定する方法で試料溶液を調製する。次に検量線を作成したときと同一条件でクロマトグラムを記録させ、被検成分のピーク面積又はピーク高さを測定し、検量線を用いて被検成分量を求める。

医薬品各条では、通例、上記の検量線が直線となる濃度範囲に入る一つの標準溶液及びこれに近い濃度の試料溶液を調製し、医薬品各条で規定するそれぞれの量につき、同一条件でガスクロマトグラフィーを行い被検成分量を求める。この方法は全測定操作を厳密に一定の条件に保って行う。通例、標準溶液などの規定量を繰り返し注入し、得られたそれぞれのクロマトグラムから標準被検成分のピーク面積又はピーク高さを求め、その相対標準偏差(変動係数)を求めて再現性を確かめる。

(3) 標準添加法

試料の溶液から 4 個以上の一定量の液を正確にとる。このうちの 1 個を除き、採取した液に被検成分の標準溶液を被検成分の濃度が段階的に異なるように正確に加える。これらの液及び先に除いた 1 個の液をそれぞれ正確に一定量に希釈し、それぞれ試料溶液とする。この液の一定量ずつを正確に再現性よく注入して得られたクロマトグラムから、それぞれのピーク面積又はピーク高さを求める。それぞれの試料溶液に加えられた被検成分の濃度を算出し、横軸に標準溶液の添加による被検成分の増加量、縦軸にピーク面積又はピーク高さをとり、グラフにそれぞれの値をプロットし、関係線を作成する。関係線の横軸との交点と原点との距離から被検成分量を求める。なお、本法は、絶対検量線法で被検成分の検量線を作成するとき、検量線が、原点を通る直線であるときに適用できる。また、全測定操作を厳密に一定の条件に保って行う。

ピーク測定法

通例、次の方法を用いる。

(1) ピーク高さ測定法

(i) ピーク高さ法

ピークの頂点から記録紙の横軸へ下ろした垂線とピークの両すそを結ぶ接線（基線）との交点から頂点までの長さを測定する。

(ii) 自動ピーク高さ法

検出器からの信号をデータ処理装

(3) 標準添加法

試料の溶液から 4 個以上の一定量の液を正確にとる。このうちの 1 個を除き、採取した液に被検成分の標準溶液を被検成分の濃度が段階的に異なるように正確に加える。これらの液及び先に除いた 1 個の液をそれぞれ正確に一定量に希釈し、それぞれ試料溶液とする。この液の一定量ずつを正確に再現性よく注入して得られたクロマトグラムから、それぞれのピーク面積を求める。それぞれの試料溶液に加えられた被検成分の濃度を算出し、横軸に標準溶液の添加による被検成分の増加量、縦軸にピーク面積をとり、グラフにそれぞれの値をプロットし、関係線を作成する。関係線の横軸との交点と原点との距離から被検成分量を求める。通例、標準溶液などの規定量を繰り返し注入し、得られたそれぞれのクロマトグラムから標準被検成分のピーク面積を求め、その相対標準偏差（変動係数）を求めて再現性を確かめる。なお、本法は、絶対検量線法で被検成分の検量線を作成するとき、検量線が、原点を通る直線であるときに適用できる。また、全測定操作を厳密に一定の条件に保って行う。

ピーク測定法

通例、次の方法を用いる。

(1) ピーク高さ測定法

(i) ピーク高さ法

ピークの頂点から記録紙の横軸へ下ろした垂線とピークの両すそを結ぶ接線（基線）との交点から頂点までの長さを測定する。

(ii) 自動ピーク高さ法

検出器からの信号をデータ処理装

置を用いてピーク高さとして測定する。

(2) ピーク面積測定法

(i) 半値幅法

ピーク高さの midpoint におけるピーク幅にピーク高さを乗じる。

(ii) 自動積分法

検出器からの信号をデータ処理装置を用いてピーク面積として測定する。

システム適合性

2.01 液体クロマトグラフィーのシステム適合性の規定を準用する。

試験条件の変更に関する留意事項

医薬品各条の試験条件のうち、カラムの内径及び長さ、充てん剤の粒径、固定相の濃度又は厚さ、カラム温度、昇温速度、キャリアーガスの種類及び流量、スプリット比は、システム適合性の規定に適合する範囲内で一部変更することができる。また、ヘッドスペース用試料導入装置及びその操作条件は、規定の方法以上の真度及び精度が得られる範囲内で変更することができる。

用語

2.01 液体クロマトグラフィーの用語の定義を準用する。

注意：標準被検試料、内標準物質、試験に用いる試薬及び試液は測定の影響となる物質を含まないものを用いる。

置を用いてピーク高さとして測定する。

(2) ピーク面積測定法

(i) 半値幅法

ピーク高さの midpoint におけるピーク幅にピーク高さを乗じる。

(ii) 自動積分法

検出器からの信号をデータ処理装置を用いてピーク面積として測定する。

用語

液体クロマトグラフィー ~~(2.01)~~ の用語の定義を準用する。

注意：標準被検試料、内標準物質、試験に用いる試薬及び試液は測定の影響となる物質を含まないものを用いる。

医薬品各条の操作条件のうち、カラムの内径及び長さ、充てん剤の粒径、固定相の濃度、カラム温度、キャリアーガスの流量は、規定された流出順序、分離度、シンメトリー係数及び相対標準偏差が得られる範囲内で一部変更することができる。また、ヘッドスペース用試料導入装置及びその操

	作条件は、規定の方法以上の真度及び精度が得られる範囲内で変更することができる。	
--	---	--

## 2.48 水分測定法（カールフィッシャー法）

新	旧	備考
<p><b>2.48 水分測定法</b> (カールフィッシャー法)</p> <p>1. 容量滴定法の試液及び標準液の調製法の(1)水分測定用試液の冒頭を次のように改める。</p> <p>1. 容量滴定法 <b>装置・試薬 略</b> 試液及び標準液の調製法 (1) 水分測定用試液 調製 (i), (ii) 又は (iii) のいずれかの方法により調製する。 <u>なお、安定化等の性能の向上を目的として添加剤を追加する場合は、規定の方法と同等の結果を与えることを検証した上で使用することができる。</u></p> <p>以下、略</p>	<p><b>2.48 水分測定法</b> (カールフィッシャー法)</p> <p>試液及び標準液の調製法 (1) 水分測定用試液 調製 (i), (ii) 又は (iii) のいずれかの方法により調製する。</p>	

## 2.49 旋光度測定法

新	旧	備考
<p><b>2.49 旋光度測定法</b></p> <p>旋光度測定法を次のように改める。</p> <p>旋光度測定法は、試料の旋光度を旋光計によって測定する方法である。 一般に光線の振動は、進行の方向に垂直に起こるが、通常の光線では、その振動方向は限定されない。しかし、一般に偏光といわれる平面偏光では、振動は進行方向を</p>	<p><b>2.49 旋光度測定法</b></p> <p>旋光度測定法は、試料の旋光度を旋光計によって測定する方法である。 一般に光線の振動は、進行の方向に垂直に起こるが、通常の光線では、その振動方向は限定されない。しかし、一般に偏光といわれる平面偏光では、振動は進行方向を</p>	

含む一平面内にのみ起こり、このような光線は、偏光面を有するという。薬品又はその溶液には、偏光面を右又は左に回転させる性質を持つものがある。この性質を光学活性又は旋光性といい、物質の化学構造に関係がある。

旋光度は、光学活性物質又はその溶液が偏光面を回転する角度で、旋光計によって測定する。この値は測定管の層長に比例し、溶液の濃度、温度及び波長に関係する。旋光の性質は、偏光の進行方向に向き合っており、偏光面を右に回転するものを右旋性、左に回転するものを左旋性とし、偏光面を回転する角度を示す数字の前に、それぞれ、記号+又は-をつけて示す。例えば、 $+20^\circ$  は右に  $20^\circ$ 、 $-20^\circ$  は左に  $20^\circ$  回転することを意味する。

旋光度  $\alpha'_x$  とは、特定の単色光 x (波長又は名称で記載する) を用い、温度  $t^\circ\text{C}$  で測定したときの旋光度を意味し、その測定は、通例、温度は  $20^\circ\text{C}$  又は  $25^\circ\text{C}$ 、層長は  $100\text{ mm}$ 、光線はナトリウムスペクトルの D 線で行う。

比旋光度  $[\alpha]'_x$  は、次の式で表す。

$$[\alpha]'_x = 100 \alpha / lc$$

t : 測定時の温度

x : 用いたスペクトルの特定の単色光の波長又は名称 (D 線を用いたときは、D と記載する。)

$\alpha$  : 偏光面を回転した角度

l : 試料溶液の層、すなわち、測定に用いた測定管の長さ (mm)

c : 日本薬局方では、溶液  $1\text{ mL}$  中に存在する薬品の g 数である。液状薬品を溶液としないでそのまま用いた

含む一平面内にのみ起こり、このような光線は、偏光面を有するという。薬品又はその溶液には、偏光面を右又は左に回転させる性質を持つものがある。この性質を光学活性又は旋光性といい、物質の化学構造に関係がある。

旋光度は、光学活性物質又はその溶液が偏光面を回転する角度で、旋光計によって測定する。この値は測定管の層長に比例し、溶液の濃度、温度及び波長に関係する。旋光の性質は、偏光の進行方向に向き合っており、偏光面を右に回転するものを右旋性、左に回転するものを左旋性とし、偏光面を回転する角度を示す数字の前に、それぞれ、記号+又は-をつけて示す。例えば、 $+20^\circ$  は右  $20^\circ$ 、 $-20^\circ$  は左に  $20^\circ$  回転することを意味する。

旋光度  $[\alpha]'_x$  とは、特定の単色光 x (波長又は名称で記載する) を用い、温度  $t^\circ\text{C}$  で測定したときの旋光度を意味し、その測定は、通例、温度は  $20^\circ\text{C}$ 、層長は  $100\text{ mm}$ 、光線はナトリウムスペクトルの D 線で行う。

比旋光度  $[\alpha]'_x$  は、次の式で表す。

$$[\alpha]'_x = \frac{100\alpha}{lc}$$

t : 測定時の温度

x : 用いたスペクトルの特定の単色光の波長又は名称 (D 線を用いたときは、D と記載する。)

$\alpha$  : 偏光面を回転した角度

l : 試料溶液の層、すなわち、測定に用いた測定管の長さ (mm)

c : 日本薬局方では、溶液  $1\text{ mL}$  中に存在する薬品の g 数である。液状薬品を溶液としないでそのまま用いた

<p>ときは、その密度である。ただし、別に規定するもののほか、この密度の代わりに、その比重を用いる。</p> <p>医薬品各条で、例えば<math>[\alpha]_D^{20} : -33.0 \sim -36.0^\circ</math>（乾燥後、1g、水、20 mL、100 mm）とは、本品を乾燥減量の項に規定する条件で乾燥し、その約 1g を精密に量り、水に溶かし正確に 20 mL とし、この液につき、<math>20^\circ\text{C}</math>、層長 100 mm で測定するとき、<math>[\alpha]_D^{20}</math> が <math>-33.0 \sim -36.0^\circ</math> であることを示す。</p>	<p>ときは、その密度である。ただし、別に規定するもののほか、この密度の代わりに、その比重を用いる。</p> <p>医薬品各条で、例えば<math>[\alpha]_D^{20} : -33.0 \sim -36.0^\circ</math>（乾燥後、1g、水、20mL、100mm）とは、本品を乾燥減量の項に規定する条件で乾燥し、その約 1g を精密に量り、水に溶かし正確に 20mL とし、この液につき、層長 100mm で測定するとき、<math>[\alpha]_D^{20}</math> が <math>-33.0 \sim -36.0^\circ</math> であることを示す。</p>	
---	---	--



## 4.05 微生物限度試験法

新

### 4.05 微生物限度試験法

**微生物限度試験法を次のように改める。**

微生物限度試験法には生菌数試験及び特定微生物試験が含まれる。原料又は製品の任意の異なる数箇所（又は部分）から採取したものを混和し、試料として試験を行う。試料を液体培地で希釈する場合は、速やかに試験を行う。また、本試験を行うに当たっては、バイオハザード防止に十分に留意する。

#### I. 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験

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。

##### 1. 序 文

本試験は、好氣的条件下で発育可能な中温性の細菌及び真菌を定量的に測定する方法である。

本試験は、原料や製剤が既定の微生物学的品質規格に適合するか否かを判定することを主目的としたものである。採取試料数も含めて指示通りに試験を実施し、結果を判定する。

有効成分として生菌を含む製品には、本試験を適用しない。

局方試験法との同等性が示されている場合は、自動化法を含む別の微生物学的方法を用いてもよい。

##### 2. 基本手順

生菌数測定は、被験製品への外部からの微生物汚染を回避するように設計された条件下で行う。汚染を回避するための予防措置は、試験で検出しようとしているいかなる微生物に対しても影響を与えてはならない。

被験製品が抗菌活性を有する場合は、この抗菌活性を可能な限り除去又は中和する。この目的のために不活化剤を用いる場合は、その有効性と微生物に対する毒性がないことを確認する。

試料の調製に界面活性剤を使用する場合は、微生物に対する毒性がないこと、及び用いる不活化剤との間に相互作用がないことを確認する。

##### 3. 生菌数測定法

通常はメンブランフィルター法又はカンテン平板法を用いる。最確数（MPN）法は概して精度に欠ける菌数測定法ではあるが、バイオバーデン（汚染菌数）が非常に少ない製品群に対しては最適な方法となることもある。

製品の特性や要求される微生物限度値などに基づいて測定法を選択するが、選択した測定法は、規格に適合していることを判断するのに十分な試料量を試験できるものでなければならない。また、選択した方法の適合性を確認する。

##### 4. 培地性能及び測定法の適合性

###### 4.1 一般要件

被験製品存在下における微生物検出能力を確認する。

また、試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や製品の処方変更があった場合には、再度、

適合性を確認する。

#### 4.2 試験菌の調製

試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用するか、又は次に示す手順で調製する。

なお、試験に用いる微生物は、最初のマスターシードロットからの継代数5回を超えないように、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を用いて管理する。細菌及び真菌の各試験菌について、表 4.05- I -1 に示す条件でそれぞれ個別に培養する。

試験菌懸濁液の調製には、pH7.0 のペプトン食塩緩衝液又は pH7.2 のリン酸緩衝液を用いる。*Aspergillus niger* の孢子を懸濁させるために、緩衝液にポリソルベート 80 を 0.05% 加えても良い。懸濁液は 2 時間以内、又は 2 ~ 8°C に保存する場合は 24 時間以内に用いる。*Aspergillus niger* 又は *Bacillus subtilis* の栄養型細胞の新鮮懸濁液を調製して希釈する代わりに、孢子懸濁液又は芽胞懸濁液を調製し、接種菌液として使用できる。それぞれの懸濁液は、保証された期間内は 2 ~ 8°C で保存できる。

#### 4.3 陰性対照

試験状態を確認するために、試料液の代わりに希釈液を用いて陰性対照試験を実施する。微生物の発育があってはならない。

#### 4.4 培地性能

市販生培地についてはバッチごとに試験する。また、乾燥粉末培地又は各成分より調製した培地については、調製バッチごとに試験する

表 4.05- I -1 に示す微生物の少数（100 CFU 以下）をソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地の一部、ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地及びサブロー・ブドウ糖カンテン培地の平板に接種する。菌株ごとに別個の液体培地の一部又は平板を用い、表 4.05- I -1 に示した条件でそれぞれ培養する。

カンテン培地では、接種菌の出現集落数は標準化された菌液の計測値の 1/2 から 2 倍以内でなければならない。新鮮培養菌を用いて試験する場合は、有効性が確認された培地バッチで以前に得られた発育と同等の発育を示さなければならない。

液体培地では、有効性が確認された培地バッチで以前に得られた発育と同等の発育が認められなければならない。

#### 4.5 製品存在下での測定法の適合性

##### 4.5.1 試料の調製

試料の調製法は、被験製品の物理学的特性に依存する。以下に記載したいずれの方法も満足できるものでない場合は、別な方法を確立する。

##### 水溶性製品

被験製品を pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 のリン酸緩衝液又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地で溶解又は希釈する（通常は 10 倍希釈液を調製する）。必要ならば、pH6 ~ 8 に調整する。さらなる希釈が必要な場合は同じ希釈液で調製する。

##### 水に不溶の非脂質製品

被験製品を pH7.0 のペプトン食塩緩衝液、pH7.2 のリン酸緩衝液又はソイビーン・カゼイン・

ダイジェスト培地に懸濁させる（通常は 10 倍希釈液を調製する）。分散しやすくするために、例えばポリソルベート 80（濃度：1 g/L）のような界面活性剤を加えることができる。必要ならば、pH6 ~ 8 に調整する。さらなる希釈が必要な場合は同じ希釈液で調製する。

#### 脂質製品

被験製品をろ過滅菌したミリスチン酸イソプロピルに溶解するか、又は、必要ならば 40°C 以下（例外的な場合でも 45°C 以下）に加温した最少必要量のポリソルベート 80 又は他の非阻害性の界面活性剤を用いて混合する。必要ならば水浴中で温度を保ちながら注意深く混和する。選定した希釈液をあらかじめ加温して加え、被験製品の 10 倍希釈液を調製する。乳化に必要な最短の時間で温度を保ちながら注意深く混和する。適切な濃度のポリソルベート 80、又は他の非阻害性の界面活性剤を含む同じ希釈液を用いて、更に 10 倍段階希釈系列を調製してもよい。

#### エアゾール状の液体又は固体

製品を無菌的にメンブランフィルター装置内又はさらなる試料採取のために滅菌容器内に移す。各被験容器から、全量あるいは定量噴霧の一定量のいずれかを用いる。

#### 経皮吸収パッチ

経皮吸収パッチの保護被覆（“剥離ライナー”）を取り除き、粘着面を上向きにして滅菌ガラス又は滅菌プラスチックトレイの上に置く。パッチ同士が付着するのを防ぐために、滅菌した多孔性物質（例えば滅菌ガーゼ）で粘着面を覆う。ポリソルベート 80 及び/又はレシチンなどの不活化剤を含む適量の選定した希釈液にパッチを移し、少なくとも 30 分間激しく振とうする。

#### 4.5.2 接種及び希釈

100 CFU 以下の接種菌を得るのに十分な量の試験菌懸濁液を 4.5.1 で調製した試料液及び対照（試料を含まない）に加える。接種する試験菌懸濁液の量は、試料液量の 1% を超えてはならない。

製品からの許容可能な微生物回収結果を得るために、最も低い希釈率の試料液を用いて試験する。抗菌活性又は低溶解度のために、最も低い希釈率の試験法を使えない場合は、更に適切な試験手順を確立する。

試料による発育阻止が避けられない場合には、中和、希釈又はろ過の後に試験菌懸濁液を加えてもよい。

#### 4.5.3 抗菌活性の中和/除去

4.5.2 及び 4.5.4 に示した手順に従って試験を行い、試料液から回収された菌数と、対照から回収された菌数とを比較する。

発育が阻害される場合（試料液からの回収菌数が、対照からの回収菌数の 1/2 未満の場合）は、正しい結果を得るために、生菌数測定の方法を変更する。方法の変更には、例えば（1）希釈液又は培地の増量、（2）特異的又は一般的な中和剤の希釈液への添加、（3）膜ろ過、又は（4）上記の手段の組み合わせが含まれる。中和剤：抗菌剤の活性を中和するため、中和剤を用いることができる（表 4.05-I-2）。中和剤は、選定した希釈液又は培地に、可能な限り滅菌前に添加する。中和剤を用いた場合は、その有効性と微生物に対する毒性がないことを、製品を含まずに中

和剤のみを加えたブランク試験で確認する。

適切な中和法が確立できない場合には、その製品のもつ殺菌活性のために、接種菌が分離できないと見なす。したがって、その製品が接種菌と同種の菌やその近縁種によって汚染されている可能性は低いと考える。しかし、その製品がこれらの微生物の一部を阻害するだけで、試験菌株以外の菌株は阻害しない可能性もあるので、微生物の発育とその許容基準に見合った最も低い濃度で試験を行う。

#### 4.5.4 製品存在下での微生物回収

表 4.05-I-1 に記載されている微生物ごとに個別に試験する。添加した微生物のみを対象に測定する。

##### 4.5.4.1 メンブランフィルター法

メンブランフィルターは、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  以下のものを使用する。フィルターの材質は、被験試料の成分によって細菌捕集能力が影響されないように注意して選択する。表 4.05-I-1 の微生物ごとに 1 枚のメンブランフィルターを用いる。

4.5.1 ~ 4.5.3 の記載どおりに調製した試料の適量（可能であれば製品の 1 g 相当量、又は多数の集落の形成が予測される場合はそれ以下）をメンブランフィルターに移して直ちにろ過し、適量の希釈液でメンブランフィルターを洗浄する。

メンブランフィルターを、総好気性微生物数（total aerobic microbial count ; TAMC）測定用としてソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の表面に、総真菌数（total combined yeasts/moulds count ; TYMC）測定用としてサブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す。表 4.05-I-1 に示した条件で平板を培養後、集落数を測定する。

##### 4.5.4.2 カンテン平板法

カンテン平板法は、各培地に対して少なくとも 2 枚の平板を用いて実施し、結果はそれぞれの平板の測定菌数の平均値を用いる。

###### 4.5.4.2.1 カンテン平板混釈法

直径 9 cm のペトリ皿を使用する場合、4.5.1 ~ 4.5.3 の記載どおりに調製した試料を 1 mL 分注する。これにあらかじめ 45°C 以下に保温した 15 ~ 20 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はサブロー・ブドウ糖カンテン培地で混和する。より大きなペトリ皿を用いる場合は、それに応じてカンテン培地量を増加する。表 4.05-I-1 に挙げた微生物ごとに少なくとも 2 枚のペトリ皿を用いる。

表 4.05-I-1 に示した条件で平板培地を培養する。培地ごとに菌数の算術平均をとり、集落数を算出する。

###### 4.5.4.2.2 カンテン平板表面塗抹法

直径 9 cm のペトリ皿を使用する場合は、15 ~ 20 mL のソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地又はサブロー・ブドウ糖カンテン培地を約 45°C で加えて固化させ、例えば、層流式キャビネット又は恒温器の中で平板培地の表面を乾燥させる。より大きなペトリ皿を用いる場合は、それに応じてカンテン培地量を増加する。表 4.05-I-1 に挙げた微生物

ごとに少なくとも2枚のペトリ皿を用いる。4.5.1～4.5.3の記載どおりに試料を調製し、その0.1 mL以上を正確に測定して培地表面全体に広げる。4.5.4.2.1の規定どおりに培養し、測定する。

#### 4.5.4.3 最確数 (MPN) 法

MPN法の精度及び正確さは、メンブランフィルター法又はカンテン平板法よりも劣っている。特にかびの測定に対しては信頼性が低い。これらの理由のために、MPN法は他に利用できる方法がない状況下でのTAMCの測定に用いられる。本法を適用する場合は、以下のように行う。

4.5.1～4.5.3の記載どおりに、製品の少なくとも3連続の10倍段階希釈系列を調製する。各希釈段階からそれぞれ1 g又は1 mLずつをとり、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地が9～10 mL入っている3本の試験管にそれぞれ接種する。必要ならば、ポリソルベート80のような界面活性剤、又は抗菌剤の不活化剤を培地に添加することができる。したがって、3段階の希釈系列を調製した場合には、9本の試験管に接種することになる。

全ての試験管を30～35℃で3日間を超えない期間培養する。被験製品の性質によって結果の判定が困難あるいは不確かな場合は、同じ培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地に移植後、同じ温度で1～2日間培養し、これらの結果を用いる。表4.05-I-3から被験製品1 g又は1 mL当たりの微生物の最確数を求める。

#### 4.6 結果及び判定

メンブランフィルター法又はカンテン平板法の適合性を確認するとき、いずれの試験菌の平均計測値も、4.5.2で定義した製品が存在しない対照の計測値の1/2～2倍以内でなければならない。MPN法の適合性を確認するとき、試験菌の計測値は、対照から得られる結果の95%信頼限界の範囲内で行う。

記述したいずれの方法においても、試験菌のうち1菌種でも上記の基準に満たない場合には、基準に最も近くなる方法と試験条件で製品を試験する。

### 5. 製品の試験

#### 5.1 試験量

別に規定するもののほか、上記の注意を払って採取した被験製品の10 g又は10 mLを用いる。エアゾール形式の液体又は固体は、10容器を抜き取る。経皮吸収パッチは、10パッチを抜き取る。

次のような条件で処方される原薬は、試験量を減らすことができる：投与単位（例えば錠剤、カプセル剤、注射剤）当たりの原薬量が1 mg以下、又は1 gあるいは1 mL（投与単位では表示されていない製剤）当たりの原薬量が1 mg未満。これらの場合、被験試料の採取量は、製品の10投与単位又は10 gあるいは10 mLに存在する量よりも少なくないようにする。

原薬として使用される物質では、試料の量に限りがあるか又はロットサイズが極度に小さい（すなわち、1000 mL又は1000 g未満）場合には、より小さな量が規定されているか又は正当な理由がない限り、試験量をロットの1%とする。

ロットを構成しているものの総数が200未満（例えば臨床試験で使われる試料）のような製品では、試験量は2単位に、又は数量が100未満の場合は1単位に減らすことができる。

バルク原料又は製剤の収納容器から、無作為に試料を選び出す。必要量の試料を得るために、十分な数の容器の内容物を混合する。

## 5.2 製品の試験

### 5.2.1 メンブランフィルター法

フィルターを培地に移すことができるように設計されているろ過装置を用いる。4.に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製し、適量を2枚のメンブランフィルターの各々に移して直ちにろ過する。適合性が確認された方法に従って、各フィルターを洗浄する。

1枚のメンブランフィルターは、TAMCの測定のためにソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の表面に、他の1枚のメンブランフィルターは、TYMCの測定のためにサブロー・ブドウ糖カンテン培地の表面に移す。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を30～35℃で3～5日間、サブロー・ブドウ糖カンテン培地を20～25℃で5～7日間培養する。製品1g又は1mL当たりの集落数を算出する。

経皮吸収パッチを試験するときは、4.5.1に記載されている調製液の10%量ずつを2枚の滅菌メンブランフィルターで別々にろ過する。1枚のメンブランフィルターはTAMCの計測のためにソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地に移し、他のメンブランフィルターはTYMCの計測のためにサブロー・ブドウ糖カンテン培地に移す。

### 5.2.2 カンテン平板法

#### 5.2.2.1 カンテン平板混釈法

4.に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製する。それぞれの培地に対し、希釈段階ごとに少なくとも2枚のペトリ皿を用意する。ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地は30～35℃で3～5日間培養し、サブロー・ブドウ糖カンテン培地は20～25℃で5～7日間培養する。集落数がTAMCでは250未満、TYMCでは50未満で、かつ最も多い集落数を示す希釈度のカンテン培地を選び出す。培地ごとに菌数の算術平均をとり、製品1g又は1mL当たりの集落数を算出する。

#### 5.2.2.2 カンテン平板表面塗抹法

4.に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製する。それぞれの培地に対し、希釈段階ごとに少なくとも2枚のペトリ皿を用意する。培養及び集落数の算出は、カンテン平板混釈法に記載されているとおりに行う。

### 5.2.3 最確数法

4.に記載されたとおりに適合性が示された方法で試料を調製し、希釈する。全ての試験管を30～35℃で3～5日間培養する。必要ならば、適合性が示された方法で移植培養する。希釈段階ごとに、微生物の増殖が認められる試験管数を記録する。表4.05-I-3から被験製品1g又は1mL当たりの微生物の最確数を求める。

## 5.3 結果の判定

ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地を使用して測定される集落数を、総好気性微生物数 (TAMC) とする。この培地上に真菌の集落が検出されても、TAMCとして測定する。サブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用して測定される集落数を、総真菌数 (TYMC) とする。この培

地上に細菌の集落が検出されても、TYMCとして測定する。細菌の発育のためにTYMCが許容基準を超えることが予測される場合には、抗生物質を含むサブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用しても良い。MPN法で計測を行う場合は、算出値はTAMCとする。

微生物学的品質の許容基準が規定されているときは、以下のように判定する。

－ $10^1$  CFU:最大許容数=20,

－ $10^2$  CFU:最大許容数=200,

－ $10^3$  CFU:最大許容数=2000, 以下同様。

推奨される溶液及び培地は、「特定微生物試験」に記載されている。

## II. 非無菌製品の微生物学的試験：特定微生物試験

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。

### 1. 序文

本試験は、規定の条件下で検出可能な特定微生物が存在しないか、又はその存在が限られているかを判定する方法である。

本試験は、原料や製剤が既定の微生物学的品質規格に適合するか否かを判定することを主目的にしたものである。採取試料数も含めて指示通りに試験を実施し、結果を判定する。

局方試験法との同等性が示されている場合は、自動化法を含む別の微生物学的方法を用いてもよい。

### 2. 基本手順

試料の調製は、「生菌数試験」に記載されているとおりに行う。

被験製品が抗菌活性を有する場合は、「生菌数試験」に記載されているように可能な限りこの抗菌活性を除去又は中和する。

試料の調製に界面活性剤を使用する場合は、「生菌数試験」に記載されているように、微生物に対する毒性がないこと、及び用いる不活化剤との間に相互作用がないことを確認する。

### 3. 培地の性能試験及び試験の適合性

被験製品存在下においても微生物を検出する能力があることを確認する。また、試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や製品の処方変更があった場合には、再度、適合性を確認する。

#### 3.1 試験菌の調製

試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用するか、又は次に示す手順で調製する。

なお、試験に用いる微生物は、最初のマスターシードロットからの継代数5回を超えないように、シードロット培養管理手法（シードロットシステム）を用いて管理する。

##### 3.1.1 好気性微生物

各細菌試験用菌株を、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地中、又はソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地上で、それぞれ30～35℃で18～24時間培養する。カンジダ・アルビカンス用の試験菌株は、サブロー・ブドウ糖カンテン培地上、又はサブロー・ブドウ糖培地中で、それぞれ20～25℃で2～3日間培養する。

*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)：例えば、ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 又