

参考情報 改正事項

14. 第十五改正日本薬局方における国際調和

2.44 強熱残分試験法の次に次を追加する。

調和年月：2008年6月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Bulk Density and Tapped Density of Powders	3.01 かさ密度及びタップ密度測定法	日本薬局方独自記載事項： 当該測定法に関する説明
	(前書き)	
Bulk density	かさ密度	
Method 1: Measurement in a graduated cylinder	第1法(メスシリンダーを用いる方法)	
Procedure	操作法	
Method 2: Measurement in a volumeter	第2法(ポリュメーターを用いる方法)	
Apparatus	装置	
Procedure	操作法	
Method 3: Measurement in a vessel	第3法(容器を用いる方法)	
Apparatus	装置	
Procedure	操作法	
Tapped density	タップ密度	
Method 1	第1法	
Apparatus	装置	
Procedure	操作法	
Method 2	第2法	
Procedure	操作法	
Method 3	第3法	
Procedure	操作法	
Measures of powder compressibility	粉体の圧縮性の尺度	

3.02 比表面積測定法の次に次を追加する。

調和年月：2007年5月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Gas Pycnometric Density of Solids (Introduction)	3.03 粉体の粒子密度測定法	日本薬局方独自記載事項： 測定法の対象を記載 測定温度の部分は操作法に記載
	(前書き)	
Apparatus	1. 装置 装置の校正	
Method	2. 操作法	
Expression of the results	2. 操作法	

コムギデンプンの次に次を追加する。

調和年月：2006年10月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Rice Starch	コムデンプン	
Definition	基原	
Identification A	確認試験 (1)	
Identification B	確認試験 (2)	
Identification C	確認試験 (3)	
pH	pH	

Iron	純度試験 (1) 鉄	
Loss on drying	乾燥減量	
Sulphated ash	強熱残分	
Oxidising substances	純度試験 (2) 酸化性物質	
Sulphur dioxide	純度試験 (3) 二酸化イオウ	

参考情報ペプチドマップ法の次に次を追加する。

調和年月： 2007年 5月

薬局方調和事項	第十五改正日本薬局方 (第二追補)	備考
Powder Fineness	参考情報 粉体の細かさの表示法	

20. バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験

次のように改める。

本文書は、バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に使用する細胞基材で細胞バンクを基にするものに対し、現段階で実施すべきと考えられるマイコプラズマ否定試験について述べたものである。

試験方法としては、A. 培養法、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による検出法が挙げられる。

本マイコプラズマ否定試験の対象は、マスター・セル・バンク (MCB)、ワーキング・セル・バンク (WCB) 及び医薬品製造工程中の培養細胞である。これらに対して、A 法と B 法による試験を実施する。ただし、B 法はマイコプラズマ由来以外の DNA も検出するので、B 法のみ陽性を示した場合は C 法によりマイコプラズマの存在を否定することも考えられる。この場合、C 法に用いるプライマーその他の試薬や反応条件を含めた試験方法の選択、方法の感度と特異性及び検体調製の妥当性を含め、マイコプラズマの存在を否定できると判定した合理的な理由を示す必要がある。

マイコプラズマ否定試験を実施する前には、検体がマイコプラズマ発育阻止因子を有するかどうか試験しておく必要がある。発育阻止因子が含まれる場合には、遠心分離、細胞の継代などの適切な方法により発育阻止因子を中和あるいは除去する。

検体を採取後 24 時間以内に試験するときは 2 ~ 8℃で、24 時間を超える場合は -60℃以下で保存する。

マイコプラズマが検出された場合、種を同定するための試験を行えば混入の原因を推定するのに役立つ可能性がある。

A. 培養法

1. 培地

培養法にはカンテン平板培地と液体培地の両方を使用する。両培地にはペニシリン以外の抗生物質を使用してはならない。使用する培地としては、生物学的製剤基準に記載されているものを参考にすること。ただし、2. の培地の性能試験に適合するものであれば他の培地でもよい。

2. 培地の性能試験

試験に用いる培地については、各ロットごとにマイコプラズマの発育性能に関し、適性であるか否かの試験を実施する。そのためには、少なくとも 2 種類の既知の菌株、デキストロース分解マイコプラズマ (*M. pneumoniae* ATCC15531 又は同等の種又は株) とアルギニン分解マイコプラズマ (*M. orale* ATCC23714 又は同等の種又は株) を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し、これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある。陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は、公的又は適切と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いもので、100 CFU (コロニー形成単位) 以下又は 100 CCU (色調変化単位) 以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) カンテン平板培地 1 枚当たり検体 (細胞懸濁液) 0.2 mL 以上を、プレートに均等に広がるように接種する。カンテン平板培地は 1 検体当たり 2 枚以上とする。検体を接種した後、カンテン平板培地表面を乾燥し、5 ~ 10% の炭酸ガスを含む窒素ガス中 (微好氣的条件) で、適切な湿度のもと 36±1℃で 14 日間以上培養する。

2) 液体培地 1 本当たり検体 (細胞懸濁液) 10 mL 以上を、100 mL の液体培地を入れた容器に接種する。液体培地は 1 検体当たり 1 本以上とし、36±1℃で培養する。

被検細胞の培養液中に抗生物質などのマイコプラズマ発育阻止因子が含まれているような場合には発育阻止因子を除去する必要があるが、遠心処理などはそうした目的に適している。マイコプラズマ発育阻止因子の測定は、生物学的製剤基準に記載されているマイコプラズマ発育阻止活性の試験を参考にできる。

3) 2) での培養開始後3日目、7日目及び14日目の計3回にわたり、それぞれ各液体培地より0.2 mLずつを採取し、カンテン平板培地各2枚以上に接種する。カンテン平板培地での培養は微好氣的条件で、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で14日間以上培養する。

4) 全カンテン平板培地を対象に7日目と14日目に100倍以上の倍率の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため、培養Vero細胞に100 CFU以下又は100 CCU以下の*M. hyorhinis* (ATCC29052, ATCC17981又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC23714又は同等の種又は株)を接種する。

マイコプラズマ汚染の検出に関して既知のものと同様以上の検出感度があることを示すデータがある場合は上記以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる。マイコプラズマ菌株は、公的又は適当と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いものにつき、接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない。細胞は適当と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータと共に入手しなければならない。入手した細胞は、マイコプラズマ混入を避けて注意深く培養し、多数の種ストックを作製して、本文書で示すいずれか一つ以上の方法でマイコプラズマの混入を否定した後、凍結保存する。試験にはこのストックを解凍し、6継代以内のものを使用しなければならない。

カバーグラスを沈めた培養ディッシュ又は同等の容器に指標細胞を接種し、1日増殖させる。この培養ディッシュ2枚以上に試験検体(細胞培養上清)1 mL以上を接種する。

試験には、陰性(非接種)対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照をおく。陽性対照には、例えば*M. hyorhinis* (ATCC29052, ATCC17981又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC23714又は同等の種又は株)100 CFU以下又は100 CCU以下を使用する。

細胞は5%炭酸ガスを含む空气中 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で3～6日間培養する。

カバーグラス上の培養細胞を固定後、ビスベンズイミダゾール(bisbenzimidazole)又は同等の染色剤によりDNA蛍光染色し、蛍光顕微鏡(倍率400～600倍又はそれ以上)でマイコプラズマの存在を鏡検する。陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する。

方法

- 1) 細胞培養用ディッシュ(直径35 mm)に滅菌したカバーグラスを無菌的に置く。
- 2) 10%ウシ胎児血清(あらかじめマイコプラズマがないことを確認しておく)を含むイーグルの最少必須培地中にVero細胞が1 mL当たり 1×10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製する。
- 3) Vero細胞懸濁液2 mLを各培養ディッシュに接種する。このときカバーグラスを培地中に完全に沈め、培地表面に浮かないように注意する。細胞がカバーグラスに接着するよう5%炭酸ガスを含む空气中 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で1日培養する。
- 4) 培地を新鮮な培地2 mLと交換した後、試験検体(細胞培養上清)0.5 mLを培養ディッシュ2枚以上に添加する。陰性対照と陽性対照(*M. hyorhinis* (ATCC29052, ATCC17981又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC23714又は同等の種又は株)等の2種類のマイコプラズマ)についても同じ操作を行う。
- 5) 培養液を5%炭酸ガスを含む空气中 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で3～6日間培養する。
- 6) 各ディッシュより培養液を除去し、メタノール/酢酸(100)混液(3:1)(固定液)2 mLをそれぞれに加え、5分間放置する。
- 7) 各ディッシュより固定液を除去し、再度各ディッシュに同量の固定液を加え10分間放置する。
- 8) 固定液を除去し、すべてのディッシュを完全に風乾する。
- 9) 各ディッシュにビスベンズアミド(bisbenzamide)蛍光染色液2 mLを加え、ディッシュに蓋をして室温で30分間静置する。
- 10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシュを蒸留水2 mLで3回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。
- 11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封入液をカバーグラスの端より吸い取る。
- 12) 400～600倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察する。
- 13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。
- 14) 細胞核を囲むように微小な核外蛍光斑点を持つ細胞が1000個のうち5個(0.5%)以上あれば陽性と判定する。

C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法

PCR法は、非常にわずかな量のマイコプラズマDNAを特異的に検出することが可能な方法として現在ではよく知られており、細胞のマイコプラズマ汚染の検査法として、近年広く利用されてきている。しかし、その感度と特異性は採用した方法に依存し、またPCRで陽性反応を得てもそれは必ずしも生きてきたマイコプラズマの存在を意味するものではない。

PCR 法では培養細胞から得た DNA を特異的なプライマーを用いて増幅することによって目的 DNA の有無を検出する。試験の検出感度と特異性を高めるには 2 段 PCR 法 (ネステッド PCR 法) を用いることが望ましい。試験は陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照を置き実施する。

細胞又は細胞培養液に含まれるマイコプラズマ DNA を増幅するにはマイコプラズマに共通な DNA 配列に対応するプライマーを用いる。増幅に際しては耐熱性 DNA ポリメラーゼのような適切なポリメラーゼを用い適切な条件下で反応を行う。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動を用いて分離し、エチジウムブロマイド染色後、UV 照射により検出する。

本法で重要な点は、マイコプラズマに特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存されている塩基配列に対応するプライマーを用いることである。例えばマイコプラズマの 16 S - 23 S リボソーム遺伝子間のスペーサー領域等に対応するプライマーがある。

1 次 PCR で陰性となった場合には、感度と特異性を高めるためネステッドプライマーを用いる 2 段 PCR 法を実施することが望ましい。

2 次 PCR に用いるプライマーは内側配列部分のネステッドプライマーを選択する。アウター及びインナープライマーは実験的又は文献的に有効性と特異性が証明されていなければならない。

なお、Vero 細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイコプラズマの増殖を図った後に PCR を行い、感染性マイコプラズマ由来の DNA の検出精度を高める方法もある。

以下に 2 段 PCR 法の例を示す。試薬や反応条件については、例示に限らず、適切であることが確認されている場合にはそれを使用してもよい。他の方法を使用する場合は、用いた方法の妥当性が立証され、その詳細が記載されていなければならない。その中に方法の感度と特異性が示されていなければならない。

操作法の例

1. テンプレートの調製

1) 被験細胞懸濁液 (必要ならば Vero 細胞により継代する) 600 μ L をチューブにとり、細胞を 0.1% SDS 等で溶かし、同量の TE 緩衝液 (10 mmol/L トリス - 塩酸 (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA) を飽和したフェノールを加え、混合する。

2) 室温で 15000 rpm, 5 分間遠心する。

3) 上清 400 μ L を別のチューブに移し、3 mol/L 酢酸ナトリウム 10 μ L を加える。

4) エタノール (95) 1 mL (2.5 倍量) を加え、十分に攪拌する。15 分間氷冷した後、4°C で 15000 rpm, 10 分間遠心する。

5) 上清を除去し、沈殿を 80% エタノール 200 ~ 300 μ L で 1 ~ 2 回洗浄し、洗液はピペットで除去する。4°C で 15000 rpm, 10 分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。

6) 沈殿を精製水 40 μ L に溶解する。

2. 陽性対照, 陰性対照についても同様の処理を行う。

3. 1 段目 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ, dNTP 溶液, アウタープライマー, 反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 90 μ L ずつ分注する。

2) 調製したテンプレートより 10 μ L をとり、1 段目の PCR 反応液 (90 μ L) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94°C で 30 秒間の変性, プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55°C) で 2 分間のアニーリング, 72°C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

4. 2 段目 PCR

1) 耐熱性 DNA ポリメラーゼ, dNTP 溶液, インナープライマー, 反応緩衝液 (Mg イオンを含む) を混合し、1 本のチューブに 99 μ L ずつ分注する。

2) 1 段目の PCR を終了したチューブから、それぞれの生成物 (1 μ L) をとり、2 段目の PCR 反応液 (99 μ L) を入れたチューブ 1 本ずつに加える。

3) 94°C で 30 秒間の変性, プライマーに適した温度 (例示のプライマーの場合は 55°C) で 2 分間のアニーリング, 72°C で 2 分間の伸長を、30 回繰り返して DNA 増幅を行う。

5. アガロースゲル電気泳動

1) 1 段目及び 2 段目の PCR 生成物 (10 μ L) を、泳動の先端を確認するための適当な色素液 (2 μ L) と混合し、1% アガロースゲル電気泳動を行う。

2) アガロースゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、紫外線照射条件下で写真撮影する。

3) DNA バンドが検出された場合、陽性と判定する。

[プライマーの例示]

・マイコプラズマ検出用

アウタープライマー

F1 : 5' - ACACCATGGGAG (C/T) TGGTAAT-3'

R1 : 5' - CTTC (A/T) TCGACTT (C/T) CAGACCCAAGGCAT-3'

インナープライマー

F2 : 5'-GTG (G/C) GG (A/C) TGGATCACCTCCT-3'

R2 : 5'-GCATCCACCA (A/T) A (A/T) AC (C/T) CTT-3'

() は混合

[PCR 反応液]

	[1 段目]	[2 段目]
dNTP 溶液 (各 1.25 mol)	16 μ L	16 μ L
プライマー (10 pmol/ μ L)	F1 2 μ L	F2 2 μ L
プライマー (10 pmol/ μ L)	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性 DNA ポリメラーゼ (1 U/ μ L)	2 μ L	2 μ L
反応緩衝液		
25 mmol/L 塩化マグネシウム	8 μ L	8 μ L
10 倍緩衝液*	10 μ L	10 μ L
滅菌精製水	50 μ L	59 μ L

*10 倍緩衝液の組成	
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジ オール・塩酸 (pH 8.4)	100 mmol/L
塩化カリウム	500 mmol/L
塩化マグネシウム	20 mmol/L
ゼラチン	0.1 g/L

[Vero 細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法]

- 1) 試験検体, 陽性対照及び陰性対照について, それぞれ 2 枚以上のディッシュを使用する。
- 2) 細胞培養用ディッシュ (直径 35 mm) に, 10%ウシ胎児血清 (PCR によりあらかじめマイコプラズマ DNA が検出されないことを確認しておく) を含むイーグル最少必須培地を用いて調製した Vero 細胞懸濁液 (1×10^4 細胞/mL) を 2 mL ずつ加え, 5%炭酸ガスを含む空气中, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 1 日培養する。
- 3) 古い培地を新鮮な培地と交換し, 試験検体 (細胞培養上清) 0.5 mL を Vero 細胞の培養ディッシュ 2 枚以上に接種する。陽性対照 (例えば 100 CFU 以下又は 100 CCU 以下の *M. hyorhinis* (ATCC29052, ATCC17981 又は同等の種又は株)) と陰性対照についても同じ操作を行う。
- 4) 試験検体, 陽性対照並びに陰性対照を接種した Vero 細胞の培養ディッシュをそれぞれ 5%炭酸ガスを含む空气中, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 3 ~ 6 日間培養する。

32. 近赤外吸収スペクトル測定法

近赤外吸収スペクトル測定法 (NIR) は, 被検物質による近赤外領域における光の吸収スペクトルを測定し, その解析を行うことにより, 物質の定性的又は定量的評価を行うための分光学的方法の一つである。

近赤外光は, 可視光と赤外光の間にあって, 通例, 750 ~ 2500 nm ($13333 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$) の波長 (波数) 範囲の光を指す。近赤外光の吸収は, 主として赤外領域 ($4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$) における基準振動の倍音 (over-tones) 又は結合音 (combinations) による振動によって生じ, 特に水素原子が関与する O-H, N-H, C-H, S-H による吸収が主である。例えば, N-H の非対称伸縮振動は 3400 cm^{-1} 付近にあるが, その第 1 倍音による吸収は 3400 cm^{-1} の 2 倍弱の 6600 cm^{-1} (波長 1515 nm) 付近に現れる。

近赤外域における吸収は, 赤外域における基準振動による吸収よりもはるかに弱い。また, 近赤外光は, 可視光に比較して長波長であることから, 光は粉体を含む固体試料中, 数ミリの深さまで侵入することができる。この過程で吸収される光のスペクトル変化 (透過光又は反射光) より, 試料に関わる物理的及び化学的知見が得られることから, 本法は, 非破壊分析法としても広く活用されている。

近赤外吸収スペクトルの解析法としては, 検量線法などの一般的な分光学的手法が適用可能であれば, これを用いるが, 通常, ケモメトリックスの手法を用いて解析を行う。ケモメトリックスは, 通例, 化学データを数量化し, 情報化するための数学的手法及び統計学的手法を指すが, 近赤外吸収スペクトル測定法におけるケモメトリックスとしては, 重回帰分析法をはじめ, 種々の多変量解析法が用いられ, これにより有効成分の定性的又は定量的評価などが行われる。

近赤外吸収スペクトル測定法は、水分の測定又は物質の確認などにおいて、既存の確立された分析法に代えて、迅速かつ非破壊的な分析法として用いられるものであり、この分析法を品質評価試験法として日常的試験に用いる場合、既存の分析法を基準として比較試験を行うことにより、その同等性を確認しておく必要がある。

医薬品分野における近赤外分光法の応用としては、原薬及び製剤中の有効成分、添加剤又は水分について、定性的又は定量的評価を行うことができる。また、結晶形、結晶化度、粒子径等の物理的状態の評価に用いることもできる。更に光ファイバーを用いることにより、装置本体から離れた場所にある試料について、サンプリングを行うことなくスペクトル測定が可能であることから、医薬品の製造工程管理をオンラインで行うための有力な手段としても活用することができる。

1. 装置

近赤外分光光度計には、分散型近赤外分光光度計及びフーリエ変換型近赤外分光光度計がある¹⁾。別に分光部に干渉フィルターを用いた干渉フィルター型近赤外分光光度計もあるが、この方式の装置は医薬品の品質管理分野で用いられることはほとんどない。

1.1 分散型近赤外分光光度計

装置は、光源部、試料部、分光部、測光部、信号処理部、データ処理部及び表示・記録・出力部より構成されている。光源には、ハロゲンランプ、タングステンランプ、発光ダイオード等、近赤外光を高輝度かつ安定に放射するものが用いられる。試料部は、試料セル及び試料ホルダーより構成される。光ファイバー及びコリメーターなどより構成される光ファイバー部を有する装置においては、分光光度計本体から離れた場所に設置された試料部に光を伝送する機能が付与されている。光ファイバーの材質としては、通例、石英が用いられる。

分光部は、分散素子を用いて必要とする波長の光を取り出すためのものであり、スリット、ミラー、分散素子から構成されている。分散素子には、プリズム、回折格子、音響光学素子(AOTF)、液晶チューナブルフィルター(LCTF)等がある。測光部は、検出器及び増幅器で構成されている。検出器としては、半導体検出器(シリコン、硫化鉛、インジウム・ガリウム・ヒ素、インジウム・アンチモン等)のほか、光電子増倍管も用いられる。半導体検出器による検出方法としては、通例、単一素子による検出が行われるが、複数の素子を用いたアレイ型検出器が用いられることもあり、これにより複数波長(波数)の光の同時検出が可能となる。信号処理部では、増幅器の出力信号から測定に必要な信号を分離し、出力する。データ処理部では、データ変換、スペクトル解析等を行う。表示・記録・出力部は、データ、分析結果及びデータ処理結果等をプリンターに出力する。

1.2 フーリエ変換型近赤外分光光度計

装置の構成は、分光測光部及び信号処理部を除き、基本的に1.1の分散型装置の構成と同様である。

分光測光部は、干渉計、サンプリング信号発生器、検出器、増幅器、A/D変換器等で構成される。干渉計には、マイケルソン干渉計、トランセプト干渉計及び偏光干渉計等がある。信号処理部については、分散型装置で要求される機能に加え、得られた干渉波形(インターフェログラム)をフーリエ変換により吸収スペクトルへ読み替える機能が付与されている。

2. 測定法

近赤外吸収スペクトル測定法には透過法、拡散反射法及び透過反射法の3種の測定法がある。測定法の選択は、試料の形状及び用途に依存し、粉体を含む固体試料には透過法又は拡散反射法が、液体試料には透過法又は透過反射法が用いられる。

2.1 透過法

透過法では、光源からの光が試料を通過する際の入射光強度の減衰の度合いを透過率 T (%) 又は吸光度 A として表す。試料は、光源と検出器の間の光路中に置かれるが、この配置は、通常の分光学的計測法におけるものと同様である。

$$T = 100t$$

$$t = I/I_0 = 10^{-ac}$$

I_0 : 入射光の強度

I : 透過光の強度

a : 吸光係数

c : 溶液の濃度

l : 層長(試料厚さ)

$$A = -\log t = \log(1/t) = \log(I_0/I) = ac$$

本法は、液体又は溶液試料に適用される方法であり、石英ガラスセル、フローセルなどに注入し、層長1~5mm程度で測定する。また、粉体を含む固体試料に対しても適用可能であり、拡散透過法とも呼ばれる。この場合、試料の粒度、表面状態などにより透過光強度は変化することから、適切な層長の選択が重要となる。

2.2 拡散反射法

拡散反射法では、試料から広い立体角範囲に放射する反射光強度 I と対照となる物質表面からの反射光強度 I_r との比を反射率 R (%) として表す。近赤外光は、粉体を含む固体試料中、数mmの深さまで侵入し、その過程で透過、

屈折、反射、散乱を繰り返す、拡散するが、この拡散光の一部は再び試料表面から放射され、検出器に捕捉される。通例、反射率の逆数の対数を波長（波数）に対してプロットすることにより、拡散反射吸光度 (A_r) のスペクトルが得られる。

$$R = 100r$$

$$r = I/I_r$$

I : 試料から拡散反射する反射光強度

I_r : 対照となる物質表面からの反射光強度

$$A_r = \log(1/r) = \log(I_r/I)$$

また、拡散反射スペクトルの強度表現には Kubelka-Munk (K-M) 関数によるものがある。K-M 関数は十分な厚さを有する試料を仮定して導かれたものであり、試料の濃度、近赤外光に対する吸光係数及び粒子の大きさ、形状、充てんの度合い（疎密）等により定まる光散乱係数を用いて表される。

本法は、粉体を含む固体試料に適用される方法であり、測定に際して、拡散反射装置が必要となる。

2.3 透過反射法

透過反射法は、透過法と反射法を組み合わせたものである。透過反射率 T^* (%) を測定する場合、ミラーを用いて試料を透過した光を再反射させる。光路長は試料厚さの2倍にする。一方、対照光は、鏡面で反射して検出器に入る反射光を用いる。ただし、本法を懸濁試料に適用する場合、ミラーの代わりに拡散反射する粗面をもつ金属板又はセラミック反射板などが用いられる。

本法における透過反射吸光度 (A^*) は、次式により得られる。

$$T^* = 100t^*$$

$$t^* = I/I_T$$

I : 試料が置かれた場合の透過光及び反射光強度

I_T : 試料がない場合の反射光強度

$$A^* = \log(1/t^*)$$

本法は、粉体を含む固体試料、液体試料及び懸濁試料に適用される方法である。固体試料に適用する場合、試料厚さを調節する必要があるが、通例、検出器の直線性と S/N 比が最良となる吸光度で 0.1 ~ 2 (透過率で 79 ~ 1%) となるように調節する。なお、粉体試料に適用する場合、粉体の粒度に応じて適切な層長をもつセルを選択する必要がある。

3. スペクトルに影響を与える要因

近赤外吸収スペクトル測定法を適用しようとするとき、特に定量的な分析においては、スペクトルに影響を与える要因として、以下の事項に留意する必要がある。

3.1 試料温度

温度が数℃違えばスペクトルに有意な変化（例えば、波長シフト）を生ずることがある。特に試料が水溶液であるか、水分を含む場合、注意する必要がある。

3.2 水分又は残留溶媒

試料中の水分又は残留溶媒及び測定環境中の水分（湿度）も近赤外領域の吸収帯に有意な影響を与える可能性がある。

3.3 試料厚さ

試料の厚さは、スペクトル変化の要因であり、一定の厚さに管理する必要がある。例えば、拡散反射法では、試料は十分に厚いことが想定されているが、一定の厚さ以下である場合、高反射率の支持板の上に試料を置き、透過反射法とするなどの工夫が必要である。

3.4 試料の充てん状態

固体又は粉体試料の測定においては、試料の充てん状態がスペクトルに影響を与える可能性がある。試料のセルへの充てんにあたっては、一定量を一定手順により充てんするよう注意する必要がある。

3.5 試料の光学特性

物理的、化学的又は光学的に不均一な試料の場合、比較的大きな光束 (beam size) を用いるか、複数試料又は同一試料の複数点を測定するか、又は粉碎するなどして、試料の平均化を図る必要がある。また、粉末試料では、粒径、充てんの度合い、表面の粗さ等もスペクトルに影響を与える。

3.6 結晶多形

結晶構造の変化（結晶多形）もスペクトルに影響を与える。複数の結晶形が存在する場合、適用しようとする試料の特性を考慮して、検量線用の標準的な試料についても分析対象となる試料と同様な多形分布を持つように注意する必要がある。

3.7 試料特性の時間的变化

試料は、サンプリング後の時間経過又は保存に伴って化学的、物理的又は光学的性質に変化が生じる可能性があるが、それらの変化は、スペクトルに微妙な影響を与えることになる。例えば、同一試料であっても時間経過が異なれば、近赤外スペクトルとしての特性は有意に変化することがある。したがって、検量線作成の際には、試験室でのオフライン測定とするか、又は製造工程でのオンライン（又はインライン）測定とするかなど、測定までの時間経過を十分に考慮して検量線用試料の調製をするなどの注意が必要である。

4. 装置性能の管理^{2,3)}

4.1 波長（波数）精度

装置の波長（波数）の正確さは、吸収ピークの波長（波数）が確定された物質、例えば、ポリスチレン、希土類酸化物の混合物（ジスプロシウム／ホルミウム／エルビウム（1：1：1））又は水蒸気などの吸収ピークと装置の指示値との偏りから求める。通例、次の3ピーク位置付近での許容差は下記のとおりとする。

1200 ± 1 nm (8300 ± 8 cm⁻¹)

1600 ± 1 nm (6250 ± 4 cm⁻¹)

2000 ± 1.5 nm (5000 ± 4 cm⁻¹)

ただし、基準として用いる物質により吸収ピークの位置が異なるので、上記3ピークに最も近い波長（波数）位置の吸収ピークを選んで適合性を評価する。例えば、希土類酸化物の混合物は1261 nm, 1681 nm, 1935 nmに特徴的な吸収ピークを示す。

また、透過法での測定を行う場合、ジクロロメタンを基準とし、1155 nm, 1417 nm, 1649 nm, 2352 nmの吸収ピークを用いることができる（層長：1.0 mm）。波数分解能の高いフーリエ変換型分光光度計では7306.7 cm⁻¹の水蒸気の吸収ピークを用いることができる。

なお、妥当性が確認できれば、他の物質を基準として用いることもできる。

4.2 分光学的直線性

異なる濃度で炭素を含浸させた板状のポリマー（Carbon-doped polymer standards）など適当な標準板を用いて分光学的直線性の評価を行うことができる。ただし、直線性の確認のためには、反射率10～90%の範囲内の少なくとも4濃度レベルの標準板を用いる必要がある。また、吸光度1.0以上での測定が想定される場合、反射率2%又は5%の標準板のいずれか又は両標準板を追加する必要がある。

これらの標準板につき、波長1200 nm, 1600 nm及び2000 nm付近の位置における吸光度（ A_{OBS} ）を測定し、この値（ A_{OBS} ）をそれぞれの標準板に付与されている各波長での吸光度（ A_{REF} ）に対してプロットするとき、得られる直線の勾配は、いずれの波長においても 1.0 ± 0.05 、縦軸切片は 0 ± 0.05 の範囲内にあることを確認する。

4.3 測光ノイズ（Spectrophotometric noise）

装置の測光ノイズは、白色反射性セラミックタイル又は反射性熱可塑性樹脂（例えば、ポリテトラフルオロエチレン）など適切な反射率標準板を用いてチェックすることができる。

4.3.1 高フラックスノイズ

高い反射率、例えば、反射率99%を有する標準板を用いて、測光ノイズを評価する。測定は、試料及び対照用試料のいずれに対しても標準板を使用して行う。1200～2400 nmの波長範囲につき、100 nm（セグメント）ごとにノイズの平均二乗根（RMS）を計算するとき、その平均値は 0.3×10^{-3} 以下であり、個々の値は 0.8×10^{-3} を超えてはならない。

$$RMS = \{1/N \cdot \Sigma (A_i - A_m)^2\}^{1/2}$$

N : セグメントあたりの測定点数

A_i : セグメントの各測定点における吸光度

A_m : セグメントにおける平均吸光度

4.3.2 低フラックスノイズ

低い反射率、例えば、反射率10%を有する標準板を用いて、光量が小さいときの測光ノイズを評価する。この場合、光源、光学系、検出器及び電子回路系のいずれもが、ノイズに対して何らかの影響を与える。高フラックスノイズの場合と同様に、1200～2400 nmの波長範囲につき、100 nmごとにRMSを計算するとき、その平均値は 1.0×10^{-3} 以下であり、個々の値は 2.0×10^{-3} を超えてはならない。

5. 定性又は定量分析への応用

近赤外領域では、赤外領域と異なり、主として基準振動の倍音又は結合音がスペクトルとして現れる。これらの吸収スペクトルは官能基及び原子団の吸収バンドが重なって観察されることが多い。したがって、近赤外吸収スペクトル測定法は、従来の分析法とは異なり、定性又は定量分析への応用のためには、通例、多変量解析など、ケモトリックスの手法を用いてモデル分析法を作成し、それぞれの用途に応じた分析法を確立する必要がある。

また、ケモトリックスの手法を用いて分析法を確立しようとする場合、近赤外吸収スペクトルの特徴を強調すること及びスペクトルの複雑さや吸収バンドの重なりの影響を減ずるために、スペクトルの一次若しくは二次微分処理又は正規化（Normalization）などの数学的前処理を行うことは、重要な手順の一つとなる。なお、ケモトリックスの手法やデータの数学的前処理法は多数あるが、分析目的に合わせ、適切な方法を組み合わせる。

近赤外分析法の確立に際しては、通常、分析法バリデーションで要求される分析能パラメーターに基づくその妥当性の評価が必要とされるが、パラメーターの選択は、分析法の用途に合わせて適切に行う必要がある。また、近赤外吸収スペクトル測定法の特質に合わせて、下記の事項に留意する。

- (i) ある分析法で利用しようとする波長（波数）が、与えられた条件下で分析対象の特性評価のために適しているか。
- (ii) 試料の取り扱い方（例えば、粉末試料の充てんの度合い、充てん圧等）や構成マトリックスなどの変動要因に対して十分な堅牢性を有しているか。
- (iii) 既存の確立された基準となる分析法と比較して、ほぼ同等の真度及び精度が得られるか。
- (iv) 確立された後の分析法の性能を維持・管理することが重要であり、継続的かつ計画的な保守点検作業が必要とされる。また、製造工程又は原料などの変更及び装置の主要部品の交換などに伴う変更管理又は再バリデーションの実施などに関する適切な評価手順は用意されているか。
- (v) ある装置を用いることを前提にして確立された分析法を他の装置に移設し（Model Transfer）、共通に利用しようとする場合、移設の妥当性を確認し得る適切な評価手順は用意されているか。

5.1 定性分析

分析対象となる各物質について、許容される範囲のロット間変動を含んだリファレンスライブラリーを作成し、多変量解析などケモメトリックスの手法を用いて分析法を確立した後、物質の確認などの定性的評価を行う。また、この手法によりロット間における品質特性の微小な差異を推定することもできる。

なお、多変量解析法としては波長相関法、残差平方和法、距離平方和法等の波長（波数）又は吸光度などを変数とする直接的な解析法のほか、主成分分析等の前処理をした後に適用される因子分析法、クラスター分析法、判別分析法及びSIMCA（Soft independent modeling of class analogy）等の多変量解析法もある。

また、近赤外吸収スペクトル全体を一つのパターンと見なし、多変量解析法の適用により得られるパラメーター又は対象物質に特徴的な波長（波数）でのピーク高さをモニタリングの指標とすることにより、原薬又は製剤の製造工程管理に利用することもできる。

5.2 定量分析

定量分析は、試料群のスペクトルと既存の確立された分析法によって求められた分析値との関係から、ケモメトリックスの手法を用いて、定量モデルを求め、換算方程式によって、測定試料中の各成分濃度や物性値を算出する。定量モデルを求めるためのケモメトリックスの手法には、重回帰分析法、主成分回帰分析法、PLS（Partial least squares）回帰分析法などがある。

また、試料の組成が単純な場合、濃度既知の検量線作成用試料を用いて、ある特定波長（波数）における吸光度又はこれに比例するパラメーターと濃度との関係をプロットして検量線とし、これを用いて試料中の分析対象成分の濃度を算出できることもある（検量線法）。

参考資料

- 1) 日本工業規格、近赤外分光分析通則 JIS K 0134(2002)
- 2) European Pharmacopoeia 5.0 (2005), 2.2.40. Near-Infrared Spectrophotometry
- 3) US Pharmacopoeia 30 (2007), <1119>Near-Infrared Spectrophotometry

33. 蛍光染色による細菌数の迅速測定法

本法は、蛍光染色を基本として、生理活性をもつ細菌を迅速に計数する手法を示す。生菌数の測定には、寒天培地上で培養する方法が広く用いられている。しかし、環境中には増殖能を有しながらも通常の手法では培養困難な細菌が多く存在することから、蛍光又は発光等により細菌を捉える新たな細菌検出法が開発されている。蛍光染色法では、蛍光色素で染色した細菌を、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターなど、蛍光シグナルを検出する種々の装置により計数する。また、染色剤を選択することにより、死菌を含めた全細菌から種々の生理活性を有する細菌まで、計数することができる。DNA や RNA に結合する核酸染色剤を用いて細菌を計数する方法は、蛍光染色法の中でも最も基本となるものであり、細菌の生死にかかわらず核酸をもつ全ての細胞を対象とする。蛍光活性染色法は、細菌の呼吸活性や細菌細胞内に普遍的に存在するエステラーゼの活性等を指標とする。マイクロコロニー法ではコロニー形成の初期段階であるマイクロコロニーを計数する。以下に、CFDA-DAPI 二重染色法とマイクロコロニー法を示す。なおここに示した方法は、迅速・高精度に生理活性をもつ細菌数を測定するための手法であり、生菌とする基準が他の方法と異なるため、測定値は他の生菌数測定法よりも高くなることが多い。本法に示した方法は、実施者の経験などによって変更可能である。すなわち、本法に示した以外の試薬、器具、装置も合理性があれば使用可能である。

1. CFDA-DAPI 二重染色法

エステラーゼ活性をもつ細菌の検出には fluorescein diacetate (FDA) 系試薬が一般的に用いられる。FDA 系試薬は細胞内のエステラーゼによって加水分解され、波長 490 nm 付近の青色励起光下で緑色蛍光を発する。なお FDA はグラム陰性菌に対する染色性が低いため、その修飾体である carboxyfluorescein diacetate (CFDA) 等が利用されている。核酸染色剤 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を併用した CFDA-DAPI 二重染色法の原理は以下のとおりである。無極性の CFDA は細胞内に浸透し、細胞内のエステラーゼにより蛍光性の carboxyfluorescein に加水分解される。この carboxyfluorescein は極性をもつために生細胞内に蓄積される。したがって、エステラーゼ活性をもつ細胞に青色励起光を照射した場合、carboxyfluorescein 由来の緑色蛍光を発する。死細胞では CFDA は加水分解されないために、蛍光性の carboxyfluorescein は生じない。一方 DAPI は生菌・死菌の両細胞内に浸透し、DNA のアデニン及びチミンが豊富な部分に特異的に結合するために、DNA をもつ全ての細菌が染色され、紫外線励起光下で青色蛍光を発する。したがって、本二重染色法により、青色励起光下ではエステラーゼ活性をもつ細菌のみを特異的に計数でき、また紫外線励起光下では全菌数（生菌数+死菌数）を測定できるので、エステラーゼ活性をもつ細菌及び DNA をもつすべての細菌を計数することが可能となる。

1.1 装置

1.1.1 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

蛍光染色した細菌を計数するための装置で、種々の機種がある。使用する蛍光染色剤に応じた適切なフィルター系を用意する。蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡、フローサイトメーターなど、各種の蛍光観察装置がある。

1.2 器具

- (i) ろ過装置（ファンネル、吸引フラスコ、吸引ポンプ）
- (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター（孔径：0.2 μm ）；
粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカーボネート製でなくても良い
- (iii) スライドガラス
- (iv) カバーガラス
- (v) 計数用接眼マイクロメーター（10 × 10 のマス目を区切ったもの）

1.3 操作法

以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

1.3.1 試料の調製

細菌が、液体（水又は緩衝液）に均一に分散した状態となるように試料を調製する。

1.3.2 ろ過

ろ過装置のファンネルにポリカーボネート製メンブランフィルター（孔径：0.2 μm ）をセットする。適当量の試料をろ過し、試料中の細菌をフィルター上に捕集する。

1.3.3 染色

CFDA を終濃度 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び DAPI を終濃度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように混合した CFDA 染色用緩衝液適量を、ろ過装置のファンネルに注ぎ、約 3 分間、室温で染色したのち、吸引ろ過する。ファンネルに無菌水を適量注ぎ、吸引ろ過し、フィルターに残った余分な蛍光染色剤を除く。フィルターを十分に乾燥させる。

1.3.4 プレパラートの作製

スライドガラスに蛍光顕微鏡用イメージジョンオイルを 1 滴落とす。その上に風乾したフィルターをろ過面を上にして置く。その上に蛍光顕微鏡用イメージジョンオイルを 1 滴滴下し、カバーガラスを被せてフィルターを封入する。油浸対物レンズを用いる場合は、カバーガラスの上に更に蛍光顕微鏡用イメージジョンオイルを 1 滴滴下する。

1.3.5 計数

蛍光顕微鏡下で 1000 倍の倍率で観察・計数する。CFDA-DAPI 二重染色の場合は、紫外線励起光による退色を防ぐために、まず青色励起光下で緑色蛍光を発する（エステラーゼ活性をもつ）細菌を計数した後、同一視野について紫外線励起光下で青色蛍光を発する（DNA をもつ）細菌を計数する。蛍光顕微鏡の接眼マイクロメーターの計 100 マス内に観察される蛍光染色剤由来の蛍光を発する細菌について、無作為に視野を選んで 20 視野以上計数し、以下の式に従って細菌数を算出する。なお、検鏡面積はあらかじめ接眼マイクロメーターと対物マイクロメーターで測定しておく。また、計数に当たっては 1 視野当たり 10 ~ 100 細胞程度になるようにろ過量を調節する。したがって、1 視野当たりの細胞数が多すぎる、又は少な過ぎる場合は試料の再調製を行う。（1 視野当たりの平均細胞数が 2 個以下の場合、または 1 視野あたりの細胞数が 0 個の視野が 5 視野以上ある場合は、検出限界以下とする。）

$$\text{菌数 (cells/mL)} = \{ (1 \text{ 視野当たりの細菌数の平均値}) \times (\text{ろ過面積}) \} / \{ (\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積}) \}$$

1.4 試薬・試液

(i) 無菌水

水を孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過した後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。注射用水を用いても良い。

(ii) CFDA 溶液、10 mg/mL

CFDA 50 mg をジメチルスルホキシドに溶かし、5 mL とする。遮光下、-20°C で保存する。

(iii) CFDA 染色用緩衝液

塩化ナトリウム 5 g に 0.1 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム試液 0.5 mL 及び薄めたリン酸水素二ナトリウム試液 (1→3) を加えて溶かし、100 mL とする。この液にリン酸二水素ナトリウム二水和物溶液 (1→64) を加えて pH 8.5 に調整する。孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過する。

(iv) DAPI 溶液, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

DAPI 10 mg を無菌水 100 mL に溶かし、無菌水で 10 倍希釈して、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過する。遮光下、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存する。

(v) 蛍光顕微鏡用イマージョンオイル

2. マイクロコロニー法

コロニー形成の初期段階であるマイクロコロニーを蛍光染色し、蛍光顕微鏡等で観察・計数することにより、増殖能をもつ細菌数を短時間の培養で測定することができる。本法ではメンブランフィルター上に細菌を捕集し、そのメンブランフィルターを培地上に静置し短時間培養した後、マイクロコロニーを計数する。肉眼で確認できる前段階のコロニーを検出するため、増殖能力をもつ細菌を迅速かつ高精度に計数することができる。マイクロコロニーの染色には、種々の核酸染色剤を用いることができる。

2.1 装置

2.1.1 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

蛍光染色した細菌を計数するための装置で、種々の機種がある。使用する蛍光染色剤に応じた適切なフィルター系を用意する。蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡など、各種の蛍光観察装置がある。

2.2 器具

- (i) ろ過装置 (ファンネル, 吸引フラスコ, 吸引ポンプ)
- (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター (孔径: 0.2 μm 以下) ;
粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカーボネート製でなくても良い
- (iii) スライドガラス
- (iv) カバーガラス
- (v) ろ紙 (No. 2)
- (vi) 計数用接眼マイクロメーター (10 × 10 のマス目を区切ったもの)

2.3 操作法

以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

2.3.1 試料の調製

細菌が、液体 (水又は緩衝液) に均一に分散した状態となるように試料を調製する。

2.3.2 ろ過

ろ過装置のファンネルにポリカーボネート製メンブランフィルター (孔径: 0.2 μm) をセットする。適当量の試料をろ過し、試料中の細菌をフィルター上に捕集する。

2.3.3 培養

フィルターをろ過装置から外し、ろ過面を上にして培地上に静置し、適切な温度で適切な時間培養する。培地にフィルターを静置する際、培地とフィルターの間に入らないように注意する。なお、サンプルにより適切な培養条件 (培地, 培養温度, 培養時間等) は異なるので注意する。

2.3.4 固定

ろ紙に中性緩衝ホルムアルデヒド試液適量をしみ込ませ、培地から外したフィルターを、その上にろ過面を上にして室温で 30 分以上静置し、マイクロコロニーを固定する。

2.3.5 染色

ろ紙に染色液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI など, 2% polyoxyethylene sorbitan monolaurate) 適量をしみ込ませ、ろ過面を上にしてフィルターをその上に室温・遮光下で 10 分間静置し、マイクロコロニーを染色する。無菌水をしみ込ませたろ紙の上ろ過面を上にして 1 分間静置し、フィルターを洗浄する。フィルターを十分に風乾させる。

2.3.6 プレパラートの作製

スライドガラスに蛍光顕微鏡用イマージョンオイルを 1 滴滴下する。その上に風乾したフィルターをろ過面を上にして置く。その上に蛍光顕微鏡用イマージョンオイルを 1 滴滴下し、カバーガラスを被せてフィルターを封入する。

2.3.7 計数

蛍光顕微鏡下で 400 倍又は 200 倍の倍率で観察・計数する。蛍光顕微鏡の接眼マイクロメーターの計 100 マス内に観察される蛍光染色剤由来の蛍光を発するマイクロコロニーについて、無作為に視野を選んで 20 視野以上計数し、以下の式に従ってマイクロコロニー数を算出する。なお、検鏡面積はあらかじめ接眼マイクロメーターと対物マイクロメーターで測定しておく。1 視野当たりのマイクロコロニー数の平均値が 2 個以下の場合、又は 1 視野あたりのマイクロコロニー数が 0 個の視野が 5 視野以上ある場合は、検出限界以下とする。

マイクロコロニー数 (cells/mL)

$$= \{(1 \text{ 視野当たりのマイクロコロニー数の平均値}) \times (\text{ろ過面積})\} / \{(\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積})\}$$

2.4 試薬・試液

(i) 無菌水

水を孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過したのち、121°Cで 15 分間高圧蒸気滅菌する。注射用水を用いても良い。

(ii) 染色液

DAPI 10 mg を無菌水 100 mL に溶かす。無菌水で 10 倍希釈して、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過する。遮光下、4°Cで保存する。使用時に polyoxyethylene sorbitan monolaurate を終濃度 2%となるように溶解する。

(iii) 中性緩衝ホルムアルデヒド試液 (4 w/v % ホルムアルデヒド溶液；中性緩衝化したもの)

(iv) 蛍光顕微鏡用イマージョンオイル

34. システム適合性

試験結果の信頼性を確保するためには、日本薬局方などに収載されている試験法を含め、既存の試験法を医薬品の品質試験に適用する際に、試験を行う施設の分析システムを使って当該試験法が目的に適う試験結果を与えることをあらかじめ検証することが肝要であり、そうした検証を行った上で分析システムの稼働状態を日常的に確認する試験としてシステム適合性の試験を行う必要がある。

1. システム適合性の意義

「システム適合性」とは、試験法の適用時に目的に適う試験結果を与えることが検証された分析システムが、実際に品質試験を行う際にも適切な状態を維持していることを確認するための試験方法と適合要件について規定したものであり、通常、一連の品質試験ごとに適合性を確認するための試験が行われる。システム適合性の試験方法及び適合要件は、医薬品の品質規格に記載される試験方法の中で規定する。規定されたシステム適合性の適合要件が満たされない場合には、その分析システムを用いて行った品質試験の結果を採用してはならない。

システム適合性は、機器分析法による多くの規格試験法に不可欠な規定である。この規定は、装置、電子的情報処理系、分析操作及び分析試料、更には試験者から構成される分析システムが、全体として適切な状態にあることを確認するための試験方法と適合要件を当該試験法の中に規定することによって、システムとして完結するとの考え方に基づいている。

2. システム適合性設定時の留意事項

規格試験法中に設定すべきシステム適合性の項目は、試験の目的と用いられる分析法のタイプに依存している。また、システム適合性の試験は、日常的に行う試験であることから、使用する分析システムが目的とする品質試験を行うのに適切な状態を維持していることを確認するのに必要な項目を選び、迅速かつ簡便に行えるような試験として設定することが望ましい。

例えば、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いた定量的な純度試験の場合には、システムの性能（試験対象物質を特異的に分析しうることの確認）、システムの再現性（繰り返し注入におけるばらつき程度の確認）、検出の確認（限度値レベルでのレスポンスの数値的信頼性の確認）などの項目について設定する。

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー」に記載されたシステム適合性の規定を補完する事項について以下に記載する。

1) 液体クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーのシステムの再現性について

(1) 許容限度値の設定

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー」のシステム適合性の項に「繰り返し注入の回数は6回を原則とする」、また、「システムの再現性の許容限度値は、当該試験法の適用を検討した際のデータと試験に必要とされる精度を考慮して、適切なレベルに設定する。」と規定されていることから、6回繰り返し注入における許容限度値を下記の記載を参考にして設定する。なお、日本薬局方収載の医薬品各条に規定された試験法により試験を行う場合には、当該各条に規定された許容限度値に従う。

原薬の定量法（原薬の含量がほぼ 100%、あるいはそれに近い場合）：分析システムが、製品中の有効成分含量のばらつきの評価に適切な精度で稼働していることを確認できるレベルに設定する。例えば、含量規格の幅が、液体クロマトグラフィーを用いた定量法において含量規格として設定されることの多い 98.0 ~ 102.0%の場合のように、5%以下の場合には「1.0%以下」を目安として適切に設定する。

製剤の定量法：製剤の含量規格の幅、並びに原薬の定量法におけるシステム再現性の規定（原薬と製剤に同様の試験法が用いられている場合）を考慮に入れて、適切に設定する。

類縁物質試験： 標準溶液やシステム適合性試験用溶液等，システム再現性の試験に用いる溶液中の有効成分濃度を考慮して，適切に設定する。試料溶液を希釈し，0.5 ～ 1.0% の有効成分濃度の溶液を調製して，システム再現性の試験に用いる場合には，通例，「2.0%以下」を目安として適切に設定する。

なお，上記の目安は，ガスクロマトグラフィーの場合には適用しない。

(2) システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー」のシステム適合性の項に「繰り返し注入の回数は6回を原則とするが，グラジエント法を用いる場合や試料中に溶出が遅い成分が混在する場合など，1回の分析に時間がかかる場合には，6回注入時とほぼ同等のシステムの再現性が担保されるように達成すべきばらつきの許容限度値を厳しく規定することにより，繰り返し注入の回数を減らしてもよい。」と規定されている。これと関連して，システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注入の回数を減らす方法を以下に示した。この方法により，必要な場合には，繰り返し注入の回数を減らして設定することができるし，日常の品質試験の中でも同様な考えに基づいて運用することができる。

システムの再現性の試験の質を繰り返し注入の回数が6回 ($n=6$) の試験と同等に保つために， $n=3\sim5$ の試験で達成すべきばらつきの許容限度値を下記の表に示した。

しかしながら，繰り返し注入の回数を減らすということは，システムの再現性を確認する上での1回の試験の重みが増すということであり，適切な技術レベルにある試験者が担当するとともに，装置が適切に維持管理されることがより重要となることに留意する必要がある。

表 システムの再現性の試験の質を $n=6$ の試験と同等に保つために
 $n=3\sim5$ の試験で達成すべきばらつきの許容限度値*

$n=6$ の試験に規定されたばらつきの許容限度値		許容限度値 (RSD)					
		1%	2%	3%	4%	5%	10%
達成すべきばらつきの許容限度値	$n=5$	0.88%	1.76%	2.64%	3.52%	4.40%	8.81%
	$n=4$	0.72%	1.43%	2.15%	2.86%	3.58%	7.16%
	$n=3$	0.47%	0.95%	1.42%	1.89%	2.37%	4.73%

* 排除すべき性能の分析システムがシステム適合性の試験に合格する確率を5%とした。

3. 分析システム変更時の考え方(分析システム変更時の管理)

目的に適う試験結果を与えることが検証された試験法と分析システムが基本的に変更されずに，品質試験が日常的に繰り返される場合には，システム適合性で規定された適合要件を満たしていることを確認すればよい。

しかしながら，当該の品質試験が長期にわたって続けられる間には，試験法や分析システムにも種々の変更が必要となる状況も起こり得る。これらの変更は，製造方法の変更の場合のように製品の品質に直接影響を与えるものではないが，品質を評価する際の尺度に影響を与えるものであり，変更の結果，評価の尺度に狂いが生じれば，適切でない品質のものを許容したり，逆に適切な品質のものを排除したりすることも起こり得る。そのため，試験法や分析システムの変更時には当該の変更が適切なことを確認して，評価の尺度に狂いが生じないように管理する必要がある。

試験法を変更する場合には，変更の内容に応じた適切なバリデーションを行う。一方，例えば，同じ試験室において液体クロマトグラフィーの装置やカラムの更新，試験者の交替などを行う場合には，上述の変更時の管理の一環として，変更した分析システムにより少なくともシステム適合性の試験を行って，変更前と同等の結果が得られることを確認する。同等な結果が得られないとき，例えば，液体クロマトグラフィーのカラムを交換したとき，新しいカラムによって試験の対象成分と分離確認物質との溶出順が逆転するなどの溶出パターンの大きな変化をもたらされるような場合には，特異性などが担保されているかが懸念されるため，そのカラムを当該品質試験に用いても目的に適う試験結果が得られることを再検証する必要がある。

35. 粉体の細かさの表示法

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。

粉体の細かさの表示法について規定する。ふるい分け法は粒子の大多数が $75\ \mu\text{m}$ より大きい場合に適しているが，より小さな粒子を含む試料であってもふるい分け法が検証されている場合には用いることができる。レーザー回折法も一般的に用いられる測定法であり，広い粒子径範囲に適用可能である。積算分布は分析用ふるい又は他の方法により測定され，粒子径については次のように表示される。

x_{90} : 積算ふるい下分布 90%に相当する粒子径

x_{50} : メジアン径 (50%の粒子がこの値より小さく, 50%の粒子がこの値より大きい.)

x_{10} : 積算ふるい下分布 10%に相当する粒子径

d も粒子径を表すのに用いられ, d_{90} , d_{50} , d_{10} を使用することもできる.

下付き添字 r が粒度分布の基準を表すとして, 積算ふるい下分布をもとに $Q_r(x)$ を定義する.

$Q_r(x)$: 粒子径 x 以下の大きさをもつ粒子の積算分布割合

r	粒度分布の基準
0	個数
1	長さ
2	面積
3	体積

そこで, 定義より: $x = x_{90}$ なら $Q_r(x) = 0.90$

$x = x_{50}$ なら $Q_r(x) = 0.50$

$x = x_{10}$ なら $Q_r(x) = 0.10$ となる.

次表の用語を用いることにより粉体の細かさを定性的に分類することもできる.

細かさによる粉体の分類		
用語	x_{50} (μm)	体積基準積算分布割合 $Q_3(x)$
粗い	>355	$Q_3(355) < 0.50$
やや細かい	$180 \sim 355$	$Q_3(180) < 0.50, Q_3(355) \geq 0.50$
細かい	$125 \sim 180$	$Q_3(125) < 0.50, Q_3(180) \geq 0.50$
極めて細かい	≤ 125	$Q_3(125) \geq 0.50$