

に一致するようにする。液の温度は $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に保つ。

顆粒剤のほかは試料 6 個をとり、試験器のガラス管に 1 個ずつ入れ、試験器はあらかじめ温度及び液量を調節したビーカー中の試験液に浸し、一定時間上下運動を行った後、試験器を静かに試験液から取り出し、ガラス管内の試料の状態を観察する。補助盤を入れるように指定されているときには、試験器のガラス管に試料を入れ、次に補助盤の上面を上にして、1 個ずつ静かに入れた後、前記の操作を行う。ただし、判定が困難なときは、補助盤の使用を省くことができる。

(1) 錠剤

試験液に水を用い、補助盤を入れ、30 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても海綿状の物質であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

試料 6 個中、試料の原形をとどめるもの 1 個、又は破片を認めるもの 1 個を残すときは、新たに試料 6 個をとってこの試験を繰り返し、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても海綿状の物質であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

(2) 適当なコーティング剤で剤皮を施した錠剤

試験液に水を用い、補助盤を入れ、60 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても皮膜若しくは海綿状の物質であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

試料 6 個中、試料の原形をとどめるもの 1 個、又は皮膜が溶解、開口若しくははく離しても内容医薬品の放出が認められないもの 1 個を残すときは、新たに試料 6 個をとってこの試験を繰り返し、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても皮膜若しくは海綿状の物質であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

(3) 丸剤

錠剤の試験を準用する。ただし、試験は第 1 液で 60 分間行い、試料の残留物をガラス管内に認めるときは、引き続き第 2 液で 60 分間行う。

(4) カプセル剤

試験液に水を用い、補助盤を入れ、20 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても皮膜であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

試料 6 個中、試料の原形をとどめるもの 1 個、又は皮膜が溶解、開口若しくははく離しても内容医薬品の放出が認められないもの 1 個を残すときは、新たに試料 6 個をとってこの試験を繰り返し、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても皮膜であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

(5) 顆粒剤

顆粒剤を 30 号 (500 μm) ふるいを用いて製剤の粒度の試験 (1) 顆粒剤の規定に準じてふるい、30 号ふるいに残留するもの 0.10 g ずつをそれぞれ補助筒 6 個にとり、補助筒を試験器のガラス管に 1 個ずつ入れて底に固定し、別に規定するもののほか、試験液に水を用い、30 分間上下運動を行った後、補助筒を取り出して観察するとき、試料の残

留物を補助筒内に認めないか、若しくは認めても原形をとどめるものが補助筒 1 個に限るとき、又は認めても皮膜であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。ただし、剤皮を施した顆粒については、試験液に水を用い、60 分間上下運動を行う。

(6) 腸溶性の製剤

(i) (ii) に該当するもの以外の腸溶性の製剤

次の (ア) 第 1 液による試験及び (イ) 第 2 液による試験の 2 つの試験を行う。

(ア) 第 1 液による試験

試験液に第 1 液を用い、120 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料 6 個中、崩壊、腸溶性の皮膜の開口、はく離又は破損などのため内容医薬品の放出を認めたものが 1 個以下のときは、第 1 液による試験に適合とし、2 個のときは、新たに試料 6 個をとってこの試験を繰り返し、6 個とも前記の異状を認めないときは適合とする。

(イ) 第 2 液による試験

別に試料 6 個をとって、試験液に第 2 液を用い、補助盤を入れ、60 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料の残留物をガラス管内に認めないか、又は認めても皮膜若しくは海綿状の物質であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

(ii) 顆粒剤及び顆粒状の形で充てんしたカプセル剤

次の (ア) 第 1 液による試験及び (イ) 第 2 液による試験の 2 つの試験を行う。

(ア) 第 1 液による試験

顆粒剤又はカプセル剤中より取り出した内容物を 30 号 (500 μm) ふるいを用いて製剤の粒度の試験 (1) 顆粒剤の規定に準じてふるい、30 号ふるいに残留するもの 0.10 g ずつをそれぞれ補助筒 6 個にとり、補助筒を試験器のガラス管に 1 個ずつ入れて底に固定し、試験液に第 1 液を用い、60 分間上下運動を行った後、観察するとき、試験器の網目から落ちる粒子が 15 粒以内のときは適合とする。

(イ) 第 2 液による試験

別に第 1 液による試験と同様の方法により試料 0.10 g ずつをそれぞれ補助筒 6 個にとり、補助筒を試験器のガラス管に 1 個ずつ入れて底に固定し、試験液に第 2 液を用い、30 分間上下運動を行った後、観察するとき、試料の残留物を補助筒内に認めないか、若しくは認めても原形をとどめるものが補助筒 1 個に限るとき、又は認めても皮膜であるか、若しくは軟質の物質若しくは泥状の物質がわずかのときは適合とする。

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。

本試験は、無菌操作に習熟した者が行い、判定は微生物学全般の基礎知識を有する者が行う。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を用い、操作は厳密な無菌的注意のもとで、空気清浄度が「無

菌医薬品製造区域の微生物評価試験法」に定めるグレード A に管理された無菌施設又は無菌装置内で行う。

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、無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅰ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、無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅰが使用しにくいときは、無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅱを用いてもよい。ただし、無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅱ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製品を記載にしたがって用いてもよい。

(1) 無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅰ

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
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
レザズリン溶液 (1 → 1000)	1.0	mL
水	1000	mL

(滅菌後の pH 6.9 ～ 7.3)

全成分を加え、加熱して溶かした後、必要ならば水酸化ナトリウム試液を加え、滅菌後の pH が 6.9 ～ 7.3 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。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、暗所に室温で保存する。保存中に水分が蒸発して流動性に变化が認められたもの、又は上部 $\frac{1}{3}$ 以上が淡赤色に変わった培地は使用してはならない。

(2) 無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅱ

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
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
水	1000	mL

(滅菌後の pH 6.9 ～ 7.3)

調製法は、無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅰ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	2.5	g
水	1000	mL

(滅菌後の pH 7.1 ～ 7.5)

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 7.1 ～ 7.5 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、暗所に室温で保存する。

(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 6.9 ～ 7.3)

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 6.9 ～ 7.3 になるように調整する。抗生物質医薬品又は抗菌剤を含む医薬品、レシチン又は油性成分を含む医薬品に対して用いる洗浄液には、必要に応じてポリソルベート 80 を 0.1 ～ 1.0 % 添加する。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する。

培地の性能試験

培地は調製するごとに、また、市販液体培地にあつては、購入するごとにその性能を試験する。培地 1 容器当たり、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 10 ～ 100 個接種し、無菌試験の各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。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、1 年間使用できる。

表 59-1 培地性能試験用菌株

培 地	試験菌株	培 養
無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅰ	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538, IFO 13276)* ¹	好気培養
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027, IFO 13275)* ²	
	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 11437, IFO 14293)* ³	
無菌試験用チオグリコール酸培地Ⅱ	<i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 11437, IFO 14293)* ³	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, IFO 3134, JCM 2499)	好気培養
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231, IFO 1594, JCM 2085)	
	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC 16404, IFO 9455)	

*1 代用菌株は、*Bacillus subtilis* (ATCC 6633, IFO 3134, JCM 2499)。

*2 代用菌株は、*Micrococcus luteus* (ATCC 9341, IFO 12708)。

*3 代用菌株は、*Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482, IFO 14291)。

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 個未満	10 % 又は 4 容器のうち多い方
100 個以上 500 個未満	10 容器
500 個以上	2 % 又は 20 容器のうち少ない方
大容量製品（表示量が 100 mL 以上）	2 % 又は 10 容器のうち少ない方
眼剤や非注射剤	
200 個未満	5 % 又は 2 容器のうち多い方
200 個以上	10 容器
固形バルク製品	
4 容器まで	各バルク容器
5 容器以上 50 容器未満	20 % 又は 4 容器のうち多い方
50 容器以上	2 % 又は 10 容器のうち多い方

微生物発育阻止活性の試験及び除去

無菌試験を実施する前に、接種した試料が微生物発育阻止活性を示すかどうかを試験する。なお、本試験は同一製法及び同一成分の医薬品の場合、ロットごとに行う必要はない。

メンブランフィルター法：Ⅰ-5 の操作により試料溶液をろ過、洗浄した後、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それぞれ約 10 ～ 100 個を含む洗浄液をろ過し、試料フィルターとする。試料溶液の代わりに洗浄液によって同様の処理を行ったフィルターを対照フィルターとし、それぞれのフィルターをⅠ-6 により培養及び観察を行う。培養期間は 7 日間とし、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、微生物発育阻止活性を示す物質がメンブランフィルターに吸着しているものと判断する。この場合は、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 100 mL 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、そのまま無菌試験を実施する。

直接法：Ⅱ-3 に定めた試料溶液を加えた試料培地及び試料溶液を加えない対照培地に表 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それぞれ約 10 ～ 100 個を接種し、Ⅰ-6 により培養する。培養期間は 7 日間とし、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、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-3 の規定にかかわらず培地量を増やす。適当な不活化剤を用いたり培地量を増やしても微生物発育阻止活性がみられる場合には、メンブランフィルター法を採用する。なお、メンブランフィルター法を適用できない医薬品については、表 59-4 に示す量を最少接種量とする。

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。

Ⅰ-1. 容器の開け方

密封容器の場合は、適当な即効性薬液で表面を消毒し、内部が陰圧になっている容器は、滅菌通気針を用い、常圧にしてから試験に供す。その他の容器又は包装から試料を取り出すときにも無菌的取扱いに注意する。

Ⅰ-2. 試料溶液の調製

液状医薬品は、そのまま試料溶液とするが、用時溶解又は懸濁して用いるものは、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、試料溶液とする。非水性の医薬品は、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。もし必要ならば加温するが、その温度は 44℃ を限界とし、その処理は 15 分以内に行う。

Ⅰ-3. 試料溶液のろ過量

液状医薬品及び用時溶解又は懸濁して用いる医薬品のろ過量は表 59-3 による。非水性の医薬品の採取量は、別に規定するもののほか、表 59-4 による。固形バルク製品の場合は、各バルク容器当たり、通例、小分け製品 10 容器分に相当する量を採取する。

表 59-3 液状及び水溶性医薬品の採取量

製品の表示量	最少採取量（培地当たり）
1 mL 未満	全量
1 ～ 10 mL	半量
10 mL 以上	表示量の 10 % 又は 5 mL のうち多い方

表 59-4 非水性医薬品の採取量

製品の表示量	最少採取量（培地当たり）
50 mg 未満	全量
50 ～ 300 mg	半量
300 mg 以上	150 mg

Ⅰ-4. ろ過装置

メンブランフィルターは、直径 20 ～ 50 mm、孔径 0.45 μm 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。

Ⅰ-5. 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を洗浄液 100 mL ずつで 3 回洗う。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。

(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 100 mL 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 等分ろ過後、培地をそれぞれ 100 mL ずつ入れる。

I-6. 培養及び観察

無菌試験用チオグリコール酸培地 I は 30 ～ 35 °C、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地は 20 ～ 25 °C で 14 日間以上培養し、少なくとも 5 ～ 9 日目に 1 回、及び培養最終日の計 2 回、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、新しい培地に移植し、同じ温度で 7 日間以上培養して観察する。

I-7. 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、各種要因、汚染菌の性状などから無菌試験自体に問題があったと推測された場合には、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。

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。

II-1. 容器の開け方

通例、メンブランフィルター法を準用する。

II-2. 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。

II-3. 試料溶液の接種量

ビベット、注射器又は適当な器具を用い、別に規定するもののほか、液状医薬品及び用時溶解又は懸濁して用いる医薬品の接種量は表 59-3 による。接種量は培地量の 10 % を越えてはならない。また、非水性医薬品については表 59-4 に示す量が無菌試験用チオグリコール酸培地 I 200 mL 及びソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 200 mL にそれぞれ接種する。

II-4. 培養及び観察

メンブランフィルター法を準用する。

II-5. 判定

メンブランフィルター法を準用する。

60. メタノール試験法

メタノール試験法は、エタノール中に混在するメタノールを試験する方法である。

試 液

(1) メタノール標準液 メタノール 1.0 g に水を加えて正確に 1000 mL とする。この液 5 mL を正確に量り、メタノール不含エタノール (95) 2.5 mL 及び水を加えて正確

に 50 mL とする。

(2) A 液 リン酸 75 mL に水を加えて 500 mL とし、これに過マンガン酸カリウム 15 g を加えて溶かす。

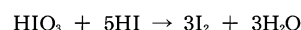
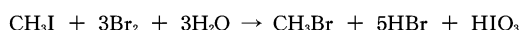
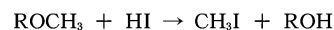
(3) B 液 硫酸を等容量の水に注意して加え、冷後、その 500 mL にシュウ酸二水和物 25 g を加えて溶かす。

操 作 法

試料 1 mL を正確に量る。これに水を加えて正確に 20 mL とし、試料溶液とする。試料溶液及びメタノール標準液 5 mL ずつをそれぞれ別の試験管に正確に量り、両試験管に A 液 2 mL を加え、15 分間放置した後、B 液 2 mL を加えて脱色し、更にフクシン亜硫酸試液 5 mL を加えて混和し、30 分間常温で放置するとき、試料溶液の呈する色はメタノール標準液の呈する色より濃くない。

61. メトキシル基定量法

メトキシル基定量法は、試料にヨウ化水素酸を加えて加熱し、生じるヨードメタンを臭素で酸化してヨウ素酸とし、これにヨウ化カリウム及び希硫酸を加え、生じたヨウ素をチオ硫酸ナトリウム液で滴定してメトキシル基を定量する方法である。



装 置

図 61-1 に示すものを用いる。

試 液

(1) 洗浄液 赤リン 1 g を水 100 mL に懸濁させる。

(2) 吸収液 酢酸カリウム 15 g を酢酸 (100) / 無水酢酸混液 (9 : 1) 150 mL に溶かし、その 145 mL を量り、臭素 5 mL を加える。用時製する。

操 作 法

ガス洗浄部 E に洗浄液を約 $\frac{1}{2}$ の高さまで入れ、また、吸収管 J に吸収液約 20 mL を入れる。メトキシル基 (CH_3O : 31.03) として約 6.5 mg に対応する試料を精密に量り、分解フラスコ A に入れ、次に沸騰石とヨウ化水素酸約 6 mL を加える。A のすり合わせ連結部 C をヨウ化水素酸 1 滴でぬらして空冷部 D に接続し、更に球面すり合わせ連結部 G を適当なシリコン樹脂をつけて連結し、装置を組み立てる。ガス導入管 B より窒素又は二酸化炭素を通じ、適当な調節器を用いて E 中に出る気泡が 1 秒につき 2 個程度になるように調節する。A を油浴に浸し、浴の温度が 20 ～ 30 分後、150 °C になるように加熱し、更に同温度で 60 分間煮沸する。油浴を外し、ガスを通したまま放冷し、冷後、G を取り外し、J の内容物を酢酸ナトリウム三水和物溶液 (1 → 5) 10 mL を入れた 500 mL の共栓三角フラスコに流し出し、水で数回洗い込み、更に水を加えて約 200 mL とする。振り混ぜながら臭素の赤色が消えるまでギ酸を滴加した後、更に 1 mL を加える。次にヨウ化カリウム 3 g 及び希硫酸 15 mL を加え、栓をして軽く振り混ぜ、5 分間放置した後、遊離したヨウ素を 0.1 mol/L チオ硫酸ナトリウム液で滴定する (指示薬 : デンブン試液 1 mL)。同様の方法で空試験を行い、補正する。