

1 胃腸薬のpH試験法

1 胃腸薬のpH試験法

2 胃腸薬のpH試験法は、制酸の効果を標榜する胃腸薬を
3 0.1mol/L塩酸の一定量中で一定時間かき混ぜ、この液のpHを
4 求める試験法である。胃腸薬のpHは、製剤の用法及び用量の1
5 回服用量(1回服用量に幅がある場合には、最小の1回服用量を
6 いう)に対応する量を取り、次の方法により試験を行うとき得
7 られるpH値で示す。

8 1. 試料の調製

9 固体製剤で製剤総則散剤の規定に適合するものは、そのまま
10 試料とする。ただし、分包されているものは、その20包以上
11 をとり、その内容物の質量を精密に量り、1回服用量当たりの
12 内容物の平均質量を算出し、均一に混合して試料とする。固体
13 製剤で製剤総則散剤の規定に適合しないもので、分包されてい
14 る顆粒剤などは、その20包以上をとり、その内容物の質量を
15 精密に量り、1回服用量当たりの内容物の平均質量を算出した
16 後、粉末とし、試料とする。固体製剤で製剤総則散剤の規定に
17 適合しないもので、分包されていない顆粒剤などは、その20
18 回服用量以上をとり、粉末とし、試料とする。カプセル剤、錠
19 剤などは、その20回服用量以上をとり、その質量を精密に量
20 り1回服用量当たりの内容物の平均質量、又は平均質量を算出
21 した後、粉末とし、試料とする。

22 液体製剤は、よく振り混ぜ、試料とする。

23 2. 操作法

24 ファクターを1.000に調整した0.1mol/L塩酸50mL又はこれ
25 に対応する0.1mol/L塩酸の容量を正確に量り、100mLのビー
26 カーに入れ、マグネチックスターラー及びマグネチックスター
27 ラー回転子(長さ35mm、径8mm)を用い、1分間に約300回転
28 の割合でかき混ぜながら、これに試料の1回服用量を正確に量
29 って加え、10分後のpHをpH測定法により測定する。ただし、
30 操作中、液温を $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に保つ。

1 医薬品の残留溶媒ガイドライン及び残留溶媒
2 試験法記載例

3 1. 医薬品の残留溶媒ガイドライン

4 「医薬品の残留溶媒ガイドライン」(平成10年3月30日医薬
5 審第307号)を参照する。

6 「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に、患者の安全のために
7 勧告された残留溶媒の許容量が示されている。医薬品中の残留
8 溶媒は、特別な場合を除き、この値を超えてはならない。

9 医薬品の製造業者は、「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に
10 規定されている許容量と自社製品中の残留量の実測値に基づい
11 て対象となる残留溶媒に適切な規格限度値あるいは管理基準値
12 を設定して、残留溶媒試験法に準じて自社製品の試験を行い、
13 製造する医薬品の品質を確保することが肝要である。

14 2. 残留溶媒試験

15 通例、残留溶媒試験法(2.46)により試験を行う。ヒトに対
16 して低毒性と考えられるクラス3の溶媒のみが存在する場合に
17 は、乾燥減量試験法(2.41)により得られる乾燥減量値が0.5%
18 以下であることを示すことで許容される。

19 ガスクロマトグラフィー(2.02)では、欧州薬局方(EP)及び
20 米国薬局方(USP)に記載されている残留溶媒試験法(EP:
21 2.4.24. Identification and control of residual solvents,
22 USP: (467) Residual Solvents)を用いて試験を行うことが
23 できる。ただし、記載方法、システム適合性試験等は日本薬局
24 方の定めにより行う。

25 3. 残留溶媒試験のためのガスクロマトグラフィーの試験条件
26 及びシステム適合性の例

27 残留溶媒試験のためのガスクロマトグラフィー試験条件とし
28 て、EP及びUSPに記載されている代表的な例を示す。ただし、
29 これらはいくまで例示であり、その他の適切な条件を用いること
30 を妨げるものではない。

31 試験条件には、通例、検出器、カラム、カラム温度、注入口
32 温度、検出器温度、キャリアーガス、流量及び面積測定範囲等
33 を、システム適合性には、通例、検出の確認、システムの性能
34 及びシステムの再現性など試験に必要な事項を規定する。試験
35 条件及びシステム適合性は、必要に応じて次のように記載する。

36 3.1. ヘッドスペース試料導入装置の操作条件の記載(EP,
37 USP記載の試験法に準じた例)

38 (i) ヘッドスペース装置の操作条件(1)

バイアル内平衡温度	80℃付近の一定温度
バイアル内平衡時間	60分間
注入ライン温度	85℃付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30秒間
試料注入量	1.0mL

39 (ii) ヘッドスペース装置の操作条件(2)

バイアル内平衡温度	105℃付近の一定温度
バイアル内平衡時間	45分間
注入ライン温度	110℃付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30秒間
試料注入量	1.0mL

40 (iii) ヘッドスペース装置の操作条件(3)

バイアル内平衡温度	80℃付近の一定温度
バイアル内平衡時間	45分間
注入ライン温度	105℃付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30秒間
試料注入量	1.0mL

41 3.2. ガスクロマトグラフィーの試験条件及びシステム適合性
42 の記載

43 (i) 操作条件(1) (EP, USPに記載されている試験法の操作
44 Aに準じた例)

45 試験条件

46 検出器：水素炎イオン化検出器
47 カラム：内径0.32mm(又は0.53mm)、長さ30mの
48 フューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ
49 用6%シアノプロピルフェニルメチルシリコ
50 ーンポリマーを厚さ1.8µm(又は3µm)に被覆する。
51 なお、必要ならば、ガードカラムを使用する。
52 カラム温度：40℃を20分間、その後、必要ならば
53 毎分10℃で240℃まで昇温し、240℃を20分間保
54 持する。
55 注入口温度：140℃付近の一定温度
56 検出器温度：250℃付近の一定温度
57 キャリヤーガス：ヘリウム
58 流量：35cm/秒
59 スプリット比：1：5

60 システム適合性

61 システムの性能：標準溶液につき、上記の条件で試
62 験するとき、それぞれのピークの分離度は1.0以
63 上である。(注：被検物質が複数の場合)
64 システムの再現性：標準溶液につき、上記の条件で
65 試験を3回繰り返すとき、被検物質のピーク面積
66 の相対標準偏差は15%以下である。

67 (ii) 操作条件(2) (EP, USPに記載されている試験法の操作
68 Bに準じた例)

69 試験条件

70 検出器：水素炎イオン化検出器
71 カラム：内径0.32mm(又は0.53mm)、長さ30mの
72 フューズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ
73 用ポリエチレングリコール20Mを厚さ
74 0.25µmで被覆する。なお、必要ならば、ガード
75 カラムを使用する。
76 カラム温度：50℃を20分間、必要ならば、その後、
77 毎分6℃で165℃まで昇温し、165℃を20分間保
78 持する。
79 注入口温度：140℃付近の一定温度
80 検出器温度：250℃付近の一定温度

2 医薬品の残留溶媒ガイドライン及び残留溶媒試験法記載例

- 81 キャリヤーガス：ヘリウム
82 流量：35cm/秒
83 スプリット比：1：5
84 システム適合性
85 システムの性能：標準溶液につき、上記の条件で試験
86 するとき、それぞれのピークの分離度は1.0以上
87 である。（注：被検物質が複数の場合）
88 システムの再現性：標準溶液につき、上記の条件で
89 試験を3回繰り返すとき、被検物質のピーク面積
90 の相対標準偏差は15%以下である。
- 91 (iii) 操作条件(3) (USP Other Analytical Procedures
92 Method Iに順じた例)
93 試験条件
94 検出器：水素炎イオン化検出器
95 カラム：内径0.53mm、長さ30mのフェーズドシリ
96 カ管の内面にガスクロマトグラフィー用5%フェ
97 ニルメチルシリコーンポリマーを厚さ約5 μ mに
98 被覆する。なお、必要ならば、内径0.53mm、長
99 さ5mのフェーズドシリカ管の内面にガスクロマ
100 トグラフィー用5%フェニルメチルシリコーンポ
101 リマーを被覆したガードカラムを使用する。
102 カラム温度：35 $^{\circ}$ Cを5分間、その後、毎分8 $^{\circ}$ Cで
103 175 $^{\circ}$ Cまで昇温し、必要ならば、次に毎分35 $^{\circ}$ Cで
104 260 $^{\circ}$ Cまで昇温する。その後、260 $^{\circ}$ Cを16分間保
105 持する。
106 注入口温度：70 $^{\circ}$ C付近の一定温度
107 検出器温度：260 $^{\circ}$ C付近の一定温度
108 キャリヤーガス：ヘリウム
109 流量：35cm/秒
110 スプリット比：スプリットレス
111 システム適合性
112 システムの性能：標準溶液につき、上記の条件で試験
113 するとき、それぞれのピークの分離度は1.0以上で
114 ある。（注：被検物質が複数の場合）
115 システムの再現性：標準溶液につき、上記の条件で試験
116 を6回繰り返すとき、被検物質のピーク面積の相
117 対標準偏差は15%以下である。

1 近赤外吸収スペクトル測定法

2 近赤外吸収スペクトル測定法(NIR)は、被検物質による近赤
3 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
4 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
5 的方法の一つである。

6 近赤外光は、可視光と赤外光の間にあって、通例、750～
7 2500nm(13333～4000cm⁻¹)の波長(波数)範囲の光を指す。近赤
8 外光の吸収は、主として赤外領域(4000～400cm⁻¹)における基
9 準振動の倍音(over-tones)又は結合音(combinations)による振
10 動によって生じ、特に水素原子が関与するO-H, N-H, C-
11 H, S-Hによる吸収が主である。例えば、N-Hの非対称伸縮
12 振動は3400cm⁻¹付近にあるが、その第一倍音による吸収は
13 3400cm⁻¹の2倍弱の6600cm⁻¹(波長1515nm)付近に現れる。

14 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
15 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
16 長波長であることから、光は粉体を含む固体試料中、数mmの
17 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
18 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
19 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
20 ても広く活用されている。

21 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
22 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
23 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
24 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
25 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
26 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
27 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
28 性的又は定量的評価などが行われる。

29 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
30 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
31 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
32 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
33 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
34 おく必要がある。

35 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
36 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
37 的評価を行うことができる。また、結晶形、結晶化度、粒子径
38 など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
39 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
40 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
41 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
42 めの有力な手段としても活用することができる。

43 1. 装置

44 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
45 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
46 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
47 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
48 んどない。

49 1.1. 分散型近赤外分光光度計

50 装置は、光源部、試料部、分光部、測光部、信号処理部、デ
51 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
52 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

53 など、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。
54 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
55 ー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
56 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
57 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
58 バーの材質としては、通例、石英が用いられる。

59 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
60 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
61 ている。分散素子には、プリズム、回折格子、音響光学素子
62 (AOTF)、液晶チューナブルフィルター(LCTF)などがある。測
63 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、
64 半導体検出器(シリコン、硫化鉛、インジウム・ガリウム・ヒ
65 素、インジウム・アンチモンなど)のほか、光電子増倍管も用
66 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
67 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
68 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
69 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
70 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、
71 データ変換、スペクトル解析などを行う。表示・記録・出力部
72 は、データ、分析結果及びデータ処理結果などをプリンターに
73 出力する。

74 1.2. フーリエ変換型近赤外分光光度計

75 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
76 1.1.の分散型装置の構成と同様である。

77 分光測光部は、干渉計、サンプリング信号発生器、検出器、
78 増幅器、A/D変換器などで構成される。干渉計には、マイケ
79 ルソン干渉計、トランセプト干渉計及び偏光干渉計などがある。
80 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、
81 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
82 り吸収スペクトルへ読み替える機能が付与されている。

83 2. 測定法

84 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
85 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
86 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
87 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。

88 2.1. 透過法

89 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
90 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
91 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
92 常の分光学的計測法におけるものと同様である。

$$93 \quad T = 100t$$

$$94 \quad t = I/I_0 = 10^{-\alpha c l}$$

95 *I*₀ : 入射光の強度

96 *I* : 透過光の強度

97 α : 吸光係数

98 *c* : 溶液の濃度

99 *l* : 層長(試料厚さ)

$$100 \quad A = -\log t = \log(1/t) = \log(I_0/I) = \alpha c l$$

101 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
102 ラスセル、フローセルなどに注入し、層長1～5mm程度で測定
103 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、
104 拡散透過法ともよばれる。この場合、試料の粒度、表面状態な

2 近赤外吸収スペクトル測定法

105 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
106 重要となる。

107 2.2. 拡散反射法

108 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
109 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
110 率 $R(\%)$ として表す。近赤外光は、粉体を含む固体試料中、数
111 mmの深さまで侵入し、その過程で透過、屈折、反射、散乱を
112 繰り返し、拡散するが、この拡散光の一部は再び試料表面から
113 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
114 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
115 (A_r)のスペクトルが得られる。

$$116 R=100r$$

$$117 r=I/I_r$$

118 I : 試料から拡散反射する反射光強度

119 I_r : 対照となる物質表面からの反射光強度

$$120 A_r=\log(1/r)=\log(I_r/I)$$

121 また、拡散反射スペクトルの強度表現にはKubelka -
122 Munk(K-M)関数によるものがある。K-M関数は十分な厚さ
123 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
124 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
125 合い(疎密)等により定まる光散乱係数を用いて表される。

126 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
127 に際して、拡散反射装置が必要となる。

128 2.3. 透過反射法

129 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。
130 透過反射率 $T^*(\%)$ を測定する場合、ミラーを用いて試料を透
131 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
132 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。
133 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
134 散反射する粗面を持つ金属板又はセラミック反射板などが用い
135 られる。

136 本法における透過反射吸光度(A^*)は、次式により得られる。

$$137 T^*=100t^*$$

$$138 t^*=I/I_r$$

139 I : 試料が置かれた場合の透過光及び反射光強度

140 I_r : 試料がない場合の反射光強度

$$141 A^*=\log(1/t^*)$$

142 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
143 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
144 する必要があるが、通例、検出器の直線性とSN比が最良とな
145 る吸光度で0.1~2(透過率で79~1%)となるように調節する。
146 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
147 長を持つセルを選択する必要がある。

148 3. スペクトルに影響を与える要因

149 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
150 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
151 て、以下の事項に留意する必要がある。

152 (i) 試料温度: 温度が数℃違くとスペクトルに有意な変化(例
153 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
154 あるか、水分を含む場合、注意する必要がある。

155 (ii) 水分又は残留溶媒: 試料中の水分又は残留溶媒及び測定
156 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
157 る可能性がある。

158 (iii) 試料厚さ: 試料の厚さは、スペクトル変化の要因であり、
159 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、
160 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
161 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
162 するなどの工夫が必要である。

163 (iv) 試料の充てん状態: 固体又は粉体試料の測定においては、
164 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。
165 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
166 充てんするよう注意する必要がある。

167 (v) 試料の光学特性: 物理的、化学的又は光学的に不均一な
168 試料の場合、比較的大きな光束(*beam size*)を用いるか、複数
169 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
170 て、試料の平均化を図る必要がある。また、粉末試料では、粒
171 径、充てんの度合い、表面の粗さなどもスペクトルに影響を与
172 える。

173 (vi) 結晶多形: 結晶構造の変化(結晶多形)もスペクトルに影
174 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
175 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
176 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
177 がある。

178 (vii) 試料特性の時間的変化: 試料は、サンプリング後の時間
179 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
180 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
181 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
182 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
183 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
184 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
185 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
186 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。

187 4. 装置性能の管理^{2, 3)}

188 4.1. 波長(波数)精度

189 装置の波長(波数)の正確さは、吸収ピークの波長(波数)が確
190 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
191 (ジスプロシウム/ホルミウム/エルビウム(1:1:1))又は水
192 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
193 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。

$$194 1200 \pm 1 \text{nm} (8300 \pm 8 \text{cm}^{-1})$$

$$195 1600 \pm 1 \text{nm} (6250 \pm 4 \text{cm}^{-1})$$

$$196 2000 \pm 1.5 \text{nm} (5000 \pm 4 \text{cm}^{-1})$$

197 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
198 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
199 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
200 は1261nm, 1681nm, 1971nmに特徴的な吸収ピークを示す。

201 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
202 し、1155nm, 1417nm, 1649nm, 2352nmの吸収ピークを用
203 いることができる(層長: 1.0mm)。波数分解能の高いフーリエ
204 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
205 ることができる。

206 なお、妥当性が確認できれば、ほかの物質を基準として用い
207 ることもできる。

208 4.2. 分光学的直線性

209 異なる濃度で炭素を含浸させた板状のポリマー(Carbon-
210 doped polymer standards)など適当な標準板を用いて分光学
211 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
212 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
213 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
214 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
215 は両標準板を追加する必要がある。

216 これらの標準板につき、波長1200nm, 1600nm及び
217 2000nm付近の位置における吸光度(A_{OBS})を測定し、この値
218 (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
219 (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
220 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
221 にあることを確認する。

222 4.3. 測光ノイズ(Spectrophotometric noise)

223 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
224 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
225 切な反射率標準板を用いてチェックすることができる。

226 4.3.1. 高フラックスノイズ

227 高い反射率, 例えば, 反射率99%を有する標準板を用いて,
228 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
229 に対しても標準板を使用して行う。1200~2200nmの波長範囲
230 につき、100nm(セグメント)ごとにノイズの平均二乗根(RMS)
231 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
232 値は 0.8×10^{-3} を超えてはならない。

$$233 \quad RMS = \{1/N \cdot \sum (A_i - A_m)^2\}^{1/2}$$

234 N : セグメント当たりの測定点数

235 A_i : セグメントの各測定点における吸光度

236 A_m : セグメントにおける平均吸光度

237 4.3.2. 低フラックスノイズ

238 低い反射率, 例えば, 反射率10%を有する標準板を用いて,
239 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,
240 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
241 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,
242 1200~2400nmの波長範囲につき、100nmごとに RMS を計算
243 するとき、その平均値は 1.0×10^{-3} 以下であり、個々の値は
244 2.0×10^{-3} を超えてはならない。

245 5. 定性又は定量分析への応用

246 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
247 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
248 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
249 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
250 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、
251 通例、多変量解析など、ケモメトリックスの手法を用いてモデ
252 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
253 必要がある。

254 また、ケモメトリックスの手法を用いて分析法を確立しよう
255 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
256 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
257 に、スペクトルの一次若しくは二次微分処理又は正規化
258 (Normalization)などの数学的前処理を行うことは、重要な手
259 順の一つとなる。なお、ケモメトリックスの手法やデータの数

260 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
261 組み合わせる選択する。

262 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
263 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
264 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
265 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
266 定法の特徴に合わせて、下記の事項に留意する。

267 (i) ある分析法で利用しようとする波長(波数)が、与えられ
268 た条件下で分析対象の特性評価のために適しているか。

269 (ii) 試料の取扱い方(例えば、粉末試料の充てんの度合い、充
270 てん圧など)や構成マトリックスなどの変動要因に対して十分
271 な堅牢性を有しているか。

272 (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
273 等の真度及び精度が得られるか。

274 (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
275 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。

276 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
277 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
278 適切な評価手順は用意されているか。

279 (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
280 ほかの装置に移設し(Model Transfer)、共通に利用しようとする
281 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
282 いるか。

283 5.1. 定性分析

284 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
285 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
286 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
287 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
288 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。

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

295 また、近赤外吸収スペクトル全体を一つのパターンとみなし、
296 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
297 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
298 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
299 もできる。

300 5.2. 定量分析

301 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
302 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
303 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
304 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
305 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
306 帰分析法、PLS (Partial least squares)回帰分析法などがある。

307 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
308 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
309 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、
310 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
311 ある(検量線法)。

312 6. 参考資料

313 ¹⁾ 日本工業規格、近赤外分光分析通則JIS K 0134(2002)

4 近赤外吸収スペクトル測定法

- 314 ²⁾ European Pharmacopoeia 5.0(2005), 2.2.40. Near-
315 Infrared Spectrophotometry
316 ³⁾ US Pharmacopeia 30(2007), < 1119 > Near-Infrared
317 Spectrophotometry

1 システム適合性

2 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
3 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
4 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
5 試験法が目的に合う試験結果を与えることをあらかじめ検証す
6 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
7 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
8 験を行う必要がある。

9 1. システム適合性の意義

10 「システム適合性」とは、試験法の適用時に目的に合う試験
11 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
12 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
13 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
14 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。
15 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
16 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
17 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
18 用いて行った品質試験の結果を採用してはならない。

19 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
20 可欠な規定である。この規定は、装置、電子的情報処理系、分
21 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
22 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
23 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
24 ステムとして完結するとの考え方に基づいている。

25 2. システム適合性設定時の留意事項

26 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
27 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
28 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
29 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
30 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
31 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。

32 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
33 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
34 対象物質を特異的に分析しうることを確認)、システムの再現
35 性(繰り返し注入におけるばらつきの程度を確認)、検出の確認
36 (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
37 目について設定する。

38 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
39 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
40 する。

41 2.1. 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
42 システムの再現性について

43 2.1.1. 許容限度値の設定

44 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
45 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」、
46 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
47 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、
48 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
49 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
50 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
51 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
52 値に従う。

53 (i) 原薬の定量法(原薬の含量がほぼ100%、あるいはそれに
54 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
55 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
56 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
57 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
58 い98.0~102.0%の場合のように、5%以下の場合には「1.0%
59 以下」を目安として適切に設定する。

60 (ii) 製剤の定量法:製剤の含量規格の幅、並びに原薬の定量
61 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
62 が用いられている場合)を考慮に入れて、適切に設定する。

63 (iii) 類縁物質試験:標準溶液やシステム適合性試験用溶液な
64 ど、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
65 慮して、適切に設定する。試料溶液を希釈し、0.5~1.0%の有
66 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
67 場合には、通例、「2.0%以下」を目安として適切に設定する。

68 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
69 用しない。

70 2.1.2. システムの再現性の試験の質を落とさずに繰り返し注
71 入の回数を減らす方法

72 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
73 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、
74 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
75 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
76 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
77 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
78 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
79 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
80 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
81 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
82 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
83 することができる。

84 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
85 =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
86 ばらつきの許容限度値を下記の表に示した。

87 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、
88 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
89 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
90 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
91 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*

		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。

92 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)

93 目的に合う試験結果を与えることが検証された試験法と分析

2 システム適合性

94 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
95 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
96 していることを確認すればよい。

97 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
98 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
99 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
100 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
101 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
102 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、
103 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
104 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
105 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
106 る必要がある。

107 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
108 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
109 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
110 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
111 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、
112 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
113 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
114 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
115 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
116 化が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
117 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
118 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。

1 中心静脈栄養剤中の微量アルミニウム試験法

2 中心静脈栄養剤(TPN)は、静脈注射用の栄養剤である。一方、
3 外国において、腎障害を有する患者等におけるアルミニウムの
4 毒性(中枢神経系や骨)発現の問題が指摘されていることから、
5 これらTPN製剤中に混在するアルミニウムに対する微量測定
6 が必要とされるようになってきている。微量アルミニウムの分
7 析法としては、蛍光検出液体クロマトグラフィー(蛍光検出
8 HPLC法)、高周波誘導プラズマ発光分析法(ICP-AES法)及び
9 高周波誘導プラズマ質量分析法(ICP-MS法)が利用できる。
10 蛍光検出HPLC法の検出感度は、約1 μ g/L(ppb)であるが、特別
11 な付属装置を用いたICP-AES法及びICP-MS法を用いる場
12 合、更に高い検出感度を得ることができる。

13 TPNは栄養剤であることから、糖類、アミノ酸類、電解質
14 など、多数の栄養成分を複雑な組成で含有しており、これらの
15 共存成分の測定への影響が無視できないため、それぞれの分析
16 法の採用にあたっては、特別な注意が必要となる。

17 本参考情報では、分離分析法として液体クロマトグラフィー
18 が広く普及している現状を考慮し、TPN中の微量アルミニウム
19 分析法として二種の蛍光性キレート試薬を用いる蛍光検出
20 HPLC法(キノリノール錯体法及びルモガリオン錯体法)につい
21 て記載する。

22 1. キノリノール錯体法

23 試料中のアルミニウムイオンのキノリノール錯体を形成させ、
24 液体クロマトグラフィーの蛍光誘導体化法により試験を行う。

25 1.1. 試料溶液の調製

26 試料(TPN製剤)1mLを正確に量り、水10 μ Lを加えた後、移
27 動相を加えて正確に10mLとし、試料溶液とする。

28 1.2. 検量線作成用標準溶液系列の調製

29 アルミニウム試験用水1mLずつを正確に量り、それぞれに
30 アルミニウム標準溶液(1)~(5)の各標準溶液10 μ Lを正確に加
31 えた後、移動相を加えて正確に10mLとし、検量線作成用標準溶
32 液系列(アルミニウム濃度：0、1.25、2.5、5.0及び10.0ppb)を
33 調製する。

34 1.3. 標準的試験法

35 試料溶液及び検量線作成用標準溶液0.1mLずつを正確にとり、
36 次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、検量線
37 法により、試料溶液中のアルミニウム濃度を求める。

38 試験条件

39 検出器：蛍光光度計(励起波長：380nm、蛍光波長：
40 520nm)

41 カラム：内径4.6mm、長さ15cmのステンレス管に5 μ mの
42 液体クロマトグラフィー用フェニルシリル化シリカゲル
43 を充てんする。

44 カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

45 移動相：8-キノリノールのアセトニトリル溶液(3 \rightarrow 100)
46 /薄めた0.5mol/L酢酸アンモニウム試液(2 \rightarrow 5)混液(1：
47 1)

48 流量：アルミニウム/キノリノール錯体のピークの保持時
49 間が約9分になるように調整する。

50 システム適合性

51 検量線作成用標準溶液系列を用いて作成された検量線の相
52 関係数は0.99以上である。

53 また、上記の変法として移動相中に8-キノリノールを加え
54 ない方法もある。

55 この場合にも、試料溶液の調製の段階で8-キノリノールを
56 加えてアルミニウム/キノリノール錯体を生成させた後、蛍光
57 検出液体クロマトグラフィーを行うが、移動相中にキレート試
58 薬を含まないため、より安定なアルミニウム/キノリノール錯
59 体を生成させておく必要がある。また、蛍光検出のための分析
60 波長が異なることから(励起波長：370nm、蛍光波長：
61 504nm)測定感度にも差異がみられ、検量線の作成は0~25ppb
62 の範囲が適当とされている。その他、カラムサイズ、カラム温
63 度及び移動相も異なるが、試料中の微量アルミニウムの分析が
64 正確かつ再現性よく行えるよう、適切な試験条件を設定する必
65 要がある。

66 2. ルモガリオン錯体法

67 試料中のアルミニウムイオンのルモガリオン錯体を形成させ、
68 液体クロマトグラフィーの蛍光誘導体化法により試験を行う。

69 2.1. 試料溶液の調製

70 試料(TPN製剤)70 μ Lを正確に量り、ルモガリオン塩酸溶液
71 0.15mLを正確に加えた後、アルミニウム試験用pH緩衝液
72 0.6mLを正確に加えて混合する。この液を40 $^{\circ}$ Cで4時間放置し
73 た後、試料溶液とする。

74 2.2. 検量線作成用標準溶液系列の調製

75 アルミニウム標準溶液(1)~(5)の各標準溶液1mLずつを正確
76 に量り、それぞれ薄めたアルミニウム試験用硝酸(1 \rightarrow 100)を加
77 えて正確に100mLとする。これらの液70 μ Lずつを正確に量り、
78 それぞれルモガリオン塩酸溶液0.15mL及びpH7.2のアルミニ
79 ウム試験用緩衝液0.6mLを正確に加えて混合した後、40 $^{\circ}$ Cで4
80 時間放置し、検量線作成用標準溶液系列(アルミニウム濃度：0、
81 1.07、2.13、4.27及び8.54ppb)を調製する。

82 2.3. 標準的試験法

83 試料溶液及び検量線作成用標準溶液0.1mLずつを正確にとり、
84 次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、検量線
85 法により、試料溶液中のアルミニウム濃度を求める。

86 試験条件

87 検出器：蛍光光度計(励起波長：505nm、蛍光波長：
88 574nm)

89 カラム：内径6.0mm、長さ10cmのステンレス管に5 μ mの
90 液体クロマトグラフィー用オクチルシリル化シリカゲル
91 を充てんする。

92 カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

93 移動相：2-プロパノール100mLに薄めたpH5.0の1mol/L
94 酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1 \rightarrow 10)を加えて1000mL
95 とする。

96 流量：アルミニウム/ルモガリオン錯体のピークの保持時
97 間が約5分になるように調整する。

98 システム適合性

99 検量線作成用標準溶液系列を用いて作成された検量線の相
100 関係数は0.99以上である。

101 3. 注意事項

102 (i) 試験で使用する水及びその他の試験用溶媒、試薬、器具
103 などにつき、アルミニウム汚染のできるだけ少ないものを選択
104 するほか、試験室環境の塵埃又はアルミニウム汚染にも注意す
105 る。

106 (ii) 試料の特性が錯体形成に影響を与えないことを確認して

2 中心静脈栄養剤中の微量アルミニウム試験法

- 107 おく必要がある。
- 108 (iii) 日本分析化学会より、アルミニウム濃度既知の金属成分
109 分析用河川水標準物質が有償配布されており、試験法及び試験
110 結果の妥当性を評価するためにこれらの標準物質を用いること
111 ができる。
- 112 4. 標準溶液及び試薬・試液
- 113 本試験には、日本薬局方に規定するもののほか、以下の標準
114 溶液及び試薬・試液を用いる。
- 115 (i) アルミニウム標準溶液 アルミニウム試験用水又はアル
116 ミニウム標準原液の一定量を取り、薄めたアルミニウム試験用
117 硝酸(1→100)を用いて希釈し、アルミニウム濃度0, 1.25, 2.5,
118 5.0及び10ppmのアルミニウム標準溶液(1)~(5)を調製する。
- 119 (ii) アルミニウム試験用水 アルミニウム濃度1ppb以下の水
120 を用いる。
- 121 (iii) アルミニウム試験用硝酸：硝酸。ただし、アルミニウム
122 濃度1ppb以下のものを用いる。
- 123 (iv) アルミニウム試験用緩衝液、pH7.2：*N,N*-ビス(2-ヒ
124 ドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸106.6gをアルミ
125 ニウム試験用水800mLに溶かした後、アルミニウム試験用テ
126 トラメチルアンモニウムヒドロキシドを加えてpHを7.2に調整
127 し、アルミニウム試験用水を加えて1000mLとする。
- 128 (v) *N,N*-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンス
129 ルホン酸： $C_6H_{15}NO_5S$ 白色の結晶又は粉末である。
- 130 (vi) アルミニウム試験用テトラメチルアンモニウムヒドロキ
131 シド溶液： $(CH_3)_4NOH$ アルミニウム試験用に製した約25%
132 水溶液。ただし、アルミニウム濃度10ppb以下のものを用いる。
- 133 (vii) ルモガリオン塩酸溶液：ルモガリオン0.86gを2-プロパ
134 ノール300mLに溶かし、薄めたアルミニウム試験用塩酸(9→
135 50)350mL及びアルミニウム試験用水を加えて正確に1000mL
136 とする。
- 137 (viii) ルモガリオン： $C_{12}H_9ClN_2O_6S$ 赤褐色～暗褐色の粉末
138 である。ただし、アルミニウム濃度1ppm以下のものを用いる。
- 139 (ix) アルミニウム試験用塩酸：塩酸。ただし、アルミニウム
140 濃度1ppb以下のものを用いる。

1 分析法バリデーション

2 分析法バリデーションとは、医薬品の試験法に用いる分析法
3 が、分析法を使用する意図に合致していること、すなわち、分
4 析法の誤差が原因で生じる試験の判定の誤りの確率が許容でき
5 る程度であることを科学的に立証することである。分析法の能
6 力は種々の分析能パラメーターにより表される。提案する分析
7 法の分析能パラメーターが、試験法の規格値などを基にして設
8 定する基準を満たしていることを実証することにより、分析法
9 の妥当性を示すことができる。

10 本文に基づく分析法バリデーションは、日本薬局方に新たに
11 収載する試験法を設定するとき、日本薬局方に収載されている
12 試験法の改正を行うとき及び通則の規定に基づき日本薬局方に
13 収載されている試験法に代わる試験法を設定するとき、これら
14 の試験法で用いる分析法について行う。

1. 分析法を日本薬局方に収載するために必要な資料

1.1. 概要

17 分析法の原理の簡潔な説明、その分析法の必要性、他の分析
18 法と比較したときの利点、バリデーションの要約などを記載す
19 る。分析法を改正する場合には、既存の分析法の限界及び新た
20 に提案する分析法によりもたらされる利点も記載する。

1.2. 分析法

22 分析法を正しく評価できるように、また、必要ならば追試を
23 行って評価できるように、分析法を詳細に記載する。分析法に
24 は、分析の手順、標準試料の調製法、試薬・試液の調製法、留
25 意事項、分析システムが正しく作動していることを検証する方
26 法(例えば、クロマトグラフィーにおける分離効率の検証)、分
27 析結果を導くための式及び測定回数などが含まれる。また、日
28 本薬局方に規定されていない装置又は器具を用いる場合には、
29 それについても詳細に記載する。新たに標準品を規定する場合
30 には、その物質の物理的、化学的又は生物学的な特性値を明ら
31 かにし、試験法を記載する。

1.3. 分析法の妥当性を示す資料

33 分析法が妥当なものであることを立証する資料を示す。本資
34 料は、分析能パラメーターを求めるための実験計画、実験デー
35 タ、計算結果及び検定結果を含む。

2. 分析能パラメーター(Validation characteristics)

37 分析法の妥当性を示すために評価が必要な典型的な分析能パ
38 ラメーターの定義と評価方法の例を次に示す。

39 分析能パラメーターに関する用語と定義は、分析法を適用す
40 る分野により異なる。本文における用語と定義は、日本薬局方
41 の目的に沿って一義的となるように定めたものである。評価方
42 法の項では、分析能パラメーターを評価する方法の概略を示し
43 た。分析能パラメーターを決定する方法は、多数の方法が提唱
44 されており、一般的に受け入れられている方法であれば、どの
45 ような方法を用いて分析能パラメーターを決定しても差し支え
46 ない。しかし、分析能パラメーターの値が決定方法に依存する
47 こともあるので、分析能パラメーターを求めるための実験方法、
48 実験データ及び計算方法は、可能な限り詳しく記述することが
49 必要である。

50 頑健性(Robustness)は、分析法バリデーションで検討する分
51 析能パラメーターには含まれないが、分析法の開発段階で頑健
52 性を検討することにより、分析法を改善し、検討結果を分析法

53 の分析条件又は留意事項に反映させることができる。

2.1. 真度(Accuracy/Trueness)

2.1.1. 定義

56 真度とは、分析法で得られる測定値の偏りの程度のこと
57 真の値と測定値の総平均との差で表される。

2.1.2. 評価方法

59 分析法の真度の推定値は、室内再現精度又は室間再現精度を
60 求めるときに得られる測定値の総平均と真の値との差として表
61 される。標準品の認証値又は合意された値を真の値とする。製
62 剤の分析法の場合には、標準溶液の測定値を合意された真の値
63 とする。

64 また、特異性の高い分析法であることを示すことにより、分
65 析法の偏りが小さいことを推論できる。

66 得られた真度の推定値と室間(内)再現精度から計算される標
67 準誤差の値から、真度の95%信頼区間を計算する。この区間
68 が0を含んでいることを確認するか、又は同区間の上限値及び
69 下限値が分析法に要求される真度の基準の値の範囲内であるこ
70 とを確認する。

2.2. 精度(Precision)

2.2.1. 定義

73 精度とは、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し分
74 析して得られる一連の測定値が、互いに一致する程度のこと
75 であり、測定値の分散、標準偏差又は相対標準偏差で表される。

76 精度は、繰り返し条件が異なる3つのレベルで表され、それ
77 ぞれ、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度という。

78 (i) 併行精度(Repeatability/Intra-assay precision) : 併行
79 精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなど
80 の分析条件を変えずに、均質な検体から採取した複数の試料を
81 短時間内に繰り返し分析するとき(併行条件)の精度である。

82 (ii) 室内再現精度(Intermediate precision) : 室内再現精度と
83 は、同一試験室内で、試験者、試験日時、装置、器具及び試薬
84 のロットなどの一部又はすべての分析条件を変えて、均質な検
85 体から採取した複数の試料を繰り返し分析するとき(室内再現
86 条件)の精度である。

87 (iii) 室間再現精度(Reproducibility) : 室間再現精度とは、試
88 験室を変えて、均質な検体から採取した複数の試料を繰り返し
89 て分析するとき(室間再現条件)の精度である。

2.2.2. 評価方法

91 はじめに、精度を検討するのに十分な量の均質な検体を確保
92 する。溶液は均質な検体である。均質な検体が得られないとき
93 には、例えば、大量の製剤を均質とみなせるまで混合粉砕した
94 検体、又は製剤の配合成分を均質とみなせるまで混合した検体
95 を、均質な検体として用いる。

96 二つ以上のレベルの精度を同時に評価するためには、一元配
97 置などのような適当な実験計画の下に実験を行うとよい。こ
98 のとき、分析法の精度を正しく推定するために、十分な数の繰
99 り返し数、分析条件の水準数及び試験室数を揃える。バリデー
100 トしようとする分析法で、考えられる可能な限りの分析の変動
101 要因について検討する。

102 各レベルの精度の分散、標準偏差、相対標準偏差、分散の
103 90%信頼区間及びこれに対応する標準偏差の区間を示す。分
104 析法に要求される精度の基準の値に照らし合わせ、分析法を採
105 用してもよいことを示す。通例、室間(内)再現精度の値から分
106 析法の採否を決定する。

2 分析法バリデーション

107 2.3. 特異性(Specificity)

108 2.3.1. 定義

109 特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、
110 分析対象物を正確に測定する能力のことで、分析法の識別能力
111 を表す。個々の分析法が特異性に欠ける場合には、別の試験法
112 によりこれを補うこともできる。

113 2.3.2. 評価方法

114 分析法を適用する試験法の目的に応じて、分析法が確実に分
115 析対象物を確認できること、又は分析対象物の量又は濃度を正
116 確に測定できることを確認する。特異性は、例えば、分析対象
117 物のみを含む試料、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産
118 物を含む検体に分析対象物を添加した試料及び分析対象物は含
119 まず、製剤の配合成分、類縁物質若しくは分解産物のみを含む
120 試料などの分析結果を比較することにより評価できる。不純物
121 の標準品が得られない場合には、不純物を含有すると考えられ
122 る試料、例えば、経時変化した試料などを用いることもできる。

123 2.4. 検出限界(Detection limit)

124 2.4.1. 定義

125 検出限界とは、試料に含まれる分析対象物の検出可能な最低
126 の量又は濃度のことであり、検出限界では定量できるとは限ら
127 ない。

128 2.4.2. 評価方法

129 通例、検出限界における消費者及び生産者の危険率が5%以
130 下となるように検出限界を定める。検出限界は、ブランク試料
131 又は検出限界付近の分析対象物を含む試料の測定値の標準偏差
132 及び検出限界付近の検量線の傾きから算出される。例えば、検
133 出限界は、測定値が正規分布し連続な場合には、検出限界付近
134 の検量線の傾き及びブランク試料の測定値の標準偏差から、次
135 式により求めることができる。

$$136 DL=3.3\sigma / slope$$

137 DL : 検出限界

138 σ : ブランク試料の測定値の標準偏差

139 $slope$: 検出限界付近の検量線の傾き

140 クロマトグラフィーの場合には、測定値の標準偏差の代わり
141 にノイズ・レベルを用いることができる。

142 分析法の検出限界が試験の規格値よりも小さいことを確認す
143 る。

144 2.5. 定量限界(Quantitation limit)

145 2.5.1. 定義

146 定量限界とは、試料に含まれる分析対象物の定量が可能な最
147 低の量又は濃度のことであり、定量限界の分析対象物を含む試
148 料の測定値の精度は、通例、相対標準偏差で表して10%であ
149 る。

150 2.5.2. 評価方法

151 定量限界は、ブランク試料又は定量限界付近の分析対象物を
152 含む試料の測定値の標準偏差及び定量限界付近の検量線の傾き
153 から算出される。例えば、定量限界は、測定値が正規分布し連
154 続な場合には、定量限界付近の検量線の傾き及びブランク試料
155 の測定値の標準偏差から、次式により求めることができる。

$$156 QL=10\sigma / slope$$

157 QL : 定量限界

158 σ : ブランク試料の測定値の標準偏差

159 $slope$: 定量限界付近の検量線の傾き

160 クロマトグラフィーの場合には、測定値の標準偏差の代わり
161 にノイズ・レベルを用いることができる。

162 分析法の定量限界が試験の規格値よりも小さいことを確認す
163 る。

164 2.6. 直線性(Linearity)

165 2.6.1. 定義

166 直線性とは、分析対象物の量又は濃度に対して直線関係にあ
167 る測定値を与える分析法の能力のことであり、このとき、必要
168 があれば、分析対象物の量、濃度又は測定値を正確に定義され
169 た数式により変換した値を用いてもよい。

170 2.6.2. 評価方法

171 量(濃度)が異なる分析対象物を含有する試料を用意し、分析
172 法に述べられている手順に従って各試料を繰り返し分析し、測
173 定値を得る。回帰式及び相関係数から直線性を評価する。必要
174 ならば、測定値の回帰式からの残差を分析対象物の量又は濃度
175 に対してプロットし、特定の傾向が観察されないことを確認す
176 る。通例、5種類の量(濃度)が異なる試料を用いる。

177 2.7. 範囲(Range)

178 2.7.1. 定義

179 分析法バリデーションにおける範囲とは、適切な精度及び真
180 度を与える、分析対象物の下限及び上限の量又は濃度に挟まれ
181 た領域のことであり、直線性のある分析法の場合には、適切な
182 精度及び真度を与え、また、直線性が成り立つ分析対象物の下
183 限及び上限の量又は濃度に挟まれた領域のことであり、

184 2.7.2. 評価方法

185 通例、分析法バリデーションにおける範囲は、試験の規格値
186 $\pm 20\%$ 程度でよい。範囲の上限値、下限値及び範囲の中央付
187 近の値の試料について、精度、真度及び直線性を検討する。

188 3. 分析法を適用する試験法の分類

189 試験法は、その目的により以下に示すように大きく三つのタ
190 イプに分類することができる。各タイプの試験法に適用する分
191 析法のバリデーションに、通例、要求される分析能パラメータ
192 を表に示す。これは原則であり、評価が必要な分析能パラメ
193 ータは、分析法の特性や分析法を適用する試験法の目的に依
194 存して変わる。

195 (i) タイプI: 確認試験法。医薬品中の主成分などをその特
196 性に基づいて確認するための試験法。

197 (ii) タイプII: 純度試験法。医薬品中に存在する不純物の量
198 を測定するための試験法。

199 (iii) タイプIII: 医薬品中の成分の量を測定するための試験法。
200 (成分には、安定剤及び保存剤などの添加剤なども含まれる。)

201 溶出試験法のように、有効性を測定する試験法。

3 分析法バリデーション

表 試験法のタイプと検討が必要な分析能パラメーター

タイプ 分析能 パラメーター	タイプ I	タイプ II		タイプ III
		定量試験	限度試験	
真度	—	+	—	+
精度				
併行精度	—	+	—	+
室内再現精度	—	—*	—	—*
室間再現精度	—	+*	—	+*
特異性**	+	+	+	+
検出限界	—	—	+	—
定量限界	—	+	—	—
直線性	—	+	—	+
範囲	—	+	—	+

— 通例評価する必要がない。

+ 通例評価する必要がある。

* 分析法及び試験法が実施される状況に応じて、室内再現精度又は室間再現精度のうち一方の評価を行う。日本薬局方に採用される分析法のバリデーションでは、通例、後者を評価する。

** 特異性の低い分析法の場合には、関連する他の分析法により補うこともできる。

202 4. 分析法バリデーションで用いられる用語

203 (i) 頑健性(Robustness)：頑健性とは、分析条件を小さい範
204 囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力の
205 ことである。反応液のpH、反応の温度、反応時間又は試薬の
206 量などの分析条件を適当な範囲で変化させ、測定値の安定性を
207 検討する。測定値が分析条件に対して不安定な場合には、安定
208 な測定値が得られるように分析法に改良を加える。また、頑健
209 性の結果は、最終的な分析法において分析条件を示す数値の有
210 効数字又は留意事項として反映させる。

211 (ii) 試験室：試験室とは、試験を行う部屋、施設を意味する。
212 本分析法バリデーションでは、試験室を変えるということは、
213 試験者、装置及び試薬ロットなどの分析条件が変化することを
214 意味する。

215 (iii) 試験法：試験法とは、一般試験法及び医薬品各条におけ
216 る試験方法、例えば、純度試験、定量法などを意味する。試験
217 法には、試料の採取方法、規格値、分析法などが含まれる。

218 (iv) 生産者危険：規格を満たしている製品が、試験を行うこ
219 とにより、誤って不合格と判断される確率のこと。通例、 α
220 で表す。第一種の過誤ともいい、限度試験の場合には偽陽性率
221 に相当する。

222 (v) 消費者危険：規格外の製品が、試験を行うことにより、
223 誤って合格と判断される確率のこと。通例、 β で表す。第二種
224 の過誤ともいい、限度試験の場合には偽陰性率に相当する。

225 (vi) 測定回数：分析法の手順の中に含まれる回数。分析法の
226 精度を上げるために、分析法の中であらかじめ測定回数を2回
227 以上に指定することがある。分析法バリデーションでは、分析
228 法の中で定められた測定回数も含めた分析法を評価する。

229 分析法の精度を評価するために繰り返し分析を行うときの繰
230 り返し数とは別のものである。

231 (vii) 測定値：1回の分析により得られる1個の値。

232 (viii) 分析法：本文が対象としている分析法は、試料中に存在
233 する分析対象物の量又は濃度に依存する測定値を与える分析法
234 及び確認試験に用いられる分析法である。本文における分析法
235 とは、試験法の分析過程を意味する。

1 誘導結合プラズマ発光分光分析法

2 誘導結合プラズマ(ICP : Inductively Coupled Plasma)発光
3 分光分析法は、高周波誘導結合法により得られるアルゴンプラ
4 ズマ中に試料を噴霧導入し、高温の熱エネルギーにより励起さ
5 れた原子による発光スペクトル(原子発光スペクトル)の波長及
6 び強度を測定して、元素の同定や定量分析を行う方法である。

7 本法で用いられるアルゴンプラズマは、通例、励起温度6000
8 ~8000K、電子密度約 10^{15} cm^{-3} の特性を有する。

9 原子に外部から高エネルギーを与えると、最外殻電子が軌道
10 遷移を起し、励起状態になる。この励起状態の原子は、基底
11 状態に戻る際に励起によって得られたエネルギーを光として放
12 出する。このとき発生する光は、各元素に固有の振動数 ν 又は
13 波長 λ を持っており、 h をプランクの定数、 c を光速とすれ
14 ば、そのエネルギー ΔE は、次式により表される。

$$15 \quad \Delta E = h\nu = hc/\lambda$$

16 最外殻電子の軌道遷移のエネルギー準位と放出エネルギーの
17 組合せは、多数あることから、通常、一つの元素からの発光線
18 の数も強弱合わせると数多くある。ただし、紫外・可視領域に
19 あって、元素の定性・定量分析に必要な検出感度を有する発光
20 線は、限定される。原子発光スペクトルは、各元素に固有の振
21 動数又は波長を示すことから、分光器により分散されるこのス
22 ペクトルの波長を解析することにより、試料中に含まれる各元
23 素を同定することができる。また、このスペクトル線の強度か
24 ら、試料中の各元素の定量分析を行うことができる。

25 ICP発光分光分析法の特長は、以下のようにまとめられる。

- 26 (i) 多くの元素について、微量分析が可能なこと
- 27 (ii) プラズマの点灯状態が安定であることから、分析精度
28 がよいこと
- 29 (iii) 検量線の直線範囲が4~5桁と広いこと
- 30 (iv) 多元素同時分析が可能であること
- 31 (v) 化学的干渉による妨害がほとんどないこと

32 ICP発光分光分析法で最大の問題は、高温のプラズマ中で試
33 料を原子化・励起させるため、各元素が多数の発光線を与える
34 ことになり、目的元素の分析を妨害する分光干渉(spectral
35 interference)を生じることである。したがって、分光干渉をど
36 のように抑制するか、又はどのように適切な補正を行うかが、
37 正確な分析値を得る鍵となる。

38 本法は、原薬又は製剤中の無機性不純物又は共存元素に対す
39 る特異的な微量成分の分析法として、また生薬又は生薬関連製
40 剤の金属残留物の分析法として優れており、アルカリ・アルカ
41 リ土類金属、重金属類だけでなく、医薬品の安全性を確保す
42 るために適切な管理が必要とされる多くの元素に対する定性・定
43 量分析が可能である。また、多数の元素の同時分析が可能なこと
44 から、金属元素など、無機性不純物のプロファイル分析を行
45 うことにより、原薬などの品質確保を図ることができる。

46 本参考情報では、誘導結合プラズマ(ICP)中に導入された金
47 属元素などの原子発光スペクトル(AES : Atomic Emission
48 Spectra)を分光分析の手法により検出する方法(ICP-AES)を
49 記載した。別に、ICPはよい励起源であると共に、よいイオン
50 源でもあることから、ICPを質量分析法(MS)のイオン源とす
51 る誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)があり、これを利
52 用することもできる。

53 1. 装置

54 1.1. 装置構成

55 装置は、励起源部、試料導入部、発光部、分光部、測光部及
56 びデータ処理部で構成される。

57 励起源部は、発光部に電気エネルギーを供給・制御するため
58 の高周波電源、制御回路及びガス供給部からなる。試料導入部
59 は、試料溶液を発光部に導入する部分で、試料を霧化するネブ
60 ライザー及び噴霧室(スプレーチャンバー)などから構成される。
61 発光部は、試料中の分析対象元素を原子化・励起・発光させ
62 るための部分で、トーチ及び高周波誘導コイルからなる。トーチ
63 は、三重管構造をしており、中心の管から試料が導入される。
64 プラズマの生成及び試料溶液を移送するためのガスとしてアル
65 ギンガスを用いる。発光部から放射される光の観測方式には、
66 プラズマの側面の光を観測する横方向観測方式及びプラズマの
67 中心の光を観測する軸方向観測方式がある。

68 分光部は、発光部から放射された光をスペクトル線に分離す
69 るための部分で、集光系及び回折格子などの光学素子からなる。
70 分光器には、波長走査形分光器(モノクロメーター)と波長固定
71 形の同時測定形分光器(ポリクロメーター)がある。なお、
72 190nm以下の真空紫外領域のスペクトル線を測定する場合、
73 分光器内は、真空排気を行うか、アルゴンガス又は窒素ガスに
74 より、空気を置換する必要がある。

75 測光部は、入射した光をその強度に応じた電気信号に変換す
76 る部分であり、検出器及び信号処理系からなる。検出器として
77 は、光電子増倍管又は半導体検出器が用いられる。

78 データ処理部は、データ処理を行い、検量線及び測定結果な
79 どを表示する。表示にはディスプレイ装置、プリンターなどが
80 使用される。

81 1.2. 付属装置

82 1.2.1. 超音波ネブライザー

83 試料溶液を、超音波振動子(圧電素子)により霧化した後、加
84 熱・冷却することで脱溶媒し、キャリアガスによって発光部
85 に導入するための装置であり、これにより試料の導入効率を高
86 めることができる。

87 1.2.2. 水素化物発生装置

88 試料溶液中のヒ素、セレン、アンチモンなどの化合物を水素
89 化ホウ素ナトリウムなどにより揮発性の水素化物に還元後、気
90 液の分離を行い、気体状態にある水素化物のみをキャリアガ
91 スにより、発光部に導入するための装置である。通常のネブ
92 ライザーに比較して、試料の導入効率を高めることができる。

93 2. 試料の前処理

94 医薬品原薬などの有機物試料は、通例、乾式灰化法又は湿式
95 分解法により有機物を灰化又は分解した後、残留物を少量の硝
96 酸又は塩酸に溶かして試料溶液を調製する。別に生薬など難分
97 解性試料の場合、密閉式の加圧容器中、マイクロ波分解装置を
98 用いて分解することもできる。

99 なお、試料を水又は適当な溶媒に溶解させることができる場
100 合、単に希釈又は溶解することにより、試料溶液とすることが
101 できる。ただし、この方法により正しく分析できることをあら
102 かじめ灰化法又は分解法のいずれかを用いて検証しておく必要
103 がある。

104 2.1. 希釈・溶解法

105 医薬品各条に規定した量の試料を採り、水又は規定の溶媒を
106 用いて単に希釈するか、又は規定した量の水又は溶媒に溶かし、

107 試料溶液とする。

108 2.2. 乾式灰化法

109 強熱残分試験法を準用し、医薬品各条に規定した量の試料を
110 るつばに採り、少量の硫酸で湿潤した後、低温で徐々に加熱し
111 て、試料を完全に炭化する。冷後、少量の硫酸で潤して徐々に
112 加熱し、更に400~600℃で強熱して、残留物を灰化する。残
113 分に少量の硝酸又は塩酸を加えて加熱溶解し、試料溶液とする。
114 別に重金属試験法第3法を準用し、硫酸で試料を湿潤するこ
115 となく、単に強熱して灰化することもできる。この場合、開放
116 系での加熱分解・灰化であるため、水銀など低沸点元素の揮散
117 に注意する必要がある。

118 2.3. 湿式分解法

119 医薬品各条に規定した量の試料をビーカー又はフラスコに採
120 り、硝酸又は硫酸若しくはこれらの混液を加え、加熱分解する。
121 必要ならば、酸化補助剤として過酸化水素などを用いることが
122 できる。残分に少量の硝酸又は塩酸を加えて加熱溶解し、試料
123 溶液とする。

124 湿式分解は、開放系又は密閉系のいずれでも行うことができ
125 る。密閉系であれば、例えば、ステンレス製外筒付きのポリテ
126 トラフルオロエチレン製耐圧分解容器を用い、高温高压下での
127 加熱分解とすることもできる。ただし、密閉系での加熱分解法
128 を用いる場合、爆発や液漏れなどに十分注意する必要がある。
129 2.4. マイクロ波分解法

130 医薬品各条に規定した量の試料を密閉式の加圧容器に採り、
131 通例、適量の硝酸を添加後、マイクロ波分解装置を用いて加
132 熱分解する方法である。高温高压下での分解操作となるため、
133 試料及び酸の量を考慮して、加圧容器内の温度及び圧力を適切
134 に制御することが望ましい。

135 前処理法は、試料及び分析対象元素の特性に応じて適宜、選
136 択するものとするが、開放系で灰化又は分解処理を行う場合、
137 目的元素の揮散による損失、操作環境などからの汚染に特に注
138 意する必要がある。また、分解又は灰化後の残留物を加熱溶解
139 して試料溶液を調製する場合、必要があれば、孔径1µmのメ
140 ンブランフィルターを用いてろ過する。

141 3. 操作法

142 3.1. 分光器の性能評価

143 3.1.1. 波長校正

144 波長校正は、各装置に特有な方法があることから、それぞれ
145 に指示された方法・手順に従って、適切に実施する必要がある。
146 例えば、複数の元素を含む標準溶液を用いる方法、水銀ランプ
147 の輝線を用いる方法、アルゴンの発光線を用いる方法などがあ
148 る。

149 3.1.2. 波長分解能

150 波長分解能は、通例、特定元素の分析線スペクトルの半値幅
151 が一定値(nm)以下として規定される。低波長側から高波長側
152 まで、通例、ヒ素As(193.696nm)、マンガンMn(257.610nm)、
153 銅Cu(324.754nm)及びバリウムBa(455.403nm)の発光線が選
154 択される。各発光線について、どのような半値幅を規定するか
155 は、装置及び分光器の特性により異なるので、それぞれの特性
156 に応じて適切な半値幅を規定しておく必要がある。

157 ただし、半導体検出器を用いた同時測定形装置においては、
158 これを必要事項とはしない。

159 3.2. 試料溶液及び標準溶液の調製

160 医薬品原薬、製剤又は生薬などは、「2.試料の前処理」記載

161 のいずれかの方法を用いて前処理し、それぞれの試料溶液を調
162 製する。通例、試料溶液は希釈硝酸溶液とするが、塩酸を用い
163 ることもできる。

164 標準溶液は、日本薬局方又は日本工業規格(JIS)で規定する
165 標準液がある場合、それらの一定量を取り、ICP分析用水を用
166 いて規定された濃度に希釈し、調製する。日本薬局方又はJIS
167 で規定する標準液がない場合、公的機関又は学術団体などによ
168 り濃度の確認された標準物質をその適用範囲内で使用する。分
169 析対象元素についての標準液が入手できない場合には、分析対
170 象の一元素又は複数元素の検量線用標準溶液として、純度
171 99.99%以上の金属又は対象元素を含む化合物を溶解して調製
172 する。複数元素を含む標準溶液を調製する場合、沈殿を生じな
173 いような試液及び元素の組合せを選択することのほか、分析対
174 象元素の分析線に対して、分光干渉が生じないような組合せと
175 する必要がある。

176 3.3. 操作条件の最適化

177 操作条件は、通例、次による。

178 装置は、15~30分の暖機運転により、プラズマを安定させ
179 た後、操作条件の最適化を図る。高周波出力は0.8~1.4kW、
180 アルゴンガスの流量は、冷却ガス10~18L/分、補助ガス0~
181 2L/分、キャリアーガス0.5~2L/分とする。プラズマの測定位
182 置は、横方向観測方式の場合、誘導コイルの上端より10~
183 25mmの範囲であり、溶液の吸い上げ量は0.5~2mL/分とす
184 る。一方、軸方向観測装置の場合は、測定される発光強度の最
185 大値が得られるように光軸の調整を行う。また、積分時間は、
186 測定される発光強度の安定性を考慮し、1~数十秒の範囲内で
187 設定する。

188 分析対象元素の分析線は、表1に示した発光線を第一選択と
189 する。ただし、分析対象元素の濃度が高すぎる場合、試料溶液
190 を希釈するか、又は想定される元素濃度を考慮して適切な分析
191 線を選択する。また、共存成分による各種の分光干渉がある場
192 合、干渉のない別の分析線を選定する。

193 本試験を医薬品各条で規定する場合、分析線(nm)、高周波
194 出力(kW)、アルゴンガス流量(L/分)など、必要な試験条件を記
195 載するものとするが、分析線を除くすべての試験条件は参考値
196 であり、それぞれの装置及び観測方式などにより、それらの最
197 適化を図る必要がある。

表1 各種元素の代表的な発光線 (nm)

Al	396.153	Fe	259.940	Os	225.585	Sn	189.980
As	193.759	Hg	184.950	Pb	220.351	Sr	407.771
B	249.773	In	230.606	Pd	340.458	Tl	276.787
Ba	455.404	Ir	224.268	Pt	214.423	V	309.311
Be	313.042	Li	670.784	Rb	780.023	W	207.911
Cd	214.438	Mg	279.553	Rh	233.477	Zn	213.856
Co	228.616	Mn	257.610	Ru	240.272		
Cr	205.552	Mo	202.030	Sb	206.833		
Cu	324.754	Ni	221.647	Se	196.090		

198 3.4. 水及び試薬類

199 本試験に用いる水及び試薬類は、次による。

200 (i) 水は、次に規定するICP分析用水を用いる。

201 ICP分析用水：導電率1µS・cm⁻¹(25℃)以下の水とする。な
202 お、その水に含まれる不純物が分析対象元素に干渉しな
203 いことを確認しておく必要がある。

204 (ii) 試薬類は、試験を妨害する物質又は元素を含まないな

3 誘導結合プラズマ発光分光分析法

205 ど、適切な品質のものを用いる。
206 (iii) アルゴンガスは、次に規定するものを用いる。
207 アルゴンガス：JIS K 1105に規定する純度99.99vol%以
208 上のもの。液化アルゴン又は圧縮アルゴンのいずれを用
209 いてもよい。

210 3.5. 操作手順

211 常時通電されている部分に異常がないことを確認した後、装
212 置本体及び周辺機器の電源スイッチを入れる。アルゴンガスを
213 所定の流量に設定した後、高周波電源を入れ、プラズマを点灯
214 する。安定したプラズマ状態が得られていることを確認した後、
215 医薬品各条に規定された方法で調製した試料溶液及び標準溶液
216 などを導入し、定められた分析線における発光強度を測定する。
217 また、確認又は同定のための定性的な試験を行う場合、分析対
218 象元素について、定められた複数の分析線が含まれる波長範囲
219 で発光スペクトルを測定する必要がある。

220 なお、真空分光器を用いて真空紫外域の発光線を測定する
221 場合には、発光部と分光部の間の光軸をアルゴンガス又は素素
222 ガスにより十分に置換しておく。

223 4. システム適合性

224 本法を用いて金属元素などの限度試験又は定量試験を行うと
225 き、あらかじめ次に規定するシステム適合性試験を行って、装
226 置の稼働性能が適切であることを確認しておく必要がある。た
227 だし、定量試験においては、「4.1.検出の確認及び直線性の評
228 価」は不要である。

229 4.1. 検出の確認及び直線性の評価

230 金属元素などの限度試験において、試料の前処理法が規定さ
231 れるとき、分析対象元素の規格限度値が、試料溶液中でどのよ
232 うな濃度($\mu\text{g/mL}$)に相当するか、推定することができる。試料
233 溶液中における分析対象元素の10~20倍を標準溶液の濃度と
234 し、3.2.に基づき分析対象元素の標準溶液を調製する。次に、
235 標準溶液の1/10濃度の希釈溶液を調製し、これをシステム適
236 合性試験用溶液とする。

237 分析対象元素の標準溶液及びシステム適合性試験用溶液につ
238 き、各装置により最適化された試験条件の下で、ICP発光スペ
239 クトルを測定し、以下のことを確認する。システム適合性試験
240 用溶液につき、定められた波長位置に分析対象元素のスペクト
241 ルが明確に観察され、その発光強度は、標準溶液の発光強度に
242 希釈率を乗じて計算される理論発光強度に対して一定範囲内
243 (例えば、80~120%)にあることを確認する。

244 4.2. システムの再現性

245 4.1.項で規定される分析対象元素の標準溶液につき、各装置
246 により最適化された試験条件の下で、試験を6回繰り返すとき、
247 分析対象元素の発光強度の相対標準偏差は一定値以下(例えば、
248 3.0%以下)であることを確認する。

249 ただし、定量試験においては、医薬品各条において規定され
250 る検量線用標準溶液の一つを適宜、選択して本試験を行うもの
251 とする。

252 5. 干渉とその抑制又は補正

253 ICP発光分光分析法における干渉とは、測定に際して、共存
254 成分又はマトリックスが測定結果に影響を与えることの総称で
255 あり、その要因としては、以下のようなことが想定される。
256 種々の干渉を大別すると、物理干渉及びイオン化干渉などの非
257 分光干渉と分光干渉があるが、適切な抑制法又は補正法の適用
258 により、その影響を排除又は軽減することができる。

259 5.1. 物理干渉

260 試料溶液と検量線用標準溶液の粘性、密度、表面張力などの
261 物理的性状が異なる場合、発光部への試料の噴霧効率に差異が
262 生じることから、測定結果がその影響を受けることを物理干渉
263 という。この種の干渉の影響を排除又は軽減するためには、干
264 渉の生じない程度まで試料溶液を希釈すること、試料溶液と検
265 量線用標準溶液の液性とをできるだけ一致させること(マトリ
266 ックスマッチング法)のほか、定量法として内標準法(強度比法)
267 又は標準添加法の適用もその有力な補正法となる。

268 5.2. イオン化干渉

269 イオン化干渉は、試料溶液中に高濃度の共存元素が存在する
270 場合、それらの元素のイオン化により発生する電子により、プ
271 ラズマ内の電子密度が増加し、イオン化率が変化することによ
272 る影響を指す。イオン化干渉に対する抑制法又は補正法は、基
273 本的には5.1.物理干渉の場合と同様である。別に、光の観測方
274 式、観測高さ、高周波出力及びキャリアーガス流量などの選択
275 及び調節により、イオン化干渉の少ない測定条件を確保するこ
276 とができる。

277 5.3. 分光干渉

278 分光干渉は、分析対象元素の分析線に種々の発光線や連続ス
279 ベクトルが重なり、分析結果に影響を及ぼすことを指す。分光
280 干渉の原因とその補正につき、以下に示す。

281 5.3.1. 他の元素の発光線による干渉とその補正

282 この干渉は、試料溶液中に含まれる共存元素の発光線が分析
283 対象元素の分析線に近接する波長を持つ場合に生じる。干渉の
284 度合いは、分光器の分解能、二つの発光線の波長差及び強度比
285 によって決まる。この干渉を回避するためには、分光干渉を受
286 けない別の分析線を選択する必要があるが、適当な分析線が得
287 られない場合、分光干渉補正を行う必要がある。

288 元素間干渉補正は、分光干渉補正の一方法である。あらかじ
289 め既知濃度の二元素系又は多元素系の標準試料を用いて、分析
290 線に及ぼす共存元素の影響を発光強度又は濃度の関数として測
291 定しておけば、分析対象元素を測定するとき、共存元素を同時
292 に測定することにより、分析線の発光強度又は濃度に対するそ
293 の影響を推定することができる。別にマトリックスマッチング
294 法又は分析対象元素の分析線に重なる共存元素のスペクトルを
295 数学的にスペクトル分離する方法などがある。

296 5.3.2. バックグラウンドの増加による干渉とその補正

297 試料中に高濃度で含まれる元素の発光線によりバックグラウ
298 ンドが増加し、分析対象元素の分析線の発光強度に影響を与え
299 る干渉をいう。この場合、次のような補正を行うことで、この
300 影響を除去することができる。この補正法は、分析線の前後の
301 波長位置におけるバックグラウンドの挙動から、分析線の波長
302 位置でのバックグラウンドの大きさを推定し、これを差し引く
303 ことで分析対象元素による真の発光強度を求めようとする方法
304 である。

305 なお、有機物試料の前処理が不十分な場合、試料溶液中のN、
306 O、H、Clに起因する分子バンドスペクトル(NO、OH、NH、
307 CHなど)が分析対象元素の分析線に近接し、干渉することがあ
308 る。この場合、光の観測方式、観測高さ、高周波出力及びキャ
309 リヤーガスの流量などの選択及び調節により、干渉の少ない測
310 定条件を確保することができる。

311 6. 定性及び定量分析

312 6.1. 定性分析

313 6.1.1. 金属元素など、無機性不純物の確認又は同定

314 日本薬局方における原薬の確認試験においては、通例、スペ
315 クトル分析などにより、その特性を全体的に捉えて確認する手
316 法が用いられる。別に分子中にC, H, O以外の元素、例えば、
317 N, S, P, ハロゲン元素及び金属などの特異元素が含まれる
318 ことが多いが、これらの存在がスペクトル分析などで確認でき
319 ない場合、化学反応を利用して、個別にそれらの元素の含有を
320 確認することとされている。本法は、窒素(N)を除くこれら特
321 異元素の確認又は同定法の一つとして用いることができる。

322 試料溶液中に含まれる、これら特異元素由来の複数の発光線
323 の波長及び相対的な発光強度が、標準溶液中に含まれるこれら
324 特異元素の発光線の波長及び相対的な発光強度に一致するとき、
325 これら特異元素の含有を確認することができる。なお、標準溶
326 液に替えて、各装置に付属のライブラリー又は学術団体などに
327 より提供される原子発光スペクトルの波長表などを利用するこ
328 ともできる。

329 6.1.2. プロファイル分析

330 試料中に不純物として混在が想定される金属触媒、無機元素
331 及び安全性の観点より常時監視しておく必要のあるヒ素、鉛な
332 どの分析対象元素を定め、原薬の製造管理の一環として、これ
333 ら分析対象となる無機性不純物のプロファイル分析を行うこと
334 ができる。

335 各元素の分析線は、表1を参考に選択するものとするが、分
336 光干渉などにより支障がある場合、各元素に固有な他の適当な
337 発光線を用いることもできる。各元素標準溶液は、別途定めら
338 れる各元素の許容限度値を考慮して、適切な濃度に調製するこ
339 ととする。ただし、複数元素標準溶液を調製する場合、共沈な
340 どが生じないことを、あらかじめ確認しておく必要がある。

341 分析対象元素の確認は、6.1.1.に従って行うこととし、別に、
342 各元素の分析線における試料溶液及び標準溶液の発光強度の比
343 より(1点検量法)、試料中の各元素の混在量を推定することが
344 できる。

345 6.2. 定量分析

346 試料中の無機性不純物の定量的評価は、一定時間の積分によ
347 って得られた発光強度から、通例、次のいずれかの方法により
348 行う。

349 6.2.1. 検量線法

350 分析対象元素について、4種類以上の異なる濃度の検量線用
351 標準溶液を調製する。この検量線用標準溶液を用い、分析線に
352 おける発光強度と濃度との関係を作図し、検量線とする。この
353 検量線を用いて発光強度に対応する試料溶液中の分析対象元素
354 の濃度を求める。

355 6.2.2. 内標準法

356 一定濃度の内標準元素を含み、分析対象元素について、4種
357 類以上の異なる濃度の検量線用標準溶液を調製する。内標準元
358 素としては、通例、イットリウム(Y)が用いられる。この検量
359 線用標準溶液を用い、内標準元素に対する分析対象元素の発光
360 強度比と濃度との関係を作図し、検量線とする。試料溶液の調
361 製に際しても、検量線用標準溶液中の濃度と同一となるように
362 内標準元素を添加する。この検量線を用いて、内標準元素に対
363 する分析対象元素の発光強度比に対応する試料溶液中の分析対
364 象元素の濃度を求める。

365 なお、本法の適用にあたっては、添加する内標準元素が試料
366 中に含まれないことを確認しておく必要がある。また、内標準
367 元素としては、測定条件や溶液の液性などによる発光強度の変
368 化が、分析対象元素と類似していること、及び分析線に対して
369 分光干渉を生じない発光線を選択する必要がある。

370 6.2.3. 標準添加法

371 同量の試料溶液を4個以上とり、分析対象元素を添加しない
372 もの、及び分析対象元素を3種類以上の異なる濃度で添加し、
373 検量線用標準溶液を調製する。この検量線用標準溶液を用い、
374 分析線における発光強度と濃度との関係を作図し、得られる回
375 帰直線の横軸(濃度)切片より、試料溶液中の分析対象元素の濃
376 度を求める。

377 ただし、この方法は、分光干渉がないか、又はバックグラウ
378 ンド及び分光干渉が正しく補正され、かつ発光強度と濃度の関
379 係が良好な直線性を保つ場合にのみ適用できる。

380 参考資料

381 ¹⁾ 日本工業規格、発光分光分析通則JIS K 0116(2003)、日本
382 規格協会

383 ²⁾ US Pharmacopeia 31(2008)、〈730〉 PLASMA
384 SPECTROCHEMISTRY

385 ³⁾ European Pharmacopeia 6.0(2008)、2.2.57
386 INDUCTIVELY COUPLED PLASMA-ATOMIC
387 EMISSION SPECTROMETRY

388 ⁴⁾ 日本分析化学会編、分析化学データブック、pp.88-
389 90(2004)、丸善

390 ⁵⁾ European Medicines Agency : *Guideline on the*
391 *specification limits for residues of metal catalysts or*
392 *metal reagents(2008)*

1 固体又は粉体の密度

1 固体又は粉体の密度

2 集合体としての固体又は粉体の密度は、粒子間及び粒子内部
3 に存在する微細な空隙部分の体積の評価方法により、異なる定
4 義がなされ、それぞれ異なる数値が与えられ、かつ実用上の意
5 味も異なる。通常、固体又は粉体の密度は三つのレベルで定義
6 される。

7 (1) 結晶密度 空隙のない均一系とみなされ、真密度とも称
8 される。

9 (2) 粒子密度 開口部のない空隙、又は気体により置換され
10 ない粒子内細孔も固体又は粉体の体積として評価される。

11 (3) かさ密度 粉体層内に形成される空隙部分も固体又は粉
12 体の体積として評価されることから、みかけ密度とも称
13 される。通常、疎充てん時の粉体の密度をかさ密度、タ
14 ップ充てん時の密度をタップ密度と定義される。

15 一般に、液体や気体の密度は温度と圧力のみに依存するが、
16 固体又は粉体の密度は分子又は粒子の集合状態に依存する。し
17 たがって、固体又は粉体の密度は、当該物質の結晶構造、結晶
18 化度によって変化することはもちろんであるが、試料が非晶質
19 であるか、その一部が非晶質である場合、試料の調製法又は処
20 理法によって変化する。したがって、二つの固体又は粉体が化
21 学的には同一物質であっても、それらの固体構造が違えば、異
22 なる密度を与える。固体又は粉体粒子の密度は、粉末状医薬品
23 及び医薬品原料の重要な物理的特性であることから、日本薬局
24 方では、粒子密度は「粉体の粒子密度測定法」、かさ密度は
25 「かさ密度及びタップ密度測定法」として、それぞれの密度測
26 定法を規定している。

27 固体又は粉体の密度は、単位体積当たりの質量(kg/m^3)であ
28 り、通例、 g/cm^3 で表す($1\text{g}/\text{cm}^3=1000\text{kg}/\text{m}^3$)。

29 結晶密度(Crystal Density)

30 ある物質の結晶密度とは、分子の充てん配列(molecular
31 packing arrangement)の基本部分(fundamental part)に属さ
32 ない、すべての空隙を除いた単位体積当たりの平均質量である。
33 これはその物質の特定の結晶構造に固有な特性であり、測定法
34 に依存しない。結晶密度は、計算又は簡単な測定によって求め
35 ることができる。

36 A. 計算による結晶密度は、以下の方法によって求められる。

37 1) 例えば、単結晶のX線回折データ又は粉末X線回折デー
38 タの指標化によって得られる結晶学的データ(体積と
39 単位格子の組成)

40 2) 当該物質の分子量

41 B. 測定による結晶密度は、単結晶の質量と体積の測定により、
42 その比(質量/体積)として与えられる。

43 粒子密度(Particle Density)

44 粒子密度は、結晶密度に加えて粒子内の空隙(粒子内部の閉
45 じた空隙、及び開口部はあるが気体が浸入できない空隙)も粒
46 子体積の一部と評価して求められる密度である。すなわち、粒
47 子密度は測定された体積に依存するが、体積の評価は測定法に
48 依存する。粒子密度の測定は、気体置換型ピクノメーター法に
49 よるか又は水銀圧入法によるが、日本薬局方では「粉体の粒子
50 密度測定法」として、ピクノメーター法を規定している。

51 A. ピクノメーター法による密度は、気体置換型ピクノメータ
52 ーを用いて、質量既知の粉体の体積を置換された気体の体

53 積に等しいものと評価することにより求める。ピクノメー
54 ター法による密度の測定においては、気体の浸入が可能な
55 開孔部のある空隙は粉体の体積とみなされないが、気体が
56 浸入できない密閉状態にある空隙は粉体の体積の一部とみ
57 なされる。ヘリウムは拡散性が高く、開孔部のあるほとん
58 どの空隙に浸入できるため、粒子密度測定用気体として推
59 奨される。したがって、細かく粉砕された粉体のピクノメ
60 ーター法による粒子密度は、一般には結晶密度とあまり違
61 わない。このため、この方法による粒子密度は、非晶質又
62 は部分的に結晶性である試料の真密度の最良の推定値とみ
63 なされ、製造工程中にある医薬品粉末の製造管理に広く役
64 立てることができる。

65 B. 水銀圧入法による粒子密度は、顆粒密度とも呼ばれる。こ
66 の方法を用いて測定される体積も、密閉状態にある空隙は
67 固体又は粉体の体積の一部とみなされるが、ある限界的な
68 大きさ以上の開孔部のある空隙は固体又は粉体の体積には
69 含まれない。この限界空隙径(pore size limit)、すなわち
70 最小浸入径(minimal access diameter)は、測定中に加え
71 られた水銀の最大浸入圧に依存し、通常、操作圧力下では、
72 水銀はヘリウムならば浸入できる非常に微細な空隙には浸
73 入し得ない。この方法を用いる場合、適用する水銀浸入圧
74 を変えることで、それぞれの浸入圧における限界空隙径に
75 対応した密度が測定できるので、一つの試料から種々の顆
76 粒密度が得られることになる。

77 かさ密度及びタップ密度(Bulk Density and Tapped Density)

78 粉体のかさ密度は、粒子間の空隙も粉体体積の一部と評価し
79 て求められる。したがって、かさ密度は粉体の粒子密度と粉体
80 層中での粒子の空間配列に依存する。また、粉体のかさ密度は
81 粉体層のわずかな揺動によっても、その空間配列が変化するた
82 め、再現性よくかさ密度を測定することは極めて難しい。した
83 がって、かさ密度の測定値を示す場合、どのようにして測定し
84 たか、その測定条件を明記することが重要である。

85 日本薬局方では「かさ密度及びタップ密度測定法」を規定し
86 ている。

87 A. かさ密度は、ふるいを通してメスシリンダー中へ注入した
88 質量既知の粉体の体積(かさ体積)を測定することにより求
89 められる(定質量法)。別に日本薬局方では、一定容量(かさ
90 体積)の粉体の質量を測定することにより、かさ密度を求
91 める方法(定容量法)も規定している。

92 B. タップ密度は、粉体試料を入れた測定用メスシリンダーを
93 機械的にタップすることにより求められる。初期のかさ体
94 積を測定した後、メスシリンダーを一定の測定条件(タッ
95 プ速度及び落下高さ)の下で機械的にタップし、連続する
96 二つの測定間での体積変化が許容範囲内となるまで測定を
97 繰り返す(定質量法)。別に日本薬局方では、タップ充てん
98 された一定容量(かさ体積)の粉体の質量を測定すること
99 により、タップ密度を求める方法(定容量法)も規定している。

1 粉体の細かさの表示法

1 粉体の細かさの表示法

2 本表示法は、三局薬局方での調和合意に基づき規定した表示法である。

3 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
4 子の大多数が75 μ mより大きい場合に適しているが、より小さ
5 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
6 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
7 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
8 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
9 ては次のように表示される。

- 10 x_{90} : 積算ふるい下分布90%に相当する粒子径
11 x_{50} : メジアン径(50%の粒子がこの値より小さく、50%の粒
12 子がこの値より大きい。)
13 x_{10} : 積算ふるい下分布10%に相当する粒子径
14 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
15 ともできる。
16 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
17 分布を基に $Q_r(x)$ を定義する。
18 $Q_r(x)$: 粒子径 x 以下の大きさを持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

- 19 そこで、定義より： $x=x_{90}$ なら $Q_r(x)=0.90$
20 $x=x_{50}$ なら $Q_r(x)=0.50$
21 $x=x_{10}$ なら $Q_r(x)=0.10$ となる。

22 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
23 することもできる。

細かさによる粉体の分類		
用語	$x_{50}(\mu\text{m})$	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	$Q_3(125) \geq 0.50$

24

1 粉体の流動性

1 粉体の流動性

2 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。

3 製薬工業における粉体の広範囲な利用によって、粉体の流動

4 性を評価するための種々の方法が考案されてきた。製剤に関す

5 る文献中には、粉体の流動性に関する種々の測定値を製造特性

6 と関係づけようとする多数の論文が出されている。このような

7 種々の試験法が開発されているのは当然である。なぜならば、

8 粉体の挙動は多面的であるので、これが粉体の流動性を評価し

9 ようとする努力を面倒にしているからである。本項では、文献

10 中で最も多く報告されている粉体の流動性の評価法について概

11 説する。医薬品粉体の流動性を適切に評価できる単純で簡便な

12 測定法はないが、本項では製剤開発の過程で有用であると思わ

13 れるいくつかの試験法の標準化について述べる。

14 粉体の流動性を評価するために、一般には四つの測定法又は

15 試験法、すなわち、「1.安息角測定法」、「2.圧縮度又は

16 Hausner比測定法」、「3.オリフィスからの流出速度測定法」、

17 及び「4.せん断セル法」が汎用されている。また、これらの基

18 本的測定法の各々について多数の変法が用いられているので、

19 これらの試験法や変法の標準化が可能であれば好都合である。

20 この目標を意識しながら、以下に最もよく用いられている方

21 法について述べる。実験的に考慮すべき重要な事項は同じであ

22 るので、測定法の標準化を推奨する。一般に、いかなる粉体の

23 流動性測定法であっても、実用的かつ有用であり、更に再現性

24 があって感度が良く、意味のある結果が得られなければならない

25 い。しかしながら、ある一つの簡便な流動性測定法が広範囲な

26 流動性を適切に又は完全に評価できるというものではない。製

27 剤研究者や技術者の必要性に応じて、種々の見地から粉体の流

28 動性を評価するために、多数の標準化された試験法をうまく利

29 用することが適切な評価につながる。

30 1. 安息角測定法

31 安息角は、粉体の流動性を評価するためにいくつかの科学分

32 野で用いられてきている。安息角は、粒子間摩擦、又は粒子間

33 の運動に対する抵抗性に関係する特性値である。安息角の試験

34 結果は、測定法に大きく依存する。本測定法では円錐形成時の

35 試料の分離・偏析や、粉体の圧密又はエアレーションのために、

36 実験上に困難を生じる。これらの難点があるにもかかわらず、

37 本測定法は製薬工業において利用され続けており、製造面での

38 諸問題を予測する際の価値を示す多数の例が文献中に見られる。

39 安息角は、次項で述べる方法のいかにかわからず、形成さ

40 れる堆積体が円錐状であると仮定した際の水平面に対する三次

41 元的角度である。

42 1.1. 基本的測定法

43 多数の安息角測定法が提案されているが、静的安息角を測定

44 するための最も一般的な方法は、二つの重要な実験的変数の扱

45 いにより次のように分類される。

46 (i) 粉体を流下させる漏斗の高さを基板に対して固定して

47 おくか、又は堆積体が形成されるにつれて漏斗の高さを変える。

48 (ii) 堆積体が形成される基板の直径を一定とする(すなわち、

49 堆積体の直径は既知である)か、又は堆積体の形成に応じて基

50 底板の直径を変える。

1.2. 基本的測定法の変法

51 前項の基本的測定法に加えて、以下のような変法が用いられ

52 ている。

53 (i) 排出安息角：一定の直径を持つ円板上にある過剰量の試

54 料を容器から排出させることによって測定する。円板上に形成

55 された円錐から、排出安息角を測定する。

56 (ii) 動的安息角：片面が透明で平らな面を持つ円筒内に粉体

57 を入れ、これを一定速度で回転させる。動的安息角は円筒内で

58 流動している粉体層の斜面が水平面との間で形成する角度とし

59 て測定される。内部運動摩擦角は粉体の最上層を流下する粒子

60 と粗い表面仕上げとされている円筒と一緒に回転している粒子

61 を分離している面によって定義される。

62 1.3. 安息角に関する流動性の一般的尺度

63 安息角を用いて粉体の流動性を定性的に説明する際に多少の

64 違いはあるが、Carr¹⁾による分類(表1)は有用である。処方設計

65 において40~50°の安息角を持つ試料であっても良好な結果が

66 得られることもあるが、安息角が50°を超えると、製造に適さ

67 ないことが多い。

表1 流動特性と対応する安息角¹⁾

流動性の程度	架橋防止対策	安息角(°)
極めて良好		25~30
良好		31~35
やや良好	不要	36~40
普通	限界点架橋あり	41~45
やや不良	攪拌や振とうが必要	46~55
不良		56~65
極めて不良		>66

1.4. 測定に関して留意すべき点

51 安息角は個々の粉体に固有な物性値ではない。すなわち、粉

52 体の円錐を形成させるために用いた方法に大きく依存する。こ

53 の点に関して、次のような重要な点が挙げられている。

54 (i) 上方から落下してくる粉体の衝撃によって円錐の頂点が

55 ゆがむ。円錐を注意深く形成させることによって、衝撃による

56 ゆがみは軽減される。

57 (ii) 円錐が形成される円板の性質が安息角に影響する。粉体

58 層の上に円錐を形成させることができる“共通の基底部”を用

59 いて円錐を形成させるのがよい。これは、円錐を形成させる粉

60 体層を保持するための外縁部を用いることによって可能となる。

61 1.5. 推奨される測定手順

62 粉体層を保持するための保持縁を持つ、固定された円板上に

63 安息角を形成させる。円板は振動しないようにする。対称性の

64 ある円錐を注意深く形成させるために、円錐の高さに応じて漏

65 斗の高さを変えるのが良い。この場合、漏斗が動くので、振動

66 しないように注意する。円錐の先端部に落下する粉体の衝撃を

67 最小限にするために、漏斗脚部下端の高さは堆積体の頂点から

68 約2~4cmの位置に保つ。対称性のある円錐を首尾よく又は再

69 現性よく形成させることができない場合には、本法は適切では

70 ない。円錐の高さを測定することによって、次式から安息角

71 α を求める。

$$\tan \alpha = \text{高さ} / (0.5 \times \text{円板の直径})$$

2. 圧縮度及びHausner比測定法

72 最近、圧縮度(Compressibility Index)とこれに密接に関係す

73 るHausner比の測定法が、粉体の流動特性を予測するための

2 粉体の流動性

95 簡便で、迅速かつ一般的な方法となってきた。粉体のかさ
96 密度、粒子径や粒子形状、表面積、含水率、付着性のすべてが、
97 測定した圧縮度に影響するので、圧縮度はこれらの粉体物性の
98 総合的な尺度とされてきた。圧縮度及びHausner比は、粉体
99 のかさ体積とタップ後のかさ体積を測定することによって求め
100 られる。

101 2.1. 基本的測定法

102 圧縮度とHausner比の測定法にはいくつかの方法があるが、
103 基本的な手順は、粉体の(1)疎充てん時のかさ体積 V_0 及び(2)こ
104 れ以上のかさ体積変化が生じなくなるまで試料をタップした後
105 の最終かさ体積 V_f を測定することである。圧縮度(%)と
106 Hausner比は、次式によって求められる。

107 圧縮度 $= (V_0 - V_f) / V_0 \times 100$

108 Hausner比 $= V_0 / V_f$

109 圧縮度(%)とHausner比は、疎充てん時のかさ密度(ρ_{bulk})と
110 タップ密度(ρ_{tapped})の測定値を用いて、次式により求めること
111 もできる。

112 圧縮度 $= (\rho_{tapped} - \rho_{bulk}) / \rho_{tapped} \times 100$

113 Hausner比 $= \rho_{tapped} / \rho_{bulk}$

114 これらの変法として、タップ中に生じるかさ体積変化に代わ
115 って、圧縮率が測定されることもある。圧縮度(%)とHausner
116 比を用いて、表2に示された流動性の尺度が一般的に認められ
117 ている。

表2 流動性の尺度¹⁾

圧縮度(%)	流動性の程度	Hausner 比
≤10	極めて良好	1.00~1.11
11~15	良好	1.12~1.18
16~20	やや良好	1.19~1.25
21~25	普通	1.26~1.34
26~31	やや不良	1.35~1.45
32~37	不良	1.46~1.59
>38	極めて不良	>1.60

118 2.2. 測定に関して留意すべき点

119 圧縮度とHausner比は個々の粉体に固有な特性値ではない。
120 すなわち、これらは用いた測定法に依存する。(1)疎充てん時
121 のかさ体積 V_0 、(2)最終かさ体積 V_f 、(3)疎充てん時のかさ密度
122 ρ_{bulk} 、及び(4)タップ密度 ρ_{tapped} の測定に影響する、次のよう
123 ないくつかの重要な点が指摘されている。

- 124 (i) 用いたメスシリンダーの直径
- 125 (ii) タップ密度を得るための粉体のタップ回数
- 126 (iii) 試験に用いた粉体の質量
- 127 (iv) タップ中のメスシリンダー内における粉体試料の回転

128 2.3. 推奨される測定手順

129 100gの試料を用いて250mLのメスシリンダーによって行う。
130 これより少量であってもよいが、用いた試料量及びメスシリン
131 ダーの容積を結果と共に記載しておく。3回の測定値の平均を
132 用いることが望ましい。

133 3. オリフィスからの流出速度測定法

134 粉体の流出速度は多くの因子に依存するが、そのうちのいく
135 つかは粒子自体の特性に関係しており、また他のいくつかは測
136 定法に関係する。オリフィスからの粉体の流出速度は、粉体の
137 流動性のより有効な尺度であるとされてきた。ここで特に重要

138 なことは、自由流動性のある試料であっても脈動型の流動パタ
139 ーンが観察されるので、流出を連続的にモニターすることが有
140 用であるということである。また、容器が空になる際も流出速
141 度の変化が見られる。これまでにオリフィス径、粒子径及び粒
142 子密度に対する流出速度に関係するいくつかの実験式が提案さ
143 れているが、オリフィスからの流出速度の測定は、自由流動性
144 のある粉体に関してのみ有用である。

145 オリフィスからの流出速度は、一般には多種類の容器(円筒
146 状容器、ファネル、ホッパー)のいずれにおいても、これらか
147 ら流出する試料の単位時間当たりの質量として測定される。流
148 出速度の測定は間欠的又は連続的に行うことができる。

149 3.1. 基本的測定法

150 オリフィスからの流出速度を測定する際に最も共通する問題
151 点は、三つの重要な実験的変数に基づいて次のように分類でき
152 る。

- 153 (1) 粉体を入れた容器の種類 一般的な容器は円筒状容器、
154 ファネル又はホッパーである。
- 155 (2) 用いたオリフィスの大きさと形状 オリフィス径とその
156 形状は、粉体の流出速度を測定する際の重要な因子である。
- 157 (3) 流出速度の測定法 流出速度は、ある種の記録装置が付
158 属した電子天秤を用いて連続的に測定することができる。また、
159 流出速度は、不連続な試料についても個別的に測定することが
160 できる(例えば、100gの粉体がオリフィスを通過するのに要す
161 る0.1秒単位までの時間、又は10秒間にオリフィスを通過する
162 0.1g単位までの粉体の質量)。

163 3.2. 基本的測定法の変法

164 質量基準又はかさ体積基準のいずれの流出速度も測定するこ
165 とができる。質量基準速度の方が測定しやすいが、高密度の試
166 料では大きな測定値が得られる。錠剤機の臼中への粉体の充て
167 んはかさ体積基準であるので、この場合にはかさ体積基準の流
168 出速度を測定することが望ましい。容器から粉体が流出しやす
169 くするためにパイプレーターを取り付けることもあるが、これ
170 は結果の解析を複雑にする。ロータリー式錠剤機の運転条件を
171 より精密に再現するための振動式オリフィス装置が提案されて
172 いる。粉体が流出する最小オリフィス径も確認することができ
173 る。

174 3.3. オリフィスからの流出速度に関する流動性の一般的尺度

175 流出速度は用いた測定法に極めて大きく依存するので、一般
176 的な尺度はない、また文献の結果を比較することも困難である。

177 3.4. 測定に関して留意すべき点

178 オリフィスからの流出速度は、個々の粉体に固有な物性値で
179 はない。これは用いた方法に極めて大きく依存する。これらの
180 方法に影響する、次のようないくつかの重要な点が指摘されて
181 いる。

- 182 (i) オリフィス径と形状
- 183 (ii) 容器の材質(金属、ガラス、プラスチック)
- 184 (iii) 容器内での粉体層の直径と高さ

185 3.5. 推奨される測定手順

186 オリフィスからの流出速度測定は、ある程度の流動性を持つ
187 粉体のみに行うことができる。したがって、付着性粉体には
188 用いることができない。粉体層の高さがオリフィス径より十分
189 に大きければ、流出速度は実質的には粉体層の高さには関係し
190 ない。円筒状容器は流出にほとんど影響しないので、容器とし
191 てこれを用いる。この形状では容器の壁面に沿った粉体ではな

3 粉体の流動性

く、粉体層内での粉体の運動による流速を測定していることになる。粉体層の高さが円筒状容器の直径の2倍未満の場合には、粉体の流出速度はしばしば増加する。オリフィスの形状は円形とし、円筒状容器は防振状態とする。円筒状容器の寸法に関する一般的な指標は次のとおりである。

(i) オリフィス径 $>$ 粒子径の6倍

(ii) 円筒状容器の直径 $>$ オリフィス径の2倍

容器としてホッパーを用いるのは適切であり、製造に際しての流出をよく表している。また、ファネル、特に軸管を持つものについては、流出速度は軸管と粉体間の摩擦と同様に、軸管の直径と長さによって決まるので、これを用いるのは得策ではない。円錐の先端を切断したものも良いが、流出は粉体-壁面間の摩擦係数に影響されるので、適切な材質を選択することが重要である。

円筒状容器内のオリフィスについては、粉体層内での流動パターンをより確実にするために、口径を変えられるような機能を持つ平面状の底板を用いる。流出速度は間欠的又は連続的に測定できる。電子天秤を用いた連続測定は、瞬間的な流出速度の変動をより効果的に検出することができる。

4. せん断セル法

より基本的な原理に基づいた粉体の流動性研究やホッパーの設計を進めようとする努力の中で、粉体の流動性をより完全かつ正確に定義した評価ができる、種々の粉体せん断試験器や方法が開発されている。せん断セル法は医薬品粉体の研究において広範囲に用いられている。本法によれば、せん断応力-せん断ひずみの関係を表す破壊包絡線、内部摩擦角、非限界降伏力、引っ張り強度、フロー・ファクターや、その他の流動性指数のような種々の2次的パラメーターを含む広範囲なパラメーターが得られる。また、本法では実験上のパラメーターをより正確に制御することができるので、流動特性は圧密荷重、時間、その他の環境条件の関数として測定することもできる。これらの方法は、限界応力状態にあるホッパーや貯槽用容器のパラメーターを測定するのにうまく利用されている。

4.1. 基本的測定法

せん断セルの第一のタイプは、せん断セルリングの下部の固定部分と上部の可動部分との間でせん断面を形成させ、水平方向に引っ張り破断する円筒型せん断セルである。この方法では、所定の手順に従ってせん断セル内の粉体層を圧密した後、上部リングを移動させることによって粉体層をせん断するのに要する力を測定する。一方、第二のタイプである環状型せん断セルは試料量が少なくて済むなど、円筒型せん断セルを上回るいくつかの利点がある。しかし、設計上、リングの内壁面近くにある試料の方がそれより内側の部分にある試料より多くせん断されるので、粉体層が均一にせん断されないという欠点がある。第三のタイプのせん断セル(平板型)は、下部の固定した粗な面と上部の粗な可動面との間で薄いサンドイッチ状の粉体層を形成している。

いずれのせん断セル法も利点と欠点を持っているが、詳細については本項では触れない。粉体の流動性を評価する他の方法については、文献中で多くの変法が述べられている。一般にせん断セル法の大きな利点は、実験的により制御しやすいことである。しかし、本法は一般に測定に際して長時間を要し、また多量の試料と熟練が必要である。

4.2. 推奨される事項

多種類のせん断セル装置や試験法からは豊富なデータが得られ、粉体の流動性を評価するのに極めて効果的に利用することができる。これらはホッパーや貯槽用容器のような装置を設計する際にも有用である。本法では利用できる装置や実験操作は多様であるので、特に標準的な方法はない。せん断セル法を用いた流動性の評価の結果には、用いた装置と方法をすべて記載しておく。

文献

1) Carr, R.L. : Evaluating flow properties of solids. *Chem. Eng.* 1965; 72 : 163-168.

1 レーザー回折法による粒子径測定法

2 測定法は、三業局方での調和合意に基づき規定した測定法である。

3 粒子径分布測定に用いられるレーザー回折法は、粒子が単色
4 光の光束に曝された際に生じる回折パターンの解析に基づいて
5 いる。歴史的には、初期のレーザー回折装置は小角散乱のみを
6 用いていた。しかし、本法はその後、より広い角度範囲にわた
7 るレーザー光散乱やフラウンホーファ近似及び異常回折のほか、
8 ミー理論の適用をも含んでいるものにまでに拡大されてきた。

9 本法は単一粒子による散乱と一次粒子のクラスター、すなわ
10 ち、アグロメライト(融解又は固結した粒子)又はアグリゲイト
11 (付着性粒子の塊)による散乱を区別することはできない。ほと
12 んどの粒子状試料はアグロメライト又はアグリゲイトを含んで
13 おり、また、測定者は一般に一次粒子の粒子径分布に関心があ
14 るので、クラスターは、通例、測定前に一次粒子に分散される。

15 非球形粒子については、本法が光学モデルにおいて球形粒子
16 であることを仮定しているため、球相当粒子径分布が得られる。
17 その結果、得られた粒子径分布は、ほかの物理的原理(例えば、
18 沈降、ふるい分け)に基づく方法によって得られた分布とは異
19 なることがある。

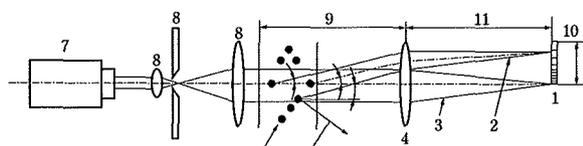
20 本参考情報は、角度に依存した光散乱パターンの解析による
21 種々の分散系(例えば、粉体、スプレー、エアゾール、サスペ
22 ンション、エマルジョン及び液中における気泡)の粒子径分布
23 測定法について記載するものであり、特定の製品の粒子径を測
24 定するための特定の要件を取り扱うものではない。

25 1. 原理

26 試料を適切な液体又は気体中に適正な濃度で分散させ、単色
27 光(通例、レーザー光)ビームを横切るように通過させる。粒子
28 によって種々の角度に散乱された光は、複数の素子を持つ検出
29 器で測定される。散乱パターンは数値化され、次の解析のため
30 に記録される。これらの数値はその後、適切な光学モデルと数
31 学的手法を用いて、離散的な粒子径区分ごとの体積分率を得る
32 ために変換され、体積基準の粒子径分布が得られる。

33 2. 装置

34 装置は電氣的ノイズ、機械的振動、温度の変動や湿度又は直
35 接光によって影響を受けない環境に設置される。レーザー回折
36 装置の構成の一例を図1に示すが、他の構成の装置を用いるこ
37 ともできる。



- 39 1 吸光度(オブスキュレーション)検出器
- 40 2 散乱光
- 41 3 直射光
- 42 4 フーリエレンズ
- 43 5 レンズ4で集められない散乱光
- 44 6 粒子集団
- 45 7 レーザー光源
- 46 8 ビーム調整部
- 47 9 レンズ4の有効距離
- 48 10 複数の素子を持つ検出器
- 49 11 レンズ4の焦点距離

50 図1 レーザー回折装置の構成例

51 装置は、レーザー光源、光束処理用レンズ、試料測定部(又
52 はセル)、フーリエレンズ及び散乱光パターン測定用の複数の
53 素子を持つ検出器から成る。散乱光データを体積基準分布とこ
54 れに関係するデータ解析及び記録用に変換するためのデータ処
55 理機能も必要である。

56 粒子は二つの位置でレーザービーム中へ置くことができる。
57 通常、粒子は集光レンズの前、かつ有効距離内にある平行ビー
58 ム中に置かれる。いわゆる逆変換フーリエ光学系の場合には、
59 粒子は集光レンズ後方の集光ビーム中に置かれる。通常の装置
60 における利点は、試料の合理的な光路長がレンズの有効距離内
61 で得られることである。逆変換フーリエ型の装置では光路長は
62 ごく短い、広角度で散乱光を測定できるので、サブミクロン
63 領域の粒子が存在する場合には有用である。

64 入射光と分散された粒子群は相互に影響して、種々の角度で
65 異なる光強度を持つ散乱パターンが生じる。直射光と散乱光か
66 ら成る全角度の光強度分布は、1枚レンズ又は複数のレンズに
67 よって複数の素子を持つ検出器の上に集光される。これらのレ
68 ンズにより、光束中にある粒子の位置に依存しない散乱パター
69 ンが生じる。したがって、連続的な角度の光強度分布は、一連
70 の検出器素子上で離散的な空間強度分布に変換される。

71 測定された粒子群についての散乱パターンは、ランダムな相
72 対的位置にある個々の単一散乱粒子から得られた散乱パター
73 の総和に等しいと仮定する。ここで、ごく限られた角度範囲の
74 散乱光のみが、レンズ、すなわち検出器によって集光されるこ
75 とに注意しておかねばならない。

76 3. 測定法の予備的検討

77 レーザー回折による粒子径の測定では、用いる装置及び試料
78 が試験条件(例えば、分散媒、試料分散体の調製法)の変動を制
79 限できるように注意深く管理されていれば、サブミクロン領域
80 においても再現性のあるデータを得ることができる。

81 レーザー回折法による粒子径測定は、これまでおおむね
82 0.1µm~3mmの範囲にある粒子に限られてきた。レンズや装
83 置設計における最近の進歩によって、最新の装置ではこの範囲
84 外にまで測定対象が広がってきている。その用途に応じて、適
85 切なバリデーションデータの裏付けがあれば、本法を適用する
86 ことができる。

87 3.1. サンプリング

88 サンプリング法は、試料を代表するような部分を粒子径測定
89 に必要な容量、採取するために適切な方法でなければならない。
90 回転式縮分法や円錐四分法のような試料分割法を用いてもよい。

91 3.2. 分散法の評価

92 粒子径範囲と粒子形状を評価するために、測定対象となる試
93 料につき、あらかじめ肉眼又は顕微鏡を用いて検査しておく。
94 分散法は測定目的に合わせなければならない。すなわち、目的
95 によっては、クラスターをできるだけ一次粒子に分散させる方
96 がより好ましい場合もあれば、逆にクラスターをできるだけそ
97 のままの状態に保持しておくことが望ましい場合もある。この
98 意味において、対象粒子は一次粒子又はクラスターのいずれか
99 である。

100 測定法の確立にあたっては、粒子が粉碎されていないか、逆
101 にいえば、粒子又はクラスターの分散が十分であることをチェ
102 ックしておくことが極めて重要である。これは、通例、分散エネ
103 ルギーを変化させて、粒子径分布の変化をモニターすることに
104 よって行うことができる。試料が十分に分散されていて、粒子

105 が壊れにくいとか又は溶解しないときには、測定された粒子径分
106 布の有意な変化は認められない。更に、晶析、粉碎の試料を調
107 製する工程が変更された場合、本法の適用性については、例え
108 ば、顕微鏡によって比較することにより、検証しておかねばな
109 らない。

110 スプレー、エアゾールや液体中の気泡については、サンプリ
111 ングや希釈を行うと一般に粒子径分布が変化するので、これら
112 の濃度が適正であれば、直接に測定すべきである。

113 エマルション、ペースト、粉体など、他の分散系の場合、代
114 表試料は適切な液体に分散することで得られる。クラスターを
115 崩して分散を安定化するために、分散剤(湿潤剤、安定剤)や機
116 械的な力(攪拌、超音波処理)がよく用いられる。これらの液体
117 分散系については、光学的測定セル、通例、攪拌器と超音波発
118 生器が付属した分散槽、ポンプ及び配管から構成される循環系
119 が最もよく用いられる。ごく少量の試料しか用いることができ
120 ない場合や特殊な分散液を用いる場合には、非循環性の攪拌セ
121 ルが有用である。

122 機械的な力により粒子を分散させる適切な乾式の粉体用分散
123 機を用いれば、乾燥粉体をエアゾールに変えることもできる。
124 一般に、分散機は、圧縮気体のエネルギー又は真空との圧力差
125 により粒子をエアゾールに分散させる。分散機中、エアゾール
126 は測定領域を通過して、通例、粒子を捕集する真空ユニットの
127 入口へ輸送される。しかし、自由流動性がある粗大粒子又は顆
128 粒については、重力効果により、粒子の適度な分散を確保する
129 ことができる。

130 試料の最大粒子径が装置の測定範囲を超える場合には、大き
131 すぎる粒子はふるい分けによって除去できるが、この場合、除
132 去した粒子の質量と百分率を記録しておく。しかし、あらかじめ
133 ふるい分けした後では、別に証明することができなければ、
134 その試料はもはや代表的ではないということに注意しておかね
135 ばならない。

136 3.3. 液体中での分散の最適化

137 粉体を分散するために用いる液体、界面活性剤及び分散剤は、
138 以下の条件を満たしていなければならない。

139 (i) レーザー光の波長において透明であり、基本的に気泡や
140 粒子を含まないこと。

141 (ii) 試料粒子とは異なる屈折率を有すること。

142 (iii) 試料粒子に対して非溶媒であること(純粋な液体又はあら
143 かじめろ過した飽和溶液)。

144 (iv) 試料粒子の粒子径を変化させないこと(例えば、溶解性、
145 溶解促進又は再結晶効果による)。

146 (v) 安定な分散系が容易に得られること。

147 (vi) 装置に用いられている部品(Oリング、ガスケット、配
148 管など)との適合性がよいこと。

149 (vii) 再循環、攪拌及びろ過を可能とするための適切な粘性を
150 有すること。

151 界面活性剤や分散剤は、粒子をぬらし、分散を安定化するた
152 めに、しばしば用いられる。試料が弱酸性及び弱塩基性物質で
153 ある場合、分散液をそれぞれ、低pH又は高pHに緩衝化してみ
154 ることが適切な分散剤の選択に役立つ。

155 目視又は顕微鏡観察により、分散液の特性につき、あらかじ
156 め確かめておくことができる。十分に混合された貯蔵分散液か
157 ら、試料を小分けすることもできる。このような貯蔵分散液は、
158 例えば、ガラス棒、スパチュラ又はボルテックスミキサーを用

159 いて混合しながら、試料に液体を注加することによって調製す
160 る。貯蔵分散液の調製にあたっては、それから代表試料が確実
161 に小分けできるように、また、大粒子の沈降が起こらないよう
162 に注意しなければならない。したがって、試料のペーストを調
163 製するか、又は攪拌下で均一な懸濁状態を保持しながら、速や
164 かにサンプリングを行う。

165 3.4. 気体中での分散の最適化

166 スプレーや乾燥粉体分散系では、油、水及び粒子状物質を含
167 まない圧縮気体を用いる。圧縮気体中からこれらの異物を除去
168 するために、フィルター付きの乾燥機を用いることができる。
169 排出空気が測定を妨害しないよう、吸引部は測定場所から離し
170 ておかねばならない。

171 3.5. 濃度範囲の決定

172 検出器でのシグナル/ノイズ比が許容値以上となるために、
173 分散体中の粒子濃度は最低水準以上でなければならない。同様
174 に、多重散乱を避けるために、濃度は最高水準以下でなければ
175 ならない。濃度範囲は、レーザー光のビーム幅、測定領域の光
176 路長、粒子の光学的性質及び検出器素子の感度によって影響を
177 受ける。

178 上記の因子を考慮して、いかなる試料についても、適切な濃
179 度範囲を決定するためには、いくつかの異なった粒子濃度で測
180 定を行わねばならない[注：装置が異なると、粒子濃度は、通
181 例、異なるスケール及び名称で表される(例えば、吸光度
182 (obscuration)、光学濃度、全質量に比例的な数値
183 (proportional number of total mass)]。

184 3.6. 測定時間の決定

185 測定時間、検出器の読取り時間及び頻度は、必要とされる測
186 定精度に従って実験的に決定される。一般には、1回の測定時
187 間内に、短い時間間隔で多数回の検出器のスキャン又はスイ
188 プが行われる。

189 3.7. 適正な光学モデルの選択

190 時にはほかの近似理論が散乱マトリックスの計算に適用され
191 ることもあるが、ほとんどの装置ではフラウンホーファ又はミ
192 ーの理論を用いている。理論モデルの選択は、測定用途や試料
193 に関する種々の仮定(粒子径、吸光度、屈折率、表面粗さ、結
194 晶の配向性、混合物か否かなど)に依存する。屈折率の値(使用
195 した波長に関する実数部と虚数部)が正確に判明していない場
196 合には、フラウンホーファ近似や屈折率の実験的な推定値を用
197 いたミー理論を用いることができる。前者は、単純でかつ屈折
198 率の値を用いる必要がないという利点を持っている。これに対
199 して後者は、通例、小さい粒子については偏りの少ない粒子径
200 分布が得られる。例えば、かなりの量の透明な小粒子を含む試
201 料についてフラウンホーファ・モデルを用いるときには、実際
202 よりも多数の小粒子が計算されることになる。複素屈折率の実
203 数部と虚数部に関して仮定された値のわずかな違いが、測定さ
204 れた粒子径分布に有意な差異を生じることもあるので、追跡可
205 能な結果を得るためには、用いた屈折率の値を記録しておかね
206 ばならない。屈折率の虚数部の小さい値(約0.01~0.1*i*)は、粒
207 子の表面粗さによる吸光度を補正するのによく用いられる。一
208 般に、構造因子(例えば、形状、表面粗さ、空隙率)と同様に、
209 試料の光学的性質は最終結果に影響するということに注意して
210 おかねばならない。

211 3.8. パリデーション

212 機器分析において、通常、ある操作手順の妥当性は、その特

213 異性、直線性、範囲、真度、精度及び頑健性を評価することに
214 より検証される。レーザー回折による粒子径解析においては、
215 試料中へ混入した異物を識別することはできないし、顕微鏡法
216 による補完的な裏付けがなければ、分散粒子とそれらのアグロ
217 メレイトを識別することもできないので、分析法バリデーショ
218 ンにおいて定義されるような意味での特異性は適用できない。
219 (濃度と反応強度の間の線形関係又は内挿のための数学的モデ
220 ルを探ることは、粒子径解析には適用できない。線形性を評価
221 するよりも、測定結果が有意に変化しない濃度範囲を定義する
222 ことの方が、この方法ではむしろ必要である。)その範囲を超え
223 る濃度では多重散乱による誤差を生じるのに対して、その範囲
224 を下回る濃度では低いシグナル/ノイズ比による誤差を生じる。
225 この範囲は、ほとんどの場合、装置のハードウェアに依存する。
226 測定の精度は、繰返し測定によって評価されるのに対して、真
227 度は、装置の適切な適合性評価や顕微鏡法との比較によって確
228 認すべきである。

229 要求される併行精度は、測定目的に依存するのに対して、本
230 法で実際に達成できる併行精度は、主として試料特性(粉碎の
231 有無、硬いか壊れやすいか、粒子径分布幅など)に依存する。
232 試料の調製法が異なった場合の併行精度は、物質によってかな
233 り変化する可能性があるため、ここでは、強制力のある形で限
234 度値を設定することはできない。しかし、分布の中央値(例え
235 ば、 x_{50})について、相対標準偏差 $RSD(\%) \leq 10\% [n=6]$ のよう
236 な、併行精度に関する許容基準を定めるようにするとよい。分
237 布の両側における値(例えば、 x_{10} 及び x_{90})は、 $RSD \leq 15\% [n=$
238 $6]$ のように許容基準はより緩和される。10 μm 以下の粒子では、
239 これらの値は2倍とする必要がある。分散媒や分散力の選択と
240 最適化に際して、頑健性を試験しておくのもよい。分散エネ
241 ルギーの変化は粒子径分布の変化によってモニターしてもよい。

242 4. 測定

243 4.1. 測定前の注意事項

244 (i) レーザーの直接光及び反射光を絶対に直視してはならな
245 い。

246 (ii) 溶媒の引火又は粉塵爆発を防ぐために、すべての装置部
247 品は接地しておくこと。

248 (iii) 装置の設定状況(例えば、暖機運転、所要測定範囲とレン
249 ズ、レンズの有効距離、検出器の位置、直射日光が当たって
250 いないこと)を点検すること。

251 (iv) 湿式分散の場合には、気泡、液体の蒸発、分散液中のシ
252 ュリーレン(schlieren)や他の不均一な状態を避けること。同様
253 に、乾式分散の場合には粒子分散機からの不適切なマスマ
254 (mass-flow)や乱流を避けること。このような影響は誤った粒
255 子径分布を与える原因となる。

256 4.2. 分散試料の光散乱の測定

257 装置の光学系の焦点及び軸調整を適切に行った後、試料測定
258 の際と同じ方法を用いて、粒子を含まない分散媒について空試
259 験を行わねばならない。バックグラウンド信号は、適正な閾値
260 以下でなければならない。検出器のデータは、試料について得
261 られたデータから後でそれらを差し引くために保存される。分
262 散試料は確立された測定法に従って測定される。

263 各検出器素子については、信号の平均値を計算し、場合によ
264 っては標準偏差も求める。各検出器素子からの信号の大きさは、
265 検出面積、光強度及び量子効率に依存する。レンズの焦点距離
266 と共に、検出器素子の座標(大きさ位置)により各素子の散乱

267 角範囲が決まる。大多数の装置では散乱しない中心部のレーザ
268 ービーム強度も測定している。空試験時の強度に対する分散試
269 料の強度比は散乱光の割合、すなわち、粒子濃度を示す。

270 4.3. 散乱パターンの粒子径分布への変換

271 この逆演算のステップは、ある粒子径分布に関する散乱パ
272 ターンの計算の逆である。ほとんどのアルゴリズムは球形粒子に
273 よる散乱について数学的解析を行っているため、粒子を球形と
274 仮定することは、特に重要である。更に、測定されたデータは、
275 常にいくらかのランダム誤差と系統誤差を含んでおり、これら
276 が粒子径分布の信頼性を低下させることがある。このため、市
277 販装置において利用できるいくつかの数学的手法が開発されて
278 いる。これらの手法は、散乱パターンの測定値と計算値の間の
279 加重偏差(例えば、最小二乗法)、いくつかの制約条件(例えば、
280 粒子量は負とならないこと)、粒子径分布曲線の平滑化のい
281 ずれか又はすべてを含んでいる。

282 用いたアルゴリズムは装置の銘柄や機種ごとに特有のもので
283 ある。装置間でアルゴリズムが異なると、計算された粒子径分
284 布に差異を生じることがある。

285 4.4. 繰返し回数

286 個々の試料調製ごとに必要な繰返し測定回数は、要求される
287 測定精度に依存する。ある物質について、特異的な測定法があ
288 る場合、この繰返し回数を定めておくことが推奨される。

289 5. 結果の記録

290 粒子径分布のデータは、通例、ふるい下積算分布及び/又は
291 体積基準積算密度分布として記録する。粒子径を表すのに記号
292 x を用い、粒子径は体積相当球の直径として定義する。 $Q_3(x)$
293 は粒子径 x におけるふるい下体積分率を表す。図示する場合には、
294 x を横軸に、従属変数である $Q_3(x)$ を縦軸にしてプロット
295 する。最も一般的な特性値は、粒子径分布曲線から内挿によ
296 って計算される。繁用されているものは、積算ふるい下値で
297 10%、50%、90%における粒子径(それぞれ、 x_{10} 、 x_{50} 、 x_{90} と
298 して表示)である。 x_{50} はメジアン径として知られている。記号
299 d も粒子径を表すのに広く用いられているので、 x の代わりに
300 d を用いてもよい。

301 更に、試料、試料の調製法、分散条件、セルの種類に関する
302 十分な情報も得ておかねばならない。測定結果は、装置、デー
303 タ解析用プログラム、用いた光学モデルに依存するので、これ
304 らの詳細についても示しておかねばならない。

305 6. 装置の性能管理

306 装置と試料に応じて、装置の性能評価を適切な頻度で行う。

307 6.1. 校正

308 レーザー回折システムは理想化された粒子特性を仮定しては
309 いるものの、レーザー光散乱の基本的原理に基づいている。し
310 たがって、厳密な意味での校正は必要ではない。しかし、それ
311 でも装置が正しく稼動していることを確認しておくことは必要
312 である。これは、社会的に広く用いられ、認証されている標準
313 物質を用いることによって行うことができる。これにより、試
314 料の採取と分散、測定部への輸送、測定及び逆演算処理を含め
315 て、全体の測定手順をチェックすることができる。また、全体
316 の操作手順が十分に記述されていなければならない。

317 認証された標準物質としては、粒子径分布が既知の球形粒子
318 であることが望ましい。認証された標準物質の粒子径は、絶対
319 的な方法により、質量基準粒子径分布として保証されていな
320 ければならない。また、可能ならば、合意された詳細な操作手順

4 レーザー回折法による粒子径測定法

321 に従って用いられねばならない。ミー理論をデータ解析に用い
322 る場合は、粒子の複素屈折率の実数部と虚数部が示されてい
323 なければならない。粒子密度がすべての粒子径区分について同一
324 であれば、体積基準粒子径分布は、質量基準粒子径分布と同一
325 の表示となる。

326 標準物質について、少なくとも3回の繰返し測定から得られ
327 た x_{50} の平均値をその保証値と比較するとき、保証範囲からの
328 逸脱が3%以下であれば、レーザー回折装置は適切に稼動して
329 いるものとみなす。また、 x_{10} と x_{90} に関する平均値は、保証範
330 囲からの逸脱が5%を超えないものとする。なお、10 μm 以下
331 の粒子については、これらの値はいずれも2倍とする必要があ
332 る。

333 標準物質としては、球形粒子を用いることが望ましいが、非
334 球形粒子を用いてもよい。これらの粒子は、認証値を有するか、
335 又は合意された詳細な操作手順に従ってレーザー回折法から得
336 られた代表値を有することが望ましい。レーザー回折法以外の
337 方法で得られた参照値(粒子径)と比較するとき、かなりのずれ
338 が生じることがある。このずれは、粒子径測定法の測定原理が
339 異なると、同じ非球形粒子であっても球相当径(sphere-
340 equivalent diameters)が異なることに起因する。

341 認証された標準物質を用いることが望ましいが、物理的性質
342 が明確な他の標準物質を用いてもよい。これらは、高品位で一
343 定の組成と粒子径分布を有する物質であり、それらの粒子径分
344 布は経時的な変化がないことが証明されている。測定結果は、
345 標準物質についてあらかじめ測定されたデータと同一の精度で
346 一致しなければならない。

347 6.2. システムの適合性評価

348 装置の校正に加えて、装置の性能評価を定期的に又はできる
349 だけ頻繁に実施しなければならない。この性能評価は、前項で
350 述べた適切な標準物質を用いて行うことができる。

351 システムの適合性評価は、装置、電子工学系、ソフトウェア
352 及び解析操作が、一体化したシステムを構成していることから、
353 システムとして評価する必要がある。このため、試料の採取、
354 分散、測定部への試料の輸送、測定と逆演算手順を含めて、操
355 作手順の全体が検証されることになる。したがって、全体の操
356 作手順が十分に記述されていることが極めて重要である。

357 医薬品各条中に別に規定されるもののほか、レーザー回折装
358 置の応答は、標準物質の x_{50} につき、保証範囲からの逸脱が
359 10%以内であれば、レーザー回折装置は正常に稼動している
360 ものとみなす。また、分布の両側における値(例えば、 x_{10} 及び
361 x_{90})についても評価する場合には、これらの値の保証範囲から
362 の逸脱は、15%を超えてはならない。ただし、10 μm 以下の粒
363 子については、これらの値は、2倍として考える。

364 注1: 装置の校正については、「6.1.校正」においてより厳密
365 な条件が定められている。

366 注2: 本測定法はISO13320-1(1999)及び9276-1(1998)に準拠し
367 たものである。

1 参考情報

2 アミノ酸分析法

3 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。

4 アミノ酸分析法は、たん白質、ペプチド、その他の医薬品の
5 アミノ酸組成やアミノ酸含量を測定する方法をいう。たん白質
6 及びペプチドはアミノ酸残基が共有結合で直鎖状に重合した高
7 分子であり、そのアミノ酸配列はたん白質やペプチドの特性を
8 規定している。たん白質は通常特定のコンフォメーションを持
9 った折りたたみ構造をとる大きな分子と考えられる。一方、ペ
10 プチドは比較的小さな分子であり、2~3個のアミノ酸で構成
11 されていることもある。アミノ酸分析法は、たん白質やペプチ
12 ドの定量、同定、構造解析に利用でき、ペプチドマップ法にお
13 けるペプチド断片の評価、たん白質やペプチド中の異常アミノ
14 酸の検出などにも利用できる。分析する前にたん白質又はペプ
15 チドを各構成アミノ酸に加水分解する必要があるが、加水分解
16 の後に行うアミノ酸分析操作は他の医薬品中の遊離アミノ酸の
17 分析で行われている方法と同じであり、加水分解試料中のアミ
18 ノ酸は一般に誘導体化して分析する。

19 装置

20 アミノ酸分析に用いる方法論は通常、試料中のアミノ酸のク
21 ロマトグラフィーによる分離に基づいている。最近の技法は専
22 らアミノ酸分析用に作られた自動クロマトグラフィー装置を利
23 用している。アミノ酸分析装置は、基本的にはカラム上でアミ
24 ノ酸を分離するための移動相勾配を作成できる低圧又は高圧液
25 体クロマトグラフィー装置である。装置にはプレカラム誘導体
26 化で分析する以外はポストカラム誘導体化機能を備えていなか
27 ればならない。検出器は利用する誘導体化の方法によって異な
28 るが、通常紫外可視検出器か蛍光検出器が用いられる。記録計
29 (例えば、インテグレーター)は検出器からのシグナルをアナロ
30 グ信号に変換し、定量できるものを用いる。使用する装置はア
31 ミノ酸分析専用のものが望ましい。

32 一般的注意

33 アミノ酸分析中、分析者は目立たないところでの汚染に常に
34 注意を払う必要があり、高純度の試薬が必要となる(例えば、
35 低純度の塩酸はグリシンの混入を招くことがある)。分析試薬
36 類は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)用溶媒類のみを使用
37 し、数週間ごとに定期的に交換すべきである。混入の可能性の
38 ある微生物や溶媒中に存在する異物は使用する前にろ過して除
39 き、ふたをした容器に保存し、分析装置は直射日光の当たらな
40 い場所に設置する。

41 実験のやり方がアミノ酸分析の質を左右する。装置は実験室
42 内の人通りの少ない場所に設置し、室内は清潔に保つこと。ピ
43 ペット類は保守手順書に従って清潔にし、調整すること。ピペ
44 ットチップはふたのある箱に保管し、素手でチップをつまんだ
45 りしないこと。実験者はパウダーの付いていないラテックス製
46 の手袋を着用すること。埃がグリシン、セリン及びアラニンの
47 含量を増加させることがあるので、試料バイアルの開け閉めの

48 回数は制限すること。

49 良好な分析結果を得るにはよく手入れされた装置が必要であ
50 る。分析装置が日常的に使用されている場合には、漏れ、検出
51 器・ランプの安定性、カラムの性能を毎日チェックする。装置
52 のすべてのフィルター及びその他の点検箇所は規定の保守管理
53 表に従って清掃あるいは交換する。

54 標準物質

55 分析に用いるアミノ酸の標準物質としては市販品が入手可能
56 であり、通常、アミノ酸の混合水溶液となっている。アミノ酸
57 組成を測定する場合、全体の操作が完全であることを示すため
58 に、たん白質又はペプチドの標準品/標準物質を対照として試
59 料と共に分析する。この目的のためのたん白質としては高純度
60 のウシ血清アルブミンが用いられる。

61 装置の校正

62 アミノ酸分析装置の校正は通常、標準アミノ酸混液を分析し
63 て行い、各アミノ酸の感度係数や測定範囲を調べる。標準アミ
64 ノ酸混液の各アミノ酸濃度は既知であるので、校正にあたって
65 は、用いる分析方法で直線関係が得られると思われる濃度範囲
66 内のいくつかの異なる濃度に標準アミノ酸混液を希釈し、これ
67 らについて試験を繰り返す。得られた各アミノ酸のピーク面積
68 を希釈液中の各アミノ酸の既知濃度に対してプロットする。こ
69 の結果から、あるアミノ酸のピーク面積がアミノ酸濃度と直線
70 関係にある濃度範囲を調べることができる。正確で再現性のあ
71 る結果を得るには、使用する分析方法での分析限界以内(例え
72 ば、直線範囲内)にある濃度の試料を調製することが重要であ
73 る。

74 各アミノ酸の感度係数を調べるには、4~6種の濃度の標準
75 アミノ酸について分析する。感度係数は標準液中に存在するア
76 ミノ酸1nmol当たりの平均ピーク面積又は平均ピーク高さとし
77 て算出する。各アミノ酸の感度係数を校正ファイルに記録して
78 おき、試料中のアミノ酸の算出に利用する。この計算はアミノ
79 酸のピーク面積をそのアミノ酸の感度係数で除し、そのアミノ
80 酸のnmol数を求める。日常の分析では一点校正で十分である。
81 しかしながら、校正ファイルは異常のないことを確認するため
82 に対照標準物質の分析によって十分に吟味され頻りに更新され
83 ている必要がある。

84 再現性

85 一貫した良好な分析結果は試験の再現性に注意を払う実験室
86 から得られるものである。HPLCによるアミノ酸又はその誘導
87 体の分離では、各アミノ酸に対応する多数のピークがクロマト
88 グラム上にみられる。ピークの数が多いため、保持時間でピー
89 クを同定したり、定量のためにピーク領域を積分したりするこ
90 とのできる分析システムが必要となる。一般的な再現性の評価
91 では、標準アミノ酸溶液を調製し、同一標準液を用いて多数回
92 (例えば、6回以上)分析を繰り返す。各アミノ酸の保持時間及
93 びピーク面積の相対標準偏差(RSD)を求める。更に、実験者を
94 変えた数日間にわたる複数回の測定で再現性の評価を行う。こ
95 の場合、試料の取扱いに起因する変動も調べるため、標準液の
96 希釈操作も毎回行う。標準たん白質(例えば、ウシ血清アルブ
97 ミン)のアミノ酸組成の分析も再現性の評価の一部としてしば
98 しば行われる。変動(すなわち、RSD)を評価することによって、
99 その実験室から得られる分析値が管理されたものであることを
100 確認するための限度値を設定することができる。最良の結果を
101 得るためには、最も低い実際のな変動の限度値を設定すること

102 が望ましい。アミノ酸分析の変動を小さくするために注意すべ
103 き事柄には、試料の調製、試薬の品質や実験操作に起因するス
104 ペクトル妨害、装置の性能及び保守、データの解析とその解釈、
105 実験者の技量や癖などがある。バリデーションは、関連するす
106 べてのパラメーターについて十分に検討する。

107 試料調製

108 アミノ酸分析の正確な結果を得るためには精製されたたん白
109 質又はペプチド試料が必要である。緩衝液組成(例えば、塩類、
110 尿素、界面活性剤)は分析に影響を与えることがあるので、分
111 析の前に試料から取り除く必要があるが、一般にポストカラム
112 誘導体化法はプレカラム誘導体化法ほどにはこれらの物質の影
113 響を受けない。汚染の可能性を減少させ、回収率を高め、労力
114 を減少させるためには、試料の処理操作の回数を少なくするほ
115 うがよい。たん白質試料から緩衝液成分を除去する一般的な方
116 法には、1)逆相HPLC装置に試料を注入し、有機性の揮発性溶
117 媒でたん白質を溶出させ、これを真空遠心分離で乾燥させる；
118 2)揮発性の緩衝液又は水に対して透析する；3)緩衝液を遠心限
119 外ろ過で揮発性の緩衝液又は水に置き換える；4)有機溶媒(例
120 えば、アセトン)でたん白質を沈殿させる；5)ゲルろ過、など
121 がある。

122 内標準物質

123 アミノ酸分析中での物理的及び化学的損失及び変化をチェッ
124 クするために、内標準物質を用いることが推奨される。加水
125 分解の前にたん白質溶液に正確な既知量の内標準物質を添加す
126 ると、たん白質溶液からのアミノ酸の一般的な回収率が内標準物
127 質の回収率から得られる。しかし、たん白質中のアミノ酸の遊
128 離又は分解の速度には違いがあるため、遊離アミノ酸の加水
129 分解中の挙動はたん白質に含まれるアミノ酸と同じではない。し
130 たがって、加水分解中に生じる損失を補正するために内標準物
131 質を用いるとき、信頼できる結果が得られないことがある。結
132 果を解釈するとき、この点を考慮に入れる必要がある。試料の
133 分析ごとの差異及び試液の安定性や流量の変動を補正するた
134 めに加水分解後のアミノ酸混液に内標準物質を添加することも
135 できる。理想的には、内標準物質は市販品として入手可能で安
136 々な自然界に存在しない α -アミノ酸がよい。しかも、加水
137 分解に対して安定でなければならず、シグナル強度も濃度と直線
138 関係にあり、他のアミノ酸と重ならない保持時間を持っている
139 ことが必要である。一般的に用いられる内標準物質にはノルロ
140 イシン、ニトロチロシン又は α -アミノ酪酸がある。

141 たん白質の加水分解

142 たん白質及びペプチドのアミノ酸分析にはこれら試料の加水
143 分解が必要である。加水分解用のガラス器具には誤った結果を
144 避けるために極力清浄にしたものを使用する必要がある。加水
145 分解管壁面の指紋や手袋のパウダーは汚染の原因となる。ガラ
146 ス製加水分解管は、1mol/L塩酸中で1時間煮沸するか、硝酸又
147 は塩酸/硝酸混液(1:1)に浸して洗浄する。洗浄した加水分解
148 管は高純度の水で洗い、更にHPLC用メタノールで洗う。その
149 後、乾燥器で一夜乾燥し、使用するまで覆いをして保存する。
150 ガラス容器を500°Cで4時間乾熱して汚染物を除去してもよい。
151 適当な使い捨ての実験用器具を用いることもできる。

152 酸加水分解は、アミノ酸分析の前にたん白質試料を加水分解
153 する最も一般的な方法である。この加水分解方法はいくつかの
154 アミノ酸を完全に又は部分的に破壊するため、分析結果に変動
155 をもたらすことがある。トリプトファンは破壊され、セリンと

156 トレオニンは一部破壊され、メチオニンは酸化され、システイ
157 ンは一般にシスチンとして回収される(ただし、シスチンの一
158 部は破壊されたりシステインに還元されるため、通常その回収
159 率は低い)。加水分解容器の内部を適切な真空度(0.0267kPa以
160 下)にするか不活性ガス(アルゴン)で置換すると酸化による破壊
161 を抑えることができる。イソロイシンやバリンを含むペプチド
162 結合のうち、Ile-Ile, Val-Val, Ile-Val及びVal-Ileのア
163 ミド結合は一部しか切断されず、アスパラギンとグルタミンは
164 脱アミド化されてそれぞれアスパラギン酸とグルタミン酸にな
165 る。酸加水分解中にトリプトファン、アスパラギン及びグルタ
166 ミンは消失するため、定量できるのは17種のアミノ酸に限ら
167 れる。以下に述べる加水分解法のいくつかはこれらの問題に対
168 処するために利用する。また、この加水分解法のいくつか(す
169 なわち、方法4~11)はシステイン、メチオニン、アスパラギ
170 ン、グルタミンを他のアミノ酸に変換させる方法である。し
171 たがって、酸加水分解以外の方法を用いる前に、その方法を用
172 いることの利点と問題点をよく比較検討しておく。

173 一部が破壊されるアミノ酸やペプチド結合の開裂が遅いアミ
174 ノ酸の濃度を分析するために、時間経過に沿った試験(すなわ
175 ち、酸加水分解時間24、48及び72時間での分析)がしばしば行
176 われる。不安定なアミノ酸(すなわち、セリンとトレオニン)の
177 測定濃度を加水分解時間に対してプロットし、得られた直線を
178 時間ゼロに外挿することによりそれらの濃度を決定することが
179 できる。時間経過に沿った加水分解試験は開裂の遅いアミノ酸
180 (例えば、イソロイシンやバリン)に対しても用いられ、これら
181 のアミノ酸の濃度がプラトーに達した点を調べ、これをこれら
182 のアミノ酸の濃度とする。加水分解時間が長くなりすぎるとこ
183 のアミノ酸の濃度は減少し始めるが、これはこの加水分解条件
184 で分解することを示している。

185 時間経過に沿った試験方法に代わる方法として、標準アミノ
186 酸を試料と同一条件で加水分解する方法がある。加水分解にお
187 いて、遊離アミノ酸はペプチド又はたん白質中の不安定なアミ
188 ノ酸の分解速度を完全には再現できない。このことは特に開裂
189 の遅いペプチド結合(例えば、Ile-Val結合)についていえる。
190 しかし、この方法によって破壊されるアミノ酸の量を測定する
191 ことができる。マイクロ波による酸加水分解が利用されている。
192 この方法は迅速ではあるが、特別な機器と注意が必要である。
193 マイクロ波加水分解での至適条件はそれぞれの試料たん白質又
194 はペプチドについて調べる必要がある。一般にこの方法での処
195 理時間はわずか数分間であるが、1分間の変動でも適切な結果
196 をもたらさない(例えば、不安定なアミノ酸の不完全な加水
197 分解や破壊)。数種のプロテアーゼを用いた完全たん白質消化も
198 利用されているが、これは処理が複雑で、厳密な調節が必要で
199 ある。そのため、一般にはたん白質よりもペプチドに適用され
200 る。

201 注：未知たん白質を初めて分析するときには、異なる加水分解
202 時間や温度条件で実験して至適条件を決定する。

203 方法 1

204 フェノールを含む塩酸を用いた酸加水分解がたん白質又はペ
205 プチドの加水分解に用いられる最も一般的な方法である。フェ
206 ノールの添加はチロシンのハロゲン化を防止する。

207 加水分解液 フェノールを0.1~1.0%含む6mol/L塩酸。

208 操作法

209 液相加水分解 試料たん白質又はペプチドを加水分解管に入

3 アミノ酸分析法

210 れ、乾燥する。(注：試料中の水分で加水分解用の塩酸が希釈
211 されないように、試料を乾燥する。)凍結乾燥たん白質500 μ g当
212 たり加水分解液200 μ Lを加え、ドライアイスアセトン浴中で
213 凍結させた後、減圧下で管を熔封する。酸化を防ぐため、通常
214 110°Cで24時間、減圧下又は不活性ガス置換下で試料を加水分
215 解する。たん白質が完全に加水分解されない懸念がある場合は、
216 長時間の加水分解(例えば、48、72時間)についても調べる。

217 **気相加水分解** この方法は最も一般的な酸加水分解法の一つ
218 であり、試料が少量しか入手できない場合の微量分析に適して
219 いる。塩酸からの試料の汚染も本法を用いることによって最小
220 限に抑えられる。乾燥した試料の入ったバイアル瓶を適当量の
221 加水分解液を入れた容器の中に置く。このとき、加水分解液が
222 試料の入ったバイアル瓶に入らないように注意する。容器の内
223 部を不活性ガスで置換するか減圧(0.0267kPa以下)にして、約
224 110°Cで24時間加熱する。気体状の酸が乾燥試料を加水分解す
225 る。試料バイアル瓶中での酸の凝結は最小限にする。加水分解
226 後、試料を減圧乾燥して残留する酸を除く。

227 方法 2

228 加水分解によるトリプトファンの酸化は、メルカプトエタン
229 スルホン酸を酸に用いることで減少させることができる。

230 **加水分解液** 2.5mol/Lメルカプトエタンスルホン酸溶液。

231 **気相加水分解** 試料たん白質又はペプチド約1~100 μ gを加
232 水分解管に入れ、乾燥する。この加水分解管を加水分解液約
233 200 μ Lを入れたより大きなガラス管の中に入れ、この管を減圧
234 (約0.0067kPa)下で熔封し、加水分解液を気化させる。これを
235 170~185°Cで約12.5分間加熱する。加水分解後、加水分解管
236 を減圧下で15分間乾燥し、残留する酸を除く。

237 方法 3

238 加水分解によるトリプトファンの酸化はチオグリコール酸を
239 還元剤として用いることによって防げる。

240 **加水分解液** 10%トリフルオロ酢酸、20%チオグリコール
241 酸及び1%フェノールを含む7mol/L塩酸溶液。

242 **気相加水分解** 試料たん白質又はペプチド約10~50 μ gを試
243 料管中で乾燥する。この試料管を加水分解液約200 μ Lを入れた
244 より大きなガラス管の中に入れ、この管を減圧(約0.0067kPa)
245 下で密封してチオグリコール酸を気化させ、166°Cで約15~30
246 分間加熱する。加水分解後、試料管を減圧下で5分間乾燥し、
247 残留する酸を除く。この方法によるトリプトファンの回収率は
248 用いる試料の量に依存する。

249 方法 4

250 たん白質の加水分解に先立ち、過ギ酸を用いてシステイン/
251 シスチン及びメチオニンを酸化する。

252 **酸化液** ギ酸と30%過酸化水素を9:1で混ぜ、1時間室温に
253 放置する。用時製する。

254 **操作法** 試料たん白質又はペプチドをギ酸20 μ Lに溶かし、
255 50°Cで5分間加熱した後、酸化液100 μ Lを加え、10~30分間放
256 置する。この反応で、システインはシステイン酸に、メチオニ
257 ンはメチオニンスルホンに変換される。過剰の試薬は真空遠心
258 分離して試料から除く。ハロゲン化合物が存在するとチロシン
259 の修飾が起こる。過ギ酸酸化したたん白質は方法1又は方法2
260 で加水分解する。

261 方法 5

262 システイン/シスチンの酸化はアジ化ナトリウムを用いた液
263 相加水分解中に行われる。

264 **加水分解液** 0.2%のフェノールを含む6mol/L塩酸にアジ化
265 ナトリウムを最終濃度0.2w/v%になるように加える。フェノール
266 はチロシンのハロゲン化を防止する。

267 **液相加水分解** 試料たん白質又はペプチドを約110°Cで24時
268 間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/シ
269 スチンは加水分解液に含まれるアジ化ナトリウムによってシス
270 テイン酸に変換される。この方法は方法4よりもチロシンの回
271 収率はよいが、メチオニンは定量的に回収されない。メチオニ
272 ンは一部が酸化されて、メチオニンスルホキシド及びメチオニ
273 ンスルホンに変わる。

274 方法 6

275 システイン/シスチンの酸化はジメチルスルホキシドで行わ
276 れる。

277 **加水分解液** 0.1~1.0%のフェノールを含む6mol/L塩酸にジ
278 メチルスルホキシドを最終濃度2vol%になるように加える。

279 **気相加水分解** 試料たん白質又はペプチドを約110°Cで24時
280 間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/シ
281 スチンは加水分解液に含まれるジメチルスルホキシドによって
282 システイン酸に変換される。ばらつきを少なくし、部分破壊を
283 補正する方法として、1~8molのシステインを含む標準たん白
284 質を酸化的加水分解して得られるシステイン酸の回収率を調べ
285 ることが推奨される。たん白質又はペプチドの加水分解物から
286 の回収率は、加水分解していないシステイン酸標準品からの回
287 収率より一般に約30%低い。ヒスチジン、メチオニン、チロ
288 シン及びトリプトファンも修飾されるので、本法では完全なア
289 ミノ酸組成分析は行えない。

290 方法 7

291 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は気相ピリジル
292 エチル化反応で行われる。

293 **還元液** ピリジン83.3 μ L、4-ビニルピリジン16.7 μ L、ト
294 リプチルホスフィン16.7 μ L及び水83.3 μ Lを適当な容器にとり、
295 混和する。

296 **操作法** 試料たん白質又はペプチド(1~100 μ g)を加水分解
297 管にとり、この管をより大きなガラス管の中に入れる。大きい
298 ガラス管の中に還元液を入れ、減圧(約0.0067kPa)下で密封し、
299 約100°Cで5分間放置する。次に、加水分解管を取り出し、減
300 圧デシケーター中で15分間乾燥し、残留する試薬を除く。ピ
301 リジルエチル化したたん白質又はペプチドは前記の方法で酸加
302 水分解する。このピリジルエチル化反応をシステイン1~8mol
303 を含む標準たん白質について同時に行い、ピリジルエチル化シ
304 スチンの回収率を補正する。ピリジルエチル化反応を長時間
305 行うと、たん白質中の末端 α -アミノ基及びリシンの ϵ -ア
306 ミノ基が修飾される可能性がある。

307 方法 8

308 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相ピリジル
309 エチル化反応で行われる。

310 **原液** 次の3種類の原液を調製し、ろ過する。原液A:
311 4mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含むpH8.5の
312 1mol/Lトリス緩衝液、原液B: 8mol/L塩酸グアニジン溶液、
313 原液C: 10%2-メルカプトエタノール溶液。

314 **還元液** 原液B/原液A混液(3:1)を調製し、6mol/L塩酸グ
315 アニジンを含む0.25mol/Lトリス緩衝液とする。

316 **操作法** 試料約10 μ gを還元液50 μ Lに溶かし、原液C約
317 2.5 μ Lを加える。この液を窒素あるいはアルゴンの存在下で暗

4 アミノ酸分析法

318 所に室温で2時間放置する。次に、この液に4-ビニルピリジ
319 ン約2 μ Lを加え、更に2時間室温で暗所に放置してピリジルエ
320 チル化反応を行う。逆相HPLCを用いてたん白質又はペプチド
321 画分を集め、脱塩する。脱塩した試料は酸加水分解する前に、
322 真空遠心分離で乾燥させる。

323 方法 9

324 システイン/シスチンの還元及びアルキル化は液相カルボキ
325 シメチル化反応で行われる。

326 原液 方法8に従って調製する。

327 カルボキシメチル化溶液 エタノール(95)1mL当たりヨード
328 アセタミド100mgを含む液を調製する。

329 緩衝液 方法8で調製した還元液を用いる。

330 操作法 試料を緩衝液50 μ Lに溶かし、原液C約2.5 μ Lを加え
331 る。これを窒素又はアルゴンの存在下で暗所に室温で2時間放
332 置する。次に、総チオールの理論量の1.5倍量のカルボキシメ
333 チル化溶液を加え、暗所に室温で更に30分間放置する。(注：
334 たん白質のチオール含量が不明の場合には、たん白質20nmol
335 当たり100mmol/Lヨードアセタミド溶液5 μ Lを加える。)反応
336 は過剰の2-メルカプトエタノールを加えて停止させる。たん
337 白質又はペプチドの脱塩は逆相HPLCによる分離で行う。酸加
338 水分解する前に、集めた試料は真空遠心分離で乾燥させる。生
339 成したS-カルボキシアミドメチルシステインは酸加水分解の
340 過程でS-カルボキシメチルシステインに変化する。

341 方法 10

342 システイン/シスチンはジチオジグリコール酸又はジチオジ
343 プロピオン酸と反応して混合ジスルフィドを生成する。(注：
344 ジチオジグリコール酸又はジチオジプロピオン酸のいずれを用
345 いるかはアミノ酸分析からどのような結果を望むかによる。)

346 還元液 ジチオジグリコール酸(又はジチオジプロピオン酸)
347 の0.2mol/L水酸化ナトリウム溶液(1 \rightarrow 100)を調製する。

348 操作法 試料約20 μ gを加水分解管に入れ、還元液5 μ Lを加
349 える。これに2-プロパノール10 μ Lを加え、真空遠心分離で水
350 分を除去した後、方法1により加水分解する。この方法の利点
351 は、他のアミノ酸残基が副反応によって誘導体化されず、また
352 加水分解前の試料の脱塩が不必要な点である。

353 方法 11

354 酸加水分解によってアスパラギンとグルタミンはそれぞれア
355 スパラギン酸とグルタミン酸に変換され、アスパラギンとアス
356 パラギン酸を合わせてAsxで表し、グルタミンとグルタミン酸
357 を合わせてGlxで表す。たん白質又はペプチドはビス(1,1-ト
358 リフルオロアセトキシ)ヨードベンゼン(BTI)と反応し、加水分
359 解によってアスパラギン及びグルタミンはそれぞれジアミノプ
360 ロピオン酸及びジアミノ酪酸に変化する。この変化によりアス
361 パラギン酸及びグルタミン酸を含むたん白質又はペプチド中の
362 アスパラギン及びグルタミンの含量を測定することができる。

363 還元液 次の3種類の溶液を調製し、ろ過する。溶液A：
364 10mmol/Lトリフルオロ酢酸溶液、溶液B：5mol/L塩酸グアニ
365 ジン及び10mmol/Lトリフルオロ酢酸を含む水溶液、溶液C：
366 用時調製したビス(1,1-トリフルオロアセトキシ)ヨードベン
367 ゼンのN,N-ジメチルホルムアミド溶液(9 \rightarrow 250)。

368 操作法 洗浄した加水分解管に試料約200 μ gをとり、溶液A
369 又は溶液B 2mL及び溶液C 2mLを加え、減圧下で加水分解管
370 を密封する。これを暗所で60 $^{\circ}$ C、4時間加熱する。次にこの試
371 料を水に対して透析し、過剰の試薬を除く。透析した試料を同

372 量のn-ブチル酢酸で3回抽出した後、凍結乾燥する。このた
373 ん白質試料を前述した方法で酸加水分解する。ジアミノプロピ
374 オン酸及びジアミノ酪酸はアミノ酸分析で用いるイオン交換ク
375 ロマトグラフィーでは通常リシンとは分離しない。したがって、
376 アミノ酸分離モードでイオン交換クロマトグラフィーを行った
377 ときは、アスパラギン及びグルタミンの含有量は非誘導体化酸
378 加水分解とBTI誘導体化酸加水分解で得られたアスパラギン酸
379 及びグルタミン酸の量の差として求められる。(注：トレオニ
380 ン、メチオニン、システイン、チロシン及びヒスチジンの測定
381 値はBTI誘導体化によって変動することがある。したがって、
382 これらのアミノ酸の組成を求める場合は、BTIを用いない加水
383 分解法を行う必要がある。)

384 アミノ酸分析の方法論とその基本原理

385 アミノ酸の分析には多くの方法があり、どの方法を選ぶかは
386 測定に要求される感度に依存する。一般に、用いられているほ
387 ぼ半数の方法はイオン交換クロマトグラフィーで遊離アミノ酸
388 を分離した後に誘導体化(例えば、ニンヒドリンやo-フタルア
389 ルデヒドによる誘導体化)して検出するポストカラム法である。
390 この方法は塩類や尿素などの少量の緩衝液成分を含む試料に利
391 用することができ、1分析当たり通常5 \sim 10 μ gのたん白質試料
392 を必要とする。その他の方法は一般に遊離アミノ酸を誘導体化
393 (例えば、フェニルイソチオシアネート、6-アミノキノイル
394 N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバマイド、o-フタルア
395 ルデヒド、(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニルクロリド、
396 9-フルオレニルメチルクロロギ酸、7-フルオロ-4-ニトロ
397 ベンゾ-2-オキサー-1,3-ジアゾールなどによる誘導体化)し
398 た後に逆相HPLCで分離するプレカラム法である。この方法は
399 感度が非常に高く、通常1分析当たり0.5 \sim 1.0 μ gのたん白質試
400 料でよいが、試料中の塩類の影響を受けやすい。更に、複数の
401 アミノ酸誘導体を生じ、結果の解釈を複雑にする可能性がある。
402 操作上の変動に対して、一般にポストカラム法のほうがプレカ
403 ラム法に比べて影響を受けにくい。

404 次に掲げる方法がアミノ酸の定量分析に利用できる。これら
405 の方法に用いる装置及び試薬類は市販されている。これらの方
406 法には、試液の調製法、反応の操作法、クロマトグラフィーの
407 システムなどが異なる多くの変法がある。特定のパラメーター
408 は実際に使用する装置や操作によって変わってくる。多くの実
409 験室では各方法の持つ利点を利用するために複数の分析方法を
410 用いている。これらの各方法では、アナログ信号がデータ取り
411 込み装置によって視覚化され、定量するためにピーク面積が計
412 算される。

413 方法 1 ニンヒドリンによるポストカラム検出法

414 ポストカラムでニンヒドリンにより検出するイオン交換クロ
415 マトグラフィーは定量的アミノ酸分析に利用される最も一般的
416 な方法の一つである。通例、より複雑な生体試料の分析にはLi
417 ⁺を基本とした陽イオン交換系を利用し、Na⁺を基本とした陽
418 イオン交換系はたん白質の加水分解で得られる単純なアミノ酸
419 混合物(通常17種のアミノ酸成分を含む)の分析に用いられる。
420 イオン交換カラム上でのアミノ酸の分離はpH及びイオン強度
421 の変化を組み合わせで行われる。分離を良くするために温度の
422 勾配変化もしばしば使用される。

423 アミノ酸がニンヒドリンと反応すると、特徴的な紫色又は黄
424 色を呈する。イミノ酸以外のアミノ酸は紫色を呈し、波長
425 570nmに吸収の極大を示す。プロリンのようなイミノ酸は黄

426 色を呈し、波長440nmに吸収の極大を示す。カラムから溶出
427 したアミノ酸とニンヒドリンの反応は440nmと570nmの両波
428 長で記録し、得られたクロマトグラムはアミノ酸組成の決定に
429 利用される。

430 検出限界はほとんどのアミノ酸で約10pmolであるが、プロ
431 リンでは約50pmolである。20pmolから500pmolの範囲で相関
432 係数0.999以上の良好な直線性が得られる。良好な組成値を求
433 めるには、加水分解前の量として1 μ g以上のたん白質試料を用
434 いるのがこの分析方法にとって最も適している。

435 方法2 OPAによるポストカラム蛍光検出法

436 *o*-フタルアルデヒド(OPA)はチオール化合物の存在下で一
437 級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生
438 成する。この反応は、イオン交換クロマトグラフィーによるア
439 ミノ酸分析のポストカラム誘導体化法として利用される。アミ
440 ノ酸の分離は方法1と同じ原理である。この方法を用いたアミ
441 ノ酸分析装置とその試薬は市販されている。また、この方法に
442 は多くの変法がある。

443 OPAは二級アミン(プロリンなどのイミノ酸)とは反応しない
444 ので、OPAと反応するように二級アミンを次亜塩素酸ナトリ
445 ウムで酸化し、蛍光誘導体を生成させる。強酸性陽イオン交換
446 カラムを用いて遊離アミノ酸を分離し、続いて次亜塩素酸ナト
447 リウムで酸化し、OPA及び*N*-アセチル-L-システインや2
448 -メルカプトエタノールのようなチオール化合物を用いて誘導
449 体化する。 α -アミノ酸の誘導体化は次亜塩素酸ナトリウム
450 の影響をほとんど受けない。

451 イオン交換カラムでのアミノ酸の分離はpH及びイオン強度
452 の変化を組み合わせで行う。溶出したアミノ酸をOPAで誘導
453 体化した後、反応物を蛍光検出器に通過させる。OPA-誘導
454 体化アミノ酸の蛍光強度は励起波長348nm、蛍光波長450nm
455 で測定する。

456 検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で数10pmolのレベル
457 である。数pmolから数10nmolの範囲で直線性が得られる。良
458 好な組成値を求めるには、加水分解前の量として500ng以上の
459 試料で分析を始めるのがこの方法にとって最も適している。

460 方法3 PITCプレカラム誘導体化法

461 フェニルイソチオシアネート(PITC)はアミノ酸と反応して
462 フェニルチオカルバミル(PTC)誘導体を生成する。この誘導体
463 は波長245nmで高感度に検出することができる。そのため、
464 アミノ酸をPITCで誘導体化し、逆相HPLCで分離した後に紫
465 外吸光度計で検出し、アミノ酸組成を分析する。

466 誘導体化されたアミノ酸は、試薬を減圧下で除いた後、乾燥
467 して凍結すれば数週間は安定に保存することができる。装置に
468 注入するために溶解したものは、冷所に保存すれば、3日間は
469 クロマトグラフ上での目立った変化は起こらない。

470 ODSカラムを用いた逆相HPLCでのPTC-アミノ酸の分離
471 はアセトニトリル濃度と緩衝液のイオン強度の変化を組み合わ
472 せて行う。カラムから溶出したPTC-アミノ酸は波長254nm
473 で検出する。

474 検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で1pmolである。
475 20pmolから500pmolの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線
476 性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量と
477 して500ng以上の試料を用いるのがこの分析方法にとって最も
478 適している。

479 方法4 AQCプレカラム誘導体化法

480 カラムに導入する前にアミノ酸を6-アミノキノリル-N-
481 ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト(AQC)で誘導体化し、
482 逆相HPLCで分離した後に蛍光光度計で検出する方法である。

483 AQCはアミノ酸と反応して安定な蛍光性尿素誘導体(AQC-
484 アミノ酸)を生成する。AQC-アミノ酸は逆相HPLCで容易に
485 分析できる。したがって、AQCでアミノ酸を誘導体化し、逆
486 相HPLCで分離することによって、アミノ酸組成を分析するこ
487 とができる。

488 ODSカラムでのAQC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃
489 度と塩濃度の変化を組み合わせで行う。この誘導体の蛍光は励
490 起波長250nm、蛍光波長395nmで選択的に検出できるので、
491 反応液を直接カラムに注入しても蛍光試薬の主要な副生成物で
492 ある6-アミノキノリンの妨害はほとんど受けない。過剰の試
493 薬は直ちに6-アミノキノリン、*N*-ヒドロキシスクシンイミ
494 ド及び二酸化炭素に加水分解されるので($t_{1/2} < 15$ 秒)、1分後
495 にはもはや誘導体化反応は起こらない。

496 AQC-アミノ酸のピーク面積は反応液を室温で放置しても
497 少なくとも1週間は変化しない。この誘導体は非常に安定であ
498 るので、自動分析装置で一晩中分析することができる。

499 検出限界はシステイン以外のアミノ酸で約40~320fmolであ
500 り、システインの検出限界は約800fmolである。2.5~
501 200 μ mol/Lの範囲で相関係数0.999以上の良好な直線性が得ら
502 れる。良好なデータは、試料たん白質又はペプチド30ngに対
503 応する加水分解物の分析で得られる。

504 方法5 OPAプレカラム誘導体化法

505 カラムに導入する前にアミノ酸を*o*-フタルアルデヒド
506 (OPA)で誘導体化し、逆相HPLCで分離した後に蛍光光度計で
507 検出する方法である。この方法では二級アミンのアミノ酸(例
508 えば、プロリン)は検出しない。

509 OPAはチオール試薬の共存下で一級アミンと反応し、強い
510 蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。2-メルカプト
511 エタノールや3-メルカプトプロピオン酸がチオール化合物と
512 して用いられる。OPAはそれ自身が蛍光を持たないので、妨
513 害ピークは現れない。更に、速やかに反応することに加えて、
514 水によく溶け、水溶液での安定性が高いことから、誘導体化と
515 分析を自動化しやすい。この自動化には試料と試薬を混合する
516 ためのオートサンプラーを使用する。しかし、二級アミンと反
517 応しないことが大きな欠点であり、この方法では二級アミンと
518 して存在するアミノ酸(例えば、プロリン)が検出できない。こ
519 の欠点を補うために、方法7又は方法8の分析法を組み合わせ
520 て行う。

521 OPAでプレカラム誘導体化したアミノ酸は逆相HPLCで分
522 離する。OPA-アミノ酸誘導体は不安定であるので、HPLC
523 での分離と分析は誘導体化した後直ちに行う。HPLCにはアミ
524 ノ酸誘導体を検出するために蛍光検出器を取り付ける。OPA
525 -アミノ酸誘導体の蛍光強度は励起波長348nm、蛍光波長
526 450nmで測定する。

527 検出限界は50fmol以下といわれているが、実際の分析にお
528 ける限界は1pmolである。

529 方法6 DABS-Clプレカラム誘導体化法

530 アミノ酸を(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホニルクロリ
531 ド(DABS-Cl)で誘導体化し、逆相HPLCで分離して可視光で検
532 出する方法である。

533 DABS-Clはアミノ酸の標識に用いる発色性試薬である。
534 DABS-Clで標識したアミノ酸(DABS-アミノ酸)は非常に安定
535 であり、波長436nmに極大吸収を示す。

536 19種の天然にあるすべてのアミノ酸のDABS誘導体は、アセ
537 トニトリルと緩衝液からなるグラジエント溶出系を用いた逆相
538 HPLCのODSカラムで分離することができる。カラムから分
539 離して溶出したDABS-アミノ酸は可視領域の波長436nmで
540 検出する。

541 この方法はプロリンのようなイミノ酸も他のアミノ酸と同程
542 度の感度で測定できる。また、「たん白質の加水分解」の項の
543 方法2に示した加水分解法、すなわちメルカプトエタンスルホ
544 ン酸、*p*-トルエンスルホン酸又はメタンスルホン酸のような
545 スルホン酸類でたん白質又はペプチドを加水分解することによ
546 って、DABS-Cl誘導体化法はトリプトファンも同時に定量で
547 できる。アスパラギンやグルタミンのような酸に不安定なアミノ
548 酸も、「たん白質の加水分解」の項の方法11に示したたん白
549 質又はペプチドのBTI処理でそれぞれをジアミノプロピオン酸
550 及びジアミノ酪酸に変換することによって分析することができ
551 る。

552 非たん白質性アミノ酸であるノルロイジンは、 α -アミノ
553 酸のピークと重なって溶出するので、本法の内標準物質として
554 は使用できない。ニトロクロシンはいずれのアミノ酸ピークと
555 も重ならないので、内標準物質に使用できる。

556 DABS-アミノ酸の検出限界は約1pmolである。2~5pmol
557 の各DABS-アミノ酸が信頼性を持って定量的に測定でき、1
558 分析当たりDABS化したたん白質加水分解物10~30ngが必要
559 である。

560 方法7 FMOC-Clプレカラム誘導体化法

561 9-フルオレニルメチルクロロギ酸(FMOC-Cl)によりアミノ
562 酸を誘導体化し、これを逆相HPLCで分離して蛍光で検出する
563 方法である。

564 FMOC-Clは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い
565 蛍光を持つ物質を生成する。アミノ酸とFMOC-Clの反応は水
566 溶液中、緩やかな条件下で進行し、30秒で反応は完了する。こ
567 の誘導体は安定であるが、ただヒスチジン誘導体だけは分解し
568 ていく。FMOC-Clはそれ自身が蛍光を持っているが、過剰の
569 この試薬と蛍光性副生成物はFMOC-アミノ酸を消失させる
570 ことなく除くことができる。

571 FMOC-アミノ酸はODSカラムを用いた逆相HPLCで分離
572 される。この分離は、酢酸塩緩衝液/メタノール/アセトニト
573 リル混液(5:4:1)から酢酸塩緩衝液/アセトニトリル混液
574 (1:1)に直線的に変化させるグラジエント溶出で行われ、20種
575 のアミノ酸誘導体は20分で分離される。カラムから溶出した
576 各誘導体は励起波長を260nm、蛍光波長を313nmに設定した
577 蛍光光度計で検出される。

578 検出限界は数fmolである。0.1~50 μ mol/Lの範囲でほとんど
579 のアミノ酸は直線性を示す。

580 方法8 NBD-Fプレカラム誘導体化法

581 7-フルオロ-4-ニトロベンゼン-2-オキサ-1,3-ジア
582 ゴール(NBD-F)によりアミノ酸を誘導体化し、これを逆相
583 HPLCで分離して蛍光で検出する方法である。

584 NBD-Fは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い蛍
585 光を持つ物質を生成する。アミノ酸はNBD-Fと60°Cで5分間加
586 熱することによって誘導体化される。NBD-アミノ酸誘導体

587 は、アセトニトリルと緩衝液の混液からなるグラジエント溶出
588 系を用いることによって逆相HPLCのODSカラムで分離され、
589 17種のアミノ酸誘導体は35分で分離される。 ϵ -アミノカプ
590 ロン酸はクロマトグラム領域の平坦部に溶出するので、内標準
591 物質として使用できる。カラムから溶出した各誘導体は励起波
592 長を480nm、蛍光波長を530nmに設定した蛍光光度計で検出
593 される。

594 この方法の感度は、OPAと反応しないプロリンを除いて、
595 OPAプレカラム誘導体化法(方法5)の感度とほとんど同じであ
596 り、OPAと比べてNBD-Fのほうが都合がよいかもしい。各ア
597 ミノ酸の検出限界は約10fmolである。最終の標識反応溶
598 液中に約1.5 μ gのたん白質加水分解物が含まれていれば、分析
599 することができる。

600 データの計算と解析

601 たん白質又はペプチドの加水分解物中のアミノ酸含量を測定
602 するときには、酸加水分解の段階でトリプトファンとシステイ
603 ンが分解されていることに注意する必要がある。セリンとトレ
604 オニンは酸加水分解により一部が分解され、イソロイシンとバ
605 リンは一部しか遊離されないことがある。メチオニンは酸加水
606 分解中に酸化を受け、また、あるアミノ酸(例えば、グリシン
607 やセリン)は外部から混入しやすい。気相加水分解で反応容器
608 中を適切な真空度(0.0267kPa以下)にするか、又は不活性ガス
609 (アルゴン)で置換すると酸化による破壊の程度を低くすること
610 ができる。したがって、たん白質又はペプチドの加水分解物中
611 のシステイン、トリプトファン、トレオニン、イソロイシン、
612 バリン、メチオニン、グリシン及びセリンの定量値は変動しや
613 すく、その解析にはより一層の検討と考察が必要である。

614 計算

615 **アミノ酸のモル%** アミノ酸のモル%とは、たん白質中の
616 100アミノ酸残基当たりの特定アミノ酸残基数である。この値
617 は試験するたん白質の分子量が明らかでないときのアミノ酸分
618 析データを評価するのに有用である。この情報はたん白質又は
619 ペプチドの同定やその他の目的に利用できる。それぞれの分析
620 方法に従って得られたピークを注意深く同定し、面積を測定す
621 る。試料中の各アミノ酸のモル%を次式により計算する。

$$622 \quad 100r_U/r$$

623 r_U : 個々のアミノ酸のピーク面積から求めた量(nmol)

624 r : 試料中の全アミノ酸のピーク面積から求めた量(nmol)の
625 合計

626 得られた各アミノ酸のモル%を既知たん白質のそれと比較す
627 ることにより試料たん白質を同定することができる。

628 **未知たん白質試料** このデータ解析法は、アミノ酸分析デー
629 タを用いて未知たん白質試料のたん白質濃度を推定するのに利
630 用できる。次式により回収された各アミノ酸の質量(μ g)を計算
631 する。

$$632 \quad mM_w/1000$$

633 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

634 M_w : ペプチド結合で除かれた水分子の質量を補正したアミ
635 ノ酸の平均分子量

636 回収されたアミノ酸の質量の総計は、部分的又は完全に破壊
637 されたアミノ酸を適切に補正した後のたん白質の総質量の推定

7 アミノ酸分析法

638 値となる。未知たん白質の分子量がSDS-PAGEや質量分析で
639 わかれば、そのアミノ酸組成が予測できる。次式により各アミ
640 ノ酸の残基数を計算する。

$$641 \quad m / (1000M / M_{WT})$$

642 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

643 M : たん白質の総質量(μg)

644 M_{WT} : 未知たん白質の分子量

645 **既知たん白質試料** このデータ解析法は、分子量とアミノ酸
646 組成が既知のたん白質試料のアミノ酸組成及びたん白質濃度を
647 アミノ酸分析データを用いて調べるのに利用できる。分析しよ
648 うとするたん白質のアミノ酸組成が明らかなきには、あるア
649 ミノ酸の回収率は良好であるが、他のアミノ酸の回収率が完全
650 又は部分的な破壊(例えば、トリプトファン、システイン、ト
651 レオニン、セリン、メチオニン)やペプチド結合の不完全開裂
652 (すなわち、イソロイシンとバリンの開裂)又は遊離アミノ酸の
653 外部からの混入(すなわち、グリシンやセリンの混入)のために
654 必ずしも十分でない場合にこの解析法を活用することができる。
655 回収率の最も良いアミノ酸はそのたん白質を代表しているの
656 で、そのアミノ酸がたん白質を定量するのに利用される。一般
657 に回収率の良いアミノ酸にはアスパラギン酸/アスパラギン、
658 グルタミン酸/グルタミン、アラニン、ロイシン、フェニルア
659 ラニン、リシン、アルギニンがある。これら回収率の良いアミ
660 ノ酸の種類は各自の分析装置での経験によって変わる。回収率
661 の良い各アミノ酸の量(nmol数)をそのアミノ酸の理論量で除し、
662 回収率の良い各アミノ酸に基づいたたん白質量を求め、これら
663 の値を平均する。回収率の良い各アミノ酸によって求めたたん
664 白質量は平均値に対して均等に分布していなければならない。
665 平均値から大きくはずれた値は除外する。通常、平均値からの
666 偏差が5%を超えるものは除外の対象と考えられる。残りの値
667 から平均値を再計算して試料のたん白質量を求める。各アミノ
668 酸の含量を計算で求めた平均たん白質含量で除して試料のアミ
669 ノ酸組成を求める。

670 相対組成誤差(%)を次式により計算する。

$$671 \quad 100m / ms$$

672 m : アミノ酸の実測値(アミノ酸残基当たりのnmol)

673 ms : 当該アミノ酸の理論量

674 平均相対組成誤差は各アミノ酸の相対組成誤差の絶対値の平
675 均であり、通常、トリプトファン及びシステインはこの計算か
676 らは除かれる。この平均相対組成誤差はアミノ酸分析の全過程
677 が適切に行われたかどうかについての重要な情報となる。たん
678 白質試料のアミノ酸組成と既知組成との一致性は試料中のたん
679 白質の同定と純度の保証に利用できる。

1 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2 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。

3 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法は生物薬品中のた
4 ん白質の特性解析、及び純度試験や定量試験に用いられる。

5 特に生物薬品中のたん白質の同定及び均一性の評価に適した
6 分析法である。また、たん白質のサブユニットの分子量の測定
7 並びに精製たん白質のサブユニット組成の決定に日常的に用い
8 られる。

9 既成のゲル及び試薬類が広く市販されているが、これらの市
10 販品を用いた場合でも同等の結果が得られ、かつ、後述するバ
11 リーテーションを行い、その基準に適合する限り、以下の方法に
12 代わって利用して差し支えない。

13 1. ポリアクリルアミドゲルの特性

14 ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果は、隣接するポリ
15 アクリルアミド鎖と交差結合するビスアクリルアミドによって
16 形成される繊維と孔の三次元的網目構造により得られる。この
17 重合反応は過硫酸アンモニウム及びN,N',N''-テトラメチ
18 ルエチレンジアミン(TEMED)からなるフリーラジカル生成系
19 により触媒される。

20 ゲルのアクリルアミド濃度が増加すると有効孔径は減少する。
21 ゲルの有効孔径は分子ふるい効果によって実験的に求められる。
22 すなわち、巨大分子の移動を妨げる程度によって決められる。

23 利用できるアクリルアミドの濃度には限界がある。高濃度では
24 ゲルが壊れやすく取扱いが難しい。ゲルの孔径が減少するに従
25 い、たん白質のゲル中の移動速度は減少する。アクリルアミド
26 の濃度を調整して孔径を調節することによって、本法の解像度
27 を目的たん白質に対して最適化させることができる。このよう
28 にゲルの物理的な性質はアクリルアミドとビスアクリルアミド
29 の濃度によって定まる。

30 ゲルの組成に加え、たん白質の状態も電気泳動の移動度を決
31 定する重要な要因となる。たん白質の電気泳動による移動度は
32 荷電する基のpK値及びたん白質分子のサイズに依存する。ま
33 た移動度は支持材料の性質と同様に、緩衝液の種類、濃度及び
34 pH、又は温度及び電界強度などによっても影響を受ける。

35 2. 変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動

36 以下に例示する方法は質量14000~100000ダルトンの単量
37 体ポリペプチドの分析に適用するものである。いろいろな技術
38 (例えばグラジエントゲル、特殊な緩衝液系等)によってこの質
39 量範囲を広げることが可能であるが、ここでは触れない。

40 ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を用いる変性条件下でのポリ
41 アクリルアミドゲル電気泳動法(SDSポリアクリルアミドゲル
42 電気泳動法)は、たん白質性生物薬品の品質評価に最も一般的
43 に利用される電気泳動法であり、以下の方法もこれを中心に記
44 述する。一般に、たん白質を電気泳動により分析する際には、
45 たん白質をポリペプチドの各サブユニットに解離させ、また凝
46 集を最少にするような条件にしたポリアクリルアミドゲル中で
47 分析を行う。通常はたん白質をゲルに添加する前に強陰イオン
48 界面活性剤であるSDSと熱により解離させる。変性したポリ
49 ペプチドはSDSと結合して負に荷電し、たん白質の種類とは
50 無関係に一定の電荷-質量比を示す。SDSの結合量はほとん
51 どの場合ポリペプチドの分子量に比例しており、そのアミノ酸

52 配列に依存しないため、SDS-ポリペプチド複合体はゲル中
53 をポリペプチドのサイズに依存した移動度で移動する。

54 生じたSDS-ポリペプチド複合体の電気泳動による移動度
55 は、すべての複合体分子について質量に対して同じ関数関係に
56 あるとみなされる。SDS-複合体は低分子量複合体のほうが
57 高分子量のものより速く陽極に向かって移動すると想定できる。
58 したがって、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法での相
59 対移動度からたん白質の分子量を測定することができ、またゲ
60 ル中で単一のバンドになることが高純度の証明となる。

61 しかしながら、N-又はO-糖鎖のようにポリペプチド骨格
62 への修飾が生じるものについては、SDSが糖に対してはポリ
63 ペプチドと同様には結合しないため、たん白質のみかけの分子
64 量に大きく影響する。そのため電荷-質量比は一定にならない。
65 このように翻訳後に修飾を受けたたん白質の場合、みかけの分
66 子量はポリペプチドの質量を反映してはいない。

67 2.1. 還元条件

68 ポリペプチドのサブユニットと三次元構造は多くの場合S-S
69 S結合により保持されている。還元条件下でのSDSポリアクリ
70 ルアミドゲル電気泳動法の目的は、S-S結合を還元してこの
71 構造を破壊したたん白質を電気泳動することにある。2-メル
72 カプトエタノールやジチオスレイトール(DTT)などで処理して
73 たん白質を完全に変性、解離させると、ポリペプチドの骨格が
74 ほどけた状態でSDSとの複合化が起こる。このような条件下
75 では、ポリペプチドのサブユニットの分子量は適当な分子量マ
76 ーカーがあれば直線回帰により求めることができる。

77 2.2. 非還元条件

78 試験目的によっては、たん白質をサブユニットペプチドへ完
79 全に解離させたくない場合がある。2-メルカプトエタノール
80 やDTTのような還元剤による処理をしなければ、S-S結合は
81 完全に保持されたままとなり、たん白質はオリゴマーとして保
82 持される。SDS-たん白質オリゴマー複合体はそれらのSDS
83 -サブユニットポリペプチド複合体より移動速度は遅い。その
84 上、非還元たん白質はSDSによって完全には飽和されないた
85 め、SDSと一定の質量比では結合しない。このため、完全に
86 還元変性させたポリペプチドの分子量の測定に比べて非還元条
87 件でのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量
88 の測定はより複雑である。なぜなら、分子量を正確に比較する
89 には標準物質と試料の双方が類似した形状である必要があるか
90 らである。一方、ゲル中で単一バンドに染色されることは、高
91 純度であることの証明になる。

92 3. 不連続緩衝液系ゲル電気泳動の特徴

93 たん白質の混合物を分析するための最も一般的な電気泳動法
94 は、二種の異なるゲルを連結する方法、すなわち、分離(下層)
95 ゲルと濃縮(上層)ゲルからなる不連続な緩衝液系ゲルを用いる
96 方法である。この二種のゲルは孔径、pH及びイオン強度にお
97 いて異なっている。更に、ゲル中と電極緩衝液で異なる移動イ
98 オンが用いられる。緩衝液系の不連続性によって、大容量の試
99 料溶液でも濃縮ゲル中で濃縮され、結果として分離度が高まる。
100 電圧をかけると試料溶液が存在するところで電圧が低下し、こ
101 れによってたん白質が濃縮ゲル中に導入される。電極緩衝液か
102 らグリシンイオンがたん白質に続いて濃縮ゲル中に入る。移動
103 の速い塩素イオンを先端に、これと比して移動が遅いグリシン
104 イオンを後端とする移動界域が速やかに形成される。この先端
105 イオンと後端イオンの境界間に高電圧が局所的に生じ、SDS

106 たん白質複合体は濃縮層を形成し、塩素イオン層及びグリシン
107 イオン層の間を泳動する。添加した試料溶液の層高に関係なく、
108 すべてのSDS-たん白質複合体はごく狭い範囲に濃縮され、極めて
109 限定された高密度たん白質の薄い層として分離ゲル中に入る。孔径
110 の大きな濃縮ゲルはほとんどのたん白質の移動を妨げず、主として
111 対流防止物質として働いている。分離ゲルの孔径はより小さいので、
112 濃縮ゲルと分離ゲルの境界面でたん白質の移動速度は急激に低下
113 する。分離ゲル中ではゲルのマトリックスによる分子ふるい効果
114 によってたん白質の移動速度は低下し続ける。グリシンイオンは
115 たん白質を追い越し、トリシドロキシメチルアミノメタンとグリ
116 シンにより形成された均一なpH域に移動する。分子ふるい効果
117 によりSDS-たん白質複合体はそれぞれの分子量に従って分離さ
118 される。

119 4. 垂直不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製

120 4.1. ゲル形成カセットの組立て

121 ガラス板2枚(サイズ:例えば10cm×8cm)、ポリテトラフル
122 オロエチレン製サンプルコウム、スペーサー2個及びシリコーン
123 ゴム管(直径:例えば0.6mm×35cm)をマイルドな洗剤で洗い、
124 水で十分にゆすぐ。ペーパータオル又はティッシュで水分をと
125 る。スペーサー及びシリコーンゴム管に非シリコーン性グリース
126 を塗る。このスペーサーをガラス板の両短端側に端から2mm
127 離し、更にゲルの底部に相当する長端側の端から2mm離れた
128 位置に取り付ける。次に片方のスペーサーに沿ってガラス板に
129 シリコーンゴム管を取り付け始める。注意しながらスペーサーの
130 下部でシリコーンゴム管を曲げてガラス板の長端側に向ける。
131 長端側のシリコーンゴム管を指で押さえながらもう片方の短端
132 側へ曲げて、取り付ける。2枚目のガラス板をきちんと置き、
133 手で押さえる。両短端側を2個ずつの留め金で固定する。ガラ
134 ス板の長端側を4個の留め金で固定してゲル枠の底部を形成さ
135 せる。シリコーンゴム管がガラス板の端に沿って取り付けられ、
136 留め金で固定したときに押し出されていないことを確認する。
137

138 4.2. ゲルの調製

139 不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲルでは、両ゲ
140 ルのアクリルアミド-ビスアクリルアミドの組成、緩衝液及び
141 pHが異なるので、分離ゲル液を注ぎ、ゲルを形成させた後に
142 濃縮ゲル液を注ぐ。

143 4.2.1. 分離ゲルの調製

144 表1に示した量に従って、目的濃度の分離ゲルを調製するの
145 に必要なアクリルアミドを含む溶液適当量を三角フラスコ中
146 で調製する。表に示した順序で組成成分を混和する。過硫酸
147 アンモニウム溶液及びTEMEDを加える前に、混和した液を必要
148 に応じてセルロースアセテート膜(孔径:0.45 μ m)を用い吸引
149 する;ろ過中に気泡が生じなくなるまでろ過装置を振りながら
150 減圧する。表1に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及び
151 TEMEDを加え、振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の2枚のガラス
152 板の間に注ぐ。濃縮ゲルのための十分なスペース(サンプルコ
153 ウムの歯の長さプラス1cm)を残しておく。この液の上にピペ
154 ットを用いてイソブタノール飽和水を注意してのせる。これ
155 を室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

156 4.2.2. 濃縮ゲルの調製

157 分離ゲルの重合が完了(約30分)した後、イソブタノール層を
158 捨て、ゲル上部を水で数回洗ってイソブタノール及び非重合の
159 アクリルアミドを取り除く。ゲルの上部からできる限り水分を

160 流し去り、更に残る水分をペーパータオルの端などで取り除く。
161 表2に示した量に従って、目的に応じた濃度のアクリルアミ
162 ドを含む溶液の適当量を三角フラスコ中で調製する。示された
163 順序で組成成分を混和する。過硫酸アンモニウム溶液及び
164 TEMEDを加える前に、混和した液を必要に応じてセルロース
165 アセテート膜(孔径:0.45 μ m)を用い吸引する;ろ過中に
166 気泡が生じなくなるまでろ過装置を振りながら減圧する。表2
167 に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及びTEMEDを加え、
168 振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の2枚のガラス板の間にある分離
169 ゲルの上に直接注ぐ。直ちに気泡が入らぬよう注意しながら清
170 潔なサンプルコウムを濃縮ゲル液中に差し込む。更に濃縮ゲ
171 ル液をサンプルコウムのスペースが完全に満たされるよう加える。
172 これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

173 4.3. 電気泳動装置へのゲルの取付け及び泳動分離

174 ゲルの重合が完了した後(約30分)、サンプルコウムを注意し
175 て取り除き、直ちに水又はSDS-ポリアクリルアミドゲル電
176 気泳動用緩衝液でみぞをゆすぎ、非重合アクリルアミドを除去
177 する。必要ならば先端を鈍化した皮下注射針で濃縮ゲルのみぞ
178 をまっすぐに直す。片方の短端側の留め金をはずし、注意して
179 シリコーンゴム管を取り除き、再び留め金を付ける。反対側
180 についても同様に操作する。ゲル底部からシリコーンゴム管を
181 取り除く。このゲルを泳動装置に取り付け、泳動緩衝液を上
182 部及び下部の緩衝液槽に入れる。ガラス板間のゲル底部の気
183 泡を取り除く。この操作を行うには曲がった注射針をつけた
184 注射筒を用いると良い。緩衝液系の不連続性が壊れるので、
185 試料液などを添加する前に予備泳動を行ってはならない。試
186 料などの液を添加する前にSDS-ポリアクリルアミドゲル電
187 気泳動用緩衝液でゲルのみぞを注意してゆすぎ、適切な試
188 料用緩衝液を用いて試料液及び標準液を調製し、各条の規
189 定に従って処理する。各々の液の適量を濃縮ゲルのみぞに
190 添加する。各電気泳動装置に適した条件を用いて泳動を開始
191 する。各電気泳動装置に応じた表面積及び厚さの異なるゲ
192 ルを市販品として入手することもできる。最適な分離を得る
193 ためには泳動時間及び電流/電圧は泳動装置により変更する
194 必要がある。分離ゲル中へ色素の先端が移動していること
195 を確認する。色素がゲルの下部に到達したら、泳動を停止
196 する。ゲル部を装置からははずし、ガラス板を取り除く。
197 スペーサーを取り除き、濃縮ゲルを除去した後、直ちに
198 染色操作に入る。

198 5. ゲル中のたん白質の検出

199 クーマシー染色はバンド当たり1~10 μ gのたん白質量が検
200 出できる最も一般的な染色法である。銀染色はゲル中のたん
201 白質の染色に最も鋭敏な方法で、10~100ngを含むバンドの
202 検出が可能である。ゲル染色はすべて適切な容器中で静かに
203 振り混ぜながら室温で行う。ゲル染色では指紋も染色され
204 るので手袋をしなければならない。

205 5.1. クーマシー染色

206 十分な量のクーマシー染色試液中にゲルを浸し、少なくとも
207 1時間染色する。染色試液を取り除く。

208 十分な量の脱色試液でゲルを脱色する。染色されたたん
209 白質のバンドが透明な背景に明瞭に区別できるようになる
210 まで脱色試液を数回交換する。ゲルの脱色が進めば進むほど、
211 より少ないたん白質量を検出できるようになる。2~3gの陰
212 イオン交換樹脂若しくは少量のスポンジ片を脱色試液中に
213 入れると脱色を速めることができる。

3 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

214 注：この操作で用いられる酸-アルコール液はゲル中のたん
215 白質を完全には固定しない。したがってゲルの染色及び脱色の
216 操作中に分子量の低いたん白質は多少とも失われることがある。
217 クーマシー染色試液中に浸す前にゲルを固定用トリクロロ酢酸
218 試液中に1時間放置することにより耐久性の固定が得られる。

219 5.2. 銀染色

220 ゲルを十分な量の固定試液に浸し、1時間放置する。固定試
221 液を除去し、新しい固定試液を加え、少なくとも1時間又は可
222 能なら一夜放置する。固定試液を捨て、ゲルを水中で1時間洗
223 う。ゲルを1vol%グルタルアルデヒド溶液中に15分間浸し、
224 水で2回15分間ずつ洗う。次に暗所で新鮮な銀染色用硝酸銀試
225 液中に15分間浸した後、5分間ずつ3回水で洗う。十分に染色
226 されるまで現像試液中に約1分間ゲルを浸し、更に停止試液中
227 で15分間放置して現像する。ゲルを水で洗う。

228 6. 染色したSDS-ポリアクリルアミドゲルの乾燥

229 使用する染色方法に応じて、ゲルの前処理法が異なる。クー
230 マシー染色したものは、脱色後少なくとも2時間濃グリセリン
231 溶液(1→10)中にゲルを放置する(一夜放置してもよい)。銀
232 染色の場合には、最後の洗浄の後に濃グリセリン溶液(1→50)
233 中に5分間浸す。

234 次に、多孔性のセルロースフィルム2枚を水に浸し、5~10
235 分間放置する。一方のフィルムを乾燥用枠にのせる。注意して
236 ゲルを取り上げ、そのフィルム上に置く。気泡をとり除き、ゲ
237 ルの周囲に2~3mLの水を注ぎ、その上にもう1枚のフィルム
238 をのせ、気泡を取り除く。乾燥用枠を組み立て、オープン中又
239 は室温で乾燥するまで放置する。

240 7. 分子量の測定

241 たん白質の分子量はそれぞれの移動度を分子量既知のいくつ
242 かのマーカーたん白質のそれと比較して算出する。一様に染色
243 するように混和された分子量既知のマーカーたん白質の混合物
244 がゲルのキャリブレーション用に市販されている。各種の分子
245 量範囲のものが入手できる。分子量既知のマーカーたん白質の
246 濃厚原液を適切な試料緩衝液で希釈し、測定しようとするたん
247 白質試料と同一のゲルに添加する。

248 泳動の完了後、直ちに泳動イオンの先端を確認するためマー
249 カー色素であるプロモフェノールブルーの位置に印を付ける。
250 これにはゲルの端に切れ込みを入れる、若しくは墨汁に浸した
251 針でゲルを刺すという方法がある。染色後、各たん白質のバン
252 ド(マーカーたん白質及び試料)について分離ゲルの上端からの
253 移動距離を測定する。各たん白質の移動距離をマーカー色素の
254 移動距離で割る。このようにして得られた移動距離はたん白質
255 の(マーカー色素に対する)相対移動度と呼ばれ、 R_f として表さ
256 れる。マーカーたん白質の相対分子量(M_r)の対数を R_f 値に対し
257 てプロットする。このグラフはわずかにS字状になることに注
258 意すること。未知のたん白質の分子量は直線回帰分析によって、
259 又は未知試料で得られた相対移動度がグラフの直線部分に位置
260 する場合には R_f に対する $\log M_r$ の曲線に内挿することによって
261 求めることができる。

262 8. 実施した試験の適合性(バリデーション)

263 分子量マーカーの先端がマーカー色素の移動距離の80%部
264 分まで移動し、また必要とされる分離範囲(例えば、目的物質
265 とその二量体又は目的物質とその類縁物質をカバーする範囲)
266 において、分子量の対数値と R_f 値をプロットするとき、7.に述
267 べたような直線関係にあることが示された場合以外は、試験は

268 無効である。その他、試料溶液についてはそれぞれの各条中に
269 規定される。

270 9. 不純物の定量

271 各条に不純物の存在許容限度に関する規格値が規定されてい
272 る場合、試料溶液を希釈して不純物の限度規格値に相当する標
273 準溶液を調製する。例えば、限度規格値が5%なら、標準溶液
274 は試料溶液を20倍に希釈したものになる。試料溶液から得た
275 不純物のバンドは標準溶液から得た主バンドより濃くない。

276 バリデートされた条件下では、デンストメーターを用いて主
277 バンドに対して相対的濃度を測定することにより不純物を定量
278 することができる。この場合、測定値に直線性が得られること
279 を確認するバリデーションを行う必要がある。

280 10. 試薬・試液

281 (i) クーマシー染色試液：クーマシーブリリアントブルーR
282 -250 125mgを水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)100mLに溶かし、ろ過する。

284 (ii) 現像試液：クエン酸-水合物2gを水に溶かし、100mLと
285 する。この液2.5mLにホルムアルデヒド液0.27mLと水を加え
286 て500mLとする。

287 (iii) 固定試液：メタノール250mLにホルムアルデヒド液
288 0.27mL及び水を加えて500mLとする。

289 (iv) 硝酸銀試液、銀染色用：水酸化ナトリウム試液40mLに
290 アンモニア水(28)3mLを加え、更にかき混ぜながら硝酸銀溶液
291 (1→5)8mLを滴加する。次に水を加えて200mLとする。

292 (v) 脱色試液：水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)。

293 (vi) 停止試液：酢酸(100)10mLに水を加えて100mLとする。

294 (vii) トリクロロ酢酸試液、固定用：トリクロロ酢酸10gを水
295 /メタノール混液(5:4)に溶かし、100mLとする。

4 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

表1 分離ゲルの調製

溶液の組成		各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
		5mL	10mL	15mL	20mL	25mL	30mL	40mL	50mL
6% アクリルアミド	水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
	アクリルアミド溶液*1	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8% アクリルアミド	水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
	アクリルアミド溶液*1	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10% アクリルアミド	水	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
	アクリルアミド溶液*1	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12% アクリルアミド	水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
	アクリルアミド溶液*1	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
14% アクリルアミド	水	1.4	2.7	3.9	5.3	6.6	8.0	10.6	13.8
	アクリルアミド溶液*1	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15% アクリルアミド	水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
	アクリルアミド溶液*1	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)*2	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS*3	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS*4	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED*5	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

*1 アクリルアミド溶液: 30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29:1)溶液

*2 1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8): 1.5mol/Lトリス塩酸塩緩衝液, pH8.8

*3 100g/L SDS: 100g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100g/L APS: 100g/L過硫酸アンモニウム溶液, 過硫酸アンモニウムはフリーラジカルを生成してアクリルアミドとビスアクリルアミドの重合を促す。過硫酸アンモニウムは次第に分解するので, 溶液は用時調製すること。

*5 TEMED: N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

表2 濃縮ゲルの調製

溶液の組成	各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL	8mL	10mL
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
アクリルアミド溶液* ¹	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0mol/Lトリス溶液(pH6.8)* ²	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
100g/L SDS* ³	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
100g/L APS* ⁴	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED* ⁵	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

*1 アクリルアミド溶液：30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29：1)溶液

*2 1.0mol/Lトリス溶液(pH6.8)：1mol/Lトリス塩酸塩緩衝液，pH6.8

*3 100g/L SDS：100g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100g/L APS：100g/L過硫酸アンモニウム溶液。過硫酸アンモニウムはフリーラジカルを生成してアクリルアミドとビスアクリルアミドの重合を促す。過硫酸アンモニウムは次第に分解するので、溶液は用時調製すること。

*5 TEMED：N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

1 キャピラリー電気泳動法

2 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。

3 キャピラリー電気泳動法は、毛細管内の電解質液中に存在す
4 る荷電試料が直流電場の影響下で移動することに基づいた物理
5 的な分析法である。

6 電場 E における移動速度は、試料の電気泳動移動度と毛細管
7 内の緩衝液の電気浸透移動度により決まる。電気泳動移動度
8 μ_{ep} は試料の特性(電荷、分子の大きさや形)と緩衝液の特性(電
9 解液の種類とイオン強度、pH、粘性及び添加剤)に依存する。

10 球形を想定した物質の電気泳動速度 v_{ep} は、次式により与えら
11 れる：

$$12 \quad v_{ep} = \mu_{ep} E = \left(\frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

- 13 q : 粒子の有効電荷
- 14 η : 緩衝液の粘度
- 15 r : 溶質イオンのStokes半径
- 16 V : 電圧
- 17 L : 毛細管の全長

18 緩衝液で満たされた毛細管に電圧を印加すると、電気浸透流
19 と呼ばれる溶媒の流れが毛細管内に発生する。電気浸透流の速
20 度は毛細管内壁の電荷密度及び緩衝液の特性に依存する電気浸
21 透移動度 μ_{eo} により決まる。電気浸透速度 v_{eo} は次式により与
22 えられる：

$$23 \quad v_{eo} = \mu_{eo} E = \left(\frac{\epsilon\zeta}{\eta} \right) \left(\frac{V}{L} \right)$$

- 24 ϵ : 緩衝液の誘電率
- 25 ζ : 毛細管内壁のゼータ電位

26 試料の移動速度(v)は次式により与えられる：

$$27 \quad v = v_{ep} + v_{eo}$$

28 試料の電気泳動移動度と電気浸透移動度は試料の電荷により、
29 同方向又は反対方向に働く。通常のキャピラリー電気泳動法で
30 は陰イオンは電気浸透流と逆方向に泳動され、移動速度は電気
31 浸透流より遅い。陽イオンは電気浸透流と同方向に泳動され、
32 移動速度は電気浸透流より速い。試料イオンの電気泳動速度と
33 比べて速い電気浸透流が存在する条件下では、陽イオン、陰イ
34 オンの両者を一斉分析することが可能である。

35 毛細管の試料導入末端から検出部までの距離(有効長、 l)を
36 試料が移動するのに要する時間(t)は、次式により与えられ
37 る：

$$38 \quad t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$$

39 通常、内面未処理の溶融シリカ毛細管は、pH3以上で内壁に
40 存在するシラノール基が解離することにより負電荷を帯びる。
41 したがって、陽極側から陰極側へと向かう電気浸透流が発生す
42 る。試料の移動速度において高い再現性を得るために電気浸透
43 流を一定に保つ必要がある。分析の目的によっては、毛細管の
44 内壁を修飾したり、緩衝液の濃度、組成及びpHを変えること

45 により電気浸透流を抑制することが必要な場合がある。

46 試料導入後、各試料成分イオンは、それぞれのゾーンとして
47 電気泳動移動度に応じて電解質内を移動する。ゾーンの分散、
48 すなわちそれぞれの試料バンドの広がりはいろいろな現象によ
49 って起こる。理想的な条件では試料ゾーンの広がりに対する唯
50 一の原因は毛細管に沿った方向への試料成分の分子拡散(軸方
51 向拡散)である。理想的な場合のゾーンの分離効率(理論段
52 数(N))として次式により表される：

$$53 \quad N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times V \times l}{2 \times D \times L}$$

54 D : 緩衝液中での試料の分子拡散

55 実際には、熱放散、毛細管壁への試料吸着、試料と緩衝液間
56 の伝導率の不均一性、試料プラグ(層)の長さ、検出セルのサイ
57 ズ、泳動液槽の水位差なども、ゾーンの広がり原因となりう
58 る。

59 二つのバンド間の分離(分離度 R_s として表される)は、試料の
60 電気泳動移動度、キャピラリー内に発生する電気浸透移動度を
61 変更して各試料イオンのゾーンの分離効率を向上することによ
62 り達成される。

$$63 \quad R_s = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

- 64 μ_{epa} 及び μ_{epb} : 分離した2種類の試料イオンの電気泳動移動
65 度
- 66 μ_{ep} : 2種類の試料イオンの電気泳動移動度の平均
- 67 $\left(\mu_{ep} = \frac{1}{2}(\mu_{epb} + \mu_{epa}) \right)$

68 装置

69 キャピラリー電気泳動装置は下記のものから構成される。

- 70 (1) 電圧可変高電圧電源
- 71 (2) 規定の陽極液及び陰極液を入れ、同じ水位に保持された
72 二つの泳動液槽
- 73 (3) 泳動液槽に浸され、電源に接続した一対の電極(陰極と
74 陽極)
- 75 (4) 光学検出用ウインドウを設けた分離用毛細管(通常溶融
76 石英製)。毛細管の両端は泳動液槽中に置かれる。この毛細管
77 は各条で規定する溶液で満たされる。
- 78 (5) 適切な試料導入システム
- 79 (6) 所定の時間に毛細管の検出部を通過する目的物質の量を
80 モニターできる検出器。通常、紫外可視吸光度測定法あるいは
81 蛍光光度法によるが、分離目的によっては電導度測定、電流測
82 定又は質量分析による検出も有用である。紫外吸収又は蛍光性
83 を持たない化合物には間接的な検出法が用いられる。
- 84 (7) 再現性のよい分離が得られるように毛細管内の温度を一
85 定に保つことのできる温度調節システムが勧められる。
- 86 (8) レコーダー及び適切なインテグレーター又はコンピュー
87 ター

88 注入操作とその自動化は正確な定量分析のために重要である。
89 注入方法として、落差法、加圧法あるいは吸引法及び電気的な
90 導入法がある。電氣的に導入される各試料成分の量は、各々の
91 電気泳動移動度に依存し、この試料導入法の採否を決定する要
92 素となる。

93 各条に規定された毛細管、泳動液、毛細管の分析前処理法、
94 試料溶液及び分析条件を用いる。分析中に検出を妨害したり、
95 気泡が発生して通電が遮断されることを防ぐため、泳動液はろ
96 過及び脱気を行う。泳動時間について、高い再現性を得るため
97 には、各分析法において厳密な毛細管の洗浄手順を設定してお
98 くべきである。

99 1. キャピラリーゾーン電気泳動法

100 キャピラリーゾーン電気泳動法では、対流を防ぐ支持体を含
101 まない緩衝液のみを満たした毛細管内で試料を分離する。この
102 方法では、試料中のそれぞれの成分が、異なる速度で不連続の
103 バンドとして移動することにより分離が起こる。各バンドの移
104 動速度は毛細管内での溶質の電気泳動移動度と電気浸透流に依
105 存する(概論参照)。シリカ表面に吸着しやすい物質の分離能を
106 高めるために内面修飾された毛細管も使用できる。

107 本分離モードを用いて、低分子試料($M_r < 2000$)並びに高分
108 子試料($2000 < M_r < 100000$)を分析できる。キャピラリーゾ
109 ン電気泳動法の高い分離効率により、質量電荷比がわずかしか
110 異ならない分子間の分離も可能となる。この分離法ではキラル
111 セレクター(chiral selectors)を分離用緩衝液に加えることによ
112 ってキラル化合物の分離も可能となる。

113 分離の最適化

114 複数のパラメーターが分離に関与する場合には、分離条件の
115 最適化が複雑になる。この分離法の条件設定では、機器及び電
116 解質溶液が主要なパラメーターである。

117 機器に関するパラメーター

118 (1) 電圧 印加電圧及びカラム温度の決定には、ジュール熱
119 プロットが有用である。分離時間は印加電圧に反比例する。し
120 かし、電圧を上げると過剰な熱が発生し、毛細管内部の緩衝液
121 の温度が上昇し泳動液の粘度にむらが生じる。結果としてバン
122 ドが広がり、分離度を低下させる。

123 (2) 極性 電極の極性については通常の電圧印加(試料導入側
124 が陽極、廃液側が陰極)で、電気浸透流は陰極側へ流れる。極
125 性を逆にした場合には電気浸透流は廃液側から導入側へ向かっ
126 て発生し、電気浸透流よりも速い電気泳動移動度を持つ試料の
127 みが検出部を通過する。

128 (3) 温度 温度の影響は主に、泳動液の粘度と導電率に対し
129 て見られ、移動速度に影響を与える。場合によっては毛細管温
130 度の上昇がたん白質の立体構造を変化させ、それらの移動時間
131 や分離効率が変化することもある。

132 (4) 毛細管 毛細管の寸法(長さ及び内径)は分析時間、分離
133 効率及び試料容量に影響を与える。全長の増加は電場を減少
134 (定電圧時)させ、有効長及び全長の増加により泳動時間が長く
135 なる。緩衝液と電場が一定ならば、熱放散効率は毛細管内径に
136 より異なる。したがって、それによって起こされる試料バンド
137 の拡散は毛細管の内径によっても変化する。また、使用する検
138 出法にもよるが、内径が変わると試料導入量が増えるため、
139 検出限界にも影響を及ぼす。

140 毛細管内壁への試料成分の吸着が分離効率を低下させるため、
141 分離法の設定で吸着を防ぐ方法を考慮する必要がある。特にた
142 ん白質を試料とする場合、吸着を防ぐいくつかの方法が工夫さ
143 れている。その方法として緩衝液組成の工夫(高又は低pHや陽
144 イオン性添加剤の内壁への吸着)をすることでたん白質の吸着
145 を防ぐ方法もある。その他、たん白質と負電荷を帯びたシリカ
146 表面との相互作用を防ぐために、毛細管内壁を共有結合により

147 ポリマーで被覆する手法がある。この目的のために、親水性の
148 中性ポリマーや陽イオン性又は陰イオン性ポリマーで修飾され
149 た毛細管を入手することができる。

150 電解質溶液に関するパラメーター

151 (1) 緩衝液の種類と濃度 キャピラリー電気泳動法に適した
152 緩衝液は、使用するpH範囲内で適当な緩衝能を持ち、また、
153 電流発生を最少に抑えることができる低移動性のものである。

154 可能ならば緩衝液イオンの移動度を溶質の移動度に合わせる
155 ことにより、ピーク形状のゆがみを最少にすることができる。
156 分離効率を高め検出感度を向上するために、キャピラリー内に
157 において試料ゾーンの収束を図る上で、試料溶媒の種類も重要で
158 ある。

159 一定のpHにおいて緩衝液濃度を高くすると電気浸透流及び
160 試料の移動速度は減少する。

161 (2) 緩衝液のpH 緩衝液のpHは、試料や添加剤の電荷及び
162 電気浸透流に影響するので、試料の分離に影響を及ぼす。たん
163 白質及びペプチドの分離において、緩衝液のpHを試料の等電
164 点より高いpHから等電点より低いpHに変えることにより、試
165 料の正味の電荷が負から正に変化することになる。一般に、緩
166 衝液のpHを高めると電気浸透流は速くなる。

167 (3) 有機溶媒 試料又は泳動液添加剤の溶解度を高めたり、
168 試料成分のイオン化度を変えるために水性緩衝液に有機溶媒
169 (メタノール、アセトニトリルなど)を添加する場合がある。一
170 般にこれらの有機溶媒の緩衝液への添加は電気浸透流を低下さ
171 せる。

172 (4) キラル分離のための添加物質 光学異性体を分離するた
173 めには、泳動液にキラルセレクターを添加する。最も一般的に
174 用いられるキラルセレクターはシクロデキストリン類であるが、
175 クラウンエーテル類、多糖類若しくはたん白質が使用される場
176 合もある。光学異性体の認識はキラルセレクターとそれぞれの
177 鏡像異性体との相互作用が異なることによるため、その分離度
178 は用いるキラルセレクターの種類により著しく異なる。内腔の
179 大きさの異なるシクロデキストリン類(α -, β -, γ -シク
180 ロデキストリン)、中性基(メチル、エチル、ヒドロキシアルキ
181 ルなど)又は極性基(アミノメチル、カルボキシメチル、スルホ
182 プチルエーテルなど)を持つシクロデキストリン類を用いるこ
183 とができる。修飾シクロデキストリンを使用するとき、製品間
184 で修飾率にばらつきがあるため、キラル分離に影響を及ぼすこ
185 とがあるので、注意する必要がある。キラル分離で分離度に影
186 響を与えるそのほかの因子として、キラルセレクターの濃度、
187 緩衝液の組成とpH、及び分析温度がある。メタノール又は尿
188 素のような有機系添加剤の使用も分離度に影響を与える。

189 2. キャピラリーゲル電気泳動法

190 キャピラリーゲル電気泳動法では、分子ふるい効果を持つゲ
191 ルを充てんした毛細管内で分離が行われる。類似した質量電荷
192 比を持つ分子において、分子サイズの小さい成分が大きい成分
193 よりもゲルのネットワーク内を自由に移動できることから、小
194 分子が大分子よりも速い速度で泳動されることで分離が達成さ
195 れる。キャピラリーゲル電気泳動法は類似した質量電荷比を持
196 つ生体高分子(例えばたん白質及びDNA断片)をそれらの分子量
197 に従って分離できる。

198 ゲルの特徴

199 二種類のゲルが用いられる。架橋型ゲルと非架橋型ゲルであ
200 る。架橋されたポリアクリルアミドゲルのような化学ゲルは、

201 毛細管内でモノマーを重合させて調製する。通常ゲルは溶融シ
202 リカ内壁と結合しているので、毛細管を破壊しない限り取り去
203 ることはできない。ゲルを還元条件下でたん白質の分析に使用
204 するときは、泳動液は通常ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含
205 み、試料を導入する前にSDSと2-メルカプトエタノール又は
206 ジチオスレイトールの混液と加熱して変性させる。非還元的条
207 件の分析(例えば未変性の抗体)では、2-メルカプトエタノール
208 及びジチオスレイトールを使用しない。架橋ゲル中での分離
209 において(「1.キャピラリーゾーン電気泳動法」で述べたよう
210 に)、泳動液の調節やゲル調製時のアクリルアミドの濃度や架
211 橋剤の比率を変更してゲルのポアサイズを調節することによ
212 って最適化できる。一般に、ポアサイズが小さい場合は試料の移
213 動度も小さくなる。ゲルは強固なため試料導入は電気的方法を
214 利用する必要がある。

215 流動性(非架橋型)ゲルとして、直鎖ポリアクリルアミド、セル
216 ロース誘導体、デキストランなどの水溶性ポリマーも分子ふる
217 りの効果を有する。これらの分離媒体は、架橋型ポリマーと
218 比べて調製が容易である。バイアル中で調製し、電気浸透流が
219 発生しないように内壁が修飾された毛細管に圧力によって充て
220 んすることができる。一般に試料を導入する前にゲルを交換す
221 ることにより分離の再現性は高くなる。高分子量のポリマー
222 (一定の濃度で)を使うか、ポリマー濃度(一定の分子量で)を低
223 くすることで、ゲルのポアサイズを大きくすることができる。
224 ゲルのポアサイズを小さくすると同一緩衝液では試料の移動度
225 は小さくなる。これらのポリマーは緩衝液に溶解しても粘性は
226 低いので、試料の導入は落差法及び電氣的導入法のいずれでも
227 行える。

228 3. キャピラリー等電点電気泳動法

229 等電点電気泳動法では、分離緩衝液に溶解した広範囲の等電
230 点(pI)を持つ両性電解質(ポリアミノカルボン酸)により形成さ
231 れたpH勾配中で、試料分子はそのpI以外のところでは電荷を
232 持つため電場の影響下で移動する。

233 等電点電気泳動法の三つの基本的なステップは、試料添加
234 (loading)、集束(focusing)及び移動(mobilization)である。

235 (1) 試料添加 二つの方法を利用できる。

236 (i) ワンステップ添加: 試料を両性電解質と混和し、加圧又
237 は吸引により毛細管に導入する。

238 (ii) 連続的な添加: リーディング緩衝液(leading buffer)、両
239 性電解質、両性電解質と混和した試料、両性電解質、最後にター
240 ミナル緩衝液(terminating buffer)の順に毛細管に導入する。
241 試料の容量はpH勾配を乱さないように少量でなければならない。
242

243 (2) 集束 電圧を印加すると、両性電解質はそれぞれの電荷
244 により陰極あるいは陽極へと移動し、陽極(低いpH)から陰極
245 (高いpH)へpH勾配が形成される。同時に分離する成分は、そ
246 れらの等電点(pI)に対応するpHのところ移動し、集束する
247 と電流が著しく低下する。

248 (3) 移動 分離した成分のバンドを検出部まで移動させる。

249 三種の方法を利用できる:

250 (i) 第1の方法では、電気浸透流により集束中に成分移動が
251 達成される。ただし、成分を集束させるために電気浸透流を小
252 さくする必要がある。

253 (ii) 第2の方法では、集束終了後に圧力を用いて移動させる。

254 (iii) 第3の方法では、集束終了後に陰極又は陽極側の泳動液

255 (移動させたい方向により選択)に塩類を加えて電圧を印加する
256 と毛細管中のpHが変化し、成分が移動する。pHが変化するに
257 つれてたん白質と両性電解質は塩類を加えた液槽の方向へ移動
258 し、検出器を通過する。

259 得られる分離はpH勾配(dpH/dx)、異なる等電点を持つ両
260 性電解質の数、分子拡散係数 D 、電場の強さ E 及びそのpHに
261 おける試料の電気泳動移動度の変化($-d\mu/dpH$)から ΔpI に
262 より表すことができる。

$$263 \Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E \left(-\frac{d\mu}{dpH} \right)}}$$

264 最適化

265 分離条件を決定する主要なパラメーターを以下に示す。

266 (1) 電圧 キャピラリー等電点電気泳動法では集束時に300
267 ~1000V/cmの高電場を利用する。

268 (2) 毛細管 試料を検出部まで移動させる方法(上記参照)に
269 よっては電気浸透流を消失若しくは最小限に抑えなければなら
270 ない。内面修飾された毛細管は電気浸透流を抑えるものが多い。

271 (3) 溶液類 陽極槽には等電点が最も酸性の両性電解質の等
272 電点より低いpHの液を満たし、陰極槽には最も塩基性の両性
273 電解質の等電点より高いpHの液を満たす。陽極側にはリン酸
274 が、陰極側には水酸化ナトリウムがしばしば使用される。

275 両性電解質液にメチルセルロースのようなポリマーを添加す
276 ると、粘性が増すことによって対流や電気浸透流が抑制される。
277 市販の両性電解質にはいろいろなpH範囲のものがあり、広い
278 pH範囲が必要などときには、混和して使用する。広いpH範囲は
279 試料の等電点を推定するために用い、狭い範囲のものは測定精
280 度を上げるために用いられる。標準たん白質マーカーの等電点
281 と移動時間の関係からpHを校正することができる。

282 必要ならば、グリセリン、界面活性剤、尿素、両性イオン緩
283 衝剤などを緩衝液に添加することにより等電点でたん白質が沈
284 殿することを防ぐことができる。しかし、尿素は濃度によって
285 はたん白質を変性させてしまう。

286 4. ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)

287 ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)では、臨界ミセル濃
288 度(cmc)以上の濃度で界面活性剤を含む電解質溶液中で分離が
289 行われる。試料分子は水性緩衝液とミセルからなる疑似固定相
290 へ、試料の分配係数に基づいて分配される。したがって、この
291 方法は電気泳動とクロマトグラフィーの両者の特徴を有する。

292 MEKCは、キャピラリー電気泳動の効率、スピード及び装置
293 への適応性を兼ね備え、かつ中性及び荷電した試料の両者の分
294 離に利用できる電気泳動法である。MEKCで最も広く用いら
295 れる界面活性剤は陰イオン性のSDSであるが、セチルトリメ
296 チルアンモニウム塩のような陽イオン性界面活性剤も用いられ
297 る。

298 MEKCにおける分離のメカニズムは以下のとおりである。
299 中性及びアルカリ性pHにおいては、強い電気浸透流が発生し、
300 泳動液は陰極方向に移動する。SDSを用いると負電荷を持つ
301 ミセルは電氣的に逆の陽極方向へ移動する。その結果、泳動液
302 に比べてミセルの移動速度は遅くなる。中性物質の場合には、
303 ミセルと水性緩衝液の間で分配が起こり、電気泳動されないた
304 め、その移動速度はミセルと水性緩衝液間の分配係数のみに依

4 キャピラリー電気泳動法

305 存する。電気泳動図において、中性物質由来のピークは常に電
306 気浸透流マーカーのピークとミセルのピークの間が存在する
307 (これらの二つのピーク間はseparation windowと呼ばれる)。
308 電荷を持つ試料の場合、その移動速度はミセルと水性緩衝液間
309 の分配係数とミセルが存在しない場合の電気泳動移動度との両
310 者に依存する。

311 中性又は弱くイオン化した試料のMEKCにおける分離原理
312 は本質的にはクロマトグラフィーであるので、試料の移動度と
313 分離は試料の(k')、すなわちミセル中の溶質のモル数と移動相
314 中のモル数の比である質量分布比(D_m)で一般化することができ
315 る。

$$316 \quad k' = \frac{t_R - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \frac{V_S}{V_M}$$

317 t_R : 試料の移動時間

318 t_0 : 保持されない物質の移動時間(ミセルに取り込まれない
319 電気浸透流マーカー, 例えばメタノールの移動時間)

320 t_{mc} : ミセルの移動時間(ミセルに常時取り込まれて, ミセル
321 と共に移動するズダンⅢ(Sudan Ⅲ)のようなミセルマーカ
322 ーの移動時間)

323 K : 試料の分配係数

324 V_S : ミセル相の容積

325 V_M : 移動相の容積

326 同様に、2種類の隣接して移動する試料間の分離度(R_S)は次
327 式で得られる:

$$328 \quad R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k'_b}{k'_b + 1} \times \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right) k'_a}$$

329 N : 一方の成分の理論段数

330 α : 選択性

331 k'_a, k'_b : 両成分の質量分布比($k'_b > k'_a$)

332 同様の関係から、電氣的に荷電した試料に対する k' 値及び R_S
333 値が得られる。

334 最適化

335 MEKCにおける分析条件を決定する際に考えられる主なパ
336 ラメーターとして以下に示すものがある。

337 機器に関するパラメーター

338 (1) 電圧 分析時間は電圧に反比例する。しかし電圧を上げ
339 ると熱を発生し、毛細管の断面で熱及び粘度の勾配が生じる。
340 この効果はミセルを含むような高導電性の泳動液で著しく起
341 りやすい。熱放散が不十分な場合にはゾーンの拡散を引き起
342 し、分離度が低下する。

343 (2) 温度 毛細管の温度の変動は試料の緩衝液とミセルへの
344 分配係数、臨界ミセル濃度及び泳動液の粘度に影響を及ぼす。
345 これらのパラメーターは試料の移動時間に影響する。適切な冷
346 却システムを用いることで試料の移動時間の再現性が改善され
347 る。

348 (3) 毛細管 キャピラリーゾーン電気泳動法におけるように、
349 毛細管の寸法(長さ及び内径)が分離時間及び分離効率に影響を
350 与える。有効長及び全長を長くすると(定電圧下では)電場が低

351 くなり、移動時間が長くなるため分離効率が向上する。内径は
352 (同一泳動液及び同一電場下で)熱放散に関与し、結果として試
353 料ゾーンの拡散にかかわる。

354 電解質溶液に関するパラメーター

355 (1) 界面活性剤の種類と濃度 界面活性剤の種類はクロマト
356 グラフィーの固定相と同様に分離の選択性を変えるので分離度
357 に影響を与える。界面活性剤の濃度の増加に伴い、中性化合物
358 の $\log k'$ 値は直線的に増加する。 k' が $\sqrt{t_m/t_0}$ 値に近づくと
359 MEKCにおける分離度は最大に達するので、移動相中の界面
360 活性剤の濃度が変わると分離度は変化する。

361 (2) 緩衝液のpH pHはイオン化していない試料の分配係数
362 を変えないが、コーティングしていない毛細管中の電気浸透流
363 を変化させる。MEKCにおいて、pHが下がると電気浸透流が
364 減少し、そのため分析時間が長くなり、中性試料の分離度が向
365 上する。

366 (3) 有機溶媒類 疎水性化合物のMEKCにおける分離を改善
367 するため、電解質溶液にメタノール、プロパノール、アセトニ
368 トリルなどを添加することができる。これらの溶媒の添加によ
369 り一般に移動時間及び分離の選択性が減少する。有機溶媒の添
370 加は臨界ミセル濃度に影響を与える。有機溶媒濃度を高くする
371 とミセル形成が阻害されるので、MEKCの分配メカニズムが
372 失われるような高濃度では使用できない。高濃度の有機溶媒の
373 存在によるミセルの消失が必ずしも分離を不可能にするという
374 ことではなく、イオン性の界面活性剤モノマーと中性の試料と
375 の疎水性相互作用により電気泳動的に分離可能な親溶媒性の複
376 合体が形成される場合もある。

377 (4) 光学分離用添加物質 MEKCで光学異性体を分離するた
378 めにはキラルセクターを界面活性剤と共有結合させたり、泳
379 動液に添加するなどしてミセル分離系に加える。光学識別でき
380 る部位を持つミセルには N -ドデカノイル-L-アミノ酸塩、
381 胆汁酸塩などがある。光学活性体の分離は、光学認識能のない
382 界面活性剤を含む電解質溶液にシクロデキストリン類のような
383 キラルセクターを添加することによっても達成される。

384 (5) その他の添加剤 泳動液に化学物質を添加して、選択性
385 を変更させる方法がいくつかある。数種のシクロデキストリン
386 類を添加してミセルと疎水性試料間の相互作用を競合させ、選
387 択性を高めることもできる。

388 ミセルに吸着する化合物を加えて試料とミセル間の相互作用
389 を調節し、MEKCにおける分離を改善できる。これらの添加
390 剤にイオン性あるいは非イオン性の他種の界面活性剤を添加し
391 て混合ミセルを形成したり、ミセルに溶けて試料と錯体形成が
392 可能な金属陽イオンを加えることもできる。

393 定量分析

394 ピーク面積は、以下の理由から対応するピークの泳動時間で
395 除することにより正しい面積を求める。

396 (1) 分析ごとの移動時間の変動によるピークレスポンスの補
397 正

398 (2) 異なる泳動時間で観察される試料成分間のレスポンスの
399 補正

400 内標準物質を使用する場合は、定量しようとする物質のピー
401 クが内標準物質のピークと重ならないことを確認する。

402 計算

403 得られた値から目的成分の含量を算出する。処方されている
404 試料の場合は、測定しようとする一成分又は複数成分の含量%

5 キャピラリー電気泳動法

405 を、溶媒や添加剤以外の全ピークの補正した総面積に対する目
406 的ピークの面積%として求める。自動積分システム(インテグ
407 レーター又はデータ読み込み処理装置)の使用が推奨される。

408 適合性パラメーター

409 キャピラリー電気泳動システムのチェックには適合性パラメ
410 ーターを使用する。これらのパラメーターは用いるキャピラリ
411 ー電気泳動法の分離モードにより選択する。質量分布比(k' 、
412 ミセル動電クロマトグラフィーの場合のみ)、理論段数(N)、
413 シンメトリー係数(A_s)及び分離度(R_s)がある。 N 及び R_s に関す
414 る理論的説明は上述のとおりであるが、電気泳動図から次式に
415 よってこれらのパラメーターを算出することができる。

416 理論段数

$$417 \quad N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

418 t_R : 目的成分のピークの移動時間又は試料導入点から目的成
419 分のピークの頂点から垂直に下ろした点までのベースライ
420 ンに沿った距離

421 w_h : ピークの半値幅

422 分離度

423 ほとんど同じピーク高さを持つ2種類の成分間の分離度(R_s)
424 は次の式で表される。

$$425 \quad R_s = \left(\frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

426 $t_{R2} > t_{R1}$

427 t_{R1} , t_{R2} : 泳動時間又は試料注入点から隣り合う二つのピー
428 クのそれぞれの頂点から垂直に下した各線のベースライン
429 に沿った各点までの距離

430 w_{h1} , w_{h2} : 各ピークの半値幅

431 一部分離しているピークの場合は二つのピーク間の谷の高さ
432 (H_v)と小さい方のピークの高さ(H_p)を測定し、その比を計算し
433 て分離度を算出してもよい。

$$434 \quad p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

435 ピークの対称性

436 ピークの対称性を示すシンメトリー係数は次式により計算す
437 ることができる:

$$438 \quad A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

439 $w_{0.05}$: ピーク高さの1/20におけるピーク幅

440 d : ピーク頂点から垂直に下した点とピーク高さの1/20に
441 おけるピークの立上がり部分との距離

442 面積の再現性(面積又は面積と移動時間の比の標準偏差)及び
443 移動時間の再現性(移動時間の標準偏差)の試験を適合性パラメ
444 ーターに加えるべきである。移動時間の再現性は、毛細管の洗
445 浄操作の適合性の試験になる。移動時間の再現性が低い場合に
446 は、内標準物質との相対移動時間を用いて再現性を補うことが
447 できる。

448 標準試料に対するSN比を調べる(又は定量限界の測定)試験

449 も有用である。

450 シグナルーノイズ比

451 検出限界値及び定量限界値はそれぞれSN比3以上及び10以
452 上に相当する。SN比は次式を用いて計算する。

$$453 \quad S/N = \frac{2H}{h}$$

454 H : 規定の標準試料溶液で得られた電気泳動図中の目的成分
455 に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の20
456 倍に相当する範囲から推定できるベースラインまでの距離
457 を測定する。

458 h : ブランクの注入後に得られた電気泳動図で、規定の標準
459 試料溶液から得られた泳動図中のピークの半値幅の20倍
460 に相当する時間範囲で、かつこのピークが現れる位置の前
461 後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。

1 たん白質量法

1 たん白質量法

2 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。
3 なお、三薬局方で調和されていない部分は「*」で囲むことによ
4 り示す。

5 以下の方法は薬局方医薬品に含まれるたん白質の定量法の例
6 を示したものである。HPLCなどの他の方法であっても、すべ
7 てのたん白質が回収されることを示すことができれば利用して
8 差し支えない。以下に記載したたん白質量法の多くは市販の
9 キットを用いて測定することが可能である。

10 注：水を用いる際は精製水を用いること。

11 方法1(紫外吸収法)

12 溶液中のたん白質は、芳香族アミノ酸、主としてチロシン及
13 びトリプトファンにより、波長280nmの紫外線を吸収する。
14 この性質を利用したのが本法である。波長280nmにおける吸
15 光度を用いたたん白質量は主にたん白質のチロシンとトリプ
16 トファン含量に依存する。たん白質の溶解に用いる緩衝液が水
17 よりも高い吸収を示す場合、緩衝液に妨害物質が存在している
18 ことを示している。この妨害は分光光度計で緩衝液の吸光度を
19 ゼロに調整することにより補正可能である。妨害物質による吸
20 収が大きく、分光光度計の感度の限界に近づく場合、正確な結
21 果が得られない可能性がある。更に、低濃度ではたん白質はキ
22 ュベットに吸着し、溶液中のたん白質含量の低下を引き起こす
23 可能性がある。これは高濃度の試料を調製するか、若しくは試
24 料調製に非イオン性界面活性剤を用いることにより防止可能で
25 ある。

26 注：試料溶液、標準溶液、緩衝液は試験中、同じ温度に置くこ
27 と。

28 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の
29 標準品又は標準物質を、試料溶液と同じ緩衝液に、試料溶液と
30 同じ濃度で溶かした液を調製する。

31 試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、
32 1mL当たり0.2~2mgのたん白質を含む液を調製する。

33 操作法 標準溶液及び試料溶液につき、緩衝液を対照とし、紫
34 外可視吸光度測定法により試験を行い、石英製のセルを用いて、
35 波長280nmにおける吸光度を測定する。正確な結果を得るに
36 は、試験するたん白質の濃度が直線性の得られる範囲にある必
37 要がある。

38 光散乱 たん白質の紫外吸収測定の精度は試料による光散乱の
39 影響で低下する可能性がある。溶液中のたん白質が測定光の波
40 長(250~300nm)に匹敵するサイズである場合、光散乱により
41 試料の吸光度は明らかな増加を示す。光散乱による波長
42 280nmの吸光度を算出するには、試料溶液につき、波長
43 320nm, 325nm, 330nm, 335nm, 340nm, 345nm及び
44 350nmにおける吸光度を測定し、直線回帰法を用いて、測定
45 したみかけの吸光度の対数を波長の対数に対してプロットし、
46 各点に最も近似した標準曲線を求め、外挿により波長280nm
47 における光散乱による吸光度を求める。波長280nmにおける
48 総吸光度から光散乱による吸光度を差し引くことにより溶液中
49 のたん白質の吸光度が得られる。特に溶液が明らかに濁ってい
50 る場合は、0.2µmのメンブランフィルターを通すか、若しくは
51 遠心分離することにより、光散乱の影響を減らすことが可能で

52 ある。

53 計算法 次式により試料溶液中のたん白質濃度 C_U を求める。

$$54 C_U = C_S \left(\frac{A_U}{A_S} \right)$$

55 C_S ：標準溶液のたん白質濃度

56 A_U ：試料溶液の補正した吸光度

57 A_S ：標準溶液の補正した吸光度

58 方法2(Lowry法)

59 本法は一般にローリー(Lowry)法と呼ばれる方法で、Folin-
60 Ciocalteuのフェノール試液(フォリン試液)に含まれるリンモ
61 リブデン酸・タングステン酸混合物の発色基がたん白質により
62 還元されて、波長750nmに吸収極大が得られることを利用し
63 た方法である。フォリン試液は主としてたん白質のチロシン残
64 基と反応するため、たん白質の種類が異なると呈色度に差異を
65 生じる場合がある。本法は妨害物質の影響を受けやすいため、
66 試料からたん白質を沈殿させる操作を入れることもできる。試
67 料中のたん白質から妨害物質を分離する必要がある場合には、
68 試料溶液の調製に先立ち、後述する「妨害物質」の項に示す方
69 法により操作する。妨害物質の影響は、試料たん白質を正確に
70 測定できる濃度範囲内で希釈することにより影響を減らせる可
71 能性がある。公定書^{※1}に記載されているローリー法の変法は以
72 下の方法に代えて用いることができる。

73 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の
74 標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶解
75 する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1mL当たり5~
76 100µgのたん白質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以上の濃
77 度の標準溶液を調製する。

78 試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標
79 準溶液の濃度範囲内の液を調製する。適切な緩衝液はpH10~
80 10.5の範囲である。

81 対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。
82 試薬・試液

83 硫酸銅試液 硫酸銅(II)五水和物100mg及び酒石酸ナトリウ
84 ム二水和物200mgを水に溶かして50mLとし、A液とする。無
85 水炭酸ナトリウム10gを水に溶かして50mLとし、B液とする。
86 B液をゆっくりとA液に振り混ぜながら加える。この試液は毎
87 日新たに調製する。

88 SDS試液、5% ドデシル硫酸ナトリウム5gを水に溶かして
89 100mLとする。

90 アルカリ性銅試液 5%SDS試液、硫酸銅試液、水酸化ナト
91 リウム溶液(4→125)の混液(2:1:1)を調製する。室温で2週間
92 保存できる。

93 希フォリン試液 フォリン試液10mLに水50mLを加える。
94 室温で遮光容器に保存する。

95 操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各1mLにアルカリ
96 性銅試液1mLを加えて混和し、室温で10分間放置する。各液
97 に希フォリン試液0.5mLを加えて直ちに振り混ぜた後、室温で
98 30分間放置する。標準溶液及び試料溶液から得た液につき、
99 対照液から得た液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試
100 験を行い、波長750nmにおける吸光度を測定する。

101 計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲
102 の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をた

2 たん白質定量法

- 103 たん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線
104 を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から、試料溶
105 液中のたん白質の濃度を求める。
- 106 妨害物質 以下の操作法では、試験に先立ち、デオキシコール
107 酸・トリクロロ酢酸を試料に加えてたん白質を沈殿させること
108 により妨害物質を除去する。この方法はたん白質を希釈溶液か
109 ら濃縮するためにも利用することができる。
- 110 デオキシコール酸ナトリウム試液 デオキシコール酸ナトリ
111 ウム150mgを水に溶かし、100mLとする。
- 112 トリクロロ酢酸試液 トリクロロ酢酸72gを水に溶かし、
113 100mLとする。
- 114 操作法 試料たん白質溶液1mLにデオキシコール酸ナトリウ
115 ム試液0.1mLを加え、攪拌機を用いて混和する。室温で10分
116 間放置した後、トリクロロ酢酸試液0.1mLを加え、同様に混和
117 する。次に3000×gで30分間遠心分離し、上澄液を捨て、更に
118 残った水分をピペットで取り除く。たん白質の沈殿をアルカリ
119 性銅試液1mLに溶解し、試料溶液の項に準じて操作する。
120 [注：呈色は室温で放置する間、20～30分で最高となり、その
121 後徐々に低下する。妨害物質のほとんどは呈色度を低下させる
122 が、界面活性剤の中には呈色をわずかに強めるものがある。塩
123 濃度が高いと沈殿を生じる場合がある。たん白質の種類が異な
124 ると呈色強度が変わることもあるので、標準たん白質と試料た
125 ん白質は同じでなければならない。]
- 126 方法3 (Bradford法)
- 127 本法は一般にブラッドフォード(Bradford)法とよばれる方法
128 で、クーマシーブリリアントブルーG-250色素の吸収極大波
129 長が、たん白質と結合することにより470nmから595nmにシ
130 フトすることを利用した方法である。クーマシーブリリアント
131 ブルーG-250は主にたん白質のアルギニン残基及びリシン残
132 基に結合するため、たん白質の種類が異なると反応性が変わる
133 こともある。
- 134 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の
135 標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶解
136 する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1mL当たり
137 100 μ g～1mgのたん白質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以
138 上の濃度の標準溶液を調製する。
- 139 試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標
140 準溶液の濃度範囲内の液を調製する。
- 141 対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。
142 クーマシー試液 クーマシーブリリアントブルーG-250^{※2}
143 100mgをエタノール(95)50mLに溶かす。[注：色素の含有量は
144 製品により異なるため、製品が違うと異なる結果が得られるこ
145 とがある。]この液にリン酸100mLを加え、水を加えて1000mL
146 とする。この液をろ紙(ワットマンNo.1又は相当品)を用いてろ
147 過し、室温で遮光容器に保存する。[注：試液の保存中に徐々
148 に沈殿が生じる。用時ろ過する。]
- 149 操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各100 μ Lにクーマシ
150 ー試液5mLを加え、転倒混和する。再現性に影響を与えるの
151 で泡立たせないようにする。標準溶液及び試料溶液から得た液
152 につき、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験
153 を行い、波長595nmにおける吸光度を測定する。[注：石英製
154 のセルは色素を吸着するため用いてはならない。たん白質の種
155 類が異なると呈色強度が異なることもあるので、標準たん白質
156 と試料たん白質は同じでなければならない。]妨害物質は比較的
- 157 少ないが、界面活性剤やアンフォライト類を試料に共存させる
158 ことは避けるべきである。塩基性の高い試料は酸性の試液を妨
159 害することがある。
- 160 計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲
161 の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をた
162 ん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線
163 を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料溶液
164 中のたん白質濃度を求める。
- 165 方法4 (ビシンコニン酸法)
- 166 本法は一般にビシンコニン酸(BCA)法とよばれる方法で、た
167 ん白質が銅II(Cu²⁺)イオンを銅I(Cu⁺)イオンに還元すること
168 を利用した方法である。BCA試液は銅I(Cu⁺)イオンの検出に
169 用いられる。本法に対する妨害物質はほとんど存在しない。妨
170 害物質が共存するときは、試料たん白質を正確に測定できる濃
171 度範囲内で希釈することにより影響を減らせる可能性がある。
172 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料たん白質の
173 標準品又は標準物質を、試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶か
174 す。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1mL当たり10～
175 1200 μ gのたん白質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以上の濃
176 度の標準溶液を調製する。
- 177 試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標
178 準溶液の濃度範囲内の液を調製する。
- 179 対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。
180 試薬・試液
- 181 BCA試液 ビシンコニン酸10g、炭酸ナトリウム一水和物20g、
182 酒石酸ナトリウム二水和物1.6g、水酸化ナトリウム4g及び炭
183 酸水素ナトリウム9.5gを水に溶かし、必要なら水酸化ナトリウ
184 ム又は炭酸水素ナトリウムを加えてpH11.25に調整した後、水
185 を加えて1000mLとする。
- 186 硫酸銅試液 硫酸銅(II)五水和物2gを水に溶かし、50mLと
187 する。
- 188 銅・BCA試液 硫酸銅試液1mLとBCA試液50mLを混和する。
189 操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各0.1mLに銅・
190 BCA試液2mLを加え、混和する。これらの液を37℃で30分間
191 放置した後、時刻を記録し、室温になるまで放置する。標準溶
192 液及び試料溶液から得た液につき、記録した時刻より60分以
193 内に、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試験を
194 行い、石英製のセルを用いて波長562nmにおける吸光度を測
195 定する。これらの液の呈色強度は室温に戻った後も徐々に増加
196 する。試験を妨害する物質が共存するときは、方法2の「妨害
197 物質」の項を準用して処理する。たん白質の種類が異なると呈
198 色強度が異なることもあるので、標準たん白質と試料たん白質
199 は同じでなければならない。
- 200 計算法 吸光度とたん白質濃度に直線関係が成立する濃度範囲
201 の標準溶液を用いて、直線回帰法により標準溶液の吸光度をた
202 ん白質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準曲線
203 を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料溶液
204 中のたん白質濃度を求める。
- 205 方法5 (Biuret法)
- 206 本法は一般にビウレット(Biuret)法とよばれる方法で、アル
207 カリ性溶液中でたん白質と銅II(Cu²⁺)イオンが反応し、波長
208 545nmの吸光度が生じることを利用した方法である。
- 209 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、あらかじめ窒素
210 分析によりたん白質含量を測定したヒトアルブミン(窒素一た

3 たん白質定量法

- 211 たん白質換算係数は6.25を用いる), 若しくは試料たん白質の標
212 準品又は標準物質を, 塩化ナトリウム溶液(9→1000)に溶かす。
213 この液の一部を塩化ナトリウム溶液(9→1000)で希釈し, 1mL
214 当たり0.5~10mgのたん白質を含む, 標準曲線上等間隔の3種
215 類以上の濃度の標準溶液を調製する。[注: 試料とヒトアルブ
216 ミンでプロリン含量が大きく異なるとき, 反応性が低い場合が
217 ある。その場合は別の標準たん白質を用いること。]
- 218 試料溶液 試料たん白質の適当量を塩化ナトリウム溶液(9→
219 1000)に溶かし, 標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。
220 対照液 塩化ナトリウム溶液(9→1000)を用いる。
221 ビウレット試液 硫酸銅(II)五水和物3.46gを水10mLに溶かし,
222 必要ならば加温して溶かした後, 放置冷却する(A液)。クエン
223 酸三ナトリウム二水和物34.6g及び無水炭酸ナトリウム20.0gを
224 水80mLに溶かし, 必要ならば加温して溶かした後, 放置冷却
225 する(B液)。A液及びB液を混和し, 水を加えて200mLとする。
226 ビウレット試液は室温で6箇月間安定であるが, 濁りや沈殿を
227 生じたものは使用しない。
- 228 操作法 標準溶液及び試料溶液の一定量に等量の水酸化ナトリ
229 ウム溶液(6→100)を加え, 混ぜる。直ちに試料溶液の0.4容量
230 のビウレット試液を加えて振り混ぜた後, 15~25°Cで15分間
231 以上放置する。標準溶液及び試料溶液から得た液につき, ビウ
232 レット試液を加えてから90分以内に, 対照液を対照とし, 紫
233 外可視吸光度測定法により試験を行い, 波長545nmにおける
234 吸光度を測定する。[注: 濁りや沈殿を生じた溶液はたん白質
235 濃度の算出に用いてはならない。]
- 236 計算法 最小二乗直線回帰法を用いて, 標準溶液のたん白質濃
237 度と吸光度をプロットし, 最も近似する標準曲線を求め, この
238 線の相関係数を計算する。[注: 標準品の濃度範囲内ではたん
239 白質濃度と吸光度はほぼ直線関係が成立する。]相関係数が0.99
240 以上の直線が得られるのが理想である。標準曲線と試料溶液の
241 吸光度から, 必要な補正を行い, 試料中のたん白質の濃度を求
242 める。
- 243 妨害物質 妨害物質の影響を最小にするため, 次のように試料
244 からたん白質を沈殿させることができる。試料の溶液1容量に
245 50%トリクロロ酢酸0.1容量を加え, 上清を捨てた後, 沈殿物
246 を0.5mol/L水酸化ナトリウム試液少量に溶かし, これを試料
247 溶液の調製に用いる。
- 248 解説 本試験では, 等量のIgGとアルブミンでごくわずかな相
249 違が見られる。水酸化ナトリウム溶液とビウレット試液を一
250 に加えたり, 水酸化ナトリウム溶液を加えた後の混和が不十分
251 であったり, 水酸化ナトリウム溶液を加えてからビウレット試
252 液を加えるまでに時間をあけた場合などでは, アルブミンより
253 IgGのほうが大きな値が得られる。妨害物質の影響を減らすた
254 めにトリクロロ酢酸を用いる方法は, 試料中のたん白質の濃度
255 が500µg/mL以下の場合にも利用することができる。
- 256 方法6(蛍光法)
- 257 本蛍光法は, たん白質の第一級アミン(例えばN末端アミノ
258 酸ヤリシン残基のε-アミノ基など)と反応するo-フタルアル
259 デヒド(OPA)によるたん白質の誘導体化を利用した方法である。
260 試験に先立ち, たん白質を加水分解することにより試験感度を
261 増加させることができる。加水分解により, たん白質を構成す
262 るアミノ酸のα-アミノ基がOPA試薬と反応できるようにな
263 る。本法は極微量のたん白質でも測定可能である。
- 264 トリス緩衝液やアミノ酸緩衝液では, トリスヒドロキシメチ
265 ルアミノメタンやアミノ酸のような第一級アミンがOPAと反
266 応するため, 使用を避けるか除去する必要がある。高濃度のア
267 ンモニアもOPAと反応する。アミンがOPAと反応して得られ
268 る蛍光は不安定である。標準的な操作を自動化することにより
269 試験の正確さ, 精度は改善される。
- 270 標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか, 試料たん白質の
271 標準品又は標準物質を, 試料溶液の調製に用いた緩衝液に溶か
272 す。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して, 1mL当たり10~
273 200µgのたん白質を含む, 標準曲線上等間隔の5種類以上の濃
274 度の標準溶液を調製する。
- 275 試料溶液 試料たん白質の適当量を適切な緩衝液に溶かし, 標
276 準溶液の濃度範囲内の液を調製する。
- 277 対照液 試料溶液及び標準溶液の調製に用いた緩衝液を用いる。
278 試薬・試液
- 279 ホウ酸緩衝液 ホウ酸61.83gを水に溶かし, 水酸化カリウ
280 ムを加えてpH10.4に調整した後, 水を加えて1000mLとする。
281 OPA試液原液 o-フタルアルデヒド120mgをメタノール
282 1.5mLに溶かし, ホウ酸緩衝液100mLを加えて混和する。こ
283 れにポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル0.6mLを加える。
284 室温で3週間安定である。
- 285 OPA試液 OPA試液原液5mLに2-メルカプトエタノール15
286 µLを加える。使用する30分以上前に調製しておく。この試液
287 は1日は安定である。
- 288 操作法 試料溶液及び各標準溶液をpH8.0~10.5に調整する。
289 試料溶液及び各標準溶液10µLをOPA試液100µLと混和し, 室
290 温で15分間放置した後, 0.5mol/L水酸化ナトリウム試液3mL
291 を加えて混和する。これらの液につき, 蛍光光度法により試験
292 を行い, 励起波長340nm, 蛍光波長440~455nmにおける蛍
293 光強度を測定する。[注: 励起のための照射は蛍光強度を低下
294 させるため, 各測定は1回限りとする。]
- 295 計算法 たん白質濃度と蛍光強度は直線関係が成立する。直線
296 回帰法を用いて, 標準溶液の蛍光強度をたん白質濃度に対して
297 プロットし, 各点に最も近似した標準曲線を求める。得られた
298 標準曲線と試料溶液の蛍光強度から, 試料中のたん白質濃度を
299 求める。
- 300 方法7(窒素測定法)
- 301 本法はたん白質定量の手段として窒素定量を利用した方法で
302 ある。試料たん白質に他の窒素含有物質が共存すると本法を妨
303 害することになる。窒素定量を行うと試料は破壊されるが, 溶
304 液中以外のたん白質にも適用可能である。
- 305 操作法A 窒素定量法により試験を行い, 試料たん白質の窒素
306 含量を測定する。ケルダール法用の市販の装置が利用できる。
307 操作法B 窒素分析用の市販の装置が利用できる。窒素分析装
308 置のほとんどは熱分解(例えば1000°C近い温度で酸素中の試料
309 を燃焼する)を利用し, 試料たん白質に含まれる窒素から一酸
310 化窒素(NO)及び他の窒素酸化物(NO_x)を産生させる。装置によ
311 っては生じた酸化窒素を窒素ガスに変え, 熱伝導度検出器で量
312 を測定するものもある。その他, 一酸化窒素(NO)をオゾン
313 (O₃)と混和して二酸化窒素ラジカル(NO₂)とし, それが減衰す
314 るときに発する光をケミルミネッセンス検出器で測定する装置
315 もある。装置への注入や熱分解条件を最適化し, 分析の恒常性
316 を評価するには, 比較的純粋で試料たん白質と同一組成のたん
317 白質標準品又は標準物質を用いる。
- 318 計算法 試料の窒素含量をそのたん白質の既知の窒素含量で割

4 たん白質定量法

319 ることにより、たん白質の含量を算出する。たん白質の既知の
320 窒素含量はたん白質の化学組成から求めるか、若しくは適切な
321 標準品又は標準物質の窒素含量と比較することにより求めるこ
322 とができる。

323 ◆※1 例：生物学的製剤基準及び薬局方医薬品各条◆

324 ※2 試液の調製において色素の純度が重要である。

1 等電点電気泳動法

1 等電点電気泳動法

2 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。
3 なお、三薬局方で調和されていない部分は「*」で囲むことによ
4 り示す。

5 はじめに

6 等電点電気泳動法は等電点の違いを利用してたん白質を分離
7 できる電気泳動法である。分離は両性電解質(アンフォライト)
8 の混合物を含むポリアクリルアミド又はカンテン平板ゲルを用
9 いて行う。このようなゲルに電圧をかけることによりアンフォ
10 ライトがゲル内を移動し、pH勾配が形成される。ゲルの調製
11 時にゲル自体に弱酸又は弱塩基の解離基を導入した固定化pH
12 勾配を持ったゲルを用いる場合もある。添加したたん白質がそ
13 の等電点と同じpHのゲルの位置にまで泳動されると、たん白
14 質の相対電荷が中和されて移動が止まる。混合するアンフォラ
15 イトを選択することにより、いろいろな範囲のpH勾配を作る
16 ことが可能である。

17 理論

18 たん白質は電場がかけられたゲル内の等電点の位置では実効
19 荷電が0となり移動度がゼロとなるが、拡散作用による移動は
20 認められる。たん白質は通電により形成されたpH勾配の各々
21 の等電点位置で移動が停止し、そこに濃縮される。この濃縮効
22 果を“フォーカシング(focusing)”とよぶ。電圧をかけることに
23 より発生する熱を放散させなければならないため、かけられる
24 電圧には制限があるが、試料量を少なくして高電圧で分析する
25 ことにより、たん白質の分離度を向上できる。薄いゲルや自動
26 温度調節循環装置を利用した冷却板を用いることによりゲルの
27 発熱を防ぎ、切れのよいフォーカシングが可能となる。分離度
28 R は隣り合う二つのバンドを分離するのに必要な最小pI差(Δ
29 pI)を測定することで算出される。

$$30 R: \Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D \left(\frac{dpH}{dx} \right)}{E \left(-\frac{d\mu}{dpH} \right)}}$$

31 式中、 D はたん白質固有の拡散係数、 dpH/dx はpH勾配、
32 E は電界強度(V/cm)、 $-d\mu/dpH$ はたん白質のpH移動度曲線
33 上におけるpIに等しいpHでの傾きである。 D 及び $-d\mu/dpH$
34 はたん白質固有の値であり変えることはできないが、より狭い
35 pH範囲を用い、電界強度を大きくすることにより分離をよく
36 することができる。アンフォライト担体を用いて作製された等
37 電点ゲルによるたん白質の分離は非常に良好な結果が得られる。
38 ゲル自体にアンフォライト担体と同様の解離基を導入した固定
39 化pH勾配を用いることにより分離度を更に向上させることが
40 できる。アンフォライト担体を用いて作製した等電点ゲルでは、
41 pH値0.02以上異なる等電点を持つたん白質を分離できるが、
42 固定化pH勾配を用いたゲルでは、pH値約0.001以上異なる等
43 電点を持つたん白質を分離できる。

44 操作

45 試料の特性並びにその調製には、特に注意を払う必要がある。
46 必要に応じて透析又はゲルろ過法により、試料を脱イオン水な
47 いしは2%アンフォライトを含む溶液に調製することが最も望
48 ましい。

49 ポリアクリルアミド平板ゲルでフォーカシングが完了するの
50 に要する時間は色素たん白質(例えばヘモグロビン)をゲル表面
51 の別々の位置に添加し、電圧をかけることによって確認できる。
52 すなわち、異なる位置に添加した色素たん白質のバンド位置が
53 同一になった時点でフォーカシングが完了したことが確認でき
54 る。プロトコールによってはフォーカシングの完了を泳動開始
55 後の経過時間で定めることができる。

56 適切に調製された標準品又は等電点電気泳動用マーカーたん
57 白質と泳動パターンを比較することにより、等電点電気泳動を
58 目的たん白質の確認試験に用いることができる。また、標準品
59 の泳動バンドとの濃淡を比較することにより、限度試験として
60 等電点電気泳動を用いることもできる。更には、デンストメー
61 ターを用いてバンドの濃淡を測定することにより定量法として
62 用いることも可能であり、若しくは同様の操作により目的たん
63 白質のバンドに含まれるたん白質の相対量を測定することも可
64 能である。

65 装置

66 装置の構成は以下のとおりである。

67 定電圧定電流定電力電源装置。2500Vの電圧を供給できるも
68 のが汎用されているが、このような電源装置が操作上、最
69 適と考えられる。また30W以上の出力を持つ装置が望ま
70 しい。

71 適当な材質でできたゲル支持用冷却板を含むプラスチック製
72 等電点電気泳動装置。

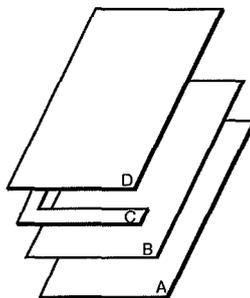
73 白金電極が付いたプラスチック製カバー。各電極はそれぞれ
74 陽極液及び陰極液で浸された適当な幅、長さ及び厚さの紙
75 芯でゲルと接続される。

76 ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法：操作の詳細

77 以下はポリアクリルアミド平板ゲルを用いる等電点電気泳動
78 操作法の詳細であり、医薬品各条に特に規定がない限り本法を
79 用いる。

80 平板ゲルの調製法

81 型枠 型枠(図参照)はガラス板(A)、ゲルの取扱いを容易に
82 するためのポリエステルフィルム(B)、一つ以上のスペーサー
83 (C)、ガラス板(D)及びこれらを固定するためのクランプからな
84 っている。



85

86 7.5%ポリアクリルアミドゲル アクリルアミド29.1g及び
87 N,N' -メチレンビスアクリルアミド0.9gを水100mLに溶かす。
88 この液2.5容に医薬品各条に規定されたアンフォライト混液を
89 加え、水で10容とする。この液を注意深く混和した後、脱気
90 する。

91 型枠の組立て 一番下のガラス板にポリエステルフィルムを
92 のせ、スペーサーを置き、2枚目のガラス板をその上に置き、
93 それらをクランプで固定する。上記で用時調製した7.5%ポリ

2 等電点電気泳動法

94 アクリルアミドゲルをマグネチックスターラーでかき混ぜなが
95 ら、10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液0.25容及び
96 N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン0.25容を加え、こ
97 の液を直ちに型枠のガラス板間の隙間に流し込む。

98 方法

99 型枠を外し、冷却した支持板を適当な液体2~3mLでぬらし、
100 その上に気泡が生じないように注意しながらポリエステルフィル
101 ム上に重合させたゲルを移す。医薬品各条に規定されたように
102 試料溶液及び標準溶液を調製する。約10mm×5mmの試料添
103 付用の紙片(複数)をゲル板上に置き、各紙片に試験する試料の
104 規定量を浸み込ませる。また、等電点既知のたん白質溶液の規
105 定量をpHマーカーとしてゲルにのせる。プロトコールによっ
106 ては紙片の代わりに試料液を添付する溝を持ったゲル板を使用
107 する。ゲルの幅に届く長さで切った2枚のろ紙をそれぞれの電
108 極液(陽極液は酸性、陰極液はアルカリ性)に浸す。陽極液及び
109 陰極液のそれぞれの組成は医薬品各条に規定される。これらの
110 紙芯をゲルの両端に端から数ミリメートル重なるように置く。
111 両電極が各紙芯に接触するようにカバーをかける。医薬品各条
112 に規定された電気泳動条件に従って泳動を開始する。標準たん
113 白質混合物の泳動が終了した時点で電流を止め、ピンセットで
114 試料添加用紙片と両電極紙芯を取り除き、ゲル平板を“ポリア
115 クリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液”に浸す。室温で30
116 分間穏やかに振とうした後、固定液を除き、“脱色液”200mL
117 を加えて1時間、振とうする。脱色液を捨て、“クーマシー染
118 色試液”を加えて30分間放置する。次に“脱色液”に浸して透明
119 な背景にバンドが見えるようになるまでゲルを脱色する。医薬
120 品各条に記載されている染色パターンのバンドの位置及び濃度
121 を調べる。

122 本試験法の細部の変更 (検証の必要な項目)

123 本法を準用して、試験法又は操作法の変更を行う場合には適
124 切な検証が必要である。変更には次のようなケースが含まれる。

- 125 (1) 市販平板ゲル、染色及び脱色液のキットの使用
- 126 (2) 固定pH勾配ゲルの使用
- 127 (3) ディスクゲルの使用
- 128 (4) 種々のサイズの超薄層(0.2mm)平板ゲルカセットの使用
- 129 (5) 異なるサンプル量若しくは紙以外のサンプル添加手段を
130 含むサンプル添加操作法の変更
- 131 (6) ゲルの寸法や装置に応じた電流、電圧等の変更や、バン
132 ドの移動度から判断するのではなく定められた泳動時間の分離
133 等、種々の泳動条件の利用
- 134 (7) プレフォーカシング段階の組入れ
- 135 (8) 自動装置の使用
- 136 (9) カンテングルの使用

137 等電点電気泳動操作法の検証

138 本法と異なる方法を採用する場合にはその検証を行う必要が
139 ある。次の判断基準により分離能を評価することができる。

- 140 (1) 例えば等電点既知の着色pHマーカーを用いる場合は目
141 的とする安定なpH勾配が形成されているかどうかの評価
- 142 (2) 被験物質の標準物質の泳動パターンと被験物質の電気泳
143 動パターンとの比較
- 144 (3) 医薬品各条に記載された以外の評価基準

145 本法の規定の変更

146 特定の物質の分析に必要な本法の変更は各医薬品各条に詳細
147 に規定することができる。これらには次のものが含まれる。

148 (1) 泳動ゲル中への尿素の添加(3mol/Lの濃度がたん白質を
149 可溶化しておくのに必要な量としてしばしば用いられるが、
150 8mol/Lまで用いることもできる)：等電点において沈殿を生じ
151 るたん白質がある場合には、沈殿を起こさせないようにゲルの
152 組成に尿素を加える。尿素を使う必要がある場合には、たん白
153 質のカルバミル化を防ぐために用時調製した溶液を用いるべき
154 である。

155 (2) 他の染色法の利用

156 (3) たん白質の凝集や沈殿を防ぐために非イオン性の界面活
157 性剤(例えばオクチルグルコシド)や両親媒性の界面活性剤(例
158 えば3-[3-Cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-
159 propanesulfonate(CHAPS) や 3-[3-
160 Cholamidopropyl]dimethylammonio]-2-hydroxy-1-
161 propanesulfonate(CHAPSO))を添加したゲルの使用や試料へ
162 のアンフォライトの添加

163 注意

164 試料はゲルのどの場所にも添加できるが、極端なpH環境
165 に試料をさらすことのないように電極付近に試料を添加するこ
166 とは避けるべきである。試験法を開発する場合に、被験試料を
167 ゲルの三つのポイント(中心と両端)に添加することができるが、
168 両端に添加したたん白質の泳動パターンは同一にはならないこ
169 とも起こりうる。

170 フォーカシングを長時間行うとpH勾配が崩れて「pHドリフ
171 ト(陰極流)」とよばれる現象が起こる可能性がある。その機構
172 は完全に解明されているわけではないが、電気的浸透圧と二酸
173 化炭素の吸収が陰極流を引き起こす要因であると考えられてい
174 る。pHドリフトはゲルの陰極側からフォーカスしたたん白質
175 が外へ泳動されてしまう現象である。固定化pH勾配を用いる
176 ことによりこの問題を解決することができる。

177 泳動中はゲルを支えるゲル支持板を十分に冷却(約4°C)する
178 ことが重要である。電気泳動中に高い電場をかけると発熱する
179 ことがあり、ゲルのフォーカシングにも影響する。

180 試薬・試液

181 ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液 5-スル
182 ホサリチル酸二水和物35g及びトリクロ酢酸100gに水を加え
183 て溶かし、1000mLとする。

184 *クーマシー染色試液 クーマシーブリアントブルー R
185 -250 125mgを水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:
186 1)100mLに溶かし、ろ過する。

187 脱色液 水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)。

1 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件

はじめに

日局に収載された医薬品の品質規格は、当該医薬品の品質管理や品質の恒常性確保はもとより、有効性、安全性を確保する上にも基本的な役割を果たすべきものと考えられている。一方、近年、医薬品の品質や安全性等の確保に関する時代の要請は極めて厳しいものとなってきている。生物起源由来の医薬品やバイオテクノロジー技術応用医薬品などの生物薬品に関しては、特に安全性確保の面での懸念が強くなってきていることに留意した対応が望まれている。生物薬品の場合、最終製品の品質規格のほかに、その起源の選択と適格性評価、製造工程の妥当性評価とその恒常性維持及び特異的な物性をいかにコントロールするかが品質、安全性確保上のキーポイントとなる。これらの点をふまえ、局方の枠組みの中でいかにその品質、安全性などを確保するかが改めて問われてきていると考えられる。そこで、本参考情報はこれらの課題を解決するためにどのようなアプローチがあるかについて述べている。

日局収載医薬品の品質・安全性などの確保は、科学の進歩、経験の蓄積を反映してその時代における最も先端的な方法、考え方でなされることが望ましい。本参考情報では、現時点における科学的考察の到達点を示すことを試みた。これにより、日局収載医薬品のみならず、生物薬品の品質・安全性確保が時代を反映したより科学的根拠に基づくものとなり、また、各条収載に関する効率的な審議の推進につながることを期待される。

1. 日局生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための基本方針

日本薬局方生物薬品には、ほ乳類などの生体組織や体液(尿、血液など)に由来するものが含まれる。ヒト又は動物細胞株由来のたん白質性医薬品(組換え医薬品、細胞培養医薬品などのバイオ医薬品)も含まれる。これら日局生物薬品のウイルスに対する総合的な安全性確保を図るための必要な基本方針には、次のようなものが挙げられる。1)ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知すること、2)原材料及びその起源たるヒトや動物の適格性に関して慎重に吟味すること、及び医薬品の製造基材と定めた段階の試料(例えばプールした体液や細胞バンクなど)において徹底的な解析とスクリーニングを行い、ウイルスの存在の有無及び存在するウイルスの種類・性質について検討すること、3)ウイルスやウイルス様粒子が存在した場合、どの程度ヒトへの有害性が高いかを検討・確認すること、4)ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないような製造関連物質(試薬、抗体カラムなど)を選択すること、5)必要に応じて最終製品を含む製造工程の適当な段階の製品のウイルス否定試験を実施すること、6)製造工程によるウイルスクリアランスを達成するために工程中にウイルスの除去・不活化に関する効果的な方法を用いること、各種の方法の組合せによるより高いウイルスクリアランスの達成に留意すること、7)周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること、8)ウイルス不活化及び除去を評価する試験を実施し、評価すること。これらの方策を、段階的にかつ相互補完的に活用していくことによって、生物薬品のウイルス面での安全性を確保、向上させることが可能になるものと考えられる。

2. 各条及び参考情報におけるウイルス安全性確保策

1.で示した日局生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための方策は、本参考情報に一括して必要な留意事項、具体的情報を記載している。各条では、当該各条に特殊な留意事項がある場合は別にして、一般には、「健康な動物から製し、原材料又は医薬品の製造基材及び生物起源由来の製造関連物質にはヒトに感染性や病原性を示すウイルスの存在は否定されている」こと、又は「ウイルス安全性に関し適格性及び妥当性が評価された細胞株及び培養方法を用いて製し、生物起源由来の製造関連物質にはヒトに感染性や病原性を示すウイルスの存在は否定されている」こと、及び「感染性や病原性を示すウイルスを除去できるような製造工程で製造されている」などの趣旨を記載して、ウイルス安全性を考慮すべき製品との注意を喚起すると共に、安全性上懸念されるウイルスについての必要な試験や工程評価試験はなされていることを明らかにしておくべきと思われる。

3. 本参考情報において盛り込んだ事項と内容

ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品のウイルス安全性については、ICH国際合意文書を受けた国内版通知「ヒト又は動物細胞を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」(平成12年2月22日付医薬審第329号厚生省医薬安全局審査管理課長通知)があり、また、血漿分画製剤については、「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」がある。日局生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための本参考情報は、基本的にこれらのガイドラインに盛り込まれた事項を参考にしながら、日局に収載されている生物薬品はもとより、将来収載される可能性のあるすべての生物薬品、すなわち生体組織や尿などの体液に由来する生物薬品、更にはヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品などのウイルス安全性確保に必要な一般の留意事項及び各論を盛り込んでいる(表1)。

2 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件

表1 日局生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための参考情報に含まれる事項

I	はじめに
1.	日局生物薬品のウイルスに対する安全性確保のための基本方策
2.	各条及び参考情報におけるウイルス安全性確保策
3.	本参考情報において盛り込んだ事項と内容
II	一般的事項
1.	目的
2.	背景
3.	ウイルス安全性確保策における未知のリスク問題
4.	適用範囲
5.	日局生物薬品がウイルスに汚染される可能性(ウイルスの汚染源)
6.	ウイルス安全性確保の基本
7.	ウイルス試験の限界
8.	ウイルスクリアランス試験の役割
III	原材料・医薬品製造基材
1.	原材料・医薬品製造基材の起源たる動物種と採取部位に依存した問題と対策
2.	原材料・医薬品製造基材の供給源としてのヒトや動物の適格性評価試験
IV	製造及びウイルス試験にかかわる留意事項
1.	精製工程前のウイルス試験
2.	中間原料等の受入れ試験としてのウイルス検査
3.	最終製品におけるウイルス試験
V	ウイルスクリアランスに関する工程評価
1.	ウイルスクリアランスの工程評価の意義、目的、一般的留意事項
2.	ウイルスの選択
3.	ウイルスクリアランス試験の設計
4.	ウイルスクリアランス試験結果の解釈
1)	ウイルスクリアランス指数の評価
2)	ウイルスクリアランス指数の計算法
3)	結果の解釈及び評価上留意すべき事項
VI	統計
1.	ウイルス力価測定における統計学とその留意点
2.	ウイルスクリアランス試験の再現性、信頼限界
VII	ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合
VIII	ウイルスクリアランス試験にかかわる測定法
1.	ウイルス感染価の測定法
2.	核酸増幅法(NAT)による検査
IX	記録と保存
X	その他

84 3.1. 目的
85 ほ乳類などの生体組織や体液に由来する生物薬品及びヒト又
86 は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品のウイルスに対する
87 総合的な安全性確保策についての考え方について提示すること
88 を目的とする。すなわち、①ウイルス汚染源についての配慮、
89 ②原材料の選択及びその起源たるヒトや動物の適格性に関する
90 適切な評価、③医薬品の製造基材段階におけるウイルス試験と
91 その解析・評価、④生物起源の製造関連物質(試薬、抗体カラ
92 ムなど)の選択に関する適切な評価、⑤製造工程の適当な段階
93 の製品における必要に応じたウイルス否定試験の実施、⑥ウイ
94 ルスクリアランス試験計画の立案、⑦ウイルスクリアランス試
95 験の実施と評価、などに関する方策や留意事項について記述し、
96 これらの要素を相補的に適切に組み合わせることによって、生
97 物薬品のウイルス面での安全性を確保、向上させることを包括
98 的に示すことを目標とする。
99 3.2. 背景
100 ヒト又は動物を直接起源とする生物薬品や、ヒト又は動物起
101 源細胞株由来のたん白質性医薬品(組換え医薬品、細胞培養医
102 薬品などのバイオ医薬品)において留意すべき安全性上の極め

103 て重要な課題の一つにウイルス汚染の可能性がある。ウイルス
104 汚染が発生すれば、臨床使用において深刻な事態を招く可能性
105 がある。ウイルス汚染は、原材料・医薬品製造基材に由来して
106 起きる可能性がある。また、製造工程中に外来性因子として混
107 入した結果生じる可能性もある。

108 日局生物薬品や細胞株由来たん白質性バイオ医薬品は、従来
109 から医療に多大の貢献を果たしてきており、また、過去にウイ
110 ルスによる安全性上の問題が生じたことはない。しかし、より
111 慎重なかつ科学的合理性に基づいた安全性確保措置をとること
112 により、不測の事態を未然に防ごうとすることは、健康被害の
113 未然防止に関する社会の強い関心を考慮すると社会的要請とし
114 て重要である。生物起源由来の医薬品のウイルス安全性をどの
115 ような視点でどこまで追求すべきかは、関係者にとって常に大
116 きな関心事であり課題でもある。

117 この課題を論ずるにあたって、まず二つの基本的なことを再
118 確認しておく必要がある。その一つは、医薬品が持つ科学的側
119 面、医学的側面、社会的側面を考慮する必要があるということ
120 である。すなわち、「医薬品はリスクとベネフィットを科学的、
121 社会的に勘案して医療のために活用するという特徴を持つ社会
122 的資産である」ということである。社会的資産である医薬品を
123 医療現場へいかに速やかに効率よく安定供給し、患者に福音を
124 もたらすかが医薬品関係者の目標であり使命であるということ
125 である。

126 もう一つは、ウイルス安全性は個別医薬品の成分本体にかか
127 わる安全性(狭義の安全性)とは独立した、いわばより一般的な
128 医薬品安全性(広義の安全性)にかかわる課題であると整理して
129 考える必要があるということである。日局医薬品のように当該
130 医薬品が長期間にわたり臨床で使用されてきたものの場合、広
131 義の安全性については疫学的に立証されているものと考えられ
132 るので、その実績は極めて重い意味を持つ。しかし、個別医薬
133 品(成分)本体の安全性とは異なり、ウイルス汚染の可能性とい
134 うことの本質を考えれば、実績のみで将来にわたる当該医薬品
135 のウイルス安全性を必ずしも保証できないことも考慮しなければ
136 ならない。実績を評価しつつ、適切な予防的措置についても
137 配慮を尽くすという方策が、日局生物薬品のウイルス安全性と
138 いう広義の医薬品安全性を確保する上での基本となるべきであ
139 ると考えられる。

140 予防的措置に対する取組みとしては、とりあえず規制や試験
141 実施を理論的に考えられる最大限行って安全性を保証するとい
142 う方策もないわけではない。しかしそうした方策を科学的吟味
143 や使用実績に対する評価を十分に行うことなく一般的に適用す
144 ると、必ずしも科学的合理性を持たない過度な規制や試験実施
145 の要求となる。その結果、実績がある医療上重要な医薬品の医
146 療現場への速やかで効率的な供給に支障をきたし、医薬品とい
147 う社会的資産が必ずしも有効に活用されない結果になる可能性
148 がある。医薬品の最大の特徴は、有効性と安全性上の要件とい
149 う両刃を持ちながら医療に活用しようとする剣である。有効性
150 と安全性上の要件というのはその時点での科学の結晶として導
151 き出され、有用性というバランスシートで相対的に評価される
152 べきものである。適正な科学的合理性に基づかない安全性上の
153 過度な懸念にウエイトを置くあまり、有用性評価がバランスを
154 欠くものになってはならない。バランスのとれた適切な科学的
155 有用性評価に時の社会的関心、評価が加味され、当該医薬品は
156 社会的資産として活かされることになる。言い換えれば、医薬

157 品という社会的資産は、その時点での科学の結晶を社会が医療
158 のために活用するという特徴を持つ共通の資産であり、活用
159 あたっのキーポイントは科学的、社会的評価に基づくリスク
160 とベネフィットのバランスにある。生物起源由来の日局医薬品
161 のウイルス安全性をどのような視点でどこまで追求すべきかは、
162 これらの要素を勘案しながら検討する必要がある。

163 また、一般に医薬品のリスクとベネフィットは、当該医薬品
164 が使用される分野における他の医薬品や治療法との相対的な比
165 較において論じられるべきものであり、代替薬や類薬、代替治
166 療法の有無とそれらとのリスクとベネフィットの比較評価によ
167 って当該医薬品の有用性が最終的に評価されることになる。

168 このような背景の下、本稿の目的は、科学的に合理性のある
169 日局生物薬品のウイルス安全性に関する方策を論じることにあ
170 る。科学的合理性のある方策とはあくまで現時点の科学的知識
171 で想定できる問題に対して、現状の科学水準に基づき、適切か
172 つ効果的に対応することである。言い換えれば、汚染の可能性
173 を想定するウイルスは、種類、形態、粒子サイズ、物理的・化
174 学的性質などにおいて既存のウイルス学の知見の範囲にあるも
175 のであり、また、当該生物薬品の起源であるヒト又は動物、組
176 織や体液、製造過程に使用する試薬、資材、添加物などに存在
177 が予測されるウイルスである。試験としては、これらのウイル
178 スを対象とした検出法を適用し、ウイルスクリアランス試験を
179 考慮することになる。

180 3.3. ウイルス安全性確保策における未知のリスク問題

181 リスクの問題には既知のリスクと未知のリスクがある。

182 医薬品(医薬品成分)が本質的に有しているか、品質上の限界
183 から不可避免的に存在するいわば既知のリスクに対しては、試験
184 方法や評価基準を明確にしやすし、リスクをいわば定量化す
185 ることも可能である。すなわち、既知のリスクはベネフィット
186 との関係においてバランスシートにのせて評価しやすい。日局
187 医薬品はこの点に関しては既に相応の評価が定まっているもの
188 と考えられる。

189 一方、ウイルス安全性確保上、不可避免的に課題となる未知の
190 リスクは対象も特定できず、量的な概念も適用しにくいので、
191 対策や評価は必ずしも容易ではない。これは、医薬品関係者が
192 英知を結集して対処しなければならぬ課題である。

193 未知のリスクについて考慮するとき、“未知であるから危険
194 である”という視点と、“何が未知でそれに対していかに安全
195 性を確保を図るか”という視点がある。

196 “未知であるから危険である”というのは、それ自体既に一
197 つの評価であり、医薬品としての可否を決定づける最終判断に
198 つながるものである。こうした評価・判断に至るときは、合理
199 性のある科学的又は社会的な判断根拠に立脚しているべきであ
200 る。

201 例えば、「医薬品生産のある工程にウイルス、ウイルス様粒
202 子又はレトロウイルス様粒子が検出されたが、同定確認ができ
203 ず、したがって危険性も否定できない」というケースでは、
204 “未知であるから危険である”という評価に科学的合理性、妥
205 当性がある。しかし一方、「医薬品生産のある工程にウイルス、
206 ウイルス様粒子又はレトロウイルス様粒子が検出されないが、
207 未知の何かがあるかもしれない‘おそれがある’”として“未
208 知であるから危険である”とするような評価の仕方は、その限
209 りでは合理性のある科学的又は社会的な判断根拠に立脚してい
210 るとはいえない。ウイルス安全性問題に関しては、慎重の上に

211 も慎重であるべきことはいうまでもないが、少なくとも‘おそ
212 れ’の内容について明確に説明できるのでなければ、‘おそれ
213 は、社会的資産である医薬品を医療に活用しようとする意義あ
214 る使命との間で齟齬をきたす可能性がある。

215 科学的観点から英知を発揮すべきは、「未知の何かがあるか
216 もしれない‘おそれがある’”として、「危険である」とする
217 のではなく、“何が未知でそれに対していかに安全性確保を図
218 るか”という課題に取り組むことであろう。その際、現段階で
219 の科学的知識を基に、“何が未知であるか”という問題を立て
220 られるもの、立てるべきものを明確にすることが重要である。
221 それによって初めて“安全性確保を図る”ための方策を考える
222 ことが可能になるからである。

223 ウイルス安全性における未知のリスクの防止という概念を
224 “何が未知であるか”という前提なしにつきつめていけば、理
225 論的には「未知なるものは」どこまでも残るので際限のない問
226 いかげになる。このようなアプローチをすると、「問題」と
227 「対策」を科学的に関係付けることはできなくなり、結果的に
228 は過度な規制や試験実施の要求につながることになる。しかし、
229 そうしてみても科学的に関係付けのない「対策」が「何が未知
230 であるかわからないという問題」に有効である可能性は極めて
231 少ないであろう。

232 例えば、「製造工程中にどのようなウイルスが迷入してきて
233 も、精製工程がウイルスをクリアランスできる十分な能力を有
234 することを評価する」という場面における“何が未知である
235 か”は、「どのような既存ウイルスが迷入してくるかが未知」
236 という問題設定であるべきである。「どのようなウイルスが世
237 に存在しているかが未知」ということではない。前者の問題設
238 定では、DNAウイルス又はRNAウイルス、エンベロープを有
239 するウイルス又は有しないウイルス、粒子サイズ、物理的・化
240 学的性質など、現在われわれが知り得るウイルスを前提とした
241 上での問題設定となる。迷入してくるウイルスは未知でも、そ
242 のウイルスは種類、形状、諸性質などにおいて既存の学問、知
243 識の範囲内にあるものという前提である。そうした前提をふま
244 え、既存の学問、知識の範囲内にあるウイルスのいずれかが迷
245 入した場合の工程が持つクリアランス能力を評価するというこ
246 とであれば、核酸の種類、エンベロープの有無、粒子サイズ、
247 物性等の異なる3種類程度のモデルウイルスを適切に組み合わ
248 せて精製工程のウイルスクリアランス特性解析試験を行えば、
249 既存のすべてのウイルスのクリアランス状況をシミュレートし
250 たことになり、“安全性確保を図る”ための方策になる。

251 「どのようなウイルスが世に存在しているかが未知」という
252 点に関しては、ウイルス学の将来の研究課題としてあり得るが、
253 ウイルスクリアランス試験における問題設定としては適切とは
254 いえない。また仮に、現在知られているいかなるウイルスより
255 も粒子サイズが小さい未知ウイルス、又はいかなるウイルスも
256 持たない物理的・化学的性質を持つ未知ウイルスが存在するか
257 もしれないという問題設定が机上でできたとしても、そのよう
258 なウイルスモデルが現に存在しない以上、現在の科学水準では
259 実験的には対応のしようがない。また、想定されるウイルス粒
260 子サイズや性質が不明な以上、既存のいかなる方法や技術を駆
261 使してウイルスクリアランス試験を行っていても“安全性確保
262 を図る”ための方策にはならない。同様に、現在のスクリーニ
263 ング法では検出できない「未知」のウイルスが存在するかもしれ
264 ない問題設定を試みて、対応のしようはなく、どのよう

265 な段階で、どのようなウイルス検出試験を課してみても“安全
266 性確保を図る”ための方策とはならない。

267 科学的合理性を過度に超えた規制や試験実施の要求は、医薬
268 品供給側に人的、経済的、時間的負担の増大をもたらすこと
269 になるが、これはひいては医療現場への迅速、効果的、経済的な
270 医薬品供給に影響を及ぼすことになる。医薬品が科学的に評価
271 されるべきものであり、社会的資産であることを考慮すれば、
272 いかにか科学的に合理性のあるアプローチで人的、経済的、時間
273 的負担を最小限にして最大限の安全性を確保するかが課題であ
274 ると思われる。

275 ここで、これらの課題の達成は、医薬品供給側の適切な対応
276 をすべての前提にしていることを改めて確認する必要がある。
277 例えば、前述の「医薬品生産のある工程にウイルス、ウイルス
278 様粒子又はレトロウイルス様粒子が検出されないが、未知の何
279 かがあるかもしれない‘おそれ’がある」という問題設定では、
280 「医薬品生産のある工程にウイルス、ウイルス様粒子又はレト
281 ロウイルス様粒子が検出されない」と判断した試験が、その時
282 点の科学的水準から見て妥当なものであることを当然の前提条
283 件としている。こうした前提の成立に疑問がある場合は、「未
284 知の何かがあるかもしれない‘おそれ’がある」と問われるの
285 は当然である。

286 3.4. 適用範囲

287 国内で使用される生体組織や体液に由来する日局生物薬品及
288 びヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品を適用対象
289 とする。ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品の場
290 合、前述の医薬審第329号「ヒト又は動物細胞を用いて製造さ
291 れるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」通
292 知施行後に開発・承認された製品は通知に従った対応がなされ
293 ているはずであるが、それ以前に承認された製品では対応が必
294 ずしも十分になされていないものもあると思われる。これらバ
295 イオ製品については日局収載時まで参考情報に適合するよう
296 必要十分な検討が行われることが期待される。一方、血液製剤
297 に関しては、生物学的製剤基準に収載され、また「血漿分画製
298 剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」が適
299 用されるので、日局参考情報の適用対象外とする。更に生物起
300 源由来物質でもアミノ酸、糖類、グリセリンなどのような比較
301 的低分子の化合物や、感染性や病原性を示す高分子化合物でも
302 ゼラチンのようなものは、その製法や精製法からウイルスの迷
303 入の可能性が考えられないケースが多く、また、たん白質には
304 適用できないような強力なウイルス不活化/除去操作を適用す
305 ることも可能なので、これらについては、適用対象外とするの
306 が合理的である。ただし、本情報に盛り込まれた事項のうち合
307 理的に適用できる部分があれば、参考にすればよい。なお、日
308 局には収載されていない生物薬品であっても、本文書の適用対
309 象となる日局生物薬品と同様なものについては、本参考情報を
310 参考にしてウイルスに対する総合的な安全確保対策をとること
311 が推奨される。

312 3.5. 日局生物薬品がウイルスに汚染される可能性(ウイルス 313 の汚染源)

314 日局生物薬品がウイルスに汚染される可能性(ウイルスの汚
315 染源)について注意を喚起し、また対応策について言及してお
316 くことは、ウイルス汚染の可能性をもとから絶ち、安全性確保
317 の確率を高めるという意味において重要である。生物薬品の多
318 くはヒト又は動物の組織、体液等を起源・原材料とした「医薬

319 品製造基材」から製造され、その精製過程や製剤化の過程にお
320 いても生物起源由来の試薬、カラム材料又は医薬品添加剤とし
321 て生物起源由来物質を用いる場合があることより、これらを汚
322 染源として伝播するウイルスについて十分な安全対策を実施し
323 なければならない。また、ヒト又は動物起源細胞株由来のたん
324 白質性医薬品についても医薬品製造基材である細胞株及びそれ
325 以降の製造過程におけるウイルス汚染の可能性について配慮が
326 必要であることは医薬審第329号通知に述べられているとおり
327 である。

328 なお、ここで「医薬品製造基材」とは、原薬の品質・安全性
329 を確保する上で決定的に重要な位置付けにあると定めた原薬製
330 造のための出発素材と定義する。「医薬品製造基材」は、ヒト
331 又は動物の組織、体液等そのものである場合もあり、尿等に
332 あってはプールしたものである場合もあり、また、一定の処理を
333 経たものである場合もある。ウイルス汚染に関する本格的な試
334 験、評価及び管理は「医薬品製造基材」を起点とする考え方で
335 実施するのが合理的であることも多いと思われる。「医薬品製
336 造基材」段階で試験、評価、又は品質管理の程度を徹底化す
337 ばするほど、より上流段階の原材料や個体レベルでの評価や管
338 理は合理化することができる。逆に、上流段階の原材料や個体
339 レベルでの評価や管理の程度を厳密にすることによって、「医
340 薬品製造基材」段階での試験、評価、又は品質管理の程度を合
341 理化することもできる。

342 現在日局に収載されている生物薬品のウイルスに対する安全
343 性確保のための方策は、個々の製剤に規定された製造方法や規
344 格試験法にうかがわれるが、起源・原材料・医薬品製造基材か
345 ら精製工程、最終製品に至る全体を俯瞰した、総合的かつ合理
346 的なウイルス安全性確保対策についての統一された方針や情報
347 については明確にされてこなかった。まず第一に重要な要素は、
348 起源動物、原材料、医薬品製造基材のいずれかの段階でウイル
349 ス汚染の可能性を徹底的に排除する方策を講ずることである。
350 生物薬品の例ではないが、原材料・医薬品製造基材からのウイル
351 ス汚染の例としては、古くは血液分画製剤においてA型肝炎
352 ウイルス(HAV)やC型肝炎ウイルス(HCV)が混入したケースが
353 知られている。また、1980年代の血漿分画製剤によるヒト免
354 疫不全ウイルス(HIV)感染も記憶に新しいところである。今回
355 の参考情報ではこのような歴史的教訓に学びながら、日局生物
356 薬品のウイルスに対する総合的な安全性を確保するための具体
357 的な指針を示そうとするものである。ヒト由来で病原性を持つ
358 感染性ウイルスで、医薬品原材料等に混入する可能性があり、
359 注意すべきものとして現在までに明らかになっているものには、
360 HIV、HAV、B型肝炎ウイルス(HBV)、HCV、ヒトT細胞白血
361 病ウイルス(HTLV-I/II)、ヒトパルボウイルスB19、サイ
362 トメガロウイルス(CMV)などがある。ヒト又は動物由来の組
363 織、体液などを原材料・医薬品製造基材とする生物薬品には、
364 常にこのようなヒトに対して病原性が知られているウイルスに
365 よる汚染やその他のウイルス潜在の可能性があり、安全対策は
366 徹底して実施する必要がある。また、原材料・医薬品製造基材
367 とする生体成分以外の材料からのウイルス汚染の可能性、例え
368 ば、製造工程で酵素やモノクローナル抗体カラムを用いる場合
369 又は安定化剤にアルブミンなどを用いる場合には、それぞれの
370 起源動物あるいは細胞由来のウイルスなどによる汚染の可能性
371 に対する注意も必要である。更に、製造施設環境から汚染され
372 る可能性や製造従事者より汚染される場合、又は製品取扱い中

373 におけるウイルス汚染の可能性も考えられないわけではないの
374 で、これらにも留意した対策が必要である。

375 ヒト又は動物起源細胞株由来のたんぱく質性医薬品の場合、細
376 胞には、潜伏感染又は持続感染状態のウイルス(例えば、ヘル
377 ペスウイルス)又は内在的なレトロウイルスが存在している可
378 能性がある。また、1)感染した動物からの細胞株の入手、2)細
379 胞株を樹立するためのウイルスの使用、3)汚染された生物起源
380 由来の試薬(例：動物血清成分)の使用、4)細胞取扱い中におけ
381 る汚染などにより、外来性のウイルス汚染が発生する可能性が
382 ある。医薬品製造過程では、1)培養などに使用する血清成分の
383 ような生物起源由来の試薬の汚染、2)目的たんぱく質をコードす
384 る特定の遺伝子の発現を誘導するためのウイルスの使用、3)精
385 製等に使用するモノクローナル抗体アフィニティーカラムのよ
386 うな試薬の汚染、4)製剤化に使用する添加剤の汚染、5)細胞及
387 び培養液の取扱い中における汚染などの原因により外来性ウイ
388 ルスが最終製品に迷入する可能性がある。なお、細胞培養パラ
389 メーターをモニターすれば、外来性ウイルスの汚染の早期発見
390 に役立つとされている。

391 3.6. ウィルス安全性確保の基本

392 ヒト又は動物由来の組織、体液、細胞株等を原材料・医薬品
393 製造基材とする生物薬品のウイルスに対する安全対策は、次に
394 示す複数の方法を適切かつ相補的に行うことにより達成される。

- 395 (1) ウィルス汚染の可能性(汚染源)について熟知すること
- 396 (2) 原材料及びその起源たるヒトや動物の適格性に関して慎
397 重に吟味すること、及び医薬品の製造基材と定めた段階の試料
398 において徹底的な解析とスクリーニングを行い、ウイルス存在
399 の有無及び存在するウイルスの種類・性質について検討するこ
400 と
- 401 (3) ウィルスやウイルス様粒子が存在した場合、どの程度ヒ
402 トへの有害性が高いかを検討・確認すること
- 403 (4) ヒトに感染性や病原性を示すウイルスが存在しないよう
404 な生物起源製造関連物質(試薬、抗体カラムなど)を選択するこ
405 と
- 406 (5) 必要に応じて最終製品を含む製造工程の適当な段階の製
407 品のウイルス否定試験を実施すること
- 408 (6) 製造工程によるウィルスクリアランスを達成するために
409 工程中にウイルスの除去・不活化に関する効果的な方法を用い
410 ること。各種の方法の組合せによるより高いウィルスクリアラ
411 ンスの達成に留意すること
- 412 (7) 周到なウィルスクリアランス試験計画を立てること
- 413 (8) ウィルス不活化及び除去を評価する試験を実施し、評価
414 すること

415 製造業者は、それぞれの製品や製造工程について、ウイルス
416 に対する安全性を保証するための総合戦略の中で採用したアプ
417 ローチを説明し、その妥当性を示す必要がある。その際、参考
418 情報で推奨されているアプローチを合理性がある限り適用する
419 べきである。

420 3.7. ウィルス試験の限界

421 ウィルスの存在の有無を検出するにはウイルス試験を実施す
422 る。しかし、ウイルス試験には、それだけでウイルスが存在し
423 ないことを決定的に結論づけたり、製品の安全性を確立するの
424 に十分であるというものはなく、限界があることを認識してお
425 く必要がある。例えば、1)統計的理由により低濃度のウイルス
426 を検出するときの感度がサンプルサイズに依存するなど定量性

427 の面で固有の限界がある。また、2)通常、いかなるウイルス試
428 験法にも検出限界が存在するため、ウイルス試験の結果が陰性
429 であってもウイルスの存在を完全に否定できないこともある。
430 更に、3)用いたウイルス試験法がヒト又は動物由来の組織、体
431 液等に存在するウイルスの検出に特異性や感度において必ずし
432 も適切ではなく、それらを検出できない場合もあり得る。

433 ウィルス試験の方法は学問や技術の進歩と共に向上するため、
434 試験の実施にあたりその時点での科学的に最高水準の技術を取
435 り入れ、適切に行うことでウイルス検出の確度を高める努力を
436 前提とすることはいうまでもないが、それでも、上記の様々な
437 限界を完全に乗り越えることはできない。また一方、生物薬品
438 の製造過程では、ウイルスが混入してくる可能性を完全には否
439 定できないので、これらを念頭に置いた上で安全対策を講ずる
440 必要がある。

441 したがって、最終製品に感染性ウイルスが存在しないという、
442 より確実な保証は、多くの場合、原材料・医薬品製造基材や製
443 品を直接試験して否定することのみでは得られず、その精製法
444 のウイルス不活化/除去能力を併せて示すことによって得られ
445 ると考えるべきである。

446 3.8. ウィルスクリアランス試験の役割

447 前項で述べたウイルス試験の限界及びヒト・動物由来の生物
448 薬品の原材料・医薬品製造基材にはウイルス潜在の可能性があ
449 ること、又は製造過程での外来性ウイルス迷入の可能性を前提
450 にすると、ウイルスに対する安全対策の上で重要なことの一つ
451 は、原材料などにおいて検出できなかったウイルス及びその後
452 の不測の事態で迷入したウイルスを製造工程でいかに除去や不
453 活化ができるかである。ウィルスクリアランス試験を実施する
454 目的は、精製工程や、製造工程中に組み込まれたウイルス除去
455 や不活化過程が、どのようなウイルス除去/不活化能力を有し
456 ているかを実験的に評価することである。このためにウイルス
457 粒子のサイズ、形状、エンベロープの有無、核酸の種類(DNA
458 型、RNA型)、耐熱性や化学的処理に対する抵抗性などの特性
459 を考え、適切なウイルスを選択し、実験室規模での添加試験
460 (スパイク試験)を実施することにより、原材料などにおいて検
461 出できなかったウイルス及びその後の不測の事態で迷入したウ
462 イルスに対する除去及び不活化能力を検討・評価することが必
463 要である。

464 このように、ウィルスクリアランス試験の役割は、製造工程
465 が有するウイルス除去及び不活化能力をモデル試験により推測
466 することであり、ヒト又は動物由来の個々の生物薬品がウイル
467 ス安全性に関して受け入れられるレベルに達しているという科
468 学的根拠を得ることに寄与するものである。

469 ウィルスクリアランス試験の実施に際しては、個々の製品ご
470 とにその起源、原材料・医薬品製造基材や製造方法の特徴を十
471 分に考慮して、最終製品がウイルス安全性において問題がない
472 ことを最も確実にかつ合理的に保証できるよう適切なアプロー
473 チ法を採用する必要がある。

474 4. 原材料・医薬品製造基材

475 4.1. 原材料・医薬品製造基材の起源たる動物種と採取部位に 476 依存した問題と対策

477 現在日局に収載されている生物薬品でウイルスに対する安全
478 対策が必要なものの原材料・医薬品製造基材は、動物種として
479 は主にヒト、ウシ、ブタ、ウマなどより得ている。いずれも健
480 康な個体由来であるべきことは当然である。動物の場合、野生

481 の動物は避け、可能な限り適切に規定された特定病原体感染防
482 止条件(SPF: specific pathogen-free)に適合したコロナー由来
483 で、適切な微生物汚染防止策や汚染監視システムを含む衛生管
484 理の行き届いた環境下で飼育された動物個体を使用する。食肉
485 基準がある動物種についてはこれを満たした動物個体を使用す
486 る。動物種に応じて考慮対象とすべきウイルスが異なってくる
487 が、動物個体の衛生管理状況、食肉基準等への適合状況によっ
488 ては、検討すべきウイルスを更に絞り込むことも可能であろう。
489 一方、同一の動物種であっても、原材料・医薬品製造基材を採
490 取した部位に応じて対策を講じる必要がある。例えば、血液
491 やある特定の組織から原材料・医薬品製造基材を得る場合には、
492 それぞれに特徴的に存在する可能性があるウイルスのリスク度
493 やそのウイルスが増殖するリスクについて考慮する必要がある。
494 その方策は、尿や乳汁などの体外排泄物や分泌物が原材料・医
495 薬品製造基材である場合のそれとは異なるかもしれない。なお、
496 下垂体などの原材料を用いる場合は伝達性海綿状脳症(TSEs)
497 に対する考慮も必要となるであろうが、これらの病原体に対す
498 る方策は本参考情報では対象範囲外とする。基本は、当該動物
499 にTSEsの汚染の報告がない国(地域)由来の原材料などやTSEs
500 に感染していない動物あるいは感染の危険性が報告されていな
501 い動物種由来の原材料などを使用することである。使用する原
502 材料などとTSEsに対する考慮事項について明確でない点があ
503 る場合にはあらかじめ規制当局と協議することが推奨される。

504 わが国における生物薬品の製造に用いられる原材料・医薬品
505 製造基材としては以下のものがある。

506 (1) ヒト由来生物薬品

507 ヒト由来生物薬品の原材料を得るソースとしては、血漿、胎
508 盤、尿などが用いられている。これらの原材料については、
509 各々の原材料を得た個人ごとにその適格性を問診したり検査し
510 たりすることが可能なケースと原材料の種類によっては個人レ
511 ベルでの十分な検査ができない場合がある。個体レベルで十分
512 な検査が不可能な場合は、その後の製造工程における適切な段
513 階、例えば医薬品製造基材と規定した段階でウイルス汚染を否
514 定する検査を行う必要がある。

515 (2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

516 動物由来の生物薬品としては、ウシ、ブタ、ウマなどの血漿
517 や各種組織より、ヘパリンや性腺刺激ホルモンなどが製造され
518 ている。

519 (3) ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品

520 ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品の場合、ヒ
521 ト又は動物起源細胞株が実質的な原材料であり、医薬品製造
522 の直接の製造基材はクローン化された細胞株から調製された細胞
523 バンク(マスター・セル・バンク、ワーキング・セル・バンク)
524 である。ウイルス安全性面での適格性は、一般には細胞バンク
525 レベルで十分に検討すればよいと考えられるが、起源たる動物
526 のウイルス面に関する情報やマスター・セル・バンクの基で
527 ある細胞株樹立の経緯が詳細であればあるほど、マスター・セ
528 ル・バンクの適格性評価試験をより適切かつ合理的に計画及び
529 実践できることはいうまでもない。

530 4.2. 原材料・医薬品製造基材の供給源としてのヒトや動物の 531 適格性評価試験

532 (1) ヒト由来生物薬品

533 ヒト由来生物薬品にあつては、健康なヒトから得た体液など
534 を用いることが必須である。更に、各々の原材料を得た個人ご

535 とにその適格性を問診したり検査したりすることが可能でかつ
536 必要なケースでは、適切なプロトコールに従って問診を行うと
537 共に、特異性や感度、精度が十分に評価された試験法を用いて
538 血清学的検査を行い、少なくともHBV、HCV及びHIVの存在
539 が否定されたヒトより得た原材料を用いるべきである。また、
540 特異性、感度及び精度が十分に評価された核酸増幅法(NAT)を
541 用いてHBV、HCV及びHIVの遺伝子の検査を実施する必要がある。
542

543 一方、ヒト尿のように各々の個人レベルでは通常健康診断
544 程度以上の十分な検査を行うことができないか又は個別検査す
545 ることが合理的ではない原材料にあつては、プールした原材料
546 を医薬品製造基材として、特異性、感度及び精度が十分に評価
547 された抗原検査や核酸増幅法(NAT)などを用いて少なくとも
548 HBV、HCV及びHIVの存在を否定しておくべきである。

549 (2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

550 生物薬品の製造に用いられる動物は、適切な健康管理を行わ
551 れており、様々な検査によりその動物が健康であることが明ら
552 かにされている必要がある。更には、飼育されている群が適切
553 に管理された飼育条件にあつて全く異常な個体が発生していな
554 いことも必要である。また、ヒトに感染症や疾病をもたらすこ
555 とが知られている各々の動物特有のウイルスの存在については、
556 否定できる情報や科学的根拠を示すか、血清学的又は核酸増幅
557 法(NAT)などを用いて否定しておくべきである。各々の動物に
558 感染することが知られている人獣共通感染ウイルスの例を表2
559 に暫定的に示した。表2は更に吟味して完成する必要があるが、
560 これらすべてについて、各動物個体、原材料となる組織、体液
561 など、又はプールした原材料(医薬品製造のための直接の基材)
562 のレベルなどで実際に試験を行って否定することが必須である
563 という意味では必ずしもない。表2は動物の由来、健康状態、
564 健康管理や飼育状況、食肉基準に適合しているか否かなど、多
565 くの関連情報を含め、ある特定の動物種を起源とした場合にど
566 のようなウイルスに着目して試験を行うべきか、必ずしも行う
567 必要がないかなどを総合的に考察するための参考資料の一つと
568 して利用するためのものである。個々のケースについてはどの
569 ようなウイルスを対象にどのような検討を行えば現実問題とし
570 て合理的なのかについて十分に吟味し、その根拠を明らかにす
571 ることが重要である。

572 (3) ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品

573 医薬品製造基材であるマスター・セル・バンク(MCB)にお
574 いて、医薬審第329号通知「ヒト又は動物細胞を用いて製造さ
575 れるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」に
576 記載された要領に沿って内在性及び非内在性のウイルスによる
577 汚染の有無を徹底的に検討する必要がある。また、医薬品製造
578 のためにイン・ビトロ細胞齢の上限にまで培養された細胞
579 (CAL)についても、適切な外来性ウイルス試験(例えば*in vitro*
580 及び*in vivo*試験)及び内在性ウイルスの存在の有無について試
581 験を実施し、評価する必要がある。医薬品製造のための出発細
582 胞基材としての各ワーキング・セル・バンク(WCB)について
583 は、それ自体を対象に又は各WCBを培養したCALの段階で、
584 外来性ウイルスに関する試験を実施すること。適切な非内在性
585 ウイルスの試験がWCBのもとであるMCBで実施され、かつ、
586 そのWCBに由来するCALにおいて外来性ウイルスの試験が実
587 施されている場合、同様の試験は当該WCBでは不要である。

588 5. 製造及びウイルス試験にかかわる留意事項

589 ヒトあるいは動物由来の組織、体液などからウイルス面で安
590 全性が高い生物薬品を製造するには、3.5.で述べたようなウイ
591 ルスの汚染源に配慮しつつ、原材料となる組織や体液など又は
592 医薬品製造基材からのウイルス汚染の可能性を排除すると共に、
593 製造工程や製品取扱い中の汚染、製造従事者や製造施設環境か
594 らのウイルスなど汚染の可能性を極力低減させるため、適切な
595 製造条件及び技術の採用、製造環境の整備などを行う必要があ
596 る。

597 更に、近年のめざましい技術進歩をふまえ、有用なウイルス
598 検査技術やウイルス不活化/除去技術を積極的に導入する必要
599 がある。ウイルス不活化/除去については、原理の異なる二つ
600 以上の工程を採用することが望ましい。また、医薬品と同程度
601 の品質を持つ試薬を用いることによりウイルスの迷入の可能性
602 に対する安全性を高める必要がある。代表的な不活化/除去工
603 程としては、①加熱(例えば、55~60℃、30分の加熱で肝炎ウ
604 イルスのような一部の例外を除き大部分のウイルスが不活化す
605 るとされている。血液や尿由来の製品では液状60℃、10~24
606 時間処理、乾燥加熱処理の例もある)、②有機溶媒・界面活性
607 剤処理(S/D処理)、③膜ろ過(15~50nm)処理、④酸性処理、
608 ⑤放射線処理(γ線照射など)、⑥カラムクロマトグラフィー処
609 理(例えば、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換
610 クロマトグラフィー)、⑦分画処理(例えば有機溶媒分画、硫酸
611 アンモニウム分画処理)、⑧抽出処理、などがある。

612 5.1. 精製工程前のウイルス試験

613 (1) ヒト由来生物薬品

614 精製工程前のウイルス試験の試験試料として想定されるのは、
615 多くの場合、原材料として得られた個人の体液や組織、又はこ
616 れらをプールしたり、抽出物とした医薬品製造基材である。こ
617 れらのケースでは、既に4.2.(1)で述べたように、特異性や感度、
618 精度が十分に評価された試験法を用いて少なくともHBV、
619 HCV及びHIVの存在を否定しておく必要がある。精製工程前
620 の未精製バルクが医薬品製造基材より下流にある場合でも、医
621 薬品製造基材段階で適切なウイルス試験がなされ、ウイルスの
622 存在が否定されていれば、製造基材段階から生物起源由来の試
623 薬などを用いて調製される特別なケースなどを除いて、精製工
624 程前ウイルス試験を重複して実施する必要は必ずしもないと思
625 われる。

626 (2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

627 5.1.(1)と同様に、精製工程前のウイルス試験の試験試料とし
628 て想定されるのは、多くの場合、原材料として得られた動物の
629 体液や組織、又はこれらをプールしたり、抽出物とした医薬品
630 製造基材である。これらのケースでは、生物薬品の製造に用い
631 られる動物に存在することが知られており、ヒトに感染症や疾
632 病をもたらすことが明らかな又はその可能性が高いウイルスに
633 ついて、既に4.2.(2)で述べたように存在を否定できる情報を示
634 すか、特異性や感度、精度が十分に評価された血清学的検査あ
635 るいは核酸増幅法(NAT)などを用いてその存在を否定しておく
636 必要がある。精製工程前の未精製バルクが医薬品製造基材より
637 下流にある場合の考え方は、(1)の場合と同様である。

638 (3) ヒト又は動物起源細胞株由来のたん白質性医薬品

639 この場合は、一般に、医薬品製造基材は細胞バンクであり、
640 細胞培養後ハーベストされた細胞及び培養液の単一又は複数の
641 プールからなる未加工/未精製バルクが精製工程前の試験試料

642 となる。未加工/未精製バルクが必ずしも細胞を含まず培養液
643 からなる場合もある。MCBやWCBレベルでのウイルス試験に
644 よるウイルス存在の否定は、培養終了後の未加工/未精製バル
645 クにおけるウイルス存在の否定を必ずしも意味するものではない。
646 また、CALでの試験も通常一回行われるのみなので、パ
647 リテーションとしての意味合いは大きい。恒常的なウイルス
648 否定を保証するものではない。培地に血清や生物起源由来の成
649 分が使用されるときには、これらのロット更新という変動要因
650 もあるので、CALでの試験をロット更新ごとに行わない限り
651 未加工/未精製バルクレベルでの恒常的なウイルス否定を保証
652 することはできない。

653 未加工/未精製バルクとして典型的なサンプルは培養槽から
654 取り出された後、処理を行っていないものである。これは、細
655 胞培養中に迷入した外来性ウイルス汚染の可能性を高確率で検
656 出するのに最も効果的な段階の一つである。ウイルス試験はこ
657 の未加工/未精製バルクの段階で適切に実施されるべきである。
658 ただし、ごく一部工程を進めることによってウイルス試験がよ
659 り高感度に行える場合には、この限りではない(例:未加工/
660 未精製バルクがウイルス試験に用いる培養細胞に毒性を示すが、
661 部分的に処理したバルクにおいては毒性を示さないようなケー
662 ス)。培養槽から取り出されたそのままの細胞、破碎細胞及び
663 培養上清からなる混合物を処理を施すことなく試験することが
664 適切な場合もある。

665 未加工/未精製バルクについては、パイロットプラントスケ
666 ール又は実生産スケールから得た未加工/未精製バルクの少な
667 くとも3ロットについてウイルス試験を行うことが最低限の要
668 求として求められる。更に、それ以降の各製造バッチについて
669 も何らかの外来性ウイルス試験を実施することを考慮してみる
670 ことが望まれている。この未加工/未精製バルクにおけるウイ
671 ルス試験の範囲、程度及び頻度を決定するにあたっては、以下
672 のような諸点を考慮する必要がある。例えば、目的産物を生産
673 するために用いられる細胞株の種類・性質、細胞株の適格性試
674 験のため実施されたウイルス試験の程度と試験結果、培養方法、
675 原材料の起源とウイルスクリアランス試験の結果などである。
676 未加工/未精製バルクにおける試験として一般に用いられてい
677 るのは、一種又は数種の細胞株を用いる*in vitro*スクリーニン
678 グ試験である。なお適宜、NAT試験その他の適切な試験法を
679 用いるとよい。

680 一般に、外来性ウイルスが検出されたハーベストは、医薬品
681 などを製造するために用いるべきではない。もしこの段階で何
682 らかの外来性ウイルスが検出されたならば、その汚染の原因を
683 突きとめるために製造工程を注意深く点検し、適切な対応をと
684 るべきである。

685 5.2. 中間原料などの受入れ試験としてのウイルス検査

686 ヒト又は動物由来の組織、体液などから生物薬品を製造する
687 場合、原材料や医薬品製造基材として部分的に加工された中間
688 原料を他の製造業者より購入し製造に用いる場合もある。この
689 場合、原材料など製造業者により既に本参考情報に沿った試験が
690 行われている場合は、これらの中間原料を購入し、生物薬品を
691 製造するメーカーにおいて、受入れ試験としてどのようなウイ
692 ルス検査を実施すれば適切かについて検討し、検査の実施の有
693 無、検査する試験の内容を含めてその合理的根拠を明らかにし
694 ておく必要がある。

695 一方、原材料など製造業者により本参考情報に沿った試験が

696 行われていない場合は、本文書に沿い中間原料を直接の医薬品
697 製造基材とみなし、必要なすべてのウイルス否定試験を行う必
698 要がある。

699 5.3. 最終製品におけるウイルス試験

700 最終製品(又はそれに至る製造段階のいずれかの製品)におい
701 てどの程度のウイルス試験を実施すべきかは、原材料や医薬品
702 製造基材の種類、原材料や医薬品製造基材の各種ウイルス検査、
703 製造工程におけるウイルス除去及び不活化工程の評価試験の結
704 果、及び製造工程においてウイルスが迷入する可能性がどの程
705 度あるかなどを勘案して総合的に決定する必要がある。原材
706 料・医薬品製造基材の選択、原材料・医薬品製造基材又は中間
707 原料に対するウイルス試験、製造工程中の適切な段階でのウイル
708 ス試験、ウイルスクリアランス試験を的確に実施することなど
709 によりウイルス汚染に対する総合的な安全確保が図られるので
710 であろうことは当然期待される。しかし、原材料が例えば不特定
711 多数のヒト由来のものであり、ウインドウ期のウイルスの存在
712 の可能性があり、若しくはウイルス試験に固有の検出上の限界
713 などがあるといった特殊な事情が背景にあった場合で、万一、
714 製造プロセスに何らかの欠陥(例えば、ろ過膜が破損)や人為ミ
715 スによる原材料などの取違えなどが生じると、最終製品にウイル
716 スが汚染してくる可能性もある。このような偶発性のウイル
717 ス汚染を防ぐために、最終製品において原材料などに存在する
718 可能性があるものでも特に危険度の高いウイルスに着目した核
719 酸増幅法(NAT)による検査などを行うことが推奨される場合も
720 あるかも知れない。

721 6. ウイルスクリアランスに関する工程評価

722 6.1. ウイルスクリアランスの工程評価の意義、目的、一般的 723 留意事項

724 ウイルス不活化や除去に関する工程評価はヒト又は動物由来
725 の組織、体液などに由来する生物薬品の安全性を確立するため
726 に重要である。このウイルスクリアランスに関する評価を行う
727 ことは、原材料などに存在する可能性がある、若しくは不測の
728 事態により迷入する可能性があるウイルスを除去できるという
729 ことの一定限の保証となる。ウイルスクリアランス試験は、綿
730 密な試験のデザインの下、適切な方法により実施し、合理的に
731 評価される必要がある。

732 ウイルスクリアランス試験の目的は、ウイルスの不活化や除
733 去に有効であると考えられる工程について評価すること、それ
734 らの各工程を合わせて全体としてウイルスがどの程度減少した
735 かを定量的に評価することにある。この目的を達成するには、
736 製造・精製工程における様々な段階にしかるべき量のウイルス
737 を意図的に添加し、以降のそれぞれの工程を経る間に添加され
738 たウイルスがどの程度除去又は不活化されるかを示す必要があ
739 る。その際、必ずしも製造工程のすべての工程について評価す
740 る必要はなく、十分なクリアランスが示されるいくつかの工程
741 について試験し、評価することでよい。しかし、評価対象以外
742 のステップがウイルスの不活化/除去に関する結果に間接的に
743 影響を与える可能性についても留意しておくべきである。なお、
744 ウイルスクリアランス試験に用いたアプローチについて説明し、
745 その妥当性を明らかにできるようにしておく必要がある。

746 ウイルス量(感染性)は、ウイルス粒子の除去又はウイルス感
747 染性の不活化により減少する。ウイルスクリアランスに関して
748 評価の対象とした各製造工程については、ウイルス量の減少の
749 メカニズムが不活化によるのか除去によるのかに関して推定し

750 ておく必要がある。不活化を評価しようとする工程における試
751 験に際しては、検体を時間を変えてサンプリングし、不活化曲
752 線が描けるように計画するべきである。

753 6.2. ウイルスの選択

754 ウイルスクリアランス試験に使用されるモデルウイルスとし
755 ては、広範囲にウイルス除去/不活化の情報を得るという観点
756 から、DNAウイルス及びRNAウイルス、エンベロープの有無
757 や粒子径の大小において差異があるもの、及びウイルスクリ
758 アランス能力を試験する目的に叶う物理的・化学的処理に対する
759 抵抗性が高いものなどを含む広範な特性を持つウイルス類を選
760 択することが望ましい。これらの特性を網羅するには3種類程
761 度のモデルウイルスを組み合わせたことが必要になる。

762 モデルウイルスを選択する際、原料に存在している可能性の
763 あるウイルスに類似している、若しくは同じ特性を持っている
764 などの理由でウイルスを選択する場合もある。この際、2種類
765 以上のウイルスが候補として選択可能な場合には、原則として
766 ウイルス除去及び不活化処理に対して、より抵抗性の強いウイル
767 スを選択する。また、高力価の材料が調製できるウイルスが
768 望ましい(ただし、これがいつも可能であるとはいえない)。更
769 に、使用するそれぞれのウイルスの検出法に関しては、試験対
770 象の各製造工程段階における試料の状態などによって検出感度
771 が影響される可能性もあるので、それぞれの段階において効果
772 的で信頼性の高いアッセイができるようなウイルスを選択する
773 必要がある。なお、ウイルスの選択にあたっては、クリアラン
774 ス試験従事者に健康被害をもたらす可能性も考慮するべきであ
775 る。

776 その他ウイルスの選択に際しての留意事項は、医薬審第329
777 号通知を適宜参考にするといよい。また、ウイルスクリアランス
778 試験に用いられるウイルスの例を表3に示した。これは医薬審
779 第329号通知から引用したものである。ただし、医薬審第329
780 号通知はヒト又は動物細胞株由来の製品のウイルス安全性を対
781 象としているので、生物薬品の起源・原料によっては、より適
782 切なモデルウイルスを選択する必要があると思われる。

783 6.3. ウイルスクリアランス試験の設計

784 ウイルスクリアランス試験は、目標とする特定の製造工程段
785 階で意図的にウイルスを添加し、当該製造工程のウイルス除去
786 や不活化能力を定量的に評価するものである。

787 ウイルスクリアランス試験の計画を立案する際、検討するこ
788 とが望ましい留意点を以下に示す。

789 (1) 高力価の材料が調製できるウイルスを選択することが望
790 ましいが、その場合には凝集を避けるよう注意を払うべきであ
791 る。凝集が起これば、物理的除去が過大に評価されたり、不活
792 化が過小に評価され、実際の製造での状況を反映しなくなる可
793 能性が生じる。

794 (2) 使用するそれぞれのウイルスの検出法は、ウイルスクリ
795 アランス指数の算定に大きく影響するので、可能な限り検出感
796 度の高い方法を用い、事前に、用いる方法の検出感度を把握し
797 ておく必要がある。それぞれの製造工程段階において十分な感
798 度と再現性を有し、有用で信頼性の高い結果が得られるアッセ
799 イ法である必要がある。結果に関して統計的に適切で妥当な処
800 理が行えるよう、十分な測定サンプル数で実施する必要がある。
801 感染性試験を行う際には、感度保証のために適切なウイルスコ
802 ントロールを含むべきである。感染性を指標としない定量試験
803 もその妥当性を明らかにした上で使用してもよい。また、低濃

804 度のウイルス試料(例えばウイルス粒子数が1L当たり1~1000)
805 を取り扱う場合、ウイルス試料のサンプリングの仕方によって
806 生じる統計学上の問題を考慮に入れるべきである。

807 (3) ウイルスクリアランス試験は、製造業者が当該生物薬品
808 の製造工程の規模を縮小した試験系で実施する。GMP上、製
809 造に用いないウイルスを製造施設に持ち込むことはできないの
810 で、ウイルスクリアランス試験は、製造設備とは別のウイルス
811 試験設備で行わなければならない。このためウイルスクリア
812 ランス試験は、ウイルス学的研究を行う設備のある隔離された別
813 の施設で、ウイルスの専門家と精製工程のスケルダウンを設
814 計し、準備に関与した製造技術者が協同で行う必要がある。そ
815 の際のウイルスクリアランス試験はGLPの基本理念に基づき
816 実施しなければならない。

817 (4) この製造規模の縮小版で行うウイルスクリアランス試験
818 における工程の各要素は、実生産規模での製造工程のそれを可
819 能な限り反映したものとし、その妥当性を明らかにする必要が
820 ある。クロマトグラフィー装置については、カラムベッド高、
821 線流速、ベッド容量に対する流速の比率(すなわち接触時間)、
822 緩衝液、カラム充てん剤の種類、pH、温度、たん白質濃度、
823 塩濃度、目的物質濃度に関して、すべて実生産スケールの製造
824 に相応している必要がある。また、溶出のプロフィールも同様
825 のものが得られなければならない。同様な考え方をその他の工
826 程についても適用すること。やむを得ない事情により実際の製
827 造工程を反映させることができない場合には、それが結果へど
828 のような影響を及ぼすかを考察しておくべきである。

829 (5) 製造工程のうち、ウイルス不活化/除去に関して原理が
830 異なると考えられる二つ以上の工程を選択し、検討することが
831 望ましい。

832 (6) ウイルスを不活化/除去することが予想される工程につ
833 いて、そのクリアランス能力を個々に評価し、それぞれが不活
834 化工程なのか、除去工程なのか、又は不活化/除去いずれにも
835 関与するのか慎重に検討し、試験を計画すべきである。一般に
836 ウイルスクリアランス試験では、試験対象となる各段階ごとに
837 ウイルスを添加し、当該工程を経た後の感染性の減少度を評価
838 するが、ある工程段階に高力価のウイルスを添加し、工程間の
839 ウイルス濃度を試験することで十分である場合もある。ウイル
840 ス除去が分離・分画操作による場合、可能な範囲で、ウイル
841 がどのように分離・分画されたのか(マスバランス)を検討する
842 ことが望ましい。

843 (7) ウイルスの不活化を評価するためには、試験対象とする
844 工程前の試料に感染性のウイルスをスパイクし、工程を経る間
845 における減少度を計算すべきである。その際、ウイルスの不活
846 化は単純な一次反応でなく、通常、速い“第一相”と遅い“第
847 二相”から構成される複雑な反応であることに留意すべきであ
848 る。したがって試験に際しては、時間を変えて検体をサンプリ
849 ングし、不活化曲線が描けるように計画すべきである。不活化
850 試験においては、最短曝露時間でのポイントに加えて、曝露ゼ
851 ロ時より長く、かつ最短曝露時間よりも短い時間でのポイント
852 を少なくとも1点はとることが望ましい。少なくとも2回の独
853 立した試験を実施して不活化において再現性があることを示す
854 必要がある。ヒトへの病原性が知られているウイルスが迷入す
855 る可能性がある場合には、その不活化に効果的な工程をクリア
856 ランス試験に組み込むよう計画し、可能な範囲で当該ウイルス
857 (若しくは同種又は密接に関連しているウイルス)を試験対象と

858 して更に詳しいデータ(より多数のポイント)をとることが、特
859 に重要である。ウイルス負荷量は、スパイクした出発物質中の
860 ウイルス量の実測値に基づいて定めるべきであるが、実際上こ
861 れが困難な場合には、スパイクに用いたウイルス溶液の力価か
862 らウイルス負荷量を算出することになる。試験対象の工程条件
863 下では不活化があまりにも速く、不活化曲線を作成することが
864 できない場合、不活化により事実上感染性が失われていること
865 を適切な試験系により示す必要がある。

866 (8) 工程前の試料中にウイルスに対する抗体が存在する場合
867 には、ウイルス除去及び不活化工程におけるウイルスの挙動に
868 影響を及ぼす可能性があるため、このことを考慮に入れた上で
869 クリアランス試験を実施する必要がある。

870 (9) 工程前の試料中に添加するウイルス量は、その製造工程
871 のウイルス除去及び不活化能力を評価するのに十分な量とする。
872 ただし、添加するウイルスが製品の特性を変えたり希釈による
873 製品中のたん白質の挙動を変えたりすることがないように、工
874 程前の試料の容量に対してできるだけ少量とするのが望ましい。

875 (10) 被験試料中のウイルスは、可能な限り超遠心分離、透析、
876 保存などの操作を行わずに定量することが望ましい。しかし、
877 阻害物質や毒性物質の除去のための操作、又はすべての試料を
878 同時に定量するために一定期間保存することなど、定量前に何
879 らかの処理をすることが避けられない場合もある。希釈、濃縮、
880 ろ過、透析、保存など、測定試料調製のための操作を伴う場合
881 は、それによるウイルス感染性における変化を評価するために、
882 同様な調製手順を経るコントロール試験を並行して行う必要が
883 ある。

884 (11) 緩衝液又は製品(に含まれる目的たん白質やその他の成
885 分)が指示細胞に望ましくない影響を及ぼす可能性がある。し
886 たがって、これらのウイルス力価測定法に対する毒性作用又は
887 干渉作用をそれぞれ個別に評価して、測定に支障のないよう
888 な対策を講ずるべきである。仮に、緩衝液がウイルス試験に用
889 いる指示細胞に対して毒性を有する場合は、希釈、pHの調整、
890 又はスパイクウイルスを含む緩衝液の透析等を試みるとよい。
891 製品(目的たん白質など)が抗ウイルス活性を持っている場合、
892 クリアランス試験を疑似工程(mock run)、すなわち目的たん
893 白質などそのものは含まない条件下でのクリアランス試験を実
894 施する必要がある。しかし、製造工程によっては、目的たん白
895 質などを除くことや抗ウイルス活性を持たない類似たん白質で
896 代替することがウイルスの挙動に影響することもあり得る。

897 (12) 同様な緩衝液又はカラムを複数の精製工程で繰り返し使
898 用するケースでは、データを解析する際に、この繰り返し使用
899 の影響を考慮すべきである。ウイルス除去の効果は、その方法
900 が製造工程のどの段階で使用されるかにより変化する可能性が
901 あることに留意する必要がある。

902 (13) 非常に強い殺ウイルス性を有している製造条件を用いて
903 いる場合又は緩衝液などが指示細胞に対し非常に強い毒性や殺
904 ウイルス性を有している場合には、総ウイルスクリアランス指
905 数は過小評価される可能性があるため、ケース・バイ・ケース
906 の考え方に立脚して考えるべきである。逆に総ウイルスクリア
907 ランス指数は、ウイルスクリアランス試験に固有の限界ないし
908 は不適切な試験計画のために過大評価される場合もあることに
909 留意する必要がある。

910 (14) ある特定のウイルス除去/不活化工程のクリアランス能
911 はウイルスの種類によって異なることを考慮する必要がある。

912 ウイルス除去／不活化工程のうち、特異的な作用原理・機構に
913 よりウイルスクリアランスを発揮する工程は、その作用機構に
914 当てはまるウイルス類に対しては極めて有効であるが、それ以
915 外のウイルスに対しては有効でない可能性がある。例えば、S
916 /D(有機溶媒／界面活性剤)処理は、一般に脂質膜を有するウ
917 イルスに対しては有効であるが、脂質膜を有しないウイルスに
918 対しては有効でない。また、ウイルスによっては通常の加熱工
919 程(55～60℃, 30分)にも抵抗性を示すものもある。このよう
920 なウイルスに対してクリアランスを期待する場合は、条件を更
921 に強くするか、作用原理・機構が異なる工程の導入を考慮する
922 必要がある。S/D(有機溶媒／界面活性剤)処理や加熱処理と
923 は原理が異なるウイルス除去膜処理工程は、膜の特性上、これ
924 を通過できないサイズを持つ広範囲のウイルスに対して有効で
925 ある。一方、目的たん白質を特異的に吸着させるアフィニティ
926 ークロマトグラフィー工程は、目的たん白質以外のウイルスな
927 どを徹底して洗い流すことも可能なので、ウイルス除去に一般
928 に有効である。イオン交換クロマトグラフィーやエタノール分
929 画処理工程などにおいては、製品中の目的たん白質と各種ウ
930 イルス類との分離・分画状況は様々な様相を呈するが、これらの
931 工程が他の処理工程で十分に不活化・除去できないウイルスの
932 クリアランスに有効であるケースも少なくない。

933 (15) ウイルスクリアランスは、例えば、不活化工程が2段階
934 以上ある場合、相互補完的分離工程が複数ある場合、又は不活
935 化及び分離工程が複数組み合わせられたような場合に効果的に達
936 成される。分離工程においては、個々のウイルスの物理的・化
937 学的特性がゲル・マトリクスとの相互作用や沈降特性に大きく
938 影響し、ウイルスごとに分離状況に違いが生じる可能性がある。
939 しかし、こうした変動要因にもかかわらず、相互補完的分離工
940 程の組合せや、又は不活化工程と分離工程との組合せにより、
941 効果的なクリアランスが達成される。また、クロマトグラフィー
942 工程、ろ過工程及び抽出工程などの分離工程で、目的ウイル
943 スとモデルウイルスの分離に影響する項目などをふまえて十分
944 に吟味してデザインしたものは、適切にコントロールされた条
945 件下で操作を行った場合、効果的なウイルス除去工程となり得
946 る。

947 (16) ウイルスクリアランス工程として有効であることを示す
948 ために、少なくとも2回以上の独立した試験により添加ウイル
949 ス量の低減に再現性があることを立証できるよう試験計画を立
950 てる必要がある。

951 (17) クロマトグラフィー用カラムなどのウイルスを除去する
952 能力が、繰り返し使用した後又は経時的に低下する可能性がある。
953 カラムなどの繰り返し使用ができるかどうかはカラムを数
954 回使用した後にウイルスクリアランスに関する性能を示す指標
955 を測定することにより評価できる。

956 (18) その他、生物薬品のウイルスクリアランス試験の設計に
957 関しては医薬審第329号通知を適宜参考にすること。

958 6.4. ウイルスクリアランス試験結果の解釈

959 6.4.1. ウイルスクリアランス指数の評価

960 ウイルスクリアランス指数は、製造工程においてクリアラン
961 ス試験の対象とした各製造段階を経る間のウイルス量(ウイル
962 ス感染性：力価)の減少度を対数で表したものである。製造工
963 程全体における総ウイルスクリアランス指数は、これら各製造
964 段階でのウイルスクリアランス指数のうち適切に評価できるも
965 のを加算することにより得られる。

966 得られた各ウイルスクリアランス指数及び総ウイルスクリア
967 ランス指数が受入れ可能かどうかについて、原材料及び製造過
968 程に混入(迷入)する可能性が現実的に考えられるすべてのウ
969 イルスを念頭において評価し、その妥当性を示すべきである。

970 齧歯類の細胞基材由来のバイオ医薬品のケースのように医薬
971 品製造基材などに何らかのウイルス粒子の存在が認められる場
972 合、当該ウイルスが排除又は不活化されたということのみでな
973 く、ウイルスクリアランスに関して、必要な程度を上回る能力
974 が精製工程に組み込まれていて、最終製品の安全性が適切なレ
975 ベルに確保されていることを示すことが重要である。製造工程
976 により除去され、又は不活化されたウイルスの量は、医薬品製
977 造基材などに存在が推定されるウイルス量と比較されるべきで
978 ある。比較をする上で、原材料・医薬品製造基材など中のウ
979 イルス量を測定することが重要である。この測定値は、感染性の
980 測定又はその他の方法、例えば電子顕微鏡(TEM)により、得ら
981 れるべきである。精製工程全体を通して評価した場合、1回の
982 臨床投与量に相当する原材料・医薬品製造基材など中に存在す
983 ると推定されるウイルス量よりはるかに上回るウイルス量を排
984 除することができなければならない。しかし、医薬品製造基材
985 などにウイルスの存在が推定されるというケースは、齧歯類の
986 細胞基材由来のバイオ医薬品を除いては極めてまれであろう。
987 当該医薬品が他の製法では得られず、臨床上も不可欠であり、
988 存在するウイルス粒子に関する感染性を含む情報が明らかであ
989 るなどの特別な場合を除いて、そのような原材料・医薬品製造
990 基材などは、原則として医薬品生産には使用できない。

991 通常は、生物薬品の製造基材には、何らかの試験・検査によ
992 りウイルスの存在は否定されている。そのような場合、可能性
993 が現実的に考えられる特定のウイルスをモデルとすることもあ
994 りうるが、一般的には、6.2.で述べたように、広範囲なウイル
995 スに関する工程のクリアランス能を示すことができる適切なモ
996 デルウイルス類の組合せを選択し、クリアランス試験をすること
997 になる。このような場合には、ウイルスクリアランスに関する
998 一般的な数値目標は特に設定できない。工程のウイルスクリ
999 アランス指数の妥当性は、医薬品製造基材などのウイルス汚染
1000 の現実的可能性をめぐる各種の情報やウイルス否定試験の検出
1001 感度、その他文献的事例などを勘案しながら考察することにな
1002 る。

1003 6.4.2. ウイルスクリアランス指数の計算法

1004 ウイルス除去及び不活化工程のウイルスクリアランス指数 R
1005 は、次式で示される。

$$1006 R = \log[(V_1 \times T_1) / (V_2 \times T_2)]$$

1007 ここで、 R =対数で表される減少度であり、 V_1 =工程処理前
1008 の試料の容量、 T_1 =工程処理前のウイルス量(力価)、 V_2 =工程
1009 処理後の試料の容量、 T_2 =工程処理後の試料のウイルス量(力
1010 価)である。

1011 ウイルスクリアランス指数を算出する場合には可能な限り、
1012 試料に添加したウイルス力価でなく、添加後の工程処理前の試
1013 料中に検出されるウイルス力価に基づき算出する。これが不可
1014 可能な場合、スパイクに用いられるウイルス溶液の力価からウ
1015 イルス負荷量を算出することになる。

1016 6.4.3. 結果の解釈及び評価上留意すべき事項

1017 ウイルス不活化／除去工程の有効性に関するデータを解釈、
1018 評価する際には、①試験に使用されたウイルスの適切さ、②ク

- 1019 リアランス試験のデザイン, ③対数で表されるウイルス減少度, 1073
 1020 ④不活化の時間依存性, ⑤工程のウイルス不活化/除去に影響 1074
 1021 する要素・項目, ⑥ウイルスアッセイ法の感度, ⑦ある不活化 1075
 1022 /除去工程が特定種類のウイルスに特に有効である可能性など, 1076
 1023 様々な要因を組み合わせて考察する必要がある。更に補足的事 1077
 1024 項を以下に示した。 1078
- 1025 これら様々な要因が結果に影響することをふまえて, 適正な 1079
 1026 解釈, 評価に導くようにする必要がある。 1080
- 1027 (1) 試験に使用したウイルスの挙動 1081
- 1028 ウイルスクリアランス試験の結果を解釈するにあたって, ク 1082
 1029 リアランスの機構は試験に使用したウイルスの種類によって異 1083
 1030 なる可能性があることを認識しておく必要がある。また, 使用 1084
 1031 されるウイルスは, 通常組織培養で製造されるが, 製造工程中 1085
 1032 において, 組織培養ウイルスの挙動は自然界に存在するウイル 1086
 1033 スの挙動とは異なっている可能性がある。例えば, 自然界に存 1087
 1034 在するウイルスと培養ウイルスとは純度や凝集の程度が異な 1088
 1035 っている場合がある。また, 分離工程の特性によっては, 糖鎖 1089
 1036 付加のようなウイルスの表面特性の変化が, 分離状況に影響す 1090
 1037 る可能性がある。これらの点を念頭に置き, 結果を解釈する必 1091
 1038 要がある場合も考えられる。 1092
- 1039 (2) 試験の設計 1093
- 1040 製造工程の変動要因, 規模縮小における変動要因などを考慮 1094
 1041 に入れてウイルススクリアランス試験は設定されているはずであ 1095
 1042 るが, 実生産スケールそのものではないのでやむを得ず差異が 1096
 1043 生じている可能性もある。データの解釈上, こうした差異を考 1097
 1044 慮したり, 試験に限界があることに留意する必要がある場合も 1098
 1045 考えられる。 1099
- 1046 (3) ウイルス減少度データの取捨選択 1100
- 1047 総ウイルススクリアランス指数は, 対数で表された各製造段階 1101
 1048 での減少度を加算することによって算出される。しかし, 複数 1102
 1049 の工程, 特にほとんど減少を伴わない工程(例えば $1 \log_{10}$ 以下 1103
 1050 の工程)の減少率を加算すると, 工程全体を通してのウイルス 1104
 1051 除去/不活化能力を過大評価してしまう可能性がある。したが 1105
 1052 って, $1 \log_{10}$ 以下のウイルス力価における除去/不活化は正当 1106
 1053 な理由がない限り通常計算に入れるべきではない。なお, 同一 1107
 1054 又は近似した方法を繰り返して達成されたウイルススクリアラ 1108
 1055 ンス指数は, 合理的な理由がない限り加算するべきではない。 1109
- 1056 (4) 不活化の時間依存性 1110
- 1057 ウイルス感染性の不活化は, 急速な初期相とそれに続く遅い 1111
 1058 相からなる2相性の曲線を示すことも多い。そのような不活化 1112
 1059 工程で不活化を免れたウイルスは次の不活化工程で抵抗力がよ 1113
 1060 り強くなる可能性がある。例えば, 不活化を免れたウイルス 1114
 1061 (抵抗力画分)が凝集形態をとった場合, 各種化学処理や熱処理 1115
 1062 に対しても抵抗力を示す可能性がある。 1116
- 1063 (5) 対数で表されるウイルス減少度の評価 1117
- 1064 ウイルス力価の減少度を対数で表してウイルススクリアランス 1118
 1065 指数とするため, 残存感染性ウイルス量が著しく低減すること 1119
 1066 は示せるが, 力価は決してゼロにはならないという限界がある。 1120
 1067 例えば, mL当たり $8 \log_{10}$ 感染単位を含む標品から $8 \log_{10}$ のフ 1121
 1068 ァクターで感染性の低減があっても, 試験の検出限界をも考慮 1122
 1069 すれば, mL当たりゼロ \log_{10} すなわち1感染単位を残している 1123
 1070 ことになる。 1124
- 1071 (6) 製造工程の変動因子 1125
- 1072 スパイクされた試料と緩衝液やカラムとの接触時間などの製 1126
- 造工程の変動因子のわずかな変動に対しウイルスの除去及び不 1127
 1128 活化効果が影響を受けやすい場合も考えられる。このような場 1129
 1130 合には, これらの因子の変動が当該製造工程のウイルス不活化 1131
 1132 効果に対していかに影響していたかを考慮する必要があるかも 1133
 1134 しない。 1135
- (7) 抗ウイルス抗体の存在 1136
- 1137 試料中に試験に用いるウイルスに対する抗体が存在すると, 1138
 1139 ウイルスの分配や不活化処理に対する感受性に影響を与える可 1140
 1141 能性がある。ウイルスの感染性を中和するのみでなく, 試験結 1142
 1143 果の解釈を複雑化する。したがって, 試料中のウイルスに対す 1144
 1145 る抗体の存在は一つの重要な変動要素であると考えられる。 1146
- (8) 不活化/除去工程の新規導入 1147
- 1148 ウイルスクリアランスが製品の安全性確保にとって重要な因 1149
 1150 子と考えられるにもかかわらず, 製造工程による感染性に関す 1151
 1152 るクリアランスの達成度が不十分である場合には, 目的に特に 1153
 1154 叶うと考えられる不活化/除去機構を特徴とする工程を新規に 1154
 1155 導入したり, 既存の工程と相互補完できるような不活化/除去 1155
 1156 工程を追加導入すべきである。 1156
- (9) ウイルスクリアランス試験の限界 1157
- 1158 ウイルスクリアランス試験は, 最終製品がウイルス安全面か 1159
 1160 ら見て受け入れられるレベルに達しているという確証を得るの 1160
 1161 に寄与はするが, それそのものが安全性を保証するわけではない。また, 1161
 1162 上述のようなウイルススクリアランス試験のデザイン 1162
 1163 や実施にかかわる様々な要因や結果の解釈如何が製造工程のウ 1163
 1164 イルス感染性除去能力について必ずしも適正ではない評価に導 1164
 1165 く可能性もあることに留意する必要がある。 1165
7. 統計 1166
- 1167 ウイルスクリアランス試験における結果の評価にあたっては 1167
 1168 データを統計学的手法を用いて解析する必要がある。また, 得 1168
 1169 られた結論が支持されるためには, 試験結果が統計学的に妥当 1169
 1170 性が検証されたものである必要がある。 1170
- 7.1. ウイルス力価測定における統計学とその留意点 1171
- 1172 ウイルスの力価測定は他の生物活性の測定と同様, ばらつき 1172
 1173 が大きい。ウイルススクリアランス試験を信頼性のあるものとする 1173
 1174 ため, ウイルス力価測定の正確さとその測定値から得られる 1174
 1175 クリアランス指数の正確さ並びに試験方法の妥当性を評価する 1175
 1176 必要がある。統計学的评价の目的は実施したウイルススクリア 1176
 1177 ランス試験がウイルス学的に適切な水準で実施されていることを 1177
 1178 裏付けることである。 1178
1. ウイルス力価測定法には半定量法(quantal method)と定 1179
 1179 量法(quantitative method)があるが, 半定量法, 定量法共に, 1179
 1180 統計学的评价の対象となる。 1180
2. 試験の変動は, 希釈誤差, 統計的な要因, 及び測定法に 1181
 1181 固有で不可避的なばらつきにより生じる。通常, 独立して実施 1181
 1182 した試験間のばらつき(試験間変動)は, 一試験内で得られた結 1182
 1183 果のばらつき(試験内変動)より大きい。 1183
3. 試験内変動の95%信頼限界を求めるとき, 通常, 平均値 1184
 1184 $\pm 0.5 \log$ のレベルに収まるようにするべきである。試験内変動 1184
 1185 は一般的な方法で計算する。試験間変動は試験にウイルス標 1185
 1186 準品を用いることでモニターできるが, この際のウイルス標準 1185
 1187 品の力価の実測値は, 別途当該試験法を用いて研究室で測定, 1186
 1188 確立しておいた試験結果の平均値のおよそ $0.5 \log$ 以内である 1186
 1189 べきである。より低い精度の試験を採用するにはそれなりの妥 1187
 1190 当な理由が必要である。 1188

1127 7.2. ウイルスクリアランス試験の再現性、信頼限界

1128 ウイルス不活化/除去工程として有効であることを示すため

1129 には、少なくとも2回以上の独立した試験により添加ウイルス

1130 量の低減に再現性があることを立証する必要がある。

1131 一方、クリアランス試験におけるクリアランス指数の95%

1132 信頼限界は、可能な範囲で算出することが望ましい。処理工程

1133 前の材料中のウイルス測定値の95%信頼限界が $\pm s$ で、工程処

1134 理後のウイルス測定値の95%信頼限界が $\pm a$ の場合、ウイルス

1135 クリアランス指数の95%信頼限界は

1136 $\pm \sqrt{(s^2+a^2)}$

1137 である。

1138 8. ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

1139 生産工程又は精製工程を変更する場合には、その変更がウイ

1140 ルスクリアランス能力に関して、直接又は間接に影響しないか

1141 を考え、必要に応じて変更した工程を含む全体のウイルスクリ

1142 アランス能力を再度検証する必要がある。精製工程を変更する

1143 とウイルスクリアランスの程度が変わる可能性がある。

1144 9. ウイルスクリアランス試験にかかわる測定法

1145 9.1. ウイルス感染価の測定法

1146 ウイルス感染価の測定法には、半定量法と定量法がある。半

1147 定量法は動物を用いた感染性試験や、CCID法(Cultured cell

1148 infectious dose: 培養細胞感染性価)で、動物や培養細胞の感

1149 染の有無をスコアする方法である。感染価は、感染した動物や

1150 培養細胞の割合で決められる。定量法においては、ウイルス量

1151 と測定される感染性は直線的な関係にある。定量法としてはプ

1152 ラーク法などがある。プラーク法では1プラークが1感染単位

1153 に相当する。測定法は、十分な感度と再現性を持つべきであり、

1154 コントロールを用いて統計学的に分析可能な結果が得られるよ

1155 うにする。半定量法、定量法共に、統計学的評価の対象となる。

1156 9.2. 核酸増幅法(NAT)による検査

1157 核酸増幅法(NAT)による検査は、各々のウイルスに対する血

1158 清学的検査が陰性であるときでも個別の検体やプールされた原

1159 材料・医薬品製造基材又は製品中のウイルスゲノムを高感度で

1160 検出できる方法である。培養系で測定できないHBVやHCV遺

1161 伝子などの検出にも応用できる。また、HBV、HCV及びHIV

1162 に関してはウインドウ期の大幅な短縮が可能になり、ウイルス

1163 安全性評価手段として寄与することが期待されている。しかし、

1164 用いるプライマーの選択によっては検出しようとする目的ウイ

1165 ルスのすべてのサブタイプを検出できないこともある。したが

1166 って、NATの採用にあたっては、可能な限りの様々なサブタ

1167 イプに対して検出可能かどうかをあらかじめ検討しておく必要

1168 がある。

1169 NATは、ウイルスクリアランス工程評価においてウイルス

1170 除去工程の有効な評価法となりうるが、ウイルス不活化工程で

1171 は、不活化されたウイルスが依然として核酸陽性の結果を示す

1172 ことがあるために、ウイルス不活化の程度が過小評価される可

1173 能性がある。また、NATを導入する場合には、検出感度の妥

1174 当性、ランコントロールとして用いる標準品の選定、プライマ

1175 ーなど用いる試薬の品質の保証・維持及び陽性又は陰性の結果

1176 の解釈において十分な注意を払わなければならない。

1177 10. 記録と保存

1178 ウイルス試験及びウイルスクリアランス試験にかかわる項目

1179 についてはすべて文書化し、保存しなければならない。

1180 11. その他

1181 ウイルス試験及びウイルスクリアランス試験について医薬審

1182 第329号が適切に適用できる場合にはこれを参考にすること。

1183 おわりに

1184 初めに述べたように、日局収載医薬品の品質・安全性などの

1185 確保は、科学の進歩、経験の蓄積を反映してその時代における

1186 最も先端的な方法、考え方でなされる必要がある。

1187 日局生物薬品のウイルス安全性を確保するための基本要件を

1188 本参考情報に示したが、ここで述べられたことは新医薬品開発

1189 を行おうとする際の安全性確保策とほぼ同レベルの方策である。

1190 これは、新薬、既承認医薬品いずれもウイルス安全面では同等

1191 の関心を払うべきとの考えに基づいている。また、その時代に

1192 における最も先端的な方法、考え方で日局収載医薬品の品質・安

1193 全性などの確保を図るべきとの考え方にも基づいている。更に、

1194 考えうるあらゆるケースを考慮しながら、すべての生物薬品に

1195 対して適用できるよう、網羅的に記述されている。したがって、

1196 長年にわたり医薬品として安全に用いられてきたある個別の生

1197 物薬品の側から見れば、改めて、本参考情報にすべて沿って、

1198 新薬に対すると同様のレベルのウイルス試験や工程のウイルス

1199 クリアランス試験を実施するのは必ずしも合理的ではない、と

1200 いうケースもあるかもしれない。個々の生物薬品については、

1201 その起源、由来、種類、製造方法、特性、臨床上の用法、過去

1202 の実績等を勘案しながら、ケース・バイ・ケースの原則で最も

1203 合理的に対処していく必要があると考えられる。

表2 各々の動物に感染することが知られている人畜共通感染ウイルス

	ウシ	ブタ	ヒツジ	ヤギ	ウマ
牛痘ウイルス(Cowpox virus)	◎				
偽牛痘ウイルス(Paravaccinia virus)	◎	◎	◎	◎	
マレーバレー脳炎ウイルス(Murray valley encephalitis virus)	◎	◎			
羊跳躍病ウイルス(Loupingill virus)	◎	◎	◎	◎	
ウエッセルズブロンウイルス(Wesselsbron virus)			◎		
口蹄疫ウイルス(Foot-and-mouth disease virus)	◎	◎			
日本脳炎ウイルス(Japanese encephalitis virus)		◎			
水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)		◎			
ウシ丘疹性口内炎ウイルス(Bovine papular stomatitis virus)	◎				
オルフウイルス(Orf virus)			◎		
ボルナ病ウイルス(Borna disease virus)			◎		◎
狂犬病ウイルス(Rabies virus)	◎	◎	◎	◎	◎
インフルエンザウイルス(Influenza virus)		◎			
E型肝炎ウイルス(Hepatitis E virus)		◎			
脳心筋炎ウイルス(Encephalomyocarditis virus)	◎	◎			
ロタウイルス(Rotavirus)	◎				
東部ウマ脳炎ウイルス(Eastern equine encephalitis virus)					◎
西部ウマ脳炎ウイルス(Western equine encephalitis virus)					◎
ベネズエラウマ脳炎ウイルス(Venezuelan equine encephalitis virus)					◎
ウマモービリウイルス(Morbillivirus)					◎
ヘンドラウイルス(Hendra virus)					◎
ニパウイルス(Nipah virus)		◎			
伝染性胃腸炎ウイルス(Transmissible gastroenteritis virus)		◎			
ブタ呼吸器コロナウイルス(Porcine respiratory coronavirus)		◎			
ブタ流行性下痢症ウイルス(Porcine epidemic diarrhea virus)		◎			
血球凝集性脳髄膜炎ウイルス(Hemagglutinating encephalomyelitis virus)		◎			
ブタ繁殖呼吸器病候群ウイルス(Porcine respiratory and reproductive syndrome virus)		◎			
ブタコレラウイルス(Hog cholera virus)		◎			
パラインフルエンザ3型ウイルス(Parainfluenza virus Type 3)		◎			
エンテロウイルス1型(Talfan/Teschen disease virus)		◎			
レオウイルス(Reovirus)		◎			
内在性レトロウイルス(Endogenous retrovirus)		◎			
ブタアデノウイルス1~4型(Porcine adenovirus)		◎			
ブタサーコウイルス(Porcine circovirus)		◎			
ブタパルボウイルス(Porcine parvovirus)		◎			
ブタポックスウイルス(Porcine poxvirus)		◎			
ブタサイトメガロウイルス(Porcine cytomegalovirus)		◎			
仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies virus)		◎			
ロシア春夏脳炎ウイルス(Russian spring-summer encephalitis virus)			◎	◎	
リフトバレー熱ウイルス(Rift Valley fever virus)			◎	◎	
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)	◎		◎	◎	
(ナイロウイルス(Nairovirus))	◎		◎	◎	
トロウイルス(Torovirus)	◎				

1204

表3 ウイルスクリアランス試験に用いられたことのあるウイルスの例

ウイルス	科	属	宿主	ゲノム	エンペロープ	サイズ (nm)	形状	耐性
水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus)	ラブドウイルス科 (Rhabdo)	ベジクロウイルス属 (Vesiculovirus)	ウマ ウシ	RNA	有	70×150	弾丸形	低
パラインフルエンザウイルス (Parainfluenza Virus)	パラミクソウイルス科 (Paramyxo)	1型・3型 Respirovirus属 2型・4型 Rubulavirus属	多種	RNA	有	100~200+	多様な形	低
マウス白血病ウイルス (MuLV)	レトロウイルス科 (Retro)	C型オンコウイルス属 (Type C oncovirus)	マウス	RNA	有	80~110	球形	低
シンドビスウイルス (Sindbis Virus)	トガウイルス科 (Toga)	アルファウイルス属 (Alphavirus)	ヒト	RNA	有	60~70	球形	低
ウシ下痢症ウイルス (BVDV)	フラビウイルス科 (Flavi)	ペスチウイルス属 (Pestivirus)	ウシ	RNA	有	50~70	多様な形	低
仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies Virus)	ヘルペスウイルス科 (Herpes)	アルファヘルペス亜科 Varicellovirus属	ブタ	DNA	有	120~200	球形	中
ポリオウイルスSabin 1型 (Poliovirus Sabin Type 1)	ピコルナウイルス科 (Picorna)	エンテロウイルス属 (Enterovirus)	ヒト	RNA	無	25~30	正20面体	中
脳心筋炎ウイルス (Encephalomyocarditis Virus)	ピコルナウイルス科 (Picorna)	カルジオウイルス属 (Cardiovirus)	マウス	RNA	無	25~30	正20面体	中
レオウイルス3型 (Reovirus 3)	レオウイルス科 (Reo)	オルトレオウイルス属 (Orthoreovirus)	多種	RNA	無	60~80	球形	中
シミアンウイルス40 (SV 40)	パポーバウイルス科 (Papova)	ポリオーマウイルス属 (Polyomavirus)	サル	DNA	無	40~50	正20面体	高
パルボウイルス(ウシ, ブタ) (Parvovirus : canine, porcine)	パルボウイルス科 (Parvo)	パルボウイルス属 (Parvovirus)	イヌ ブタ	DNA	無	18~24	正20面体	高

1205

1 日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件

1 日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件

はじめに

日本薬局方の通則等に、「医薬品又は当該医薬品の製造に用いる医薬品が動物に由来するものを原料として製造されるものであるときは、別に規定する場合を除き、当該動物は、原則として、健康なものでなければならない」旨の規定を追加することが平成14年3月29日付官報で告示された。

同日付、医薬発第0329001号通知では、「ここでいう健康なものとは、各医薬品の適切な使用方法において、ヒトへの感染性を有する疾病又は感染を有さない動物をいうものであり、現時点においては、例えば、経口・外用医薬品などについて、動物由来成分の原料となる動物が食用基準をみたしていることが確認できることをいうこと、なお、この健康なもの基準は人獣共通感染症等に関する新たな知見等を踏まえ、適宜見直されるべきものであること」と記載されている。

本参考情報では、医薬発第0329001号通知の趣旨をふまえ、動物に由来するものを原料として製造される医薬品における感染性面での安全性確保について述べる。

1. 基本的考え方

ヒトを含む動物に由来するものを原料として製造される医薬品を使用する上で、当該医薬品にウイルスなど感染性物質が混入し、それがヒトに感染して感染症を発症若しくは何らかの身体的異常を生じさせる可能性があることに関する配慮が必要になる。この際、医薬品原料の起源としてのヒトを含む動物や医薬品原料にウイルスなど感染性物質が存在しているかどうかはまず重要な留意点であることはいうまでもない。更に重要な点は、それを基に製造した医薬品にウイルスなど感染性物質が存在し、ヒトに投与した場合に、ヒトに感染する可能性があるかどうかということである。医薬品原料の起源としてのヒトを含む動物が、「各医薬品の使用方法において、ヒトへの感染性を有する疾病又は感染を有さないもの」として求められている要件は、「医薬品原料の起源としてのヒトを含む動物の適格性に関する評価、適切な医薬品製造過程の設定と管理及び最終製品の用法・用量の遵守という全体方策をとおして、ヒトに感染症を引き起こすことはないもの」である。

2. 医薬品原料起源としてのヒトを含む動物について

ヒトを含む動物由来の医薬品によるヒトへの感染を防止するには、使用する原料にウイルスなど感染性物質が存在していないことを保証すること、すなわち、「ヒトに病原性がある感染性物質に汚染されていないことが証明されたという意味での健康な動物由来の原料を使用するか、動物由来の原材料に適切な処理を施した後、ヒトに病原性がある感染性物質に汚染されていないことを立証したものを医薬品製造原料として使用すること」が最も明快で適切な対応である。

ヒト由来製品の原材料としては、細胞・組織、血液、胎盤、尿などが用いられている。これらの原材料の起源となるドナーについて、個人ごとに問診や検査を行うべき場合や行うことができる場合には、ウイルスなど安全性面での適格性をこの段階で試験すべきである。

例えば、平成12年12月に厚生省医薬安全局より公表された「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考

え方(医薬発第1314号 平成12年12月26日、別添1)」に基づき、ドナー(ヒト)より提供される細胞・組織が感染性物質に関する十分な不活化・除去工程を経ることなく患者に投与されることから、ドナーについて、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目などを考慮して、選択基準、適格性基準を定め、その妥当性を明らかにすることを求めている。特にB型肝炎(HBV)、C型肝炎(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染症、成人T細胞白血病、パルボウイルスB19感染症については、問診及び検査(血清学的試験や核酸増幅法など)により否定することが求められている。また、サイトメガロウイルス感染及びEBウイルス感染については必要に応じて検査により否定することとされている。そのほか、「梅毒トレポネーマ、クラミジア、淋菌、結核菌などの細菌による感染症」、「敗血症及びその疑い」、「悪性腫瘍」、「重篤な代謝、内分泌疾患」、「膠原病、血液疾患」、「肝疾患」、「認知症(伝達性海綿状脳症及びその疑いのあるもの)」については既往歴、問診などの診断を行うと共に、輸血、移植医療を受けた経験の有無などからドナーとしての適格性を判断することも求められている。検査項目及び検査方法については、その時点で最も適切とされる方法を採用することとするが、感染症などに関する新たな知見及び学問・技術の進歩に鑑み、随時見直しを行う必要があるとされている。また、ドナースクリーニングにあたっては、検査項目、検査方法などにより、ウィンドウ期(感染初期に細菌、真菌、ウイルス等又は細菌、真菌、ウイルスなどに対する抗体が検出できない期間)を勘案し、可能な限り適切な時期に再検査を実施することとされている。

国内献血由来血漿分画製剤にあつては、献血者について問診、自己申告によりチェックし、献血血液段階で血清学的検査、HBV、HCV、HIVを対象としたミニプール核酸増幅試験(NAT)を実施している。また、分画用原料血漿は最低4箇月間貯留保管し、採血後情報/輸血後情報を反映する措置を講ずることによりヒトに何らかの感染症を引き起こす可能性のある原料の使用を排除しようとしている。

一方、尿由来製品などのように多数の不特定者から採取され、一定の処理が施された後原料とされるような場合、各個人ごとにウイルスなどの検査をすることは、現実的ではなくまた合理的でもない。この場合プールした原料についてウイルス試験など、適切な試験を行い確認するべきである。

ヒト以外の動物の場合、野生の動物は避け、適切な微生物汚染防止対策や汚染監視システムを含む衛生管理の行き届いた環境条件下で飼育された動物個体を使用するべきである。可能な限り適切に規定された特定病原体感染防止条件(specific pathogen-free: SPF)に適合したコロニー由来の動物を使用することが望ましい。また、食肉基準がある動物についてはこれを満たした動物個体を使用すべきである。必要に応じて適切な試験により病原体などの感染がないことを確認する必要がある。

伝達性海綿状脳症(Transmissible Spongiform Encephalopathies: TSEs)の病原体とされているプリオンによる伝播や汚染を極力回避するための具体的手段は、①ヒツジやヤギにおけるスクレイピー、ウシにおけるBSE、シカのChronic Wasting Disease(CWD)、ヒトにおける新型CJDなどのTSEs発生地域(国)やリスクの高い地域(国)の動物、長期(6箇月以上)滞在由来の医薬品原料や関連物質の使用を避けるこ

2 日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件

107 と、②スクレイピー、BSE、CJDなどを発症している個体由
108 来の物質の使用を避けること、③リスクの高い器官、臓器、細
109 胞などに由来する物質の使用を避けること、④TSEsの発症状
110 況、プリオンに関する疫学的調査結果、研究成果若しくは原料
111 採取後のドナーの遅発性感染症の発症状況などに関する情報を
112 収集して的確に対応することなどである。

113 3. 医薬品原料となるヒトや動物由来の細胞について

114 ヒトや動物由来の細胞基材を使用して、医薬品を製造するこ
115 とが行われているが、この場合、細胞基材の起源たるヒトや動
116 物が健康なものであることが望ましいことはいうまでもない。
117 しかし、一般には、細胞基材由来医薬品のウイルス安全性など
118 の評価は、事実上の医薬品製造原料である細胞レベルで行われ
119 ることが合理的であるとされている。この場合、可能な限り、
120 細胞バンクを作製して、徹底的なウイルスなどに関する試験と
121 解析を実施することにより安全性を確認する必要がある。この
122 際の試験項目や試験方法については、ICH国際合意文書を受け
123 た国内版通知「ヒト又は動物細胞を用いて製造されるバイオテ
124 クノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」(平成12年2月
125 22日付医薬審第329号厚生省医薬安全局審査管理課長通知)に
126 詳細に記載されており、これに従うべきである。ところで細胞
127 レベルでの試験の結果、ウイルスが仮に検出された場合、その
128 細胞をどのように取り扱うかが問題である。この問題の取扱い
129 については、同通知に次のように記載されている。「医薬品の
130 製造に用いる細胞株には、内在性のレトロウイルス、その他の
131 ウイルス又はウイルス由来の塩基配列を含むことが知られてい
132 るものがある。そのような場合に製造業者が行うべき対応策が
133 同通知の第V章(ウイルスクリアランス試験と精製バルクにお
134 けるウイルス試験の意義、考え方及び実施要領)に記載されて
135 いる。内在性のレトロウイルス以外のウイルスが存在する細胞
136 株の使用の可否は、ケース・バイ・ケースで規制当局が考慮す
137 ることになるが、その際、製品のベネフィットや予定される臨
138 床上の用途、混入するウイルスの種類・性質、ヒトへの感染性
139 又は病原性、製品の精製工程(ウイルスクリアランスに関する
140 評価データ等)、及び精製バルクにおいてどの程度のウイルス
141 試験を実施したかなどに基づくリスク/ベネフィットのバラン
142 スを勘案し、判断することになる」。例えば、最もよく用いら
143 れるげっ歯類細胞には、内在性のレトロウイルス様のA粒子、
144 R粒子、C粒子などの存在が知られている。しかしそれはヒト
145 に感染することではなく、危険性がないことが知られており、
146 CHO細胞などは医薬品生産に汎用されている。また、担ガン
147 患者からの株化細胞(例：NAMALWA細胞、BALL-1細胞な
148 ど)を用いて製造を行う場合もあるが、この場合も徹底的なウ
149 イルスなどの試験を行うことによりその安全性が確認されてい
150 る。ウイルス安全性面からみた場合、徹底的なウイルス検査が
151 困難な初代培養細胞よりこのような株化細胞のほうが安全性が
152 高いといえる。

153 4. 適切な医薬品製造工程の設定と管理及び最終製品の用法・ 154 用量の遵守が安全性確保に果たす役割

155 医薬品原料となる動物レベルのみにおいて感染性などに関し
156 て安全性を保証するにはおのずと限界がある。また、「動物の
157 健康」とは一義的に定められるものではなく、様々な要件によ
158 って異なる。本課題の最終目標は、医薬品がヒトに感染症など
159 を引き起こすことがないようにすることである。この目的を達
160 成するために適切な医薬品製造工程の設定と管理及び最終製品

161 の用法・用量の遵守が果たす役割は大きい。

162 前述のように、医薬品生産に汎用されているげっ歯類細胞に
163 は内在性のレトロウイルスの存在が知られているが、二重三重
164 に安全性が確保されているのは精製段階などで適切な不活化・
165 除去処理工程が取り入れられていることによる。極端な例とし
166 ては、製造の手段として、意図的にウイルスや微生物などを使
167 用する場合もある。これについても、製造工程や精製工程に当
168 該ウイルスなどに適応した除去や不活化手段が適切に取り入れ
169 られており、医薬品として使用することにおいて、ヒトへの感
170 染の危険性は十分に否定され、安全性が担保されるという対応
171 策がとられている。更に、当該動物において、仮にヒトに対す
172 る感染性物質の有無に関して明らかにすることが困難である場
173 合や、原料にウイルスなどが存在している場合があったとして
174 も、製造段階や精製段階などで適切な不活化・除去処理工程が
175 取り入れられ、その有効性が検証され、またGMPなどによる
176 適切な工程管理がなされることにより、十分に安全性が確保さ
177 れるならば、当該原料の使用が可能な場合もある。

178 5. まとめ

179 医薬品原料の起源としてのヒトを含む動物が、「各医薬品の
180 使用方法において、ヒトへの感染性を有する疾病又は感染を有
181 さないもの」として求められている要件は、「医薬品原料の起
182 源としてのヒトを含む動物の適格性に関する評価、適切な医薬
183 品製造過程の設定と管理及び最終製品の用法・用量の遵守とい
184 う全体方策をとおして、ヒトに感染症を引き起こすことはない
185 もの」である。

186 なお、本課題への対応は、その時点での科学的水準をふまえ
187 て行うこととするが、ヒトにおける感染症、動物由来感染症な
188 どに関する新たな知見及び学問・技術の進歩を随時反映した合
189 理的根拠に基づくものとする必要がある。

1 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

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ほか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。ただし、2.の培地の性能試験に適合するものであればほかの培地でもよい。

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* ATCC 15531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* ATCC 23714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、100CFU(コロニー形成単位)以下又は100CCU(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)0.2mL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(微好気的条件)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)10mL以上を、100mL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0.2mL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気的条件下で、36±1℃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100CFU以下又は100CCU以下の*M. hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同等の種又は株)及び*M. orale*(ATCC 23714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。細胞は適切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。

カバーガ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、一日増殖させる。この培養ディッシュ2枚以上に試験検体(細胞培養上清)1mL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置く。陽性対照には、例えば*M. hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同等の種又は株)及び*M. orale*(ATCC 23714又は同等の種又は株)100CFU以下又は100CCU以下を使用する。

細胞は5%炭酸ガスを含む空气中、36±1℃で3~6日間培養する。

カバーガ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35mm)に滅菌したカバーガ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

107 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
108 胞が1mL当たり 1×10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製す
109 る。

110 3) Vero細胞懸濁液2mLを各培養ディッシュに接種する。
111 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
112 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%
113 炭酸ガスを含む空气中、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で一日培養する。

114 4) 培地を新鮮な培地2mLと交換した後、試験検体(細胞培
115 養上清)0.5mLを培養ディッシュ2枚以上に添加する。陰性対照
116 と陽性対照[*M. hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同
117 等の種又は株)及び*M. orale*(ATCC 23714又は同等の種又は株)
118 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。

119 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
120 培養する。

121 6) 各ディッシュより培養液を除去し、メタノール/酢酸
122 (100)混液(3:1)(固定液)2mLをそれぞれに加え、5分間放置す
123 る。

124 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
125 同量の固定液を加え10分間放置する。

126 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。

127 9) 各ディッシュにビスベンズアミド(bisbenzamide)蛍光染
128 色液2mLを加え、ディッシュにふたをして室温で30分間静置
129 する。

130 10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシュを
131 蒸留水2mLで3回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。

132 11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封
133 入液をカバーグラスの端より吸い取る。

134 12) 400~600倍又はそれ以上の倍率の蛍光顕微鏡で観察す
135 る。

136 13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。

137 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
138 1000個のうち5個(0.5%)以上あれば陽性と判定する。

139 C. ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による検出法

140 PCR法は、非常にわずかな量のマイコプラズマDNAを特異
141 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
142 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
143 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
144 依存し、またPCRで陽性反応を得てもそれは必ずしも生きた
145 マイコプラズマの存在を意味するものではない。

146 PCR法では、培養細胞から得たDNAを特異的なプライマー
147 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。

148 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
149 PCR法)を用いることが望ましい。試験は陽性対照[例えば
150 100CFU以下又は100CCU以下の*M. hyorhinis*(ATCC 29052,
151 ATCC 17981又は同等の種又は株)と陰性対照を置き実施する。

152 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
153 するには、マイコプラズマに共通なDNA配列に対応するプ
154 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
155 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。

156 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
157 チジウムブロマイド染色後、紫外線照射により検出する。

158 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
159 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
160 ライマーを用いることである。例えばマイコプラズマの16S-

161 23S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
162 マーがある。

163 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
164 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
165 望ましい。

166 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
167 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
168 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。
169

170 なお、Vero細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマ
171 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
172 プラズマ由来のDNAの検出精度を高める方法もある。

173 以下に2段PCR法の例を示す。試薬や反応条件については、
174 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
175 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
176 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。
177 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。

178 操作法の例

179 1. テンプレートの調製

180 1) 被験細胞懸濁液(必要ならばVero細胞により継代す
181 る)600 μL をチューブにとり、細胞を0.1%SDS等で溶かし、同
182 量のTE緩衝液(10mmol/Lトリス-塩酸(pH8.0), 1mmol/L
183 EDTA)を飽和したフェノールを加え、混合する。

184 2) 室温で15000rpm, 5分間遠心する。

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

187 4) エタノール(95)1mL(2.5倍量)を加え、十分に攪拌する。
188 15分間氷冷した後、 4°C で15000rpm, 10分間遠心する。

189 5) 上清を除去し、沈殿を80%エタノール200~300 μL で1
190 ~2回洗浄し、洗液はピペットで除去する。 4°C で15000rpm,
191 10分間遠心後、上清を完全に除去し、沈殿を乾燥する。

192 6) 沈殿を精製水40 μL に溶解する。

193 2. 陽性対照, 陰性対照についても同様の処理を行う。

194 3. 1段目PCR

195 1) 耐熱性DNAポリメラーゼ, dNTP溶液, アウタープライ
196 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
197 に90 μL ずつ分注する。

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

200 3) 94°C で30秒間の変性, プライマーに適した温度(例示の
201 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
202 間の伸長を, 30回繰り返しDNA増幅を行う。

203 4. 2段目PCR

204 1) 耐熱性DNAポリメラーゼ, dNTP溶液, インナープライ
205 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
206 に99 μL ずつ分注する。

207 2) 1段目のPCRを終了したチューブから, それぞれの生成
208 物(1 μL)をとり, 2段目のPCR反応液(99 μL)を入れたチューブ1
209 本ずつに加える。

210 3) 94°C で30秒間の変性, プライマーに適した温度(例示の
211 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
212 間の伸長を, 30回繰り返しDNA増幅を行う。

213 5. アガロースゲル電気泳動

214 1) 1段目及び2段目のPCR生成物(10 μL)を, 泳動の先端を

3 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

215 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
216 ゲル電気泳動を行う。

217 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,
218 紫外線照射条件下で写真撮影する。

219 3) DNAバンドが検出された場合, 陽性と判定する。

220 [プライマーの例示]

221 ・マイコプラズマ検出用

222 アウタープライマー

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

224 R1 : 5'-CTTC(A/T)TCGACTT(C/T)CAGACCCAAGG-
225 CAT-3'

226 インナープライマー

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

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

229 ()は混合

230 [PCR反応液]

	[1段目]	[2段目]
dNTP溶液(各1.25mol)	16 μ L	16 μ L
プライマー(10pmol/ μ L)	F1 2 μ L	F2 2 μ L
プライマー(10pmol/ μ L)	R1 2 μ L	R2 2 μ L
耐熱性DNAポリメラーゼ (1U/ μ L)	2 μ L	2 μ L

231 反応緩衝液

25mmol/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

232 *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(pH8.4)	100mmol/L
塩化カリウム	500mmol/L
塩化マグネシウム	20mmol/L
ゼラチン	0.1g/L

233 [Vero細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法]

234 1) 試験検体, 陽性対照及び陰性対照について, それぞれ2
235 枚以上のディッシュを使用する。

236 2) 細胞培養用ディッシュ(直径35mm)に, 10%ウシ胎児血
237 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
238 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
239 製したVero細胞懸濁液(1×10^4 細胞/mL)を2mLずつ加え, 5%
240 炭酸ガスを含む空气中, $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で1日培養する。

241 3) 古い培地を新鮮な培地と交換し, 試験検体(細胞培養上
242 清)0.5mLをVero細胞の培養ディッシュ2枚以上に接種する。
243 陽性対照[例えば100CFU以下又は100CCU以下の *M.*
244 *hyorhinis*(ATCC 29052, ATCC 17981又は同等の種又は株)]
245 と陰性対照についても同じ操作を行う。

246 4) 試験検体, 陽性対照並びに陰性対照を接種したVero細
247 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,
248 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で3~6日間培養する。

1 ペプチド及びたん白質の質量分析

2 質量分析(以下「MS」という)は、分子をイオン化させ、質
 3 量(m)を電荷数(z)で割った m/z に応じてイオンを分離し、検
 4 出する方法である。測定結果は、イオンの m/z をx軸に、そ
 5 れに対する信号の相対強度をy軸に示したマスペクトルとし
 6 て示される。イオンの m/z と z より、分子の質量を求めること
 7 ができる。タンデム質量分析(以下「MS/MS」という)は、一
 8 段階目の分析部で選択した前駆イオンを解離させ、生じたプロ
 9 ダクトイオンを二段階目の分析部で分離し、検出する手法であ
 10 る。観測したプロダクトイオンの m/z により、構造の確認や
 11 推定を行うことができる。質量分析で得られる情報は定性的で
 12 あるが、定量にも利用される。MS並びにMS/MSは、ペプチ
 13 ド及びたん白質分子の質量の測定並びにアミノ酸配列の確認及
 14 び翻訳後修飾の確認などに利用できることから、ペプチド及び
 15 たん白質性医薬品の確認試験などに用いられる。

1. 装置

17 質量分析計は、イオン源、分析部、検出部及びデータ処理部
 18 からなる(図1)。イオン源は、導入された試料をイオン化する
 19 部位であり、ペプチド及びたん白質のイオン化には主に、マト
 20 リックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI: Matrix-
 21 assisted laser desorption/ionization)及びエレクトロスプレー
 22 イオン化法(ESI: Electrospray ionization)が用いられる。
 23 分析部は、生成したイオンを m/z に応じて分離する部位であ
 24 り、主に四重極型、飛行時間型、イオントラップ型及びフーリ
 25 エ変換イオンサイクロトロン共鳴型などが用いられる。検出部
 26 は、分離されたイオンを信号として検出する部位であり、検出
 27 された信号は、データ処理部で処理され、マスペクトルとし
 28 て出力される。MS/MS又は多段階MSは、複数の分析部を連
 29 結した分析計並びにイオントラップ型及びフーリエ変換イオン
 30 サイクロトロン共鳴型の分析計を用いて行われる。イオンの解
 31 離には、通例、衝突誘起解離(CID: Collision-induced
 32 dissociation)、ポストソース分解(PSD: Post-source decay)及
 33 び電子捕獲解離(ECD: Electron capture dissociation)などが利
 34 用される。

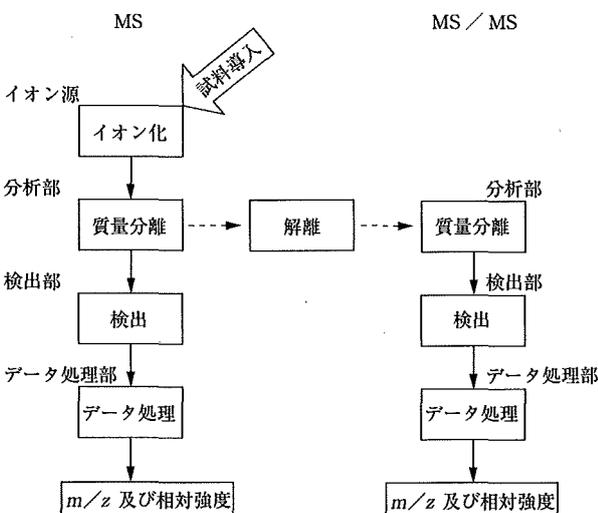


図1 MS及びMS/MSの概念図

2. 各種測定様式

2.1. MS

MSの測定法には次の方法がある。

(1) フルスキャンモード

選択した m/z 範囲のイオンを検出する方法であり、試料の
 質量及び同位体に関する情報を得ることができる。

(2) 選択イオンモニタリング

特定の m/z のイオンのみを検出する方法であり、試料の高
 感度な検出に利用される。

2.2. MS/MS

MS/MSの測定法には次の方法がある。

(1) プロダクトイオンスキャンモード

選択した m/z の前駆イオンより生じたプロダクトイオンを
 検出する方法であり、試料や不純物の定性的な情報を得ること
 ができる。

(2) 前駆イオンスキャンモード

解離により特定の m/z のプロダクトイオンを生ずる前駆イ
 オンを走査する測定法であり、特定の部分構造を持つ試料の特
 異的検出に利用される。

(3) コンスタントニュートラルロススキャンモード

解離により特定の質量の減少(中性種の脱離)が起こる前駆イ
 オンを走査する測定法であり、特定の部分構造を持つ試料の特
 異的検出に利用される。

(4) 選択反応モニタリング

特定の m/z の前駆イオンを解離させて生じる特定の m/z の
 プロダクトイオンを検出する方法であり、複雑なマトリックス
 中の低レベルの試料の定量的検出に利用される。

3. 操作法

3.1. MS

あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液
 を用いて質量測定を行い、検出感度及び理論質量と測定質量の
 差などが医薬品各条に定める基準値に適合していることを確認
 する。基準値を満たしていない場合は、イオン源、分析部又は
 検出部の電圧などの調整や、適切な質量校正標準物質を用いた
 質量校正を行う。基準値を満たしていることを確認した後、医
 薬品各条に規定した方法で試料を調製し、試験条件に従い質量
 測定を行う。通例、イオン化法に応じて以下の方法で操作する。

(1) マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)

脱塩した試料ペプチド及びたん白質を適切な溶媒に溶解して
 試料溶液とする。通例、溶媒にはトリフルオロ酢酸を含む水溶
 液などを用いる。別に試料ペプチド及びたん白質の構造特性に
 応じて適切なマトリックスを選び、トリフルオロ酢酸を含む水
 とアセトニトリルなどの混合液に溶かしてマトリックス溶液と
 する。通例、ペプチド及びたん白質の測定には、 α -シアノ
 -4-ヒドロキシ桂皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸又はシナ
 ビン酸などを用いる。試料溶液とマトリックス溶液を混合し、
 サンプルプレートに滴下し、乾燥させる。サンプルプレートを
 イオン源に設置し、適切な強度のレーザーを照射して試料をイ
 オン化し、マスペクトルを得る。

(2) エレクトロスプレーイオン化法(ESI)

脱塩した試料ペプチド及びたん白質を適切な溶媒に溶解して
 試料溶液とする。通例、溶媒には酢酸などを含む水及びメタノ
 ール又はアセトニトリルの混合液を用いる。シリンジ又は液体
 クロマトグラフィーなどにより、試料溶液をキャピラリーに導

91 入する。キャピラリーに電圧をかけて試料をイオン化し、マス
92 スペクトルを得る。

93 **3.2. MS/MS**

94 あらかじめ医薬品各条のシステム適合性で規定した試験溶液
95 を用いてMS/MSを行い、規定されたプロダクトイオンが検
96 出されることを確認する。MSと同様に試料ペプチドを適切な
97 溶媒に溶解して試料溶液とし、イオン源に導入してイオン化す
98 る。医薬品各条で規定された前駆イオンを選択し、試験条件に
99 従い適切な解離条件を設定して解離させ、マスペクトルを得
100 る。分子内にジスルフィド結合を含むペプチドのMS/MSを
101 行う場合は、通例、試料を還元アルキル化する。還元試薬とし
102 て、通例、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール及
103 びトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィンなどが用いられ
104 る。また、アルキル化試薬として、通例、ヨード酢酸、ヨード
105 アセトアミド及び4-ビニルピリジンなどが用いられる。

106 **4. 確認試験への応用例**

107 **4.1. 分子の質量の確認**

108 MSにより試料ペプチド及びたん白質分子の質量を測定する。
109 モノアイソトピックピークが確認できる場合には、そのピーク
110 よりモノアイソトピック質量を求める。モノアイソトピックピー
111 クが確認できない場合は、ピークの頂点より平均質量を求め
112 る。試料たん白質が多数の多価イオンとして観測される場合に
113 は、デコンボリューション処理により平均質量を求める。測定
114 値が医薬品各条で規定した値の範囲内であることを確認する。

115 **4.2. アミノ酸配列などの確認**

116 試料ペプチド分子の質量を確認した後、MS/MSにより医
117 薬品各条で規定した前駆イオンを選択して解離させ、医薬品各
118 条で規定したプロダクトイオンが検出されることを確認する。
119 分子量が大きく有用なプロダクトイオンが観測できない場合、
120 試料ペプチド及びたん白質を酵素などにより断片化し、生じた
121 ペプチド断片のMS/MSによりアミノ酸配列などを確認でき
122 ることがある。ペプチド及びたん白質の断片化方法は、「ペプ
123 チドマップ法」におけるペプチド結合の選択的切断を参照する。

124 **5. 用語解説**

125 **イオントラップ型(IT : Ion trap)** : 狭義には四重極イオントラ
126 ップを指し、四重極型と同様の原理を利用して、高周波電圧に
127 よりイオンを閉じこめ、イオンを m/z 別にセルから追い出す
128 ことによりイオンを分離する方法。特定の m/z のイオンをト
129 ラップし、解離及びイオン放出を繰り返すことにより、多段階
130 MS(MS^n)を行うことができる。

131 **エレクトロスプレーイオン化法(ESI : Electrospray
132 ionization)** : 大気圧下、試料溶液を高電圧をかけたキャピラ
133 リーより噴霧し、帯電液滴を形成させ、試料イオンを生成する
134 方法。ペプチド及びたん白質などの高分子化合物では多価イ
135 オンが生成する。液体クロマトグラフィーと接続して用いること
136 ができる。

137 **四重極型(Q : Quadrupole)** : 直流と高周波を重ね合わせた電
138 圧を、双曲線又はそれに相当する断面を持つ平行な4本の電極
139 柱に印加し、電圧を変化させることによって通過できるイオン
140 の m/z を変化させて、イオンを分離する方法。

141 **衝突誘起解離(CID : Collision-induced dissociation)** : 加速さ
142 れたイオンと中性の衝突ガス(He, Ar, N_2 など)との衝突によ
143 って衝突エネルギーの一部がイオンの内部エネルギーに変換さ
144 れ、イオンが励起し、解離すること。衝突ガスと衝突させる際
145 のイオンの加速電圧により低エネルギーCID(約1000V以下の
146 電圧で加速されたイオンの衝突)と高エネルギーCID(1000V以
147 上の電圧で加速されたイオンの衝突)に分けられる。

148 **電子捕獲解離(ECD : Electron capture dissociation)** : 多価の
149 プロトン付加分子が、低エネルギーの電子と反応し、ラジカル
150 イオンとなった後、解離すること。フーリエ変換イオンサイク
151 ロトロン共鳴質量分析計やイオントラップ型質量分析計でイ
152 オンの解離に利用される。

153 **飛行時間型(TOF : Time-of-flight)** : イオン化した試料を高電
154 圧で加速した後、一定距離を飛行するのに要した時間の違いに
155 よりイオンを分離する方法。イオン源から検出器までイオンを
156 直線的に飛行させるリニア型と、静電界ミラー(リフレクトロ
157 ン)を用いて反転させるリフレクトロン型がある。リフレクト
158 ロンを利用した場合、イオンの初期運動エネルギーのばらつき
159 を補正することにより質量分解能が向上する。

160 **フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型(FT-ICR : Fourier
161 transform ion cyclotron resonance)** : 一樣な磁場中で、磁場
162 に垂直な平面内で回転運動(サイクロトロン運動)するイオンの
163 周期が m/z に反比例することを利用して、 m/z 値の異なるイ
164 オンを検出する方法。高周波電圧を印加してイオンを共鳴励起
165 させた後、検出電極で検出した誘導電流信号をフーリエ変換に
166 より解析し、マスペクトルを得る。

167 **ポストソース分解(PSD : Post-source decay)** : MALDIにおい
168 て、イオン源で生じたイオンが加速場領域を出てから検出器に
169 到達するまでに、イオン自身の過剰内部エネルギー又は残留ガ
170 スとの衝突によって解離すること。リフレクトロン飛行時間型
171 質量分析計を用いたMS/MSに利用される。

172 **マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI : Matrix-
173 assisted laser desorption/ionization)** : 試料とマトリックス
174 を混合し、ナノ秒オーダーの短時間のレーザー光を照射するこ
175 とにより試料イオンを生成する方法。たん白質や糖質、オリゴ
176 スクレオチド、脂質などの生体高分子をほとんど分解せずにイ
177 オン化することができる。主に一価イオンが生成する。

1 ペプチドマップ法

1 ペプチドマップ法

2 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。

3 ペプチドマップ法はたん白質医薬品、特にバイオテクノロジー
4 一応用医薬品の確認試験の一方法である。本法はたん白質を化
5 学的又は酵素的に処理してペプチド断片とし、その断片を再現
6 性よく分離確認するもので、相補的DNA配列の読み違い若し
7 くは点変異などによって生じる1個のアミノ酸の変化をも確認
8 できる試験法である。標準品/標準物質について同様に処理し
9 たものと比較することで、たん白質の一次構造の確認、構造上
10 の変化の有無の検出、製造工程の恒常性及び遺伝子安定性の評
11 価を行うことが可能である。たん白質はそれぞれ固有の特性を
12 有しており、化学的、分析学的アプローチによって十分に特異
13 性のあるペプチドマップが可能になるように、当該たん白質の
14 特性についてよく理解しておかなければならない。

15 ここでは、目的たん白質の特性解析、組換えたん白質生産の
16 ための遺伝子発現構成体の安定性及び製造工程全体の恒常性の
17 評価、たん白質の同一性や安定性の評価、若しくはたん白質の
18 変異の検出を目的として、本法を適用する際の手引きを記す。

19 1. ペプチドマップ

20 ペプチドマップ法にはどのようなたん白質にも適用可能な一
21 般的な操作法はない。しかし、個々のたん白質に応じた特異的
22 なマップの設定は可能である。ペプチドマップに関する解析技
23 術は現在でも急速に進歩しつつあるが、広く認められている常
24 法がいくつか存在する。各条においては、目的に応じてこれら
25 の方法の変法が規定されることもある。

26 ペプチドマップはたん白質の指紋(フィンガープリント)とみ
27 なすことができ、酵素的又は化学的処理を受けた結果生成した
28 最終分解産物であり、当該たん白質に関する包括的な情報を与
29 える。本法は以下の主な4段階の操作からなる：たん白質が製
30 剤成分の一部である場合には分離精製；ペプチド結合の選択的
31 切断；得られたペプチドのクロマトグラフィーによる分離；各
32 ペプチドの分析と確認。試料は標準品/標準物質と同様に消化、
33 分析する。化学的な切断剤に比べてエンドプロテアーゼ(例え
34 ばトリプシン)のような酵素を用いればより完全な切断が可能
35 である。ペプチドマップはたん白質を識別するのに十分な種類
36 のペプチド断片を得るべきである。断片の数が多すぎると多く
37 のたん白質が類似したプロフィールを示してしまい、かえって
38 その特異性が失われる場合もある。

39 2. 分離と精製

40 たん白質の分離及び精製は、試験を妨害する添加剤やたん白
41 質性賦形剤を含む原薬及び製剤を分析する場合に必要であり、
42 必要に応じて各条で規定する。製剤からたん白質を分離・精製
43 した場合は回収率の定量性を検証しておく必要がある。

44 3. ペプチド結合の選択的切断

45 ペプチド結合を切断する手段はたん白質試料の種類により異
46 なる。用いる切断剤は切断のタイプ(酵素的又は化学的)、及び
47 それぞれのタイプに存在する切断剤の種類に応じて選択される。
48 いくつかの切断剤とその特異性を表1に示す。この表は、切断
49 剤すべてを網羅しているということではなく、他の切断剤が適
50 切と認められたときには追加される。

表1 切断剤の例

種類	試薬	特異性
酵素法	トリプシン(EC 3.4.21.4)	アルギニン、リシンのC末端側
	キモトリプシン(EC 3.4.21.1)	疎水性アミノ酸(ロイシン、メチオニン、アラニン、芳香族アミノ酸)のC末端側
	ペプシン(EC 3.4.23.1&2)	非特異的消化
	リシルエンドペプチダーゼ(Lys-Cエンドペプチダーゼ)(EC 3.4.21.50)	リシンのC末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ(<i>S.aureus</i> 株V8由来)(EC 3.4.21.19)	グルタミン酸、アスパラギン酸のC末端側
	ペプチジル-Asp メタロエンドペプチダーゼ(エンドプロテアーゼ Asp-N)(EC 3.4.24.33)	アスパラギン酸のN末端側
化学法	クロストリパイン(EC 3.4.22.8)	アルギニンのC末端側
	臭化シアン	メチオニンのC末端側
	2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸	システインのN末端側
	o-ヨードソ安息香酸	トリプトファン、チロシンのC末端側
	希酸	アスパラギン酸、プロリン
	BNPS-スカトール	トリプトファン

51 3.1. 試料の前処理

52 たん白質の大きさや形状によっては特別な前処理を行う必要
53 がある。モノクローナル抗体についてはあらかじめH鎖とL鎖
54 に分離する必要がある。分子量が100000ダルトン以上のた
55 ん白質の切断剤としてトリプシンを用いる場合には、リシン残
56 基をあらかじめシトラコニル化若しくはマレイル化しておかな
57 いと多種類のペプチド断片が生成してしまう。

58 3.2. 切断剤の前処理

59 特に酵素系の切断剤については、マップの再現性を維持する
60 ために精製を目的とした前処理を行う必要がある場合がある。
61 例えばトリプシンを用いる際には、混在するキモトリプシンを
62 不活化するためにトシル-L-フェニルアラニクロロメチル
63 ケトンで処理する必要がある。高速液体クロマトグラフィー
64 (HPLC)によるトリプシンの精製、若しくはゲル支持体上への
65 酵素の固定化などの方法も、たん白質試料が少量の場合に効果
66 的である。

67 3.3. たん白質の前処理

68 試料濃度が低い場合など試料の濃縮が必要な場合があり、ま
69 た製剤の処方用いる添加剤や安定化剤がマッピングの操作を
70 妨害する場合、妨害物質をたん白質から分離する操作が必要な
71 場合がある。前処理に用いる物理的方法として限外ろ過、カラ
72 ムクロマトグラフィー、凍結乾燥が挙げられる。また、酵素が
73 たん白質の切断部位に接近できるようにするため、たん白質の
74 折りたたみ構造を解きほぐす目的で、例えば変性剤(例えば尿
75 素)を添加したり、あらかじめジスルフィド結合を還元し、ア
76 ルキル化することがしばしば必要となる。

77 トリプシンを用いる場合に、非特異的切断、脱アミド化、ジ
78 スルフィド結合の異性化、メチオニン残基の酸化、ペプチドの

79 N末端グルタミンの脱アミド化によるピログルタミル基の生成、
80 などの酵素反応中に起こる副反応によりマップが不明瞭になる
81 ことがある。更に、トリプシンの自己消化によりピークが生じ
82 ることもあるが、自己消化に起因するピークのピーク強度(ピ
83 ーク面積又はピーク高さ)は用いるトリプシンと試料たん白質
84 の比率に依存する。酵素の自己加水分解を避けるには、酵素が
85 活性を示さないように、至適pHとは異なるpH(例えばトリプ
86 シンではpH5)で酵素溶液を調製し、使用時に切断反応に用い
87 る緩衝液で更に希釈調製するとよい。

88 3.4. 至適消化条件の設定

89 たん白質の消化の程度と効率に影響を及ぼす因子は、化学的
90 又は酵素的切断に影響する因子そのものである。

91 (i) pH: 消化反応液のpHは用いる切断剤が働くのに最適と
92 考えられる値に調整する。例えば、臭化シアンを切断剤に用い
93 る場合は、強酸性条件(pH2, ギ酸)が必要であるが、トリプシ
94 ンを用いる場合は弱アルカリ条件(pH8)が最適である。一般に、
95 反応液のpHは、反応中に試料たん白質の化学的特性を変化さ
96 せるものであってはならないし、切断反応の過程で変動しては
97 ならない。

98 (ii) 温度: ほとんどの切断反応は25~37°Cが適当であるが、
99 副化学反応が最も少ない反応温度を選択する。反応温度が上昇
100 するとたん白質によっては変性を受けやすいものもあるので、
101 反応液の温度はたん白質の種類によって決定する必要がある。
102 例えば、組換えウシソマトロピンは高温では消化反応中に沈殿
103 するため、消化は4°Cで行う。

104 (iii) 反応時間: 十分な量の試料たん白質が入手可能な場合に
105 は、再現性のあるマップを得るため、かつ不完全な消化を避け
106 るため、至適反応時間を検討する。消化の時間を2~30時間の
107 間で変化させ、例えばトリプシン処理の場合は、生じたマップ
108 を妨害しない酸の添加か凍結により反応を止める。

109 (iv) 切断剤の量: 反応時間を適度に短く(すなわち6~20時
110 間)するために、通常は過剰量の切断剤を用いるが、マップの
111 クロマトグラムパターンへの影響を避けるために、切断剤の使
112 用は最小量に留める。たん白質とプロテアーゼの比率は20:1
113 から200:1が一般的である。切断剤は最適な切断を得るため2
114 回又はそれ以上の回数に分けて加えることもある。ただし、最
115 終反応液量はペプチドマップ法におけるその後の操作(分離操
116 作)を容易にするため、できるだけ小さくする。後の分析に障
117 害となる分解生成物を区別するために、試料たん白質以外のす
118 べての使用試薬を用いて空試験を行う。

119 4. クロマトグラフィーによる分離

120 多くの方法がマッピングにおけるペプチド分離に利用される。
121 分離法は試験するたん白質に応じて選択する。ペプチドの分離
122 に利用される効果的な方法を表2に示す。ここでは最も広く用
123 いられている逆相分配型高速液体クロマトグラフィー(RP-
124 HPLC)をクロマトグラフィーによる分離手法の例として示す。

表2 ペプチドの分離方法

逆相分配型高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)
イオン交換クロマトグラフィー(IEC)
疎水的相互作用クロマトグラフィー(HIC)
ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE), 非変性
SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)
キャピラリー電気泳動(CE)
高圧ろ紙クロマトグラフィー(PCHV)
高電圧ろ紙電気泳動(HVPE)

125 溶媒や移動相の純度はHPLCによる分離において極めて重要
126 な因子である。RP-HPLCでは入手可能な市販のHPLC用溶媒
127 や水が推奨される。グラジエント法を用いて分離する場合、単
128 一溶媒より混合溶媒において溶存ガスの溶解性が低いと、ガス
129 が気化し問題を生じる場合がある。このような場合は、減圧や
130 超音波による攪拌が溶存ガスを除去する有効な操作法として汎
131 用される。溶媒中の固形物がHPLC系に入ると、ポンプのバル
132 プシールの損傷、分離用カラムの先端の詰まりの原因になる。
133 ポンプの前及び後のろ過も推奨される。

134 4.1. 分離用カラム

135 分離用カラムは個々のたん白質に応じて経験に基づき選択す
136 る。孔径10nm又は30nmのシリカ担体のカラムが分離に適し
137 ている。小さなペプチドの分離には、直径3~10µmの全多孔
138 性シリカ粒子にオクチルシランが化学的に結合した充てん剤又
139 は直径3~10µmの多孔性シリカ粒子又はセラミックの微粒子
140 にオクタデシルシランが化学的に結合した充てん剤は、直径5
141 ~10µmの全多孔性シリカ粒子にブチルシランが化学的に結合
142 した充てん剤より有効である。

143 4.2. 溶媒

144 最も一般的に用いられる溶媒は水とアセトニトリルの混液に
145 0.1%未満のトリフルオロ酢酸を加えた溶液である。粘度が過
146 度に上昇しない限り、必要に応じてペプチドの溶解性を高める
147 ために2-プロパノール又は1-プロパノールを加えてもよい。
148

149 4.3. 移動相

150 pHを3.0~5.0の範囲で変えることにより、酸性アミノ酸残
151 基(例えばグルタミン酸及びアスパラギン酸)を含むペプチドの
152 分離を改善できるので、pHの選択において適応範囲の広いリ
153 ン酸塩緩衝液が移動相によく用いられる。リン酸ナトリウム、
154 リン酸カリウム、酢酸アンモニウム、リン酸のpH2~7(ポリマ
155 ー担体のカラム充てん剤ではそれ以上のpHでも使用できる)の
156 溶液もアセトニトリルによるグラジエント法と組み合わせで用
157 いられる。トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルも非常によ
158 く使用される。

159 4.4. グラジエント法の選択

160 直線、非直線若しくは段階的グラジエントを用いることができ
161 る。複雑な混合物を分離するには濃度勾配の緩やかなグラジ
162 エントが推奨される。マーカーピークとなる1~2個のピーク
163 を明確に分離するのに最適なグラジエントを選択する。

164 4.5. アイソクラティック法の選択

165 単一の移動相を用いるアイソクラティックHPLCシステムは、
166 簡便でありかつ検出器の感度の向上が期待できるためによく用
167 いられる。ピーク一つ一つについて明瞭な分離を得るために移
168 動相の組成を決めることは、時として困難なことがある。移動
169 相の組成比やpHのわずかな変化がペプチドマップのピークの
保持時間に大きく影響するような移動相は、アイソクラティッ

170 クHPLCシステムでは用いてはならない。

171 4.6. その他のパラメーター

172 良好な再現性を得るためには、通常カラムの温度を制御する
173 必要がある。移動相の流速は毎分0.1~2.0mL、ペプチドの検
174 出はUV検出器を用いて200~230nmの測定波長で行う。その
175 他の検出法も利用されている(例えば、ポストカラム誘導体化
176 法)が、UV検出法より頑健性の点で劣り、また適用範囲も狭い。

177 4.7. システム適合性

178 この項には試験法の全体にわたる性能を評価する方法を記述
179 する。システム適合性の判定基準は、得られるデータの解釈と
180 適否の決定に影響を及ぼす重要な試験パラメーターの特定に基
181 づく。これらの重要なパラメーターはペプチドの消化とペプチ
182 ド断片の分析をモニターする基準でもある。試料と全く同一に
183 処理した標準品/標準物質との比較は、消化反応の終了を知る
184 指標になる。システム適合性の判定基準を設定するために、試
185 料と併行して標準品/標準物質を使用することが重要である。
186 更に、比較のために標準品/標準物質から得たクロマトグラム
187 の実例を付けるべきである。その他の指標として、目視による
188 たん白質又はペプチドの溶解性の検査、未切断たん白質が存在
189 しないことの確認、消化の程度に依存して生成するペプチド断
190 片の測定などがある。ペプチド分析のシステム適合性として重
191 要なパラメーターは、ペプチドの分離方法及び検出方法並びに
192 データ解析に関する要求に依存する。

193 ペプチドマップ法を確認試験として用いる場合、システム適
194 合性として選択性及び精度が重要である。たん白質の同一性の
195 確認試験においては、変異たん白質の存在の確認の場合と同様
196 に、試料たん白質のペプチドマップのペプチド断片を標準品/
197 標準物質のペプチドマップのそれと比較することにより、既知
198 の一次構造との一致を証明したり、変異たん白質の存在を確認
199 する。ペプチドの分離度を測定するためには、試料たん白質の
200 代わりに標準品/標準物質の消化物を利用することができる。
201 変異たん白質の検討には、変異を生じたペプチド部分が特にマ
202 ップ上で分離が不十分な領域に存在する場合、変異たん白質と
203 標準品/標準物質との一定混合物の比較分析が有効である。パ
204 ターンの一致度の指標としては、検出される主要ペプチド断片
205 の数が用いられる。各ペプチド断片のパターンの一致度はペプ
206 チド断片のピークの分離度から最もよく判定できる。クロマト
207 グラフィーで使用される各種のパラメーター(例えばピーク間
208 の分離度、ピークの最大幅、ピーク面積、テーリングファクタ
209 ー、カラム効率)がペプチドの分離度の決定に利用できる。試
210 験するたん白質及び用いる分離法によっては、一つ又は複数の
211 ペプチドの分離を適合性の条件としてもよい。

212 標準品/標準物質の消化物について試料と同一の条件で繰り
213 返し分析することによって、試験精度の基準値が得られると共
214 にペプチドの回収率を求めることができる。一般に試料たん白
215 質のペプチド断片の回収率は、内標準物質又は外標準物質とし
216 て添加したペプチドを用いて得られる。精度は相対標準偏差
217 (RSD)で表される。回収率や精度は常に一定ではないので、シ
218 ステム適合性ではその両者についての限度値を設定しなければ
219 ならない。これらの限度値は、試料たん白質に特有なものであ
220 り、各条ごとに規定されることになる。

221 まず、相対保持時間、ピーク強度、ピークの数、全体の溶出
222 パターンなどを視覚的に比較する。次に、ピーク強度比の数学
223 的分析、更に試料の消化物及び標準品/標準物質の消化物の

224 1:1(v/v)混合液のクロマトグラムのプロフィールを比較して、
225 一致することを確認する。試料と標準品/標準物質のそれぞれ
226 の消化物のすべてのピークが同じ相対保持時間及び同じピーク
227 強度比を示すことにより、試料と標準品/標準物質との同一性
228 が確認される。

229 試料と標準品/標準物質との間で明らかに異なる相対保持時
230 間を示したピークが、上記の1:1混合液では単一ピークとし
231 て見られた場合は、システムの変動性を示している。1:1混
232 合液でピークが分離するときは、それぞれのピークのペプチド
233 断片が同一ではないことの証拠となる。1:1混合液中のある
234 ピークが、試料及び標準品/標準物質消化液中のそれに相当す
235 るピークに比べ明らかにブロードならば、異なるペプチドの存
236 在を示している可能性がある。ペプチドマップ分析のためのコ
237 ンピューター用パターン認識ソフトウェアの利用が提案され、
238 適用されているが、ソフトウェアの検証に問題があり、当面は
239 公定法として採用することはできない。その他、計算式、数学
240 的モデル、又はパターン認識による自動化の試みが既に行われ
241 ている。例えば、赤外吸収スペクトルやダイオードアレイUV
242 スペクトルによるペプチドの確認の自動化が挙げられる。しか
243 しこれらの方法には、分解能が不十分な場合、ペプチド断片間
244 の分離が不完全な場合、若しくは標準品/標準物質と試料の消
245 化断片間にピーク強度に差がある場合において、限界が存在す
246 る。

247 ペプチドマップにおいて正確に同定された特定のピークにつ
248 いては、ピークの保持時間とピーク面積又はピーク高さに関し
249 て数値を比較することができる。ピーク面積は、ピーク面積積
250 分法がベースラインの変動の影響を受けやすく誤差を生じやす
251 いことさえ考慮すれば、変動の比較的小さいピークを内標準と
252 して利用して計算することができる。代わりに、試料のすべて
253 のペプチド断片のピーク高さの合計に対する各ピーク高さの比
254 率を算出し、標準品/標準物質で得られる該当ピークの比率と
255 比較することもできる。トリプシンの自己消化の可能性はブラ
256 ンクのペプチドマップ、すなわちブランクの溶液をトリプシン
257 処理した際得られるペプチドマップから確認できる。

258 ペプチドマッピング法の適格性を示すために最低限必要な要
259 件は、試験条件の管理のためのシステム適合性試験を含む試験
260 法が設定され、その適格性が証明されていることである。一般
261 的には開発の初期段階においては、たん白質のペプチドマッピ
262 ングの適格性を示すことのみで十分である。しかし、たん白質
263 性医薬品の開発を進め、規制当局へ承認申請するためには、当
264 該たん白質について意図したとおりペプチドマップを得るこ
265 とができることを保証するような、試験操作に関する検証を含
266 めた方法の妥当性に関する追加的資料が必要な場合もある。

267 5. ペプチドの分析と確認

268 この項は、規制当局へ承認申請を行うために医薬品の開発途
269 上においてペプチドマッピングを用いる上での手引きである。

270 ペプチドマップを定性試験の手段として利用する場合には、
271 個々のペプチドピークを完全に解析する必要はない。しかし、
272 規制当局に承認申請する場合に必要なペプチドマップ法の検証
273 には、個々のペプチドピークについて厳密な確認が必要である。
274 ピークについての確認方法には、各ピークのN末端アミノ酸配
275 列分析及びアミノ酸組成分析の組合せによる方法から質量分析法
276 (MS)まで様々である。

277 N末端アミノ酸配列分析法とアミノ酸組成分析法の組合せを

4 ペプチドマップ法

278 解析に利用する場合には、ペプチドの分離スケールを上げる。
279 スケールアップは時としてペプチドピークの分離能に影響を及
280 ぼすので、その際分離度が低下しないことを実験的に確かめて
281 おく必要がある。特定のペプチドのピークに相当する画分を分
282 取し、減圧濃縮し、必要ならば再度クロマトグラフィーで分離
283 する。ペプチド断片のアミノ酸分析はペプチドの大きさによっ
284 て制限を受ける。N末端がブロックされている場合にはアミノ
285 酸配列分析を始める前にその除去が必要となる。カルボキシペ
286 プチダーゼ処理とMALDI TOF(Matrix-Assisted Laser
287 Desorption Ionization Time of Flight)・MS(マトリックス支援
288 レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法)による検出を組
289 み合わせたC末端アミノ酸配列分析法も各ピークの解析のため
290 に利用できる。
291 質量分析法によるアミノ酸配列分析では、分離したペプチド
292 を直接測定装置に導入するか、又はオンライン液体クロマトグ
293 ラフィー/質量分析法(LC-MS)を利用して構造を分析する。一
294 般にエレクトロスプレー質量分析法、MALDI TOF質量分析法
295 やFAB(Fast Atom Bombardment)イオン化質量分析法が利用
296 される。修飾たん白質のアミノ酸配列や修飾アミノ酸の決定に
297 は、タンデム質量分析法(MS/MS)も利用されている。
298 たん白質試料の還元前後における消化物のマスペクトルを
299 比較することにより、ジスルフィド結合の形成にあずかるチオ
300 ール基を含むペプチドのジスルフィド結合を同定することがで
301 きる。
302 ペプチドマップで一次構造が明確に証明できない部分がある
303 場合には、更に詳細なペプチドマップが必要な場合もある。ペ
304 プチドマップ法によってたん白質の一次構造を解析する場合、
305 理論たん白質構造と少なくとも95%が一致することを目標と
306 する。

1 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

2 本法は、医薬品の製造工程管理試験や出荷判定試験において
3 検出される微生物(細菌及び真菌)を遺伝子解析法によって種又
4 は属レベルで同定又は推定する手法を示す。無菌試験や無菌製
5 造工程で検出された汚染微生物の同定は、汚染原因の究明に役
6 立つ。また、医薬品製造区域や医薬品原料等から検出される微
7 生物の種類についての知見は、微生物学的に安全な医薬品を製
8 造する上で重要である。微生物の同定法は、微生物固有の形態
9 や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせ、分類
10 階級の上位から下位に進めていく表現形質解析法が広く用いら
11 れてきた。表現形質による微生物同定システムも数多く市販
12 されているが、医薬品製造原料や環境から検出される微生物の
13 中には、同定できないものも多い。また、表現形質による同定
14 法は、一般に専門知識が必要な上、結果の判定が客観性に欠け
15 るおそれがある。微生物の進化の歴史はリボソーム
16 RNA(rRNA)に記録されており、近年の微生物分類学ではこの
17 記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。
18 本法は、細菌については、16S rRNAの高度可変領域の一部、
19 真菌については18S rRNAと5.8S rRNA間のスペーサー領域
20 (ITS1)の遺伝子配列を自動解析し、データベースと照合するこ
21 とによって微生物を迅速に同定又は推定する手法を示す。なお、
22 本法は他の同定法に取って代わるものではない。また、本法に
23 示した方法は、用いる装置や材料、実施者の経験などによって
24 変更可能である。

25 また、本法に示した以外の遺伝子領域も合理性があれば使用
26 可能である。

27 1. 装置

28 (i) DNA自動解析装置

29 DNAの塩基配列を読み取る(シーケンスする)装置で、ゲル
30 板法やキャピラリー法など、種々の機種がある。

31 (ii) DNA増幅装置

32 被検菌の標的DNAの増幅(PCR)に用いる。また、PCR産物
33 をシーケンス試薬で標識するためにも用いる。

34 2. 操作法

35 以下、操作法の一例を示す。

36 2.1. 鋳型DNAの調製

37 同定対象とする細菌又は真菌は純培養されていることが重要
38 である。被検菌が集落の場合は、1.5mL遠心チューブに被検菌
39 処理液を0.3mL入れ、これに滅菌竹串などで集落の一部(かび
40 の場合は、ごく少量)をとり懸濁させる。被検菌が液体培養物
41 の場合は、1.5mL遠心チューブに培養物を0.5mLとり、
42 10000rpmで10分間遠心後、上清を除去し、残留物に被検菌処
43 理液を0.3mL入れて懸濁させる。ヒーターを用いて懸濁液を
44 100°Cで10分間加熱する。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物
45 でもPCRはかかるが、かびの中には集落を用いるとPCR反応
46 を阻害するものもある。その場合には、液体培養物からDNA
47 抽出を行った方がよい。

48 2.2. PCR

49 PCR反応液に加熱処理した菌液の上清又はDNA抽出物を
50 2 μ L加え、細菌の場合は10F/800Rプライマーセット(16S
51 rRNAの後半部分についても解析する必要がある場合には、
52 800F/1500Rプライマーセットを使用)、真菌の場合はITS1F

53 /ITS1Rプライマーセットを添加して以下の条件でPCRを行
54 う。94°C, 30秒→55°C, 60秒→72°C, 60秒の反応を30サイク
55 ル。細菌の場合は約800bp, 真菌の場合は菌種により約150~
56 470bpのDNA断片が増幅生成する。PCRを行う際には、陰性
57 対照(菌液の代わりに水)を置くこと。

58 2.3. PCR産物の検出

59 反応終了後のPCR液5 μ Lを1 μ Lのローディング緩衝液と混合
60 し、1.5w/v%アガロースゲルのウェルに添加し、1倍TAE緩衝
61 液を用いて電気泳動する。この際、適当なDNAサイズマーカ
62 ーも並行して泳動する。泳動後、トランスイルミネーター(主
63 波長: 312nm)で観察し、鮮明な1本の標的サイズバンドが得
64 られていることを確認する。複数のバンドが確認された場合に
65 は、標的バンドを切り出し、適当な市販DNA抽出キットを用
66 いてDNAの抽出を行う。

67 2.4. PCR産物の精製

68 未反応物(dNTPやプライマーなど)を除去するための方法と
69 してはいろいろある。採用する方法のプロトコルに従って精製
70 する。

71 2.5. 精製DNAの定量

72 精製DNA量を分光光度計で測定する場合には、

73 1 OD_{260nm} = 50 μ g/mLで換算する。

74 2.6. 精製PCR産物の標識

75 DNA解析装置又はそのプログラムに合った蛍光標識シーク
76 エンシング試薬を用い、PCR産物を標識する。

77 2.7. シークエンシング反応物の精製

78 1.5mL遠心チューブに薄めたエタノール(7→10)を75 μ L入れ、
79 反応終了物を移す。氷中に20分間放置後、15000rpmで20分間
80 遠心する。遠心終了後、上清を除去し、薄めたエタノール(7→
81 10)250 μ Lを加え、15000rpmで5分間遠心する。上清を除去し、
82 乾燥させる。

83 2.8. 塩基配列の解析

84 DNA解析装置やシーケンス試薬に合った方法で処理した
85 試料をDNA解析装置にセットし、塩基配列を読み取る。得ら
86 れた塩基配列をBLAST検索によりデータベースと照合する。

87 3. 判定

88 一般に、得られた塩基配列とデータベースとが90%以上合
89 致した場合、以下のように判定できる。

90 (i) 細菌の場合は、10Fプライマー(800F/1500Rプライマ
91 ーセットを用いた場合には、800Fプライマー)で読み取った塩
92 基をBLASTを用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検
93 菌と同一種又は近縁種と判定する。

94 (ii) 真菌の場合は、ITS1Fプライマーで読み取った領域を
95 BLASTを用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と
96 同一種又は近縁種と判定する。

97 4. 試薬・試液

98 (i) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液、
99 0.5mol/L: エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水
100 和物18.6gを水に溶かし、100mLとする。

101 (ii) トリス緩衝液, 1mol/L, pH8.0: 2-アミノ-2-ヒドロ
102 キシメチルー-1,3-プロパンジオール24.2gを水に溶かし、
103 0.2mol/L塩酸試液を加えてpH8.0に調整した後、水を加えて
104 200mLとする。

105 (iii) TE緩衝液: pH8.0の1mol/Lトリス緩衝液1.0mLに
106 0.5mol/Lエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液

2 遺伝子解析による微生物の迅速同定法

- 107 0.2mLを加えた後、水を加えて100mLとする。
 108 (iv) 被検菌処理液：ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニル
 109 ルエーテルを1vol%含むTE緩衝液を小分けし、凍結保存する。
 110 (v) PCR反応液

10倍緩衝液*	5μL
dNTP溶液** (各2.5mmol/L)	4μL
10μmol/Lセンスプライマー	1μL
10μmol/Lアンチセンスプライマー	1μL
耐熱性DNAポリメラーゼ(1U/μL)	1μL
水	36μL

- 111 *10倍緩衝液
 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(pH8.4) 100mmol/L
 塩化カリウム 500mmol/L
 塩化マグネシウム 20mmol/L
 ゼラチン 0.1g/L

- 112 **dNTP溶液(dGTP, dATP, dCTP, dTTPのなどモル混合
 113 液)

dGTP(2'-デオキシグアノシン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5mmol/L
dATP(2'-デオキシアデノシン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5mmol/L
dCTP(2'-デオキシシチジン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5mmol/L
dTTP(2'-デオキシチミジン5'-トリ フォスフェート, ナトリウム塩)	2.5mmol/L

- 114 なお、これらの成分を有する適当な製品を記載に従って
 115 用いてもよい。

- 116 (vi) シークエンシング試薬
 117 シークエンシング方式には、プライマーを標識するダイプ
 118 イマー(dye-primer)法、dNTPターミネーターを標識するダイ
 119 ターミネーター(dye-terminator)法など、種々の方法がある。
 120 DNA自動解析装置やプログラムに合った適切な試薬キットを
 121 使用する。

- 122 (vii) TAE緩衝液, 50倍濃縮
 123 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール
 124 242gに酢酸(100)57.1mL, 0.5mol/Lエチレンジアミン四酢酸
 125 二水素二ナトリウム試液100mL及び水を加えて溶かし、
 126 1000mLとする。

- 127 (viii) 1倍TAE緩衝液
 128 用時, 50倍濃縮TAE緩衝液を水で50倍に希釈する。

- 129 (ix) アガロースゲル
 130 アガロース1.5gに50倍濃縮TAE緩衝液2.0mL, 臭化エチジ
 131 ウム (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium
 132 bromide)溶液(1→100)10μL, 及び水100mLを加えて加熱して
 133 溶かした後, 60°Cに冷却する。

- 134 (x) ローディング緩衝液, 6倍濃縮
 135 プロモフェノールブルー0.25g, キシレンシアノール
 136 FF0.25g及びエチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水
 137 和物1.63gを水50mLに溶かし, グリセリン30mLを加え, 水を
 138 加えて100mLとする。

- 139 (xi) PCR用プライマー

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	800R	5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'
	800F	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	1500R	5'-TACCTTGTACGACTT-3'
真菌	ITS1F	5'-GTAACAAGT(T/C)TCCGT-3'
	ITS1R	5'-CGTCTTCATCGATG-3'

- 140 (xii) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル
 141 本品は微黄色の粘性の液体である。

1 エンドトキシン規格値の設定

1 エンドトキシン規格値の設定

- 2 注射剤のエンドトキシン規格値は、下記の方法に従って設定
3 される。

4 エンドトキシン規格値 = $\frac{K}{M}$

- 5 ただし、 K は、発熱を誘起するといわれる体重1kg当たりの
6 エンドトキシンの量(EU/kg)であり、投与経路による区分に基
7 づき、次の表のように設定される。

投与経路	K (EU/kg)
静脈内	5.0
静脈内：放射性医薬品	2.5
脊髄腔内	0.2

- 8 また、 M は体重1kg当たり1回に投与される注射剤の最大量
9 である。ただし、注射剤が頻回又は持続的に投与される場合は、
10 M は1時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。 M の単
11 位は、投与量が製剤の容量に基づく場合はmL/kg、主薬の質量
12 に基づく場合はmg/kg又はmEq/kg、主薬の生物学的単位に基
13 づく場合は単位/kgで表す。

14 備考

- 15 1) 質量又は単位に基づいて投与する製剤では、主薬の表示量
16 を基準としてエンドトキシン規格値を設定する。
17 2) 成人の体重1kg当たりの最大投与量を算出するとき、成人
18 の平均体重として60kgを用いる。
19 3) 体重1kg当たりの小児投与量とその成人投与量よりも多い
20 ときは、小児投与量に基づいてエンドトキシン規格値を設定
21 する。
22 4) 上記の表に示した投与経路区分以外の経路で投与される医
23 薬品等の K 値は、静脈内投与の K 値を準用する。

1 蛍光染色による細菌数の迅速測定法

2 本法は、蛍光染色を基本として、生理活性を持つ細菌を迅速
3 に計数する手法を示す。生菌数の測定には、カンテン培地上で
4 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
5 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
6 ることから、蛍光又は発光などにより細菌を捉える新たな細菌
7 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
8 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
9 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
10 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
11 有する細菌まで、計数することができる。DNAやRNAに結合
12 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
13 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
14 酸を持つすべての細胞を対象とする。蛍光活性染色法は、細菌
15 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
16 性などを指標とする。マイクロコロニー法ではコロニー形成の
17 初期段階であるマイクロコロニーを計数する。以下に、
18 CFDA-DAPI二重染色法とマイクロコロニー法を示す。なおこ
19 こに示した方法は、迅速・高精度に生理活性を持つ細菌数を測
20 定するための手法であり、生菌とする基準がほかの方法と異な
21 るため、測定値はほかの生菌数測定法よりも高くなることが多
22 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
23 である。すなわち、本法に示した以外の試薬、器具、装置も合
24 理性があれば使用可能である。

25 1. CFDA-DAPI二重染色法

26 エステラーゼ活性を持つ細菌の検出には fluorescein
27 diacetate (FDA)系試薬が一般的に用いられる。FDA系試薬は
28 細胞内のエステラーゼによって加水分解され、波長490nm付
29 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
30 性菌に対する染色性が低いため、その修飾体である
31 carboxyfluorescein diacetate (CFDA)などが利用されている。
32 核酸染色剤4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を併用した
33 CFDA-DAPI二重染色法の原理は以下のとおりである。無極性
34 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
35 性の carboxyfluorescein に加水分解される。この
36 carboxyfluoresceinは極性を持つために生細胞内に蓄積される。
37 したがって、エステラーゼ活性を持つ細胞に青色励起光を照射
38 した場合、carboxyfluorescein由来の緑色蛍光を発する。死細
39 胞ではCFDAは加水分解されないために、蛍光性の
40 carboxyfluoresceinは生じない。一方DAPIは生菌・死菌の両
41 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
42 特異的に結合するために、DNAを持つすべての細菌が染色さ
43 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
44 染色法により、青色励起光下ではエステラーゼ活性を持つ細菌
45 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
46 菌数+死菌数)を測定できるので、エステラーゼ活性を持つ細
47 菌及びDNAを持つすべての細菌を計数することが可能となる。

48 1.1. 装置

49 1.1.1. 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

50 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
51 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
52 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、

53 各種の蛍光観察装置がある。

54 1.2. 器具

- 55 (i) ろ過装置(ファンネル, 吸引フラスコ, 吸引ポンプ)
56 (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径
57 0.2 μ m): 粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカ
58 ーボネート製でなくとも良い。
59 (iii) スライドガラス
60 (iv) カバーガラス
61 (v) 計数用接眼マイクロメーター(10 \times 10のマスを区切っ
62 たもの)

63 1.3. 操作法

64 以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

65 1.3.1. 試料の調製

66 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
67 うに試料を調製する。

68 1.3.2. ろ過

69 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
70 ルター(孔径0.2 μ m)をセットする。適当量の試料をろ過し、試
71 料中の細菌をフィルター上に捕集する。

72 1.3.3. 染色

73 CFDAを終濃度150 μ g/mL及びDAPIを終濃度1 μ g/mLとなる
74 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
75 ネルに注ぎ、約3分間、室温で染色した後、吸引ろ過する。フ
76 ア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
77 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。

78 1.3.4. プレパラートの作製

79 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
80 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。
81 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
82 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
83 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
84 ジョンオイルを1滴滴下する。

85 1.3.5. 計数

86 蛍光顕微鏡下で1000倍の倍率で観察・計数する。CFDA-
87 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
88 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
89 を持つ)細菌を計数した後、同一視野について紫外線励起光下
90 で青色蛍光を発する(DNAを持つ)細菌を計数する。蛍光顕微鏡
91 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
92 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
93 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
94 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
95 ロメーターで測定しておく。また、計数にあたっては1視野当
96 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
97 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
98 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
99 の場合、又は1視野当たりの細胞数が0個の視野が5視野以上あ
100 る場合は、検出限界以下とする。)

101 菌数(cells/mL)

$$102 = \frac{\{(1\text{視野当たりの細菌数の平均値}) \times (\text{ろ過面積})\}}{\{(ろ過量) \times (\text{検鏡面積})\}}$$

104 1.4. 試薬・試液

105 (i) 無菌水: 水を孔径0.2 μ mのメンブランフィルターでろ過

2 蛍光染色による細菌数の迅速測定法

106 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
107 も良い。

108 (ii) CFDA溶液、10mg/mL：CFDA50mgをジメチルスルホ
109 キシドに溶かし、5mLとする。遮光下、-20°Cで保存する。

110 (iii) CFDA染色用緩衝液：塩化ナトリウム5gに0.1mol/Lエチ
111 レンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液0.5mL及び薄めた
112 リン酸水素二ナトリウム試液(1→3)を加えて溶かし、100mL
113 とする。この液にリン酸二水素ナトリウム二水和物溶液
114 (1→64)を加えてpH8.5に調整する。孔径0.2µmのメンブラン
115 フィルターでろ過する。

116 (iv) DAPI溶液、10µg/mL：DAPI 10mgを無菌水100mLに溶
117 かす。無菌水で10倍希釈して、孔径0.2µmのメンブランフィ
118 ルターでろ過する。遮光下、4°Cで保存する。

119 (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

121 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
122 し、蛍光顕微鏡などで観察・計数することにより、増殖能を持
123 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
124 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
125 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
126 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、
127 増殖能力を持つ細菌を迅速かつ高精度に計数することができる。
128 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
129 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

132 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
133 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
134 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
135 ある。

2.2. 器具

137 (i) ろ過装置(ファンネル、吸引フラスコ、吸引ポンプ)
138 (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.2µm以
139 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
140 ネット製でなくても良い。

141 (iii) スライドガラス

142 (iv) カバーガラス

143 (v) ろ紙(No.2)

144 (vi) 計数用接眼マイクロメーター(10×10のマス目を区切つ
145 たもの)

2.3. 操作法

147 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

149 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
150 うに試料を調製する。

2.3.2. ろ過

152 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
153 ルター(孔径0.2µm)をセットする。適当量の試料をろ過し、試
154 料中の細菌をフィルター上に捕集する。

2.3.3. 培養

156 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
157 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
158 を静置する際、培地とフィルターの間に空気が入らないように
159 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、培養時間など)は異なるので注意する。

2.3.4. 固定

162 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
163 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
164 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

166 ろ紙に染色液(1µg/mL DAPIなど、2% polyoxyethylene
167 sorbitan monolaurate)適量をしみ込ませ、ろ過面を上にして
168 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
169 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
170 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
171 ーを十分に風乾させる。

2.3.6. プレパラートの作製

173 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
174 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。
175 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
176 ーガラスを被せてフィルターを封入する。

2.3.7. 計数

178 蛍光顕微鏡下で400倍又は200倍の倍率で観察・計数する。
179 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
180 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、
181 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
182 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
183 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。
184 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、
185 又は1視野当たりのマイクロコロニー数が0個の視野が5視野以
186 上ある場合は、検出限界以下とする。

187 マイクロコロニー数(cells/mL)

188
$$= \frac{\{(1 \text{視野当たりのマイクロコロニー数の平均値}) \times (\text{ろ過面}$$

189
$$\text{積})\} / \{(\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積})\}$$

2.4. 試薬・試液

191 (i) 無菌水：水を孔径0.2µmのメンブランフィルターでろ過
192 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
193 も良い。

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

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

200 (iv) 蛍光顕微鏡用イマージョンオイル

1 最終滅菌医薬品の無菌性保証

2 「最終滅菌法及び滅菌指標体」に示すように、最終滅菌を適
3 用できる医薬品には、通例、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が得ら
4 れる条件で滅菌を行わなければならない。 10^{-6} 以下の無菌性保
5 証水準は、物理的及び微生物学的手法に基づく滅菌工程のバリ
6 デーションを通して証明できるものであり、滅菌製品の無菌試
7 験によって証明できるものではない。本節では、最終滅菌を適
8 用した製品に対して無菌試験を実施せず、滅菌工程の重要管理
9 項目を適正に管理することによって製品を出荷させるパラメト
10 リックリリース(照射滅菌の場合は、ドジメトリックリリース
11 という)に必要な事項を示す。パラメトリックリリースとは、
12 滅菌機構が十分に解明されており、その重要管理項目も明らか
13 で、適切なバイオリジカルインジケータを用いてその滅菌工
14 程を微生物学的にバリデートできるときに適用できる方法であ
15 る。

16 1. 定義

17 本節で用いる用語の定義は、以下のとおりである。

18 1.1. 最終滅菌

19 被滅菌物が最終容器又は包装におさまった状態で滅菌され、
20 滅菌後の微生物の死滅を定量的に測定又は推測できる滅菌法を
21 いう。

22 1.2. バリデーション

23 工程が恒常的にあらかじめ定めた規格に適合していることを
24 示すための計画、実施及び記録とその解釈のために必要なデー
25 タを得るための方法を文書化したもの。

26 1.3. 定期的再バリデーション

27 工程が恒常的にあらかじめ定めた規格に適合していることを
28 定期的に再確認するために実施するバリデーションで、変動要
29 因やその許容条件が引続き目的とする品質に適合する医薬品を
30 恒常的に製造するために妥当であることを検証すること。

31 1.4. 設備適格性の確認

32 製造設備、計測器、製造環境制御設備などの設備が適切に選
33 定され、正しく据え付けられ、設定された仕様に適合して稼働
34 することを設備の据付け時及び運転時に確認すること。

35 1.5. 稼働性能適格性の確認

36 工程管理手順書に従って操作したとき、機器が保証され、規
37 格に適合する製品を製造する証拠が得られていることを物理的、
38 化学的及び微生物学的に確認すること。

39 1.6. 滅菌工程を支援するシステム

40 酸化エチレングス滅菌におけるプレコンディショニング設備
41 及びエアレーション設備、高圧蒸気滅菌における蒸気供給設備、
42 放射線滅菌におけるローディング装置などの滅菌装置に付帯す
43 る設備をいう。

44 1.7. 品質システム

45 品質管理を実施するために必要となる製造業者の組織構造
46 (責任、権限及び相互関係)、手順、及び経営方法をいう。

47 1.8. 変更管理システム

48 工程管理が継続的に実施されていることを保証するため、医
49 薬品の品質に影響をもたらす可能性のあるすべての変更事項を
50 対象として評価するように立案設計されたシステムをいう。

51 1.9. F_0 値

52 D 値を10倍変化させる温度変化の度数として定義される Z 値

53 を 10°C と仮定し、全加熱工程の致死係数(L)を積分して得られ
54 た滅菌熱量を T_b における換算時間(分)で表したもの。

$$55 L = \log^{-1} \frac{T_b - T_b}{Z} = 10^{\frac{T_0 - T_b}{Z}}$$

56 T_b : 滅菌器内又は滅菌物内の温度

57 T_b : 滅菌基準温度(121°C)

$$58 F_0 = \int_{t_0}^{t_1} L dt$$

59 $t_1 - t_0$: 処理時間(分)

60 1.10. 制御装置

61 計測可能な物理的パラメーター(温度、湿度、圧力、時間、
62 線量など)を制御する装置、計測機器及び記録計などを含む装
63 置/計器の総称

64 1.11. パラメトリックリリース

65 最終製品の試験結果によるものではなく、バリデーションの
66 結果を基にして、滅菌工程の重要パラメーター(温度、湿度、
67 圧力、時間、線量など)及び製造記録などを照査して、出荷の
68 可否を判断すること。

69 2. 滅菌バリデーション

70 2.1. 実施対象

71 無菌医薬品の製造業者(以下、「製造業者」という)は、品質
72 システムを確立した上で、原則として以下の項目について該当
73 する品目の滅菌バリデーションを実施し、滅菌バリデーション
74 の結果に基づいて日常の滅菌工程管理を行うこと。

- 75 a) 滅菌工程
- 76 b) 滅菌工程を支援するシステム

77 2.2. 滅菌バリデーション手順書

78 2.2.1. 製造業者は、滅菌工程管理の手順に関して、次に掲
79 げる事項を定めた「滅菌バリデーション手順書」を作成しなけ
80 ればならない。

- 81 a) バリデーション責任者の業務範囲及び権限に関する事項
- 82 b) 滅菌バリデーションの実施時期に関する事項
- 83 c) 滅菌バリデーション計画書の作成、変更及び承認などに
84 関する事項
- 85 d) 滅菌バリデーション実施結果の報告、判定及び承認に関
86 する事項
- 87 e) 滅菌バリデーションに関する書類の保管に関する事項
- 88 f) その他、必要な事項

89 2.2.2. 滅菌バリデーション手順書には、制定者及び制定年
90 月日並びに改訂した場合には、改訂者、改訂年月日、改訂事項
91 及び改訂理由を記載すること。

92 2.2.3. 製造業者は、滅菌バリデーション手順書の内容につ
93 いての改廃にかかわる手続きを明確にした上で、滅菌バリデ
94 ション手順書を適切に管理すること。

95 2.3. バリデーション責任者

96 製造業者は、滅菌バリデーションにかかわる責任者をおくこ
97 と。責任者は、滅菌バリデーション手順書に基づき、次の各号
98 に掲げる業務を行うこと。

99 2.3.1. 滅菌バリデーション手順書に基づき製造しようとする
100 品目について、滅菌バリデーションの実施計画書を作成する。
101 実施計画書には、滅菌バリデーションの実施内容を考慮した上
102 で、次の事項を定める。

2 最終滅菌医薬品の無菌性保証

103 a) 対象医薬品名(品目名)
104 b) 当該滅菌バリデーションの目的
105 c) 期待される結果
106 d) 検証の方法(検証結果の評価方法を含む)
107 e) 検証の実施期間
108 f) 滅菌バリデーションを行う者(担当者)の氏名
109 g) 計画書の作成者及び作成年月日並びに改訂した場合には、
110 改訂者、改訂年月日、改訂事項及び改訂理由
111 h) 当該滅菌バリデーションに関する技術的条件
112 i) その他当該滅菌バリデーションの実施に必要な事項
113 2.3.2. 前号に定める計画書に従い、次の滅菌バリデーションを実施する。
114
115 a) 製造業許可及び製造品目追加(変更)許可を取得する際に
116 実施する滅菌バリデーションの実施項目
117 1 製品適格性の確認
118 2 設備適格性の確認
119 1) 据付け時適格性の確認
120 2) 運転時適格性の確認
121 3 稼働性能適格性の確認
122 1) 物理的稼働性能適格性の確認
123 2) 微生物学的稼働性能適格性の確認
124 b) 製造業許可更新時まで実施する滅菌バリデーション
125 1 変更時の再バリデーション
126 2 定期的再バリデーション(実施項目などは滅菌方法などを考慮して定めること)
127
128 2.3.3. 滅菌バリデーションの結果を判定し、無菌性を保証
129 していることを確認する。
130 2.3.4. 滅菌バリデーションの結果を製造管理者に対して文
131 書により報告する。
132 2.3.5. 日常の滅菌工程管理を行う。
133 3. 微生物の管理プログラム
134 パラメトリックリリースを採用する場合、製品原料、容器/
135 栓及び滅菌前製品中のバイオバーデン管理が重要である。バイオ
136 オーバーデン数をあらかじめ定められた方法及び頻度によって測
137 定し、必要に応じて検出された微生物の性状検査、当該滅菌法
138 に対する抵抗性を調べる。また、医薬品製造区域における環境
139 微生物の評価方法については、「無菌医薬品製造区域の微生物
140 評価試験法」を参照すること。
141 4. 滅菌指標体
142 滅菌工程の管理又は滅菌の指標として使用されるもので、バ
143 イオロジカルインジケーター(BI)、ケミカルインジケーター
144 (CI)及び線量計などがある(最終滅菌法及び滅菌指標体参照)。
145 滅菌指標体を使用する際には、環境及び人体への安全性を考慮
146 し、必要に応じて適切な注意を払うこと。滅菌バリデーション
147 及び日常の工程管理に使用するBIは、その仕様を規定し、文
148 書化すること。日常の工程管理にBIを用いる場合には、その
149 形状、製品又は模擬製品への負荷形態などは、微生物学的稼働
150 性能適格性の確認を行う際に用いたものと同一又は同等以上の
151 抵抗性を持つことが確認されたものでなければならない。
152 5. 変更管理システムの確立
153 滅菌にかかわる品質に大きな影響を及ぼす滅菌装置、載荷形
154 態及び滅菌条件などの変更は、当該医薬品のパラメトリックリ
155 リース条件の変更該当する。滅菌バリデーション手順書に変
156 更管理システムを定め、あらかじめ特定した変動要因の変更に

157 あたっては、変動要因やその許容条件が引続き目的とする品質
158 に適合する医薬品を恒常的に保証することが妥当であることを
159 検証しなければならない。また、バリデートされた滅菌工程で
160 の変更を実施するに先立ち、適切な責任組織より当該変更の実
161 施についての承認を受ける必要がある。
162 6. 出荷手順
163 最終滅菌製品のパラメトリックリリースによる出荷に必要な
164 条件を明記した出荷手順書を作成すること。出荷にあたって評
165 価すべき記録としては、以下のものが含まれる。
166 なお、滅菌法によっては、これらの項目の一部を省略又は緩
167 和できる。
168 a) バッチ記録
169 b) 製造環境の微生物評価データ
170 c) 原料、滅菌前製品のバイオバーデンデータ
171 d) 滅菌指標体に関するデータ
172 e) 滅菌工程及び滅菌工程を支援するシステムの維持管理に
173 関するデータ
174 f) 滅菌パラメーターの管理に関するデータ
175 g) 計器の校正に関するデータ
176 h) 再バリデーションデータ
177 i) その他
178 7. 重要管理項目
179 各滅菌法における重要管理項目を示す。
180 7.1. 高圧蒸気滅菌
181 高圧蒸気滅菌は、滅菌チャンパー内で適当な温度及び圧力ま
182 で飽和水蒸気を発生、又は導入し、所定の時間加熱することに
183 より、微生物を殺滅する方法で、被滅菌物へ直接飽和蒸気を暴
184 露させる飽和蒸気滅菌と、アンブルなどの容器内の液体に外部
185 より湿熱エネルギー又は高周波エネルギーを当てる非飽和蒸気
186 滅菌に大別される。
187 7.1.1. 重要管理項目
188 医薬品の滅菌にかかわる品質に影響を及ぼす工程パラメータ
189 ーを特定し、それぞれのパラメーターの許容変動域を規定した
190 工程管理手順書を作成すること。高圧蒸気滅菌における重要管
191 理項目を以下に示す。
192 a) 熱履歴(通例、 F_0 値で表示)
193 b) 温度
194 c) 圧力
195 d) 時間
196 e) 製品の載荷形態/載荷密度
197 f) その他、必要な事項
198 7.1.2. ユーティリティ
199 高圧蒸気滅菌に必要なユーティリティ及び制御装置について
200 は、その品質及び精度を定めること。
201 a) 使用する蒸気の品質
202 b) 滅菌器の中に圧戻しなどのため導入する空気品質
203 c) 冷却のため用いる水の品質
204 d) 温度制御装置の精度
205 e) 圧力制御装置の精度
206 f) 時間制御装置の精度
207 g) その他
208 7.2. 酸化エチレンガス滅菌
209 酸化エチレンガスは、低温下での滅菌が可能で、一般に被滅
210 菌物を損傷することは少ないが、毒性を有するためその取扱い

211 には細心の注意が必要である。滅菌工程はプレコンディショニング、滅菌サイクル及びエアレーションからなる。プレコンディショニングとは、滅菌サイクルに先立ち、部屋又は容器内において温度及び相対湿度を仕様の範囲に達するように製品を処理する工程をいい、滅菌サイクルは、実際の滅菌工程を指し、空気除去、コンディショニング(使用する場合)、滅菌ガスの注入、滅菌状態の維持、滅菌ガスの除去、空気置換からなる。エアレーションとは、滅菌器内又は別の場所で残留酸化エチレンガスを除去する工程をいう。

220 7.2.1. 重要管理項目

221 酸化エチレンガス滅菌における重要管理項目を以下に示す。

222 7.2.1.1. プレコンディショニング(行う場合)

- 223 a) 時間, 温度, 湿度
- 224 b) 製品の載荷形態/載荷密度
- 225 c) 滅菌載荷の温度及び/又は湿度
- 226 d) プレコンディショニング終了から滅菌開始までの時間
- 227 e) その他, 必要な事項

228 7.2.1.2. コンディショニング

- 229 a) 減圧を行うならば, 到達圧と所要時間
- 230 b) 減圧保持時間
- 231 c) 時間, 温度, 圧力, 湿度
- 232 d) 滅菌載荷の温度と湿度
- 233 e) その他, 必要な事項

234 7.2.1.3. 滅菌サイクル

- 235 a) 滅菌ガス導入による圧力上昇, 導入時間, 最終圧力
- 236 b) 酸化エチレンガス濃度(滅菌器内ガス濃度の直接分析が望ましいが, 困難な場合には以下の方法も許容される)
 - 238 i) 使用するガスの質量
 - 239 ii) 使用するガスの容積
 - 240 iii) 初期減圧度とガス投入圧からの換算式採用
- 241 c) 滅菌器内の温度
- 242 d) 滅菌載荷物の温度
- 243 e) 作用時間(曝露時間)
- 244 f) 製品の載荷形態/載荷密度
- 245 g) BIの設置点及び培養結果
- 246 h) その他, 必要な事項

247 7.2.1.4. エアレーション

- 248 a) 時間, 温度
- 249 b) 載荷滅菌物の温度
- 250 c) 滅菌容器及び/又はエアレーション室内の圧力変化
- 251 d) エアレーション室内の空気又は他のガスの変化率
- 252 e) その他, 必要な事項

253 7.2.2. ユーティリティ

254 酸化エチレンガス滅菌に必要なユーティリティ及び制御装置
255 については, その品質及び精度を定めること。

- 256 a) 酸化エチレンガスの品質
- 257 b) 注入する蒸気又は水の品質
- 258 c) 滅菌終了後, 置換する空気の品質
- 259 d) BIの品質
- 260 e) 温度制御装置の精度
- 261 f) 圧力制御装置の精度
- 262 g) 湿度制御装置の精度
- 263 h) 時間制御装置の精度
- 264 i) その他

265 7.3. 放射線滅菌

266 放射線滅菌とは, 電離放射線の照射によって微生物を殺滅する
267 方法をいう。電離放射線には, ⁶⁰Coや¹³⁷Csなどの放射性同
268 位元素から放射されるガンマ(γ)線と電子加速器から発生する
269 電子線や制動放射線(X線)がある。γ線は二次的に発生する電
270 子で細胞を死滅させるのに対し, 電子線は電子加速器から直接
271 発生する電子で細胞を死滅させる。そのため, 一般に, 電子線
272 滅菌の処理時間はγ線滅菌に比べ短い, γ線に比べ透過力が
273 劣るため, 被滅菌物の密度や厚みを十分考慮する必要がある。
274 放射線滅菌の場合, 滅菌工程の管理手段は主として線量計
275 (dosimeter)を用いて被滅菌物への吸収線量の測定にあるので,
276 ドジメトリックリリースという。

277 7.3.1. 重要管理項目

278 放射線滅菌における重要管理項目を以下に示す。

279 7.3.1.1. γ線照射

- 280 a) 照射時間(タイマー設定又はコンベア速度)
- 281 b) 吸収線量
- 282 c) 製品の載荷形態
- 283 d) その他, 必要な事項

284 7.3.1.2. 電子線及びX線照射

- 285 a) 電子ビーム特性(平均電子ビーム電流, 電子エネルギー,
286 走査幅)
- 287 b) コンベア速度
- 288 c) 吸収線量
- 289 d) 製品の載荷形態
- 290 e) その他, 必要な事項

291 7.3.2. ユーティリティ

292 照射装置及び線量測定システムは, 国家標準にトレーサブル
293 な校正を行い, 精度限界内に維持されていることを確認するた
294 めに計画的に校正を行うこと。

295 7.3.2.1. γ線照射施設において校正の必要な項目

- 296 a) サイクル時間又はコンベア速度
- 297 b) 質量計
- 298 c) 線量測定システム
- 299 d) その他

300 7.3.2.2. 電子線及びX線照射施設において校正の必要な項目

- 301 a) 電子ビーム特性
- 302 b) コンベア速度
- 303 c) 質量計
- 304 d) 線量測定システム
- 305 e) その他

307 参考資料

- 308 1) バリデーション基準について, 薬発第158号, 厚生省,
309 1995年
- 310 2) 滅菌バリデーション基準について, 医薬監第1号通知,
311 厚生省, 1997年
- 312 3) 医療用具の品質確保基準, 薬発第1128号, 厚生省,
313 1994年
- 314 4) ISO 9000 Series(品質保証の国際規格)
- 315 5) ISO 11134(工業用高圧蒸気滅菌)
- 316 6) ISO 11135(エチレンオキシド滅菌)
- 317 7) ISO 11137(放射線滅菌)

4 最終滅菌医薬品の無菌性保証

- 318 8) ISO 11138(バイオロジカルインジケータ)
- 319 9) ISO 11140(ケミカルインジケータ)
- 320 10) ISO 11737-1(微生物試験法-バイオバーデン試験法)
- 321 11) USP <1222> Terminally Sterilized Pharmaceutical
- 322 Products-Parametric Release

1 最終滅菌法及び滅菌指標体

2 滅菌とは、物質中のすべての微生物を殺滅又は除去すること
3 である。これには、最終滅菌法とろ過法がある。最終滅菌法が
4 適用可能な製品には、加熱法、照射法又はガス法の中から各滅
5 菌法の長所・短所を十分理解した上で、被滅菌物の性質及び包
6 装を含む製品の適合性に於いて、適当な滅菌法を選択する。滅
7 菌装置据付け(滅菌工程の設計・開発を含む)後、その工程が科
8 学的根拠や妥当性をもって設計どおりに正しく稼働しているか
9 どうかを空荷時及び被滅菌物負荷時において検証しなければなら
10 ない。滅菌工程の確立後、その工程を正しく管理し、定期的
11 に装置類の適格性を証明しなければならない。

12 最終滅菌法を適用するにあたっては、被滅菌物のバイオバー
13 デンを定期的又は一定滅菌単位ごとに測定し、被滅菌物当たり
14 のバイオバーデンを把握しておかなければならない。バイオバ
15 ーデンの測定法などについては、ISO基準(ISO 11737-1)を参
16 照すること。最終滅菌法を適用できる製品には、通例、 10^{-6} 以
17 下の無菌性保証水準が得られる条件で滅菌を行う。滅菌の適否
18 は、適切な滅菌工程管理を行い、次いでそれぞれの滅菌法に適
19 した適切な滅菌指標体を使用し、必要に応じて無菌試験の結果
20 によって判定する。最終滅菌法を適用できない液状製品の滅菌
21 には、ろ過法を用いる。なお、医薬品の製造機器及び製造環境
22 並びに医薬品各条に規定された微生物関連試験法などを実施す
23 る際に必要な微生物の殺滅方法については、「微生物殺滅法」
24 を参照すること。

25 1. 定義

26 本法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。

27 (i) 最終滅菌法：被滅菌物が最終容器又は包装におさまった
28 状態で滅菌され、滅菌後の微生物の死滅を定量的に測定又は推
29 測できる滅菌法をいう。

30 (ii) 製品：製造の中間工程で造られるものであって、以後の
31 製造工程を経ることによって最終製品となるものを含む被滅菌
32 物をいう。

33 (iii) バイオバーデン：被滅菌物に生存する微生物の数と種類
34 をいう。

35 (iv) 無菌性保証水準：適切な滅菌工程で処理された滅菌製品
36 中に存在が推定される汚染菌の最大生存確率をいう。 10^{-6} で表
37 される。

38 (v) 完全性試験：細菌チャレンジ試験によって測定されるフ
39 イルターのろ過滅菌性能を非破壊的な方法で予測する方法をい
40 う。

41 (vi) D値：微生物の死滅率を表す値で、供試微生物の90%を
42 死滅させ、生存率を $1/10$ に低下させるのに要する時間
43 (Decimal Reduction Time)又は $1/10$ に低下させるのに要する
44 線量(Decimal Reduction Dose)をいう。

45 (vii) 滅菌指標体：滅菌工程の管理又は滅菌の指標として使用
46 されるもので、バイオリジカルインジケータ(BI: Biological
47 indicator)、ケミカルインジケータ(CI: Chemical
48 indicator)及び線量計などがある。

49 2. 最終滅菌法

50 2.1. 加熱法

51 加熱法とは、熱によって微生物を殺滅する方法をいう。

52 2.1.1. 高圧蒸気法

53 高圧飽和水蒸気中で微生物を殺滅する方法をいう。本法は、
54 滅菌に影響を及ぼす要因として温度、水蒸気圧及び時間がある。
55 したがって、通常の滅菌工程管理においては、温度、水蒸気圧
56 及び時間を常時モニターすべきであり、滅菌装置の仕様として
57 含まれていなければならない。

58 2.1.2. 乾熱法

59 加熱乾燥気体で微生物を殺滅する方法をいう。通例、パッチ
60 式乾熱滅菌器又は連続式乾熱滅菌器が用いられる。本法は、滅
61 菌に影響を及ぼす要因として温度及び時間がある。したがって、
62 通常の滅菌工程管理においては、温度及び時間を常時モニター
63 すべきであり、滅菌装置の仕様として含まれていなければなら
64 ない。

65 2.2. 照射法

66 電離放射線の照射によって微生物を直接的に殺滅する放射線
67 法と、高周波の照射によって発生する熱で微生物を殺滅する高
68 周波法がある。

69 2.2.1. 放射線法

70 電離放射線には、 ^{60}Co などの放射性同位元素から放射される
71 ガンマ(γ)線と電子加速器から発生する電子線や制動放射線(X
72 線)がある。本法は、熱に不安定な製品にも適用できるが、品
73 質変化を考慮する必要がある。滅菌線量は、従来25kGyが広
74 く用いられているが、被滅菌物のバイオバーデン数を測定し、
75 平均バイオバーデン数と標準抵抗力分布を基に滅菌線量を算出
76 するISO基準(ISO 11137)の方法1、バイオバーデン数を測定し
77 ないで、累加線量照射ごとの無菌試験結果から生残する微生物
78 の抵抗力を求め、滅菌線量を算出するISO基準(ISO 11137)の
79 方法2及びバイオバーデン数と最も抵抗力の強い菌のD値を基
80 に滅菌線量を算出するLog法(5.3項参照)などがある。本法は、
81 滅菌に影響を及ぼす要因として線量(吸収線量)がある。したが
82 って、 γ 線滅菌の工程管理においては、適切な頻度で線量(吸
83 収線量)測定のほか、操作因子である照射時間(コンベア速度、
84 サイクルタイム)を常時モニターすべきであり、滅菌装置の仕
85 様として線量制御機構が含まれていなければならない。電子線
86 滅菌又は制動放射線滅菌の場合は、上記のほかに加圧電圧、ビ
87 ーム電流及びビーム走査幅のモニターが必要である。

88 2.2.2. 高周波法

89 高周波を直接照射し、発生する熱によって微生物を殺滅する
90 方法をいう。通例、2450±50MHzの高周波が用いられる。本
91 法は、密封容器に充てんされた液状又は水分含量の多い製品に
92 適用される。ガラス製又はプラスチック製容器にあつては、容
93 器内の内圧の上昇によって破損したり、変形することがあるの
94 で、熱及び内圧に耐えられる容器を使用する必要がある。高周
95 波法において発生する電波漏洩については、人体や通信などに
96 影響のないレベルにしなければならない。本法は、滅菌に影響
97 を及ぼす要因として被滅菌物の温度、処理時間及び高周波出力
98 がある。したがって、通常の滅菌工程管理においては、温度、
99 時間及び高周波出力を常時モニターすべきであり、滅菌装置の
100 仕様として含まれていなければならない。

101 2.3. ガス法

102 滅菌ガスとしては、酸化エチレン(EO)ガスが広く用いられ
103 ている。EOガスは、爆発性があるため、通例、二酸化炭素な
104 どで10~30%に希釈して用いられる。EOガスは、反応性の強
105 いアルキル化剤であるので、EOガスと反応又はEOガスを吸収

2 最終滅菌法及び滅菌指標体

106 しやすい製品の滅菌には適用できない。また、EOガスは、変
107 異原性などの残留毒性があるので、EOガス滅菌を施した製品
108 については、出荷までにエアレーションなどにより残留EOガ
109 スや他の二次生成有毒ガス濃度を安全レベル以下に下げる必要
110 がある。本法は、滅菌に影響を及ぼす要因として温度、湿度、
111 ガス濃度(圧力)及び時間がある。したがって、通常の滅菌工程
112 管理においては、温度、湿度、ガス濃度(圧力)及び時間を常時
113 モニターすべきであり、滅菌装置の仕様として含まれていな
114 ければならない。

115 3. ろ過法

116 適切な材質の滅菌用フィルターを用い、微生物を除去する方
117 法をいう。なお、細菌より小さい微生物のろ過滅菌は本法の対
118 象とはしない。一般に、滅菌を目的とした滅菌用フィルターは、
119 膜の有効ろ過面積(cm²)当たり、適切な条件下で培養された指
120 標菌 *Brevundimonas diminuta*(ATCC 19146, NBRC 14213,
121 JCM 2428)又はこれより小さな適当な菌を10⁷個以上をチャレ
122 ンジして、二次側に無菌ろ液の得られることが必要である。本
123 法は、滅菌に影響を及ぼす要因として、ろ過圧力、流量及びフ
124 イルターユニットの特性などがある。したがって、通常のろ過
125 滅菌工程管理においては、使用後(必要に応じて使用前にも)に
126 滅菌フィルターの完全性試験を行わなければならない。

127 4. 滅菌指標体

128 4.1. バイオロジカルインジケーター(BI)

129 BIとは、特定の滅菌法に対して強い抵抗性を示す指標菌を
130 用いて作られたものであり、当該滅菌法の滅菌条件の決定及び
131 滅菌工程管理に使用される。ドライタイプのBIは、担体によ
132 って2種類に分類される。一つは、ろ紙、ガラス又はプラスチ
133 ックなどを担体とし、指標菌の芽胞を塗布乾燥して包装したも
134 の、一つは、製品又は類似品を担体とし、指標菌の芽胞を塗布
135 乾燥したものである。包装材としては、乾熱法では熱伝導性の
136 優れたもの、ガス法と高圧蒸気法では、ガス又は飽和水蒸気の
137 透過性の優れたものを用いなければならない。いずれの担体を
138 用いる場合にも、指標菌の芽胞のD値に影響がないことを確認
139 しなければならない。製品が液状の場合、製品と同一の溶液又
140 は指標菌に対する滅菌効果が同等の溶液に指標菌の芽胞を懸濁
141 させてもよい。ただし、溶液に指標菌の芽胞を懸濁させた場合、
142 芽胞が発芽して抵抗性に影響を及ぼさないようにしなければな
143 らない。

144 代表的な指標菌の例を表1に示す。

表1 代表的な指標菌の種類

滅菌法	指標菌*	株名
高圧蒸気法	<i>Geobacillus</i>	ATCC 7958, NBRC 13737,
	<i>stearothermophilus</i>	JCM 9488, ATCC 12980, NBRC 12550, JCM 2501
乾熱法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721
ガス法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721

* これら以外にもバイオバーデンの中から当該滅菌法に対し、最も抵抗性の強い菌を指標菌として使用できる。

145 4.1.1. BIのD値

146 D値の測定法は、一般に生残曲線法又はフラクションネガテ
147 イブ法(Stumbo, Murphy & Cochran法やLimited Spearman-
148 Karber法など)がある。市販BIを使用するにあたっては、ラベ
149 ルに表示されているD値がISO基準(ISO 11138-1)に従って、
150 厳密に規定された条件下で、標準化された生物指標評価装置

151 (BIER: Biological indicator evaluation resistometer)を用い
152 て測定されたものであれば、通常、使用時にD値を測定する必
153 要はない。通例、ラベルに表示されているD値は、±30秒間以
154 内のばらつきが許容される。

155 4.1.2. BIの設置方法

156 4.1.2.1. 被滅菌物がドライタイプの場合

157 ドライタイプのBIをあらかじめ決められた製品又は製品と
158 同等の滅菌効果を示す適切な類似製品内の最も滅菌されにくい
159 部位に設置する。通例、製品と同様に包装し、二次包装などが
160 なされている場合はそれに従う。

161 4.1.2.2. 被滅菌物がウエットタイプの場合

162 製品と同一の溶液又は適切な類似溶液に指標菌の芽胞をBI
163 として懸濁させ、これを最も滅菌されにくい部位に設置する。

164 4.1.3. 指標菌の培養条件

165 通常、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を用いる。
166 一般的な培養条件は、*G. stearothermophilus*の場合は55~
167 60°Cで7日間、*B. atrophaeus*は30~35°Cで7日間である。

168 4.2. ケミカルインジケーター(CI)

169 CIとは、熱、ガス又は照射の作用を化学又は物理変化によ
170 って変色する物質を塗布又は印刷した紙片などで、用途別に3
171 種類のタイプに分類される。一つは、滅菌処理の有無を区別す
172 るために用いられるもの、一つは、BIの死滅条件にある程度
173 の安全時間を加えた滅菌条件で色が変化する滅菌工程の管理に
174 用いるもの、もう一つは、真空型滅菌装置の真空排気能力試験
175 を行う場合に用いるBowie & Dickタイプのものである。

176 4.3. 線量計

177 放射(γ)線法においては、滅菌効果は被滅菌物の吸収線量に
178 依存するので、滅菌工程の管理手段は、主として吸収線量の測
179 定による。線量計の設置位置は、照射容器の最低線量部位又は
180 最低線量部位に対して量的関係が明らかにされている管理しや
181 すい部位とする。測定は、照射ロットごととし、同一ロットを
182 形成する照射容器数が多い場合には、照射室内の有効照射区
183 内に常に1個以上の線量計を使用する。線量計によっては、照
184 射の前後及び照射中の環境条件(温度、湿度、紫外線及び読取
185 りまでの時間など)に影響される場合もあるので注意を要する。
186 γ線及び制御放射線滅菌の吸収線量を測定する実用線量計と
187 しては、着色ポリメチルメタクリレート線量計、透明ポリメチル
188 メタクリレート線量計、セリックス線量計及びアラニン線
189 量計などがある。γ線滅菌用線量計は、通例、エネルギー
190 3MeV未満の電子線を用いる滅菌の工程管理には適さない。電
191 子線滅菌用線量計としては、セルロースアセテート線量計やラ
192 ジオクロミックフィルム線量計などがある。実用線量計を使用
193 する場合は、適切な国家標準又は国際標準線量計システムを
194 用いた測定結果に遡及できる校正をしなければならない。

195 5. 微生物を指標とした滅菌条件の設定法

196 被滅菌物の滅菌法に対する特性、バイオバーデンなどを考慮
197 に入れ、以下の中から適当な方法を選び、滅菌条件を設定する。

198 5.1. ハーフサイクル法

199 被滅菌物上に存在するバイオバーデン数や検出菌の当該滅菌
200 法に対する抵抗性とは関係なく、BIに含まれる10⁶個の指標菌
201 のすべてが死滅する処理時間の2倍の滅菌時間を採用する方
202 法をいう。

203 5.2. オーバーキル法

204 被滅菌物上に存在するバイオバーデン数や検出菌の当該滅菌

3 最終滅菌法及び滅菌指標体

205 法に対する抵抗性とは関係なく、 10^{-6} 以下の無菌性保証水準が
206 得られる条件で滅菌を行うことを前提としている。通例、D値
207 が1.0以上の菌数既知のBIを用い、指標菌を12べき乗(12D)滅
208 少させるに等しい滅菌条件を採用する方法をいう。

209 5.3. BIとバイオバーデン併用法

210 広範なバイオバーデン調査によって得られた平均バイオバー
211 デン数に3倍の標準偏差を加えたものを、通例、最大バイオバ
212 ーデン数とみなし、目標とする無菌保証水準を基に、BIを用
213 いて滅菌時間(又は滅菌線量)を算出する方法をいう。本法を用
214 いる場合は、被滅菌物のバイオバーデン数を頻繁に調査し、検
215 出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定も定期的実施する必要
216 がある。バイオバーデン調査において、BIの指標菌より抵抗
217 性の強い菌種が検出された場合には、それを指標菌とする。

$$218 \text{ 滅菌時間(又は滅菌線量)} = D \times \log \frac{N_0}{N}$$

219 D : BIのD値

220 N : 目的とする無菌性保証水準

221 N_0 : 被滅菌物の最大バイオバーデン数

222 5.4. 絶対バイオバーデン法

223 被滅菌物や製造環境から検出された菌について、当該滅菌法
224 に対する抵抗性調査を行い、その中から最も抵抗性の強い菌を
225 選び、そのD値を用い、被滅菌物のバイオバーデン数を基に滅
226 菌条件を設定する方法をいう。バイオバーデン数は、通例、広
227 範なバイオバーデン調査によって得られた平均バイオバーデン
228 数に3倍の標準偏差を加えたものが用いられる。本法を採用す
229 る場合には、日常のバイオバーデン管理において、菌数計測及
230 び検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定を頻繁に行う必要が
231 ある。

232 6. 参考資料

233 医療製品の滅菌に関する主なISO基準

234 (i) ISO 11134 Industrial moist heat sterilization(工業用高
235 圧蒸気滅菌)

236 (ii) ISO 11135 Ethylene oxide sterilization(エチレンオキサ
237 イド滅菌)

238 (iii) ISO 11137 Radiation sterilization(放射線滅菌)

239 (iv) ISO 11138 Biological indicators(バイオロジカルインジ
240 ケーター)

241 (v) ISO 11140 Chemical indicators(ケミカルインジケー
242 ー)

243 (vi) ISO 11737 Microbiological methods(微生物試験法)

244 Part1: Estimation of population of microorganisms on
245 products(パート1: バイオバーデン試験法)

1 培地充てん試験（プロセスシミュレーション）

1 培地充てん試験（プロセスシミュレーション）

3 本法は、無菌操作法で製造される医薬品の無菌性保証の適切
4 性を充てん医薬品の代わりに無菌培地などを用いて検証するプ
5 ロセスバリデーションの一種である。したがって、充てん・
6 閉塞工程、作業環境、作業操作、作業従事者などについては、
7 実製品の製造工程を用い、かつ最悪ケースを想定したものでな
8 ければならない。また本法は、充てん・閉塞工程以外の無菌操
9 作工程の無菌性検証にも適用可能である。

10 1. 培地充てん試験の実施頻度

11 1.1. 初期評価

12 初期評価の対象は、それぞれ初めて使用する設備、装置、工
13 程及び異なった容器デザイン(同じ容器デザインでサイズの異
14 なるものは除く)などである。表1を参考に、それぞれの充てん
15 ラインでの実製造を反映できる十分な個数の容器を用い、培地
16 充てん試験を少なくとも連続3回、別々の日に実施する。

17 1.2. 再評価

18 1) 表2を参考に、それぞれの充てんラインでの実製造を反
19 映できる十分な個数の容器を用い、それぞれの充てんラインの
20 各作業シフトについて少なくとも半年ごとに培地充てん試験を
21 実施する。無菌重要工程作業者は、無菌操作に関する教育訓練
22 を受け、少なくとも年1回の頻度で培地充てん試験に参加する
23 ことが必要である。

24 2) 充てんラインを6箇月以上使用しなかった場合は、その
25 充てんラインを再使用する前に初期評価に準じる回数の培地充
26 てん試験を実施する。

27 3) 無菌性保証に影響を与える工程、設備又は装置の変更
28 (標準部品の交換は再評価の対象にならない)、ラインの配置変
29 更、無菌重要工程作業者の変更(例えば、作業者の大きな変更)、
30 環境微生物試験結果の異常、最終製品の無菌試験で汚染製品が
31 認められた場合には、必要に応じて初期評価に準じる回数の培
32 地充てん試験を実施する。

33 2. 培地充てん試験の許容基準

34 初期評価及び再評価において、充てん容器数に関係なく汚染
35 容器数はゼロとする。汚染が認められた場合には、表1及び表
36 2に示した行動をとる。

37 2.1. 汚染原因の調査

38 培地充てん試験において、汚染原因の調査を行うにあたって、
39 必要な評価対象要因としては以下のものが含まれる。

- 40 1) 環境微生物モニタリングデータ
- 41 2) 環境微粒子モニタリングデータ
- 42 3) 作業従事者の微生物モニタリングデータ(作業終了時、
43 無塵衣や手袋表面などに付着している微生物のモニタリング)
- 44 4) 培地、器材、装置等の滅菌サイクルデータ
- 45 5) 滅菌装置のキャリブレーションデータ
- 46 6) 滅菌機材の保存状態の適切性
- 47 7) HEPAフィルターの評価(微粒子の捕捉性能、流速など)
- 48 8) 使用前及び使用後のフィルター完全性試験結果(フィル
49 ターハウジング組立ての適切性も含む)
- 50 9) 無菌エリアでの空気の流れと圧力の適切性
- 51 10) 培地充てん試験中に起こった通常と異なった出来事
- 52 11) 汚染微生物の諸性状検査結果

- 53 12) 衛生管理方法とそのトレーニング内容の適切性
- 54 13) 作業従事者のガウニングとそのトレーニング内容の適
55 切性
- 56 14) 作業従事者の無菌操作技術とそのトレーニング内容の
57 適切性
- 58 15) 作業従事者の健康状態(特に、呼吸器系疾患による咳や
59 くしゃみなどの影響)
- 60 16) その他、無菌性に影響を及ぼす要因

61 3. 培地充てん試験におけるデータ管理

62 それぞれの培地充てん試験において、下記の事項を詳細なデ
63 ータとして記録する。

- 64 1) 試験実施日時
- 65 2) 試験実施充てん室、充てんラインの識別
- 66 3) 容器、栓の種類とサイズ
- 67 4) 充てん容量
- 68 5) 充てん速度
- 69 6) 滅菌フィルターの形式と完全性試験成績(ろ過滅菌した
70 場合)
- 71 7) 充てん培地の種類
- 72 8) 充てん容器数
- 73 9) 培養しなかった充てん容器数とその理由
- 74 10) 培養容器数
- 75 11) 陽性容器数
- 76 12) 培養温度と培養期間
- 77 13) 実際の製造工程のあるステップを模倣するために使わ
78 れた方法(例えば、模擬凍結乾燥、又はバイアルガス置換など)
- 79 14) 培地充てん試験開始前及び試験実施中に得られた微生
80 物学的モニタリングデータ
- 81 15) 培地充てん試験参加者リスト
- 82 16) 充てん培地の性能試験結果(粉末充てんの場合は、微生
83 物発育阻止活性の試験成績も必要)
- 84 17) 陽性容器から検出された微生物の同定及び性状検査結
85 果
- 86 18) 当該培地充てん試験でカバーする医薬品リスト
- 87 19) 汚染容器の認められた又は失敗に帰した培地充てん試
88 験の原因調査
- 89 20) 総合評価

90 4. 培地充てん試験の方法

91 液状製品、粉末製品及び凍結乾燥製品の無菌製造工程を検証
92 する方法について示す。基本的には、液状製品に対する培地充
93 てん試験を応用することによって、他の剤形の医薬品の無菌性
94 検証が可能である。

95 4.1. 培地の選択と性能試験

96 ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地、又は適当な他の
97 培地を使用する。微生物限度試験法(4.05)に規定されている
98 培養条件で、指定菌株及び必要に応じて環境モニタリングで検
99 出頻度の高い代表菌1~2株を培養したとき、各菌が明らかな
100 増殖を示さなければならない。

101 4.2. 培地の滅菌

102 あらかじめバリデーションの行われた方法に従って滅菌する。

103 4.3. 培養及び観察

104 培養に先立ち、容器に漏れが認められたもの、又は損傷した
105 ものを除去し、記録にとどめる。20~35℃で14日間以上培養
106 する。これ以外の温度で培養する場合には、その妥当性を示す

2 培地充てん試験（プロセスシミュレーション）

107 こと。異なる二つの温度で培養する場合には、低い温度で7日
 108 間以上、次いで高い温度で7日間以上培養する。設定培養温度
 109 は、±2.5℃以内で維持すること。培養最終日に菌の発育の有
 110 無を観察する。汚染が認められた容器については、汚染菌の同
 111 定及び性状検査を実施する。汚染菌の同定には、参考情報「遺
 112 伝子解析による微生物の迅速同定法」や適切な市販の微生物同
 113 定システムなどが適用できる。

114 A. 液状製品

115 培地充てん手順

116 施設、装置等の清掃は通常どおりに行い、容器、栓、充てん
 117 装置部品、トレイなどは標準操作手順書に従って洗浄、滅菌す
 118 る。培地充てん試験は、最悪ケース(例えば、打栓ラインの修
 119 正、充てん針/チューブの修理又は交換、充てんラインのフィ
 120 ルター交換等の介入作業、最長製造時間、最大バッチサイズ、
 121 最多作業員数など)を考慮に入れ、実施する。ただし、1回の培
 122 地充てん試験に想定しうるすべての最悪ケースを組み入れる必
 123 要はないが、計画的にすべての最悪ケースを評価する。多くの
 124 製造ラインは高度に自動化されており、比較的高速で稼働し、
 125 作業員の介入も限定するように設計されている一方、かなりの
 126 頻度で作業員が介入するラインもある。実際の製造におけるバ
 127 ッチサイズを用い、実際の工程時間で充てんするのが最も正確
 128 なプロセスシミュレーションになるが、これ以外の適切なバッ
 129 チサイズと充てん時間でも、当該ラインの無菌性を正当に評価
 130 することはできる。滅菌容器に適量の培地を製品の開放時間を
 131 考慮した充てん速度で充てんし、閉塞する。適当な方法で培地
 132 を容器の内表面全体に接触させ、あらかじめ定めた温度で培養
 133 する。

134 B. 粉末製品

135 B.1. 充てん粉末の選択と微生物発育阻止活性試験

136 実製品又はプラセボ粉末を用いる。プラセボ粉末としては、
 137 一般に乳糖、D-マンニトール、ポリエチレングリコール6000、
 138 カルボキシルメチルセルロース塩、粉末培地などを用いる。あ
 139 らかじめ、充てん粉末が微生物に対して発育阻止活性を有する
 140 かどうか調べなければならない。粉末培地は水で、他の滅菌粉
 141 末は培地で培地充てん試験濃度に希釈し、4.1.項に定める培地
 142 性能試験用各菌を1培地当たり100CFU未満接種する。あらか
 143 じめ定めた温度で5日間培養したとき、明らかな増殖が認めら
 144 れれば、充てん粉末には微生物発育阻止活性がないものとみな
 145 し、本試験に使用できる。

146 B.2. 充てん粉末の滅菌法

147 プラセボ粉末を適当な容器(例えば、二重に熱シールされた
 148 ポリエチレン袋)に入れ、放射線滅菌を行う。

149 B.3. 充てん粉末の無菌性確認

150 無菌試験法に従い無菌試験を行うとき、適合しなければなら
 151 ない。ただし、用いた滅菌法のバリデーションが行われている
 152 場合には、無菌試験を省略することができる。

153 B.4. 培地充てん手順

154 下記の中から適当なものを選ぶ。

155 1) 適当な方法で容器に滅菌液体培地を充てん後、粉末充て
 156 ん機を用い、実製品又は滅菌プラセボ粉末を充てんする。プラ
 157 セボ粉末として滅菌粉末培地を用いる場合は、滅菌液体培地の
 158 代わりに滅菌した精製水を充てんする。

159 2) 液体培地を容器に充てん後、高圧蒸気滅菌する。この容
 160 器を充てんエリアに移動し、粉末充てん機を用いて実製品又は

161 滅菌プラセボ粉末を充てんする。

162 3) 粉末充てん機を用い、容器に実製品又は滅菌プラセボ粉
 163 末を充てん後、適当な方法で滅菌液体培地を充てんする。プラ
 164 セボ粉末として滅菌粉末培地を用いた場合は、滅菌液体培地の
 165 代わりに滅菌した精製水を充てんする。

166 C. 凍結乾燥製品

167 凍結乾燥製品の場合、培地充てん試験を凍結乾燥製品の実製
 168 造工程と全く同じ条件下で行うことはできない。凍結及び乾燥
 169 を行うと、汚染菌を死滅させる可能性がある上、培地の特性も
 170 変えてしまう。また、復圧ガスとして不活性ガスを使用すると、
 171 好気性菌や真菌の発育を阻害する可能性がある。そのため、通
 172 常、凍結及び乾燥を避け、復圧ガスとしては空気が用いられる。
 173 ただし、嫌気条件下で製造される医薬品には、嫌気性菌用培地
 174 を用いて培地充てん試験を実施する場合もある。その場合には、
 175 復圧ガスとしては窒素ガスなどを用いる。

176 培地充てん手順

177 下記の方法によるか、又はこれに相当する方法を用いる。

- 178 1) 製品充てん機を用い、容器に培地を充てん後、半打栓状
 179 態にし、滅菌トレイに集める。
- 180 2) トレイを凍結乾燥機にセット後、扉を閉め、製造工程に
 181 準じて凍結乾燥の操作を行う。ただし、凍結は行わず、充てん
 182 液が突沸しないような減圧下に適当な時間保持する。
- 183 3) 減圧保持完了後、復圧し、打栓する。
- 184 4) 適当な方法で培地を内表面全体に接触させ、あらかじめ
 185 定めた温度で培養する。

表1 初期評価

最少試験回数	1回当たりの最少充てん容器数	3回の培地充てん試験における汚染容器総数	必要な行動
3	<5000	≥1	汚染原因の調査、是正処置、初期評価を繰り返す
3	5000~10000	1	汚染原因の調査、培地充てん試験を1回繰り返すことを検討
		>1	汚染原因の調査、是正処置、初期評価を繰り返す
3	>10000	1	汚染原因の調査
		>1	汚染原因の調査、是正処置、初期評価を繰り返す

3 培地充てん試験（プロセスシミュレーション）

表2 定期的再評価

実施頻度	1回当たりの最少充てん容器数	汚染容器数	必要な行動
半年ごと	<5000	1	汚染原因の調査後、必要に応じて初期評価を実施
		1	汚染原因の調査、培地充てん試験を繰り返すことを検討する
	5000~10000	>1	汚染原因の調査、是正処置後、必要に応じて初期評価を実施
		1	汚染原因の調査
	>10000	1	汚染原因の調査
		>1	汚染原因の調査、是正処置後、必要に応じて初期評価を実施

187 参考資料

188 ISO13408-1(2008) : Aseptic processing of health care

189 products : Generals.

1 微生物殺滅法

1 微生物殺滅法

2 微生物殺滅法は、医薬品の製造機器及び製造環境並びに医薬
3 品各条に規定された、微生物関連試験法等を実施する際に必要
4 な微生物の殺滅方法について示すものであって、「最終滅菌法
5 及び滅菌指標体」に示す「最終滅菌法」及び「ろ過法」とは異
6 なる。したがって、本法を適用する目的によって、推測される
7 微生物殺滅効果又は無菌性保証水準は大きく異なり、消毒法及
8 び滅菌法における処理条件も一義的に規定することはできない。
9 一般に、本法を適用するものの性質及び汚染状態(汚染微生物
10 の種類及び汚染程度)に応じて、その適切な選択と操作及び条
11 件の適正化を検討してから、通例、次に示す方法を単独で又は
12 併用して行う。

13 ただし、本法を医薬品の製造工程に適用するにあたっては、
14 「最終滅菌法及び滅菌指標体」に準じる滅菌バリデーションが
15 必要である。

1. 消毒法

17 生存する微生物の数を減らすために用いられる処置法で、必
18 ずしも微生物をすべて殺滅したり除去するものではない。一般
19 に、消毒法は化学薬剤(消毒剤)を用いる化学的消毒法と湿熱や
20 紫外線などを用いる物理的消毒法に分けられる。

1.1. 化学的消毒法

22 化学薬剤を用いて微生物を殺滅する方法をいう。化学薬剤の
23 微生物を死滅させる機序及び効果は、使用する化学薬剤の種類、
24 濃度、作用温度、作用時間、消毒対象物の汚染度、微生物の種
25 類・状態(例えば、栄養型細菌及び芽胞細菌)などによって異な
26 る。本法を適用するにあたっては、調製化学薬剤の無菌性及び
27 有効貯蔵期間、適用箇所からの耐性菌出現の防止、残存化学薬
28 剤の製品に与える影響などについて注意を要する。化学薬剤を
29 選択するにあたっては、その使用目的によって以下に示すこと
30 を考慮に入れ、適切なものを選ぶ。

- 31 (i) 抗菌スペクトルの範囲
- 32 (ii) 微生物の死滅に要する作用時間
- 33 (iii) 作用の持続性
- 34 (iv) たん白質存在下での効果
- 35 (v) 人体に対する影響
- 36 (vi) 水に対する溶解性
- 37 (vii) 消毒対象物への影響
- 38 (viii) 臭気
- 39 (ix) 使用方法の簡便性
- 40 (x) 廃棄処理方法の容易性
- 41 (xi) 廃棄に伴う環境への影響
- 42 (xii) 耐性菌の出現頻度

1.2. 物理的消毒法

44 化学薬剤を用いないで微生物を殺滅する方法をいう。

45 (i) 流通蒸気法：加熱水蒸気を直接流通させることによって
46 微生物を殺滅する方法をいう。本法は、高圧蒸気法によって変
47 質するおそれのあるものに用いる。通例、当該物を100℃の流
48 通蒸気中に30～60分間放置する。

49 (ii) 煮沸法：沸騰水中に沈め、加熱することによって微生物
50 を殺滅する方法をいう。本法は、高圧蒸気法によって変質する
51 おそれのあるものに用いる。通例、当該物を沸騰水中に沈め、
52 15分間以上煮沸する。

53 (iii) 間けつ法：80～100℃の水中又は流通水蒸気中で一日一
54 回、30～60分間ずつ3～5回加熱を繰り返すことによって微生
55 物を殺滅する方法をいう。本法は、高圧蒸気法によって変質す
56 るおそれのあるものに用いる。なお、60～80℃で同様に加温
57 を繰り返す低温間けつ法もある。加熱又は加温の休止中は、
58 20℃以上の微生物の発育に適切な温度に保つこと。

59 (iv) 紫外線法：通例、254nm付近の波長を持つ紫外線を照射
60 することによって微生物を殺滅する方法をいう。本法は、比較
61 的平滑な物品表面、施設、設備又は水、空気などで、紫外線照
62 射に耐えるものに用いる。本法は、化学的消毒法で見られる耐
63 性菌出現の心配もなく、細菌、真菌及びウイルスに対して殺滅
64 効果を示すが、人体に対して直接照射すると目や皮膚に障害を
65 受けるので注意を要する。

2. 滅菌法

2.1. 加熱法

68 加熱法を行うとき、温度又は圧力などが規定の条件に至るま
69 での加熱時間は、本法が適用されるものの性質、容器の大きさ
70 及び収納状態などにより異なる。なお、本法を行う時間は、本
71 法が適用されるもののすべての部分が規定の温度に達してから
72 起算する。

73 (i) 高圧蒸気法：適当な温度及び圧力の飽和水蒸気中で加熱
74 することによって、微生物を殺滅する方法をいう。本法は、主
75 としてガラス製、磁製、金属製、ゴム製、プラスチック製、紙
76 製若しくは繊維製の物品、水、培地、試薬・試液又は液状の試
77 料などで、熱に安定なものに用いる。通例、高圧蒸気法の場合
78 は次の条件で滅菌を行う。

115～118℃	30分間
121～124℃	15分間
126～129℃	10分間

79 (ii) 乾熱法：乾熱空气中で加熱することによって微生物を殺
80 滅する方法をいう。本法は、主としてガラス製、磁製、金属製
81 の物品、鉱油、油脂類又は粉体の試料など、熱に安定なものに
82 用いる。ガス又は電気により直接加熱するか、加熱した空気を
83 循環させる方式などがある。通例、乾熱法の場合は、次の条件
84 で滅菌を行う。

160～170℃	120分間
170～180℃	60分間
180～190℃	30分間

2.2. 照射法

86 (i) 放射線法：放射性同位元素から放出するγ線又は電子加
87 速器から発生する電子線や制動放射線(X線)を照射することに
88 よって微生物を殺滅する方法をいう。本法は、主としてガラス
89 製、磁製、ゴム製、プラスチック製又は繊維製の物品などで、
90 放射線照射に耐えるものに用いる。本法が適用されるものの材
91 質、性状又は汚染状況などによって線量を調節して行うが、適
92 用後の品質の変化には特に注意する。

93 (ii) 高周波法：高周波を直接照射し、発生する熱によって微
94 生物を殺滅する方法をいう。本法は、主として水、培地又は試
95 液などで高周波の照射に耐えるものに用いる。通例、2450±
96 50MHzの高周波が用いられる。

2.3. ガス法

98 滅菌用ガスを用いて微生物を殺滅する方法をいう。滅菌用ガ
99 スとしては、酸化エチレンガス、ホルムアルデヒドガス、過酸
100 化水素ガス及び二酸化塩素ガスなどが用いられる。ガスの種類
101 によって、滅菌時の温度、湿度、ガス濃度、滅菌時間が異なり、

2 微生物殺滅法

102 更に人体に悪影響をもたらすものもあるので、使用環境及び残
103 留ガス濃度については厳重な注意が必要である。ガス法の中に
104 は、滅菌後の微生物の死滅を定量的に測定又は推測できないも
105 のもある。

106 2.4. ろ過法

107 適当なるろ過装置を用いてろ過し、微生物を除去する方法をい
108 う。本法は、主として気体、水又は可溶性で熱に不安定な物質
109 を含有する培地・試液などに用いる。通例、滅菌用フィルター
110 には孔径0.22 μm 以下のフィルターが用いられるが、本法にお
111 いては、孔径0.45 μm 以下のフィルターの使用も許容される。

1 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

1 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

2 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。
3 なお、三薬局方で調和されていない部分は「[◆]」で囲むことによ
4 り示す。

5 非無菌製剤における、ある特定微生物の存在は、製品の薬効
6 の減少あるいは失効につながる可能性があり、また、患者の健
7 康を損なう可能性もある。したがって、医薬品の製造業者は、
8 製造、貯蔵及び流通に際し、最新のガイドラインに従って
9 GMPを実施することにより、最終製品のバイオーバーデンを確
10 実に低くしなければならない。[◆]本指針は、非無菌医薬品(原料
11 及び製剤)中に存在する増殖能力を有する微生物(細菌及び真菌)
12 の限度の目安を基準値として示したものである。[◆]非無菌医薬
13 品の微生物試験は、微生物限度試験法〈4.05〉の「1.生菌数試
14 験」及び「2.特定微生物試験」に準拠して行う。[◆]非無菌医薬
15 品に対して生菌数試験及び特定微生物試験を実施するにあつ
16 ては、微生物管理計画を確立し、それを当該医薬品の品質保証
17 システムの重要な一部として位置づけなければならない。また、
18 試験実施者及び責任者は、微生物の取扱い技術、バイオセーフ
19 ティ対策及びデータ解釈について専門知識を有していなければ
20 ならない。[◆]

21 [◆]1. 定義

- 22 (i) 非無菌医薬品：日本薬局方の医薬品各条に記載されてい
23 るもので無菌でないもの及び最終製品で無菌でないもの。
- 24 (ii) 医薬品原料：原薬、添加剤を含む医薬品製造に用いるす
25 べての物質。ただし、医薬品製造用水及びガス類は除く。
- 26 (iii) バイオーバーデン：非無菌医薬品中に生存する微生物(細菌
27 及び真菌)の数と種類。
- 28 (iv) 処置基準値：直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置
29 をとらなければならないバイオーバーデンに対して設定した基準
30 値。
- 31 (v) 警報基準値：予知される問題点を早急に警告するものと
32 して、直ちに是正措置をとる必要はないが、調査は行う必要が
33 あるバイオーバーデンに対して設定した基準値。
- 34 (vi) 品質保証システム：品質管理を実施するために必要とな
35 る製造業者の組織構造(責任、権限及び相互関係)及び実施手順。

36 2. 試験の適用除外

37 生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、通例、生菌数試験
38 を適用しない。

39 3. 試料の採取方法及び試験の実施頻度

40 3.1. 試料の採取方法

41 一般に、非無菌医薬品や医薬品原料ロット中の微生物汚染は
42 均一でない。偏りのある試料採取方法では、正確なバイオー
43 デン値を推測できない場合もある。したがって、回顧的又は同
44 時的バリデーショんで得られたバイオーバーデンデータの解析に
45 基づいて、非無菌医薬品又は医薬品原料ロットを代表できる採
46 取方法を確立する必要がある。通例、同一製造番号の非無菌医
47 薬品又は医薬品原料の任意に選択した異なる数箇所(少なくと
48 も3箇所以上)から試料をほぼ同量ずつ採取し、それらを合わせ
49 たものを被験試料とする。

50 また、清浄度管理環境下での試料採取が困難な場合には、採
51 取環境や採取器材に注意を払い、採取した試料のバイオーバー

52 ンが不注意による汚染によって影響されないようにしなければ
53 ならない。乾燥又は非水性の非無菌医薬品や医薬品原料におい
54 ては、採取試料中のバイオーバーデンが変化しないことが確認さ
55 れている場合、本試験を試料採取直後に行う必要はない。

56 3.2. 試験の実施頻度

57 試験の実施頻度は、別に規定されている場合を除き、種々の
58 要因を考慮して設定しなければならない。これらの要因には次
59 のものがある。

- 60 (i) 非無菌医薬品の剤形(用法)
- 61 (ii) 製造方法
- 62 (iii) 製造頻度
- 63 (iv) 医薬品原料の特性(天然物より製したもので、化学合成で製
64 したもので)
- 65 (v) ロットサイズ
- 66 (vi) バイオーバーデン値のばらつき(ロット間、季節変動など)
- 67 (vii) バイオーバーデンに影響を及ぼす変更事項(製造工程の変更、
68 医薬品原料の入手先の変更、医薬品原料ロットの変更など)
- 69 (viii) そのほか

70 医薬品の製造初期段階においては、医薬品原料や当該医薬品
71 の微生物学的品質特性を把握するために、一般に高頻度に微生
72 物限度試験を行う必要がある。しかし、回顧的又は同時的バリ
73 デーションなどのデータを蓄積することによって、例えば、季
74 節ごと、一定期間ごと、数ロットごとなど、試験頻度を少なく
75 することができる。

76 4. 微生物管理計画書

77 非無菌医薬品に「4.05微生物限度試験法」を適用する場合に
78 は、当該医薬品からの微生物の回収法、培養法、計測法の妥当
79 性を検証した上で、次の事項を定めた微生物管理計画書を作成
80 しなければならない。

- 81 (i) 試験対象医薬品名(品目名)
- 82 (ii) 試料採取頻度及び試験実施頻度
- 83 (iii) 試料の採取方法(採取者、採取量、採取環境などを含む)
- 84 (iv) 採取試料の試験室への移動(試験実施までの保存条件を含
85 む)
- 86 (v) 試料の処理方法(微生物の回収方法)
- 87 (vi) 生菌数の測定方法(供試量、培地の種類、培地の性能試験、
88 培養方法などを含む)
- 89 (vii) 特定微生物の検出方法(供試量、培地の種類、培地の性能
90 試験、培養方法などを含む)
- 91 (viii) 生菌数の算出方法及び検出菌の性状検査
- 92 (ix) 微生物許容基準値(警報基準値、処置基準値)の設定
- 93 (x) 微生物許容基準値を超えた場合の対処方法
- 94 (xi) 試験実施者、試験責任者など
- 95 (xii) そのほかの必要な事項[◆]。

96 5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値

97 総好気性微生物数(Total Aerobic Microbial Count : TAMC)
98 及び総真菌数(Total Combined Yeasts / Moulds Count :
99 TYMC)に対する微生物許容基準値を設定する[◆]ことにより、医
100 薬品原料中の微生物学的品質が維持されているか又は悪化して
101 いるかを製造初期段階に判断することができる。また、必要に
102 応じて適切な是正措置をとることも可能となり、医薬品原料の
103 微生物学的品質の維持、改善に役立てることができる。[◆]

104 合成及び鉱物由来原料に対する微生物許容基準値は、別に規
105 定するもののほか、表1に従う。[◆]化学合成で製する医薬品原料

2 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

106 は製造工程において高温処理，有機溶媒処理などを行うことに
 107 より一般に低いバイオバーデン状態にあるが，植物や動物由来
 108 の医薬品原料は，一般に合成原料よりかなり高いバイオバーデ
 109 ン状態にある。

110 非無菌医薬品の製造に用いる水の微生物学的特性は，最終製
 111 品の微生物学的品質に直接影響を及ぼすので，これらの微生物
 112 管理にも，細心の注意が必要である。◆

113 非無菌医薬品の最終製剤に対する微生物許容基準値の判定は，
 114 別に規定するもののほか，表2に従う。◆これらの基準値は，非
 115 無菌医薬品の適用法，水との親和性などに基づき規定されてい
 116 る。経口用の液状製剤や水との親和性の高い非無菌医薬品につ
 117 いては，一般に低い微生物許容基準値が設定されている。◆

118 表2には，微生物許容基準値が設定されている製剤において
 119 存在してはならない特定微生物も示している。ただし，これら
 120 検出されてはならない特定微生物をすべて網羅しているわけで
 121 はない。ある特定の製剤では原材料の特性や製造工程によつて
 122 は，ほかの微生物に対する否定試験も必要である。

123 また，規定された試験では規定されたレベルでの有効な微生
 124 物測定ができない場合には，示された許容基準値に可能な限り
 125 近い検出限界を有することがバリデートされた試験方法を用い
 126 ることができる。

127 表2に挙げた微生物に加えて，検出すべきほかの微生物の重
 128 要性は次のような見地によって評価される。

129 (i) 製品の用途：危険要素は投与経路(眼球，鼻，呼吸器官)
 130 によって異なる

131 (ii) 製品の性状：当該製品は微生物の発育を支持するのか，
 132 それとも十分な抗菌的活性を有するのか

133 (iii) 使用方法

134 (iv) 使用者：新生児，幼児，衰弱した人に対するリスクも異
 135 なる

136 (v) 免疫反応抑制剤：皮質ステロイドの使用

137 (vi) 疾患，外傷，臓器損傷の有無

138 必要に応じて，関連した要素のリスク評価は，微生物学を学
 139 び，微生物学的データの解釈について特別に訓練された職員に
 140 よってなされる。

141 原料に対するリスク評価はその原料が供される工程，最新の
 142 試験技術，要望される品質規格の原料であることを考慮に入れ
 143 る。微生物許容基準値が規定されているときは，以下のように
 144 判定する。なお，微生物許容基準値は，個々の試験成績，又は
 145 繰り返し測定を行う場合には繰り返し測定値の平均値とする。

146 10^1 CFU：最大許容値=20

147 10^2 CFU：最大許容値=200

148 10^3 CFU：最大許容値=2000，以下同様。

149 ◆6. 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物許容基準値

150 生薬及び生薬製剤の微生物限度の目安を基準値として表3に
 151 示す。カテゴリー1は，熱湯で処理して用いる生薬及びその製
 152 剤，カテゴリー2は，そのほかの生薬及びその製剤である。本
 153 指針では，生薬及び生薬製剤に対する特定微生物として，腸内
 154 細菌とそのほかのグラム陰性菌，大腸菌，サルモネラ及び黄色
 155 ブドウ球菌を掲げているが，生薬原料の由来や生薬を配合した
 156 製剤の製法によっては，これら以外の微生物(例えば *Bacillus*
 157 *cereus*，*Clostridium*，*Pseudomonas*，*Burkholderia*，
 158 *Aspergillus*属や大腸菌群の一部の菌種)についても注意を払わ
 159 なければならない場合がある。◆

表1 非無菌医薬品原料の微生物学的品質に対する許容基準値

	総好気性微生物数 (CFU/g又はCFU/mL)	総真菌数 (CFU/g又はCFU/mL)
医薬品原料	10^3	10^2

160

3 非無菌医薬品の微生物学的品質特性

表2 非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

投与経路	総好気性微生物数 (CFU/g又は CFU/mL)	総真菌数 (CFU/g又は CFU/mL)	特定微生物
経口(非水性製剤)	10 ³	10 ²	大腸菌は認めない(1g又は1mL)
経口(水性製剤)	10 ²	10 ¹	大腸菌は認めない(1g又は1mL)
直腸	10 ³	10 ²	—
口腔粘膜			
歯肉			
皮膚	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌は認めない(1g又は1mL) 緑膿菌は認めない(1g又は1mL)
鼻			
耳			
膣	10 ²	10 ¹	緑膿菌は認めない(1g又は1mL) 黄色ブドウ球菌は認めない(1g又は1mL) カンジダ・アルビカンスは認めない(1g又は1mL)
経皮吸収パッチ (粘着層及び支持材を含む1パッチに限 定)	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌は認めない(1パッチ) 緑膿菌は認めない(1パッチ)
吸入 (噴霧用の液状製剤にはより厳しい要件 が適用される)	10 ²	10 ¹	黄色ブドウ球菌は認めない(1g又は1mL) 緑膿菌は認めない(1g又は1mL) 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌は認めない(1g又は1mL)

161

◆表3 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物学的品質に対する許容基準値

微生物	カテゴリー1 (CFU/g又はCFU/mL)	カテゴリー2 (CFU/g又はCFU/mL)
好気性細菌	10 ⁷	10 ⁵
真菌	10 ¹	10 ³
腸内細菌とその他のグラム陰性菌	※	10 ³
大腸菌	10 ²	非検出
サルモネラ	非検出	非検出
黄色ブドウ球菌	※	※

※ 基準値は設けていない。◆

162

1 保存効力試験法

2 保存効力試験法は、多回投与容器中に充てんされた製剤自体
3 又は製剤に添加された保存剤の効力を微生物学的に評価する方
4 法である。製剤に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合
5 し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力を
6 評価する。

7 なお、医薬品GMPに対応するために、又は単に生菌数を抑
8 制する目的のためだけに、保存剤を使用してはならない。保存
9 剤は、それ自体毒性のある物質でもある。それゆえ、ヒトへの
10 安全性に影響を及ぼすような量を製剤に添加してはならず、保
11 存剤の添加量を可能な限り少なくする配慮が必要である。本試
12 験は、一般に製剤の処方設計段階や定期的な保存効力の検証な
13 どに適用され、ロットの出荷判定試験としては行わないが、最
14 終容器に詰められた製剤中の保存剤の効果は、製剤の有効期間
15 にわたって検証しなければならない。

1. 製剤とそのカテゴリー

17 本試験を行うために、製剤を二つのカテゴリーに分類する。
18 カテゴリーIは水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られたもの、
19 カテゴリーIIは非水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られたもの
20 である。なお、水中油型基剤を用いて作られたものはカテゴリー
21 Iに、油中水型基剤を用いて作られたものはカテゴリーIIに
22 含まれる。

23 カテゴリーIは、剤形によって3群に細分類する。

24 カテゴリーIA：注射剤及び無菌の非経口剤。

25 カテゴリーIB：非無菌の非経口剤。

26 カテゴリーIC：経口液剤(用時溶解又は懸濁して用いる
27 シロップ剤を含む)。

28 カテゴリーII：非水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られた
29 製剤で、カテゴリーIに記載しているすべての剤形を含
30 む。

2. 試験菌株と培地

32 以下の菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を使用
33 する。

34 *Escherichia coli* ATCC 8739, NBRC 3972

35 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NBRC 13275

36 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NBRC 13276

37 *Candida albicans* ATCC 10231, NBRC 1594, JCM 2085

38 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, NBRC 9455

39 これらの試験菌は、製剤の製造、使用又は保存中に人や環境
40 から混入するおそれのある微生物を代表し、また、日和見感染
41 病原体である。これらの指定菌株に加えて、製剤の性質により
42 混入して増殖するおそれのある微生物を試験菌株として使用し
43 た方がよい。試験菌株は、微生物保存機関から入手後、新鮮培
44 地で植え継ぐごとに1継代と定義し、5継代以内のものを用い
45 る。試験菌は混合せず、それぞれ単独に製剤に混入して試験す
46 る。接種菌の培養は、カンテン平板培養又は液体培養のいずれ
47 かを採用する。

48 カンテン平板培養：上記5種の菌株をそれぞれカンテン平板
49 培地又はカンテン斜面培地の表面に接種して培養する。カンテ
50 ン培地としては、細菌の場合はソイビーン・カゼイン・ダイジ
51 エストカンテン培地を、真菌の場合はサブロー・ブドウ糖カン
52 テン培地、グルコース・ペプトンカンテン培地又はポテト・デ

53 キストロースカンテン培地のいずれかを使用する。細菌の場合
54 は30～35℃で18～24時間、*C. albicans*は20～25℃で40～48時
55 間、*A. brasiliensis*は20～25℃で1週間又は十分な孢子が形成
56 されるまで培養する。これらの培養菌体を白金耳等で無菌的に
57 採取し、滅菌生理食塩液又は0.1%ペプトン食塩液に浮遊させ、
58 約 10^8 個/mLの生菌を含む浮遊液を調製する。*A. brasiliensis*の
59 場合には、ポリソルベート80を0.05%の割合で添加した滅菌
60 生理食塩液又は0.1%ペプトン食塩液に浮遊させ、約 10^8 個/mL
61 の孢子を含む浮遊液を調製する。これらの浮遊液を接種菌液と
62 して使用する。

63 液体培養：上記4種(*A. brasiliensis*は除く)の菌株をそれぞれ
64 適当な液体培地に培養後、遠心分離して培地を除く。菌体は滅
65 菌生理食塩液又は0.1%ペプトン食塩液で洗浄して、同じ溶液
66 で約 10^8 個/mLの生菌又は孢子を含む接種菌液を調製する。

67 上記5種以外の菌株を培養する場合は、当該菌株の生育に適
68 した培地を選んで使用することができる。浮遊液の調製もその
69 菌に適した方法を採用する。カンテン平板培養法と液体培養法
70 のいずれにおいても、得られた接種菌液は24時間以内に使用
71 する。2時間以内に被検体に接種できない場合には、冷蔵庫に
72 保存する。接種菌液中の菌数を使用直前に計測し、得られた菌
73 数値より接種直後における製剤1mL(g)当たりの理論菌数を算
74 出する。

3. 試験手順

3.1. カテゴリーI製剤

77 製剤を含む容器5個のそれぞれの中に接種菌液を無菌的に注
78 入し、均一に混合する。製剤の容器の中に菌液を無菌的に混合し
79 難いとき、又は製剤量が少ない場合には、滅菌した別の容器に
80 試験に必要な十分な量の製剤を無菌的に移して接種菌液を混合
81 する。非無菌製剤の場合、これらに加えて菌を接種しない製剤
82 を対照として保存し、生菌数(細菌数及び真菌数)を測定する。
83 菌液を製剤中に均一に混合するために、滅菌した注射針、スバ
84 ーテル、ガラス棒などを使用できる。混合する接種菌液の量が
85 製剤の1/100量を超えてはならない。通常、製剤1mL又は1g
86 当たり 10^5 ～ 10^6 個の生菌数になるように接種、混合する。これ
87 らの容器を遮光下で20～25℃に保存し、0、14及び28日目に
88 被検製剤から1mL又は1gをとり生菌数を測定する。上記の期
89 間中、混合試料に顕著な変化(例えば、色調の変化や異臭の発
90 生)が観察されたときは記録し、当該製剤の保存効力について
91 評価検討する。生菌数の経時的な変化は、試験開始時の菌数を
92 100とした百分率で表される。生菌数測定は、原則として「微
93 生物限度試験法」に記載されているカンテン平板混濁法による。
94 なお、この場合、発育阻止物質の確認試験を行い、その影響を
95 除去しなければならないときは、試料溶液の調製に用いる緩衝
96 液や液体培地並びにカンテン培地に効果的な不活化剤を添加す
97 ることができる。ただし、不活化剤が微生物の増殖に影響を与
98 えないという確認が必要である。保存剤や製剤そのものの存在
99 が生菌数測定に影響し、かつ適当な不活化剤のない場合は、
100 「微生物限度試験法」に記載されているメンブランフィルター
101 法により生菌数を測定する。

3.2. カテゴリーII製剤

103 カテゴリーIで示された手順と同様に行うが、試験菌を製剤
104 と均一に混和する場合及び混合試料中の生菌数を測定する場合
105 に、特別の手技と配慮が要求される。

106 半固形の軟膏基剤製品では、試料を45～50℃に加熱して油

2 保存効力試験法

107 状とし、浮遊液を加えて滅菌ガラス棒又はスパーテルで接種菌
 108 を均一に分散させる。均一に混合されるように、界面活性剤を
 109 加えてもよいが、添加される界面活性剤が接種菌の生残性や増
 110 殖性に影響を与えず、かつ、製剤の保存効力を増強させないこ
 111 とを確認する必要がある。生菌数測定のために被検製剤を緩衝
 112 液や液体培地に均一に混合するときも、界面活性剤や乳化剤を
 113 添加することが望ましいこともある。特に、半固形軟膏製剤や
 114 油性製剤などに接種された微生物を液体培地中に均一に分散さ
 115 せるには、ソルビタンモノオレイン酸エステル、ポリソルベ
 116 ト80、レシチンなどを使用するとよい。これらは汎用されて
 117 いる保存剤の多くを不活化したり、中和させる作用がある。

118 4. 判定

119 保存効力の判定は、表1に従う。表1に記されている試験結
 120 果が得られた場合、保存効力があると判定する。なお、無菌製
 121 剤に接種菌以外の菌が発見されたときは、重大な微生物汚染が
 122 起こっている可能性が強く、試験操作上又は製造管理上の注意
 123 を要する。また、非無菌製剤中の汚染菌数が、参考情報記載の
 124 「非無菌医薬品の微生物学的品質特性」に定める菌数を超える
 125 場合にも、試験操作上又は製造管理上の注意を要する。

表1 製剤区分別判定基準

製剤区分	微生物	判定基準	
		14日後	28日後
カテゴリー I A	細菌	接種菌数の 0.1%以下	14日後のレベル と同等若しくはそ れ以下
	真菌	接種菌数と同 レベル若しく はそれ以下	接種菌数と同レベ ル若しくはそれ以 下
カテゴリー I B	細菌	接種菌数の 1%以下	14日後のレベル と同等若しくはそ れ以下
	真菌	接種菌数と同 レベル若しく はそれ以下	接種菌数と同レベ ル若しくはそれ以 下
カテゴリー I C	細菌	接種菌数の 10%以下	14日後のレベル と同等若しくはそ れ以下
	真菌	接種菌数と同 レベル若しく はそれ以下	接種菌数と同レベ ル若しくはそれ以 下
カテゴリー II	細菌	接種菌数と同 レベル若しく はそれ以下	接種菌数と同レベ ル若しくはそれ以 下
	真菌	接種菌数と同 レベル若しく はそれ以下	接種菌数と同レベ ル若しくはそれ以 下

126 5. 培地等

127 保存効力試験用の培地等を以下に掲げる。他の培地等でも類
 128 似の栄養成分を含み、かつ、試験対象となる微生物に対して類
 129 似の選択性や増殖性を持つものは使用して差し支えない。

130 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地

カゼイン製ペプトン	15.0g
ダイズ製ペプトン	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

131 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅

132 菌後のpH：7.1～7.3.

133 サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ペプトン(肉製及びカゼイン製)	10.0g
ブドウ糖	40.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

134 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅

135 菌後のpH：5.4～5.8.

136 GP(グルコース・ペプトン)カンテン培地

ブドウ糖	20.0g
酵母エキス	2.0g
硫酸マグネシウム七水和物	0.5g
ペプトン	5.0g
リン酸二水素カリウム	1.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

137 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅

138 菌後のpH：5.6～5.8.

139 ポテト・デキストロースカンテン培地

ポテトエキス	4.0g
ブドウ糖	20.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

140 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅

141 菌後のpH：5.4～5.8.

142 0.1%ペプトン食塩液

1 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法

2 本試験法は、無菌医薬品の製造区域における微生物管理方法
3 及びその評価法について示す。無菌医薬品の製造区域は、清浄
4 空気の要求特性により、重要区域及び清浄区域に分類される。
5 重要区域とは、清浄度管理が行われている限られた空間であつ
6 て、空気中における浮遊微粒子数及び浮遊微生物数がグレード
7 Aに管理され、その空間を形成する設備・機器の表面及び供給
8 される材料、薬品、水などについても要求される清浄度が保持
9 され、必要に応じて温度、湿度、圧力などの環境条件について
10 も管理が行われている区域を指す。清浄区域とは、空気、ガス
11 又は液体中の汚染物について清浄度管理が行われ、要求される
12 清浄度が保持されている空間を指すが、無菌操作を行う区域を
13 意図したものではない。無菌医薬品の製造にあたっては、微生
14 物学的管理が適切に維持されていることを保証するために、環
15 境、設備及び作業員に対する微生物学的モニタリングを適切な
16 頻度で行う必要がある。汚染微生物の検出は、あらかじめ定め
17 たサンプリング計画に従い、適切なサンプリング装置を用い、
18 原則として通常の作業形態下で行わなければならない。空中微
19 生物及び表面付着微生物の捕集、培養、計数、評価方法は、モ
20 ニタリング目的、対象物、検出対象微生物などによって異なる
21 ので、目的、対象物などに応じた適切な方法の選択が必要であ
22 る。なお、本法に示すサンプリング装置及び測定方法、培地及
23 び培養温度、モニタリング頻度、並びに環境微生物の評価基準
24 値はあくまでも参考情報であり、絶対的なものではない。

25 1. 定義

26 本試験法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。
27 (i) 製造区域：培養、抽出・精製、原料秤量、容器・栓など
28 の洗浄・乾燥、薬剤の調製・充てん作業、閉塞、包装などの作
29 業を行う場所、及び更衣を行う場所をいう。
30 (ii) 処置基準：微生物の数(及び必要に応じて種)に対して設
31 定した基準値をいい、この値を超えた場合には直ちに調査を行
32 い、必要に応じて是正措置をとる。
33 (iii) 警報基準：微生物の数(及び必要に応じて種)に対して設
34 定した基準値をいい、この値は予知される問題点を早期に警告
35 するものであり、その設定レベルを超えた場合には直ちに是正
36 措置を必要とはしないが、調査は行う必要がある。
37 (iv) 汚染物：対象物に付着、混入することなどによって汚染
38 を引き起こす空中微粒子及び環境微生物をいう。
39 (v) 清浄度：対象物の清浄状態を示す量をいい、一定面積又
40 は一定体積中に含まれる汚染物の数又は質量によって表す。
41 (vi) 清浄度管理：限られた空間又は表面について、要求され
42 る清浄度を保持するために必要とされるあらゆることがらにつ
43 いて、計画を立て、組織し、実施することをいう。
44 (vii) 作業シフト：同じ作業員又はグループによってなされる
45 一定の作業又は作業時間をいい、通常、1シフトは12時間以内
46 である。
47 (viii) 性状検査：汚染菌を識別できる程度に区分するための手
48 段をいい、日常管理では、属レベルまでの分類が良いが、必要
49 に応じて種レベルの同定を行う。

50 2. 無菌医薬品製造区域の空気清浄度

51 医薬品製造環境の空中微粒子は、物理的には製品に侵入して
52 不溶性微粒子の原因の一つになりうる。また、生物学的には微

53 生物の媒体として作用するため、空気中の微粒子数を最小限に
54 し、存在する微粒子を効果的に排除することが必要である。無
55 菌医薬品の製造において、各作業別に要求される空気清浄度を
56 表1に示す。

表1 無菌医薬品製造のための空気の清浄度

空気の清浄度レベル	最大許容微粒子数/m ³	
	非作業時	作業時
グレード*1	0.5µm以上	0.5µm以上
A(層流作業区域)	3530	3530
B(非層流作業区域)	3530	353000
C	353000	3530000
D	3530000	—*2

*1 作業時における最大許容微粒子数は、USP<1116>の規
格と次のように対応している。グレードAはクラス
100(M3.5)、グレードBはクラス10000(M5.5)、グレードCは
クラス100000(M6.5)、グレードDについては対応する規格
はない。

*2 作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

57 2.1. 最終滅菌法を適用できる無菌医薬品

58 溶液の調製は、通例、グレードCの環境で行う。密封容器を
59 使うなど、汚染を極力少なくするための追加措置が講じられて
60 いる場合には、グレードDでの溶液調製も許容される。注射剤
61 の充てん作業は、グレードC以上の環境内に設置されたグレー
62 ドAの環境で行う。注射剤以外の無菌医薬品の調製及び充てん
63 も、通例、注射剤に準じる。

64 2.2. ろ過滅菌後、一連の無菌操作法で製造される無菌医薬品

65 出発原料の秤量及び溶液調製は、グレードC以上の環境で行
66 う。これらの作業は、ろ過の前まで密封容器を使うなど、汚染
67 を極力少なくするための追加措置が講じられている場合には、
68 グレードDの環境で行うことが許容される。無菌ろ過後、閉塞
69 までのすべての無菌操作は、グレードAの環境で取り扱わな
70 なければならない。

71 2.3. 原料段階から一連の無菌操作法で製造される無菌医薬品

72 出発原料の取扱い及び閉塞までのすべての無菌操作をグレー
73 ドAの環境で行わなければならない。

74 3. 環境モニタリングによる環境微生物の管理

75 環境モニタリングは、無菌操作法で製造される無菌医薬品に
76 対しては、特に重要な無菌性保証要素である。環境モニタリン
77 グの主目的は、製造区域への環境悪化を事前に予知し、製品の
78 品質に悪影響を及ぼすことを防ぐと共に、適切な清浄度管理に
79 より、高度な無菌医薬品の製造を行うことにある。

80 3.1. 環境微生物のモニタリング

81 (i) 無菌医薬品の製造区域における環境微生物のモニタリン
82 グプログラムの手順書を各施設ごとに作成すること。手順書に
83 含まれる項目としては、1)モニタリング対象物、2)モニタリン
84 グ対象微生物、3)モニタリング頻度、4)モニタリング方法、5)
85 モニタリング対象物に対する警報及び処置基準値、6)設定基準
86 値に達した際の具体的な処置手順などがある。

87 (ii) 無菌操作、無菌管理を行う環境とその周辺では、環境微
88 生物の定期的なモニタリングが必要であり、無菌医薬品が環境
89 空気と直接接触する重要区域においては、作業シフトごとのモ
90 ニタリングが必要である。モニタリング対象物としては、空気、
91 床、壁、機械表面、作業員の着衣や手袋などがある。微生物の
92 モニタリングの参考頻度を表2に示す。

93 (iii) 環境微生物のモニタリングに使用するサンプリング装置、
94 方法及び培地は、検出しようとする微生物(好気性細菌、嫌気

2 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法

95 性細菌、かび、酵母など)に適したものでなければならない。
 96 また、検出対象微生物に適切な培養温度及び培養期間などの培
 97 養条件を選択すべきである。通例、環境微生物試験に用いられ
 98 ている培地及び培養条件を表3に示す。
 99 (iv) サンプリングしたものは、微生物限度試験法のメンブラ
 100 ンフィルター法、カンテン平板混釈法、カンテン平板表面塗抹
 101 法及び液体培地段階希釈法(最確数法)などによって生菌数を計
 102 測する。
 103 (v) 環境微生物の参考評価基準を表4に示す。各モニタリン
 104 グ対象物の警報基準値と処置基準値は、十分なデータが収集さ
 105 れた後、必要に応じて調整することができる。環境モニタリン
 106 グにおいて重要なことは、モニタリング対象物が一定の清浄度
 107 を維持していることを恒常的に監視することである。
 108 (vi) 分離された微生物については、必要に応じて性状検査を
 109 行う。また、微粒子数についてもその経時的又は経日的推移を
 110 分析し、無菌医薬品の製造区域の環境評価データとする。
 111 3.2. 環境モニタリングデータの評価
 112 (i) 環境モニタリングデータは、定期的に評価し、各区域又
 113 は場所において予知される環境上の問題点を推論する。また、
 114 問題が発生したときには、直ちに原因調査を開始し、調査結果
 115 を報告書にまとめる。再モニタリングは、問題区域が再び元の
 116 管理された状態に戻ったことを立証できる方法で実施しなけれ
 117 ばならない。
 118 (ii) 調査報告書は、あらかじめ定めた責任者若しくは品質管
 119 理責任者により評価及び承認され、その後、当該製造区域に従
 120 事する主な関係者に配付する。

121 4. サンプリング装置及び測定方法

122 空中微生物又は表面付着微生物の捕集や測定に関しては、
 123 種々のサンプリング装置及び方法がある。モニタリングの目的
 124 及び対象物によって、適切なサンプリング装置及び方法を選定
 125 しなければならない。

126 4.1. 空中微生物の測定方法

127 4.1.1. 落下菌測定法

128 カンテン培地を入れた一定の大きさのペトリ皿を、測定場所
 129 でふたをとり、一定時間放置後、表面に落下した微生物を培養
 130 し、集落数を計数する方法である。本法は、静置した培地の表
 131 面に沈降しなかった微生物を検出できないこと、微生物凝集物
 132 の沈降速度は気流の影響を受けることから、微生物の総数を定
 133 量的にモニタリングするには有効でない。本法は、得られる
 134 結果が定性又は半定量的であるが、製品又は装置が空中に浮遊
 135 する微生物によって汚染される可能性を、長時間モニタリング
 136 するのに適切な方法である。

表2 微生物のモニタリングの参考頻度

製造区域	モニタリングの参考頻度
重要区域(グレードA)	作業シフトごと
重要区域に隣接する清浄区域(グレードB)	作業シフトごと
他の清浄区域(グレードC, D)	
製品や容器と接触する区域	週2回
製品や容器と接触しない区域	週1回

137

表3 培地及び培養条件

検出対象微生物	培地*1	培養条件
好気性細菌	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン(又は液体)培地	30~35℃*2 5日間以上*3
	ブレインハートインフュージョンカンテン(又は液体)培地	
	ニュートリエントカンテン(又は液体)培地	
酵母及びかび	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン(又は液体)培地	20~25℃*2 5日間以上*3
	サブローデキストロースカンテン(又は液体)培地	
	ポテト・デキストロースカンテン(又は液体)培地	
嫌気性細菌*4	ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30~35℃ 5日間以上*3
	クックドミート液体培地	
	強化クロストリジウムカンテン(又は液体)培地	
	無菌試験用チオグリコール酸培地 I (又はカンテン培地)	

*1 培地には、必要に応じて適切な濃度の抗生物質を添加してもよい。また、被検面に消毒剤の存在するおそれがあり、それが試験時に混入する可能性のある場合には、それを不活化する物質を添加する。

*2 好気性細菌と酵母及びかびをソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地で検出する場合には、25~30℃で5日間以上の培養も許容される。

*3 信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後5日以前の計測値を採用してもよい。

*4 通例、微生物モニタリングに、嫌気性細菌は含まれない。嫌気性細菌の検出にカンテン培地を用いる場合には、適当な装置を用いて嫌気培養を行うこと。

138

表4 環境微生物の評価基準*1

グレード	空中微生物数*2 (CFU/m ³)	最小空気採取量 (m ³)	表面付着微生物数	
			機器、設備 (CFU/24~30cm ²)*3	手袋
A	<1	0.5	<1	<1
B	10	0.5	5	5
C	100	0.2	25	—
D	200	0.2	50	—

*1 各条件における平均許容上限値を示す。

*2 スリットサンプリング法又は同等の微生物捕集性能を有する方法を用いての値。

*3 コンタクトプレート(直径約5.4~6.2cm)当たりに現れる生菌数を示す。拭き取り法を用いる場合には、25cm²当たりの表面積の換算値とする。手袋の場合は、通常、5指をプレートに押捺。

139 4.1.2. 浮遊菌測定法

140 4.1.2.1. 測定法

141 一定量の空気を吸引する方法で、サンプリング方法によって
 142 る過型サンプリング装置及び衝突型サンプリング装置がある。
 143 る過型サンプリング装置は、吸引力及びフィルターサイズを適
 144 切に変えることによって、希望する空気量を捕集することがで
 145 きるが、フィルターを無菌的にホルダーに取り付けたり、取
 146 り出すときに注意を要する。重要区域で使用する場合、空気
 147 の流れを乱し、無菌医薬品の製造に悪影響を及ぼさないように注
 148 意を払うこと。フィルターには、ゼラチンフィルターなどを用
 149 いたウェットタイプ及びメンブランフィルターを用いたドライ
 150 タイプのものがある。ドライタイプのフィルターは、静電気の
 151 影響により微生物粒子をフィルター上に定量的に捕集できな
 152 いことがある。

153 衝突型サンプリング装置の選択及び使用にあたっては、捕集
 154 される空気の培地への衝突速度が捕集された微生物粒子に悪影

3 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法

155 響を及ぼさず、かつ微生物を捕集するのに十分な速度であるこ
156 と。また、空気の吸引量は、それぞれの微生物汚染限度に応じ
157 微生物汚染を検出するのに十分な量であり、かつ培地の物理
158 的・化学的特性を大きく変えるものであってはならない。重要
159 区域で使用する場合、空気の流れを乱し、無菌医薬品の製造に
160 悪影響を及ぼさないように注意を払うこと。

161 4.1.2.2. 測定装置

162 一般的に使用される浮遊菌測定装置には、①スリットサンプ
163 ラー、②アンダーセンサンプラー、③ピンホールサンプラー、
164 ④遠心型サンプラー及び⑤ろ過型サンプラーがある。スリット
165 サンプラーは、回転するカンテン培地に一定サイズのスリット
166 を通して一定流量の空気を吹きつけて微生物を捕集する装置で、
167 培地の回転速度及びスリットと培地表面との距離を調節して測
168 定し、最大1時間まで時系列的に微生物の推移を把握すること
169 ができる。アンダーセンサンプラーは、多孔板とカンテン培地
170 を数段組み合わせ、培地に多孔板を通して一定流量の空気を吹
171 きつけて微生物を捕集する装置で、空気中の微生物の粒子分布
172 を測定するのに適している。ピンホールサンプラーは、スリッ
173 トサンプラーのスリット部分がピンホールになった装置で、回
174 転するカンテン培地に数個のピンホールを通して一定流量の空
175 気を吹きつけて微生物を捕集する。遠心型サンプラーは、回転
176 羽根を回転し、一定流量で吸引した空気を周囲に固定したカン
177 テン培地のストリップに吹きつけて微生物を捕集する装置で、
178 機器の持ち運びが容易で局所の測定に適している。ろ過型サン
179 プラーの特性については、「4.1.2.1.測定法」を参照。

180 4.2. 表面付着微生物の測定方法

181 4.2.1. コンタクトプレート法

182 適切な接触表面を有するコンタクトプレートを使用する。
183 サンプリング箇所、コンタクトプレート全体を均等に数秒
184 間接触させる。この際、回転させたり直線的に動かしてはなら
185 ない。接触後、プレートに覆いをし、できるだけ速やかに適切
186 な培養条件で培養する。なお、コンタクトプレート使用後は、
187 接触箇所に着した培地成分を無菌的に拭き取ること。

188 4.2.2. 拭き取り法

189 無菌のガーゼ、脱脂綿、綿棒などを適切なリンス液に浸し、
190 あらかじめ規定された表面積をゆつくりと回転、又は平行線状
191 に拭き取ることによってサンプリングを行う。サンプリング後、
192 ガーゼ、脱脂綿、綿棒などを適切な一定量のリンス液に入れて
193 攪拌後、適切な方法で微生物数を測定する。

194 5. 浮遊菌測定サンプリング装置の捕集性能試験

195 浮遊菌測定サンプリング装置の捕集性能試験は、JIS K
196 3836(空中浮遊菌測定器の捕集性能試験法)又はISO 14698-
197 1(クリーンルームの生物汚染管理、一般原則)によって行う。

198 6. 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

199 微生物限度試験法(4.05)の「1.生菌数試験」の「培地の性
200 能試験及び発育阻止物質確認試験」を準用する。

201 7. 培地

202 (i) ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン(又は液
203 体)培地：微生物限度試験法を参照。

204 (ii) サブロー・デキストロースカンテン(又は液体)培地：微
205 生物限度試験法を参照。ただし、抗生物質は必要に応じて添加
206 する。

207 (iii) ポテト・デキストロースカンテン(又は液体)培地：微生
208 物限度試験法を参照。ただし、抗生物質は必要に応じて添加す

209 る。

210 (iv) グルコース・ペプトンカンテン(又は液体)培地
ブドウ糖 20.0g
酵母エキス 2.0g
硫酸マグネシウム七水和物 0.5g
ペプトン 5.0g
リン酸二水素カリウム 1.0g
カンテン 15.0g
水 1000mL

211 全成分を混和し、121℃で15~20分間高压蒸気滅菌する。滅
212 菌後のpH5.6~5.8。使用直前に培地1L当たりベンジルペニシ
213 リンカリウム0.10gとテトラサイクリン0.10gを滅菌溶液として
214 加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代
215 わりに培地1L当たりクロラムフェニコール50mgを加えてもよ
216 い。ただし、抗生物質は必要に応じて添加する。

217 (v) 液状チオグリコール酸培地(又はカンテン培地)：無菌試
218 験法を参照。ただし、カンテン培地のカンテン濃度は約1.5%
219 とする。

220 (vi) ブレインハートインフュージョンカンテン(又は液体)培
221 地

子ウシ脳200gからの浸出物
ウシ心臓250gからの浸出物
ペプトン 10.0g
ブドウ糖 2.0g
塩化ナトリウム 5.0g
リン酸水素二ナトリウム十二水和物 2.5g
カンテン 15.0g
水 1000mL

222 121℃で15~20分間高压蒸気滅菌する。滅菌後のpH7.2~

223 7.6

224 (vii) ニュートリエントカンテン(又は液体)培地

牛肉エキス 3.0g
ペプトン 5.0g
カンテン 15.0g
水 1000mL

225 121℃で15~20分間高压蒸気滅菌する。滅菌後のpH6.6~

226 7.0

227 (viii) クックドミート液体培地

ウシ心臓 450gからの浸出物
ペプトン 20.0g
ブドウ糖 2.0g
塩化ナトリウム 5.0g
水 1000mL

228 121℃で15~20分間高压蒸気滅菌する。滅菌後のpH7.2~

229 7.6

230 (ix) 強化クロストリジウムカンテン(又は液体)培地

4 無菌医薬品製造区域の微生物評価試験法

牛肉エキス	10.0g
ペプトン	10.0g
酵母エキス	3.0g
溶性デンプン	1.0g
ブドウ糖	5.0g
L-システイン塩酸塩	0.5g
塩化ナトリウム	5.0g
酢酸ナトリウム三水和物	3.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

231 液体培地の場合、カンテンを0.5g加える。

232 121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH6.7～

233 6.9

234 8. リンス液

235 (i) リン酸緩衝液(pH7.2)：微生物限度試験法を参照。

236 (ii) ペプトン食塩緩衝液(pH7.0)：微生物限度試験法を参照。

237 (iii) リンゲル溶液1/4濃度

塩化ナトリウム	2.25g
塩化カリウム	0.105g
塩化カルシウム二水和物	0.16g
水	1000mL

238 121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH7.0

239 (iv) チオ硫酸リンゲル溶液

チオ硫酸ナトリウム五水和物	0.8g
リンゲル溶液1/4濃度	1000mL

240 121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH6.6

241 (v) LP希釈液

カゼイン製ペプトン	1.0g
大豆レシチン	0.7g
ポリソルベート80	1.0～20.0g
水	1000mL

242 121°Cで15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH7.2

1 アリストロキア酸について

1 アリストロキア酸について

2 アリストロキア酸は、ウマノスズクサ科の植物に含有されて
3 いる成分で、腎障害を引き起こすことが疑われている。また、
4 発がん性があるとの報告もある(参考参照)。
5 日本薬局方に定められた基原及び部位の生薬を使用していれ
6 ば問題はないが、国によっては異なる植物を類似した生薬名で
7 呼称している場合などもあり、また、諸外国においては日本薬
8 局方に適合しない製品が流通していることから、生薬・漢方薬
9 の使用にあたっては、アリストロキア酸を含む植物の混入がな
10 いように原料の確認などに留意する必要がある。第十四改正日
11 本薬局方第一追補以降、使用部位として植物の根及び根茎が規
12 定されているサイシンに、アリストロキア酸を含む可能性のあ
13 る地上部が混入する場合を考慮し、純度試験にアリストロキア
14 酸Iの分析法が規定された。ボウイ、モクツウ、モッコウでは、
15 規定された基原植物を用いていけば、アリストロキア酸の混入
16 は考えられないが、上述した理由から、アリストロキア酸Iを
17 含む生薬が流通する可能性がある。その場合、サイシンの純度
18 試験を準用することで、アリストロキア酸の混入の有無につい
19 て試験を行うことが可能となる。

20 参考：2000年7月医薬品・医療用具等安全性情報(No.161)
21 New England Journal of Medicine(June 8, 2000)
22 Mutation Research 515, 63-72(2002)

1 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験

2 天然物の品質確保の第一歩は、基原の正しい原材料を使用す
3 ることである。したがって、生薬の基原は、適否の判定基準で
4 あることが、生薬総則4)に明示されている。生薬の基原を鑑別
5 する方法には、形態学的方法や、官能試験、化学的方法が
6 あり、それぞれ各条に適切な方法が明示されている。形態学的
7 方法や、官能試験、化学的方法は、生薬の表現形質に基づく
8 種の鑑別方法である。他方、近年分子生物学的な技術の進歩と
9 植物の遺伝子情報の蓄積に伴い、それぞれの生薬の遺伝子型を
10 確認することで、種を鑑別する手法が確立されつつある。この
11 ような方法は、形態学的方法などによる植物の表現型に基づ
12 く鑑別法とは異なり、環境による影響を受けない。また、鑑別
13 のための専門知識と熟練を必要とせず、客観的な結果が得られ
14 やすい等の利点がある。

15 生物の進化は、遺伝子の突然変異により担われており、近縁
16 種間における遺伝子の塩基配列の違いは、種の系統関係を反映
17 している。この理論に基づき、近年微生物の鑑別では、核ゲノ
18 ム上のリボゾームRNA(rRNA)をコードする遺伝子領域
19 (rDNA)の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法
20 が採用されている。同様に遺伝子型を用いた高等植物の鑑別に
21 も、このrDNAの塩基配列が最もよく用いられている。特に
22 rDNA領域のITS(Intergenic Transcribed Spacer)領域では、
23 コード遺伝子領域と比較して塩基置換が起こりやすいため、近
24 縁種を区別しやすくなる。また、核ゲノム上の遺伝子は、
25 両親に由来するため、種間雑種を確認できる利点がある。高等
26 植物には、更にミトコンドリアゲノム上の遺伝子と葉緑体ゲノ
27 ム上の遺伝子がある。これらのゲノム上の遺伝子も鑑別のため
28 よく用いられるが、通常単性遺伝であるため、種間雑種の確認
29 はできない。

30 ここに示した二つの方法は、近年、論文報告^{1),2)}された
31 rDNAのITS領域の遺伝子配列に基づくソウジュツとビャクジ
32 ュツの鑑別法を基礎として開発された、ビャクジュツ中のソウ
33 ジュツに関する純度試験法で、バリデーシヨンのための共同試
34 験が終了したものである。各条では、ソウジュツの基原植物は、
35 *Atractylodes lancea* De Candolle 又は、*A. chinensis*
36 *Koidzumi (Compositae)*、ビャクジュツの基原植物は、*A.*
37 *japonica* Koidzumi ex Kitamura 又は *A. ovata* De Candolle
38 (*Compositae*)と規定されている。また、基原の適否は、基本
39 的にソウジュツでは鏡検を含む生薬の性状で、ビャクジュツで
40 は鏡検を含む生薬の性状と、確認試験の呈色反応で規定されて
41 いる。上記の論文では、これらの四種の植物について、前述し
42 たITS領域の塩基配列を比較することで、明確に区別できるこ
43 と、更に種特異的なプライマー対を用いた遺伝子の増幅(PCR)、
44 又は、種特異的配列を認識する制限酵素の利用により、塩基配
45 列の解析を行わずに種の鑑別が簡便に行えることを示している。
46 共同試験では、試験の簡便さを最大限考慮し、塩基配列の解
47 析を行わず、種特異的なプライマー対を利用し、PCR増幅パ
48 ンドを観察する方法(Mutant Allele Specific Amplification
49 法：方法1)及び各基原植物に共通のプライマー対により調製し
50 たPCR産物に対して種特異的配列を認識する制限酵素で処理
51 し、生成するDNA断片を観察する方法(PCR-Restriction
52 Fragment Length Polymorphism法：方法2)について検討し

53 た。このような、PCR法を利用する試験法では、微量の鋳型
54 DNAが理論的には、数十億〜数千億倍に増幅される。したが
55 って、粉末生薬の確認試験として用いる場合、分析する生薬の
56 ほとんどが不適なものでわずかに適合植物由来の生薬の粉末が
57 存在していても、検出対象のDNA断片が観察されることにな
58 る。(よって、確認試験法として利用するには、他生薬由来の
59 粉末の混入に注意しながら切断生薬、全形生薬の単一個体に対
60 して利用することになる。)他方、純度試験として用いる場合、
61 どのような形態の生薬であったとしても、対象遺伝子に多型が
62 存在せず正しく遺伝子増幅が行われる限り、純度試験で対象と
63 する不適な植物由来のDNA断片が確認されれば、生薬の形態
64 にかかわらず、対象とする不適な生薬が混入していることが
65 明らかとなる。

66 なお、ここで示した方法は、参考情報であり、現段階で本法
67 を用いて得られた結果がそのまま各条の生薬の適否を左右する
68 ものでない。また、論文で示されたシーケンスを行うことで、
69 基原種についてより正確な判定が行えることはいうまでもない。

1. DNA増幅装置

71 生薬より抽出精製して得られたDNAの増幅に用いる。機器
72 により、温度調節方法等が微妙に異なるため、指定された条件
73 でPCRを行っても、PCR増幅バンドの強度等が異なることが
74 ある。したがって、「3.方法1」のようにPCRの増幅バンドの
75 有無のみで、結果を判定する場合、事前にあらかじめ基原種が
76 判明している試料を用い、得られたDNAを用いてPCRを行う
77 とき、適切な増幅バンドのみが得られることを確認し、得られ
78 ない場合には、PCRの温度条件を微調整することが必要とな
79 る。また、本装置は、「4.方法2」における制限酵素処理にも
80 転用することができる。

2. 一般的注意

82 生薬は、新鮮な植物体とは異なり乾燥物で、採取されてから
83 ある程度の時間を経たものである。したがって、DNAが断片
84 化を起こしている場合が多く、また植物中には様々なPCRの
85 反応阻害物が存在している可能性があり、鋳型DNAの抽出精
86 製は、最も注意を要する過程である。ジュツ類生薬の場合、生
87 薬の周皮に阻害物が存在している場合が多いため、周皮を清潔
88 なメスなどではぎおとして除いた試料を使用する。

3. 方法1 (Mutant Allele Specific Amplification法)

90 本法は、一般に Mutant Allele Specific Amplification
91 (MASA) 法又は Amplification Refractory Mutation System
92 (ARMS) 法と呼ばれる方法で、種特異的プライマー対による
93 PCRにおけるDNA増幅の有無により、検体由来の鋳型 DNA
94 の塩基配列情報を得る方法である。

3.1. 操作法

96 以下、操作法の一例を示す。

3.1.1. 鋳型DNAの調製

98 試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有
99 害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮され
100 ば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。その
101 場合、最終的に得られるDNA量(濃度)に注意して、最初の試料
102 量とDNAを溶出させる液量を調整する必要がある。組換え
103 DNA技術応用食品の検査方法に関する通知⁹⁾で使用されている
104 シリカゲル膜タイプのキットを用い、同法に準拠して抽出精製
105 を行う場合、試料採取量は200mgとし、AP1緩衝液1mL、
106 RNase Aを2 μ L、AP2緩衝液325 μ Lを用いるのが適当である。

107 また、第一カラムに負荷する上清は、清澄であることが最も重
108 要で、無理に1mLを負荷する必要はない。また、最終的に
109 DNAを溶出させる液量は、50 μ Lが適当であり、通常1回目の
110 溶出液をDNA試料原液として用いる。

111 3.1.2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認及びDNAの定量
112 原液中のDNAの純度は、分光光度計を用いOD_{260nm} /
113 OD_{280nm}の比で確認することができる。同比が1.5になれば、
114 DNAが十分に精製されていることを示す。DNA量は、1
115 OD_{260nm} = 50 μ g/mLで換算する。上記の測定は、適当に希釈し
116 たDNA試料原液を用いて行い、得られた結果を基に、以後
117 PCRの反応に必要な濃度に水で希釈し、DNA試料液として、
118 マイクロ試料管に分注し、必要な場合は-20 $^{\circ}$ C以下で冷凍保
119 存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残っ
120 た溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度
121 がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試
122 料液として用いる。

123 3.1.3. PCR

124 上記の通知で例示された定性PCR法⁴⁾で用いる市販の酵素を
125 用いた場合、酵素に添付されたマグネシウム入りPCR緩衝液
126 2.5 μ L、酵素に添付されたdNTP(0.2mmol/L)、5'及び3'プライ
127 マー(0.4 μ mol/L)及びTaq DNAポリメラーゼ(1.25units)を含む
128 液に、10ng/ μ Lに調製したDNA試料液5 μ L(DNAとして50ng)
129 を氷中で加え、全量が25 μ Lで反応を行うのが適当である。な
130 お、ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験を実施する
131 場合、プライマー対は、前述の論文[J. Nat. Med. 60, 149-156
132 (2006)]で示されたC、D(Cは、*A. lancea*で陽性、Dは、*A.*
133 *chinensis*で陽性)を使用するが、プライマー対A、Bを組み合
134 わせて使用すると、それぞれの検体の基原種を確認すること
135 ができる。また、DNAが正しく抽出されていることを確認する
136 ため、以下の陽性対照プライマー対を加えた反応液を調製する
137 とともに、陰性対照として、調製したDNA試料液を加えない
138 もの、それぞれのプライマー対を加えないものも調製し、同時
139 にPCRを行う必要がある。

140 Pf: 5'-CAT TGT CGA AGC CTG CAC AGC A-3'

141 Pr: 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'

142 PCR反応は、以下の条件で行う。95 $^{\circ}$ Cに10分間保ち反応を
143 開始させた後、95 $^{\circ}$ C 0.5分間、68 $^{\circ}$ C(プライマー対Cを用いる場
144 合のみ69 $^{\circ}$ C)0.75分間を1サイクルとして、30サイクルのPCR
145 増幅、次に終了反応として72 $^{\circ}$ Cで7分間保った後、4 $^{\circ}$ Cで保存
146 し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。

147 3.1.4. アガロースゲル電気泳動とPCR産物の検出

148 反応終了後、PCR増幅反応液5 μ Lを、適当量のゲルローディ
149 ング緩衝液と混合し、2w/v%アガロースゲルのウェルに添加
150 し、1倍TAE緩衝液(参考情報、遺伝子解析による微生物の迅
151 速同定法参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当なDNA
152 分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝液に含
153 まれるプロモフェノールブルー色素がゲルの1/2から2/3ま
154 で進んだところで電気泳動を終了する。

155 泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲ
156 ルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析
157 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312
158 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標
159 準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。

160 3.2. 結果の判定

161 まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で305bpのバンド
162 が確認され、プライマー対を加えないもの、DNA試料液を加
163 えないものでバンドが確認されないことを確かめる。次に、C
164 プライマー対を加えたもので226bpのバンド、あるいはDプ
165 ライマー対を加えたもので200bpのバンドが確認された場合、試
166 料はソウジュツと判定され(刻み生薬の場合は、ソウジュツの
167 混入が認められ)、不合格となる。陽性対照プライマー対を加
168 えたもので305bpのバンドが確認され、プライマー対を加えな
169 いもの、DNA試料液を加えないものでバンドが確認されず、
170 Cプライマー対で226bpのバンド、Dプライマー対で200bpの
171 バンドが確認されない場合、試料はソウジュツではない(刻み
172 生薬の場合は、ソウジュツの混入がない)と判定され、純度試
173 験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバンドが確認
174 されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考えられるの
175 で、DNAの抽出からやり直すことが求められる。また、プ
176 ライマー対を加えないもの、DNA試料液を加えないものでバン
177 ドが確認された場合は、PCR操作に間違いがあったものとし
178 て、「3.1.3.PCR」から実験をやり直すことになる。

179 4. 方法 2 (PCR-Restriction Fragment Length 180 Polymorphism法)

181 本法は、一般にPCR-Restriction Fragment Length
182 Polymorphism (RFLP) 法と呼ばれる方法であり、対象植物の
183 DNA配列に共通のプライマー対を用いて増幅したPCR産物に
184 対して、種特異的な配列を認識する制限酵素による消化反応を
185 行い、生成するDNA断片のパターンを観察することにより、
186 検体由来の鋳型DNAの塩基配列情報を得る方法である。

187 試験は、各ロット、25個体に番号を付し、各個体別にPCR-
188 RFLPによる基原種鑑別を行い、若い番号から順に、鑑別可能
189 な20個体中に不適合試料が幾つ存在するかで、純度試験の合
190 否判定を行う。

191 4.1. 操作法

192 以下に操作の一例を示す。

193 4.1.1. 鋳型DNAの調製

194 試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有
195 害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれ
196 ば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。近年
197 では、検体由来のPCR酵素阻害物質の作用を抑える働きを有
198 するPCR試薬が市販されており、このような試薬を利用する
199 場合、検体からの鋳型DNAの調製は、DNA抽出試薬によるイ
200 ンキュベーション操作のみで良い。試験実施者の利便性を考え、
201 ここでは、このようなPCR試薬を用いる場合のDNA調製法を
202 示す。

203 検体20mgを清潔なナイフで刻み、細片化し、DNA抽出用試
204 薬400 μ Lを加え、55 $^{\circ}$ C、一晚(16~18時間)インキュベーショ
205 ンする。終了後、95 $^{\circ}$ C、5分間加温し、試薬中の酵素を失活さ
206 せる。検体が沈殿するまで、遠心を行い、上清50 μ Lを分取し、
207 鋳型DNA溶液とする。なお、この方法で調製したDNA溶液は、
208 検体由来の多くの夾雑物を含んでおり、OD_{260nm}に基づく濃度
209 測定は、適用できない。

210 DNA抽出用試薬の組成は、下記のとおりである。

3 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験

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(pH8.0)	20mmol/L
エチレンジアミン四酢酸	5mmol/L
塩化ナトリウム	400mmol/L
ドデシル硫酸ナトリウム	0.3%
Proteinase K	200µg/mL

211 4.1.2. PCR

212 論文²⁾で示されたPCR酵素及びPCR試薬を用いた場合、2倍
213 濃縮PCR試薬10.0µL、5'及び3'プライマー(0.5µmol/L)及びTaq
214 DNAポリメラーゼ(0.5units)を含む液に、鋳型DNA溶液0.5µL
215 を氷中で加え、全量が20µLで反応を行うのが適当である。

216 PCR反応は、以下の条件で行う。95°Cに10分間保ち反応を
217 開始させた後、95°C 0.5分間、65°C 0.25分間、72°C 0.25分間
218 を1サイクルとして、40サイクルのPCR増幅、次に終了反応と
219 して72°Cで7分間保った後、4°Cで保存し、得られた反応液を
220 PCR増幅反応液とする。PCR反応の際には、陰性対照(鋳型
221 DNA溶液の代わりに水)を必ず置く。各プライマーの配列は、
222 下記のとおりである。

223 5'-プライマー: 5'-GGC ACA ACA CGT GCC AAG GAA
224 AA-3'

225 3'-プライマー: 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC
226 C-3'

227 4.1.3. 制限酵素処理

228 2種の制限酵素、*FauI*及び*MspI*を用い、それぞれ、個別に
229 処理する。*FauI*については、酵素に添付の反応緩衝液及び
230 1.0unitsの酵素からなる反応液にPCR産物3.0µLを氷中で加え、
231 全量を15.0µLとする。同様に、*MspI*では、反応緩衝液及び
232 20.0unitsの酵素からなる反応液にPCR産物3.0µLを加え、全
233 量を15.0µLとする。これらの反応液をメーカー推奨の温度条
234 件で、2時間インキュベーションし、終了後、72°Cで10分間加
235 温し、酵素を失活させる。PCR反応における陰性対照試料に
236 ついても、制限酵素処理を行う。

237 4.1.4. アガロースゲル電気泳動とDNA断片の検出

238 制限酵素反応終了後、反応液全量を、適当量のゲルローディ
239 ング緩衝液と混合し、4w/v%アガロースゲルのウェルに添加
240 し、1倍TAE緩衝液(参考情報、遺伝子解析による微生物の迅
241 速同定法参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当なDNA
242 分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディング緩衝液に含
243 まれるプロモフェノールブルー色素がウェルより2cm程度進ん
244 だところで電気泳動を終了する。4w/v%アガロースゲルは、
245 粘度が高く、調製、取り扱いが難しいことから、市販のプレキ
246 ャスト型ゲルを使用した方が良い。

247 泳動後、事前にエチジウムブロミドにより染色されているゲ
248 ルを用いていない場合、ゲルを後染色する。ゲルイメージ解析
249 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線
250 (312nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。

251 4.2. 結果の判定

252 4.2.1. 各個体の判定

253 PCR反応の際の陰性対照試料にプライマーダイマー(約
254 40bp)を除くバンドが検出されないことを確認する。次に、
255 *FauI*処理した各検体において、約80bp及び60bpのバンドが検
256 出される場合、あるいは、*MspI*処理した各検体において、約
257 90bp及び50bpのバンドが検出される場合、このものは、ソウ

258 ジュツと判断する。いずれの酵素処理においても、約140bpの
259 バンド及びプライマーダイマーの他にバンドを認めない場合、
260 このものは、ビャクジュツと判断する。いずれの反応液におい
261 ても、プライマーダイマーの他にバンドを認めない場合、その
262 検体からは、PCR産物が得られていないと判断し、判定不能
263 とする。

264 4.2.2. 純度試験の判定

265 各個体の判定結果を用いて、純度試験の判定を行う。判定不
266 能と判断された個体を除き、若い番号順に20個体の結果を用
267 いる。20個体中、ソウジュツと判断される個体があれば、
268 純度試験合格とする。20個体中、ソウジュツと判断される個
269 体が1個体存在する場合、新たに25個体を選び、同様の試験を
270 行い、ソウジュツと判断される個体があれば、合格とする。
271 2度目の試験においてもソウジュツと判断される個体が見出さ
272 れる場合及び1度目の試験において、ソウジュツと判断される
273 個体が二つ以上見出される場合は、純度試験不合格とする。

274 5. 参考資料

275 ¹⁾ Y. Guo, et al., J. Nat. Med. 60, 149-156 (2006).

276 ²⁾ K. Kondo, et al., J. Jpn. Bot. 84, 356-359 (2009).

277 ³⁾ 平成13年3月, 食発第110号, 一部改正, 平成18年6月, 食
278 安発第0629002号2.2.1.2.

279 ⁴⁾ 平成18年6月, 食安発第0629002号2.1.3.1.1.

1 日本薬局方収載生薬の学名表記について

1 日本薬局方収載生薬の学名表記について

2 日本薬局方収載生薬の基原植物及び基原動物の学名表記法は、論文等で使用される分類学的に用いられる学名表記と若干異なっている。これは、主に局方が学術書ではなく法令であるために生じる問題である。局方での学名の表記と、分類学的に通常使用される学名表記との不一致について、局方利用者の誤解を避ける目的で、本表に、局方で表記した学名と分類学的に通常使用される学名表記との関係を示す。

日本薬局方の学名表記と分類学的に用いられる学名表記

生薬名	日本薬局方の学名表記 =分類学的に用いられている学名表記 日本薬局方の学名表記とは異なるが分類学的に同一あるいは同一とみなされることがあるもの及び収載種に含まれる代表的な下位分類群。*印のあるものは、日本薬局方で併記されているもの。	科名
アカメガシワ	アカメガシワ <i>Mallotus japonicus</i> Mueller Argoviensis = <i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Müll. Arg.	<i>Euphorbiaceae</i> トウダイグサ科
アセンヤク	<i>Uncaria gambir</i> Roxburgh = <i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.	<i>Rubiaceae</i> アカネ科
アマチャ	アマチャ <i>Hydrangea macrophylla</i> Seringe var. <i>thunbergii</i> Makino = <i>Hydrangea macrophylla</i> (Thunb.) Ser. var. <i>thunbergii</i> (Siebold) Makino	<i>Saxifragaceae</i> ユキノシタ科
アラビアゴム	<i>Acacia senegal</i> Willdenow = <i>Acacia senegal</i> (L.) Willd. その他同属植物	<i>Leguminosae</i> マメ科
アロエ	<i>Aloe ferox</i> Miller = <i>Aloe ferox</i> Mill. <i>Aloe ferox</i> Miller と <i>Aloe africana</i> Miller との雑種 <i>Aloe africana</i> Miller = <i>Aloe africana</i> Mill. <i>Aloe ferox</i> Miller と <i>Aloe spicata</i> Baker との雑種	<i>Liliaceae</i> ユリ科
アンソッコウ	<i>Styrax benzoin</i> Dryander = <i>Styrax benzoin</i> Dryand. その他同属植物	<i>Styracaceae</i> エゴノキ科
イレイセン	サキシマボタンズル <i>Clematis chinensis</i> Osbeck <i>Clematis mandshurica</i> Ruprecht = <i>Clematis mandshurica</i> Rupr. <i>Clematis hexapetala</i> Pallas = <i>Clematis hexapetala</i> Pall.	<i>Ranunculaceae</i> キンボウゲ科
インチンコウ	カララヨモギ <i>Artemisia capillaris</i> Thunberg = <i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	<i>Compositae</i> キク科
インヨウカク	<i>Epimedium pubescens</i> Maximowicz = <i>Epimedium pubescens</i> Maxim. <i>Epimedium brevicornu</i> Maximowicz = <i>Epimedium brevicornu</i> Maxim. <i>Epimedium wushanense</i> T. S. Ying ホザキイカリソウ <i>Epimedium sagittatum</i> Maximowicz = <i>Epimedium sagittatum</i> (Siebold & Zucc.) Maxim. キバナイカリソウ <i>Epimedium koreanum</i> Nakai イカリソウ <i>Epimedium grandiflorum</i> Morren var. <i>thunbergianum</i> Nakai = <i>Epimedium grandiflorum</i> Morr. var. <i>thunbergianum</i> (Miq.) Nakai トキワイカリソウ <i>Epimedium sempervirens</i> Nakai	<i>Berberidaceae</i> メギ科
ウイキョウ	ウイキョウ <i>Foeniculum vulgare</i> Miller = <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Umbelliferae</i> セリ科
ウイキョウ油	ウイキョウ <i>Foeniculum vulgare</i> Miller = <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. <i>Illicium verum</i> Hooker filius = <i>Illicium verum</i> Hook. f.	<i>Umbelliferae</i> セリ科 <i>Illiciaceae</i> シキミ科
ウコン	ウコン <i>Curcuma longa</i> Linné = <i>Curcuma longa</i> L.	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
ウヤク	テンダイウヤク <i>Lindera strychnifolia</i> Fernandez-Villar = <i>Lindera strychnifolia</i> (Siebold & Zucc.) Fern. Vill. <i>Lindera aggregata</i> (Sims) Kosterm.	<i>Lauraceae</i> クスノキ科
ウワウルシ	クマコケモモ <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> Sprengel = <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng.	<i>Ericaceae</i> ツツジ科
エイジツ	ノイバラ <i>Rosa multiflora</i> Thunberg = <i>Rosa multiflora</i> Thunb.	<i>Rosaceae</i> バラ科
エンゴサク	<i>Corydalis turtchaninowii</i> Besser forma <i>yanhusuo</i> Y. H. Chou et C. C. Hsu = <i>Corydalis turtchaninowii</i> Besser f. <i>yanhusuo</i> (W. T. Wang) Y. H. Chou & C. C. Hsu	<i>Papaveraceae</i> ケシ科

2 日本薬局方収載生薬の学名表記について

	<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang	
オウギ	キバナオウギ <i>Astragalus membranaceus</i> Bunge = <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge <i>Astragalus mongholicus</i> Bunge ----- <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge var. <i>mongholicus</i> (Bunge) Hsiao	Leguminosae マメ科
オウゴン	コガネバナ <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Labiatae シソ科
オウセイ	ナルコユリ <i>Polygonatum falcatum</i> A. Gray カギクマバナルコユリ <i>Polygonatum sibiricum</i> Redouté <i>Polygonatum kingianum</i> Collett et Hemsley = <i>Polygonatum kingianum</i> Collett & Hemsly. <i>Polygonatum cyrtoneura</i> Hua	Liliaceae ユリ科
オウバク	キハダ <i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht = <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. ヒロハキハダ <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. var. <i>sachalinense</i> F. Schmidt オオバナキハダ <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. var. <i>japonicum</i> (Maxim.) Ohwi ミヤマキハダ <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. var. <i>lavallei</i> (Dode) Sprague ----- <i>Phellodendron chinense</i> Schneider = <i>Phellodendron chinense</i> C. K. Schneid.	Rutaceae ミカン科
オウレン	オウレン <i>Coptis japonica</i> Makino = <i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino セリバオウレン <i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>dissecta</i> (Yatabe) Nakai キクバオウレン <i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>japonica</i> コセリバオウレン <i>Coptis japonica</i> (Thunb.) Makino var. <i>major</i> (Miq.) Satake ----- <i>Coptis chinensis</i> Franchet = <i>Coptis chinensis</i> Franch. <i>Coptis deltoidea</i> C. Y. Cheng et Hsiao <i>Coptis teeta</i> Wallich = <i>Coptis teeta</i> Wall.	Ranunculaceae キンボウゲ科
オンジ	イトヒメハギ <i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow = <i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	Polygalaceae ヒメハギ科
カゴソウ	ウツボグサ <i>Prunella vulgaris</i> Linné var. <i>lilacina</i> Nakai = <i>Prunella vulgaris</i> L. var. <i>lilacina</i> Nakai	Labiatae シソ科
カシュウ	ツルドクダミ <i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg = <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	Polygonaceae タデ科
ガジュツ	ガジュツ <i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe	Zingiberaceae ショウガ科
カッコウ	<i>Pogostemon cablin</i> Benthham = <i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.	Labiatae シソ科
カッコン	クズ <i>Pueraria lobata</i> Ohwi = <i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	Leguminosae マメ科
カノコソウ	カノコソウ <i>Valeriana fauriei</i> Briquet = <i>Valeriana fauriei</i> Briq. ----- エゾカノコソウ <i>Valeriana fauriei</i> Briq. f. <i>yezoensis</i> Hara	Valerianaceae オミナエシ科
カロコン	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz = <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim. ----- キカラスウリ <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz var. <i>japonicum</i> Kitamura = <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim. var. <i>japonicum</i> (Miq.) Kitam. ----- オオカラスウリ <i>Trichosanthes bracteata</i> Voigt = <i>Trichosanthes bracteata</i> (Lam.) Voigt	Cucurbitaceae ウリ科
カンキョウ	ショウガ <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae ショウガ科
カンソウ	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer = <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch. <i>Glycyrrhiza glabra</i> Linné = <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Leguminosae マメ科
カンテン	マクサ(テングサ) <i>Gelidium elegans</i> Kuetzing その他同属植物 諸種紅そう類	Gelidiaceae テングサ科
キキョウ	キキョウ <i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle = <i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	Campanulaceae キキョウ科
キクカ	キク <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramatuelle = <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat. ----- シマカンギク <i>Chrysanthemum indicum</i> Linné = <i>Chrysanthemum indicum</i> L.	Compositae キク科
キササゲ	キササゲ <i>Catalpa ovata</i> G. Don <i>Catalpa bungei</i> C. A. Meyer = <i>Catalpa bungei</i> C. A. Mey.	Bignoniaceae ノウゼンカズラ科

3 日本薬局方収載生薬の学名表記について

キジツ	ダイダイ <i>Citrus aurantium</i> Linné var. <i>daidai</i> Makino = <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>daidai</i> Makino ----- <i>Citrus aurantium</i> L. <i>Daidai</i>	<i>Rutaceae</i> ミカン科
	ナツミカン <i>Citrus natsudaikai</i> Hayata <i>Citrus aurantium</i> Linné = <i>Citrus aurantium</i> L. ----- ハッサク <i>Citrus aurantium</i> L. subsp. <i>hassaku</i> (Tanaka) Hiroe <i>Citrus hassaku</i> hort. ex Tanaka	
キョウカツ	<i>Notopterygium incisum</i> Ting ex H. T. Chang <i>Notopterygium forbesii</i> Boissieu	<i>Umbelliferae</i> セリ科
	ホンアンズ <i>Prunus armeniaca</i> Linné = <i>Prunus armeniaca</i> L. ----- アンズ <i>Prunus armeniaca</i> Linné var. <i>ansu</i> Maximowicz = <i>Prunus armeniaca</i> L. var. <i>ansu</i> Maxim. ----- <i>Prunus sibirica</i> Linné = <i>Prunus sibirica</i> L.	<i>Rosaceae</i> バラ科
クコシ	クコ <i>Lycium chinense</i> Miller = <i>Lycium chinense</i> Mill. ----- <i>Lycium barbarum</i> Linné = <i>Lycium barbarum</i> L.	<i>Solanaceae</i> ナス科
	クララ <i>Sophora flavescens</i> Aiton	<i>Leguminosae</i> マメ科
	ケイガイ <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briquet = <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	<i>Labiatae</i> シソ科
ケイヒ	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	<i>Lauraceae</i> クスノキ科
ケイヒ油	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees	<i>Lauraceae</i> クスノキ科
ケツメイシ	エビスグサ <i>Cassia obtusifolia</i> Linné = <i>Cassia obtusifolia</i> L. ----- <i>Cassia tora</i> Linné = <i>Cassia tora</i> L.	<i>Leguminosae</i> マメ科
	アサガオ <i>Pharbitis nil</i> Choisy = <i>Pharbitis nil</i> (L.) Choisy	<i>Convolvulaceae</i> ヒルガオ科
	ゲンチアナ <i>Gentiana lutea</i> Linné = <i>Gentiana lutea</i> L.	<i>Gentianaceae</i> リンドウ科
ゲンノショウコ	ゲンノショウコ <i>Geranium thunbergii</i> Siebold et Zuccarini = <i>Geranium thunbergii</i> Siebold & Zucc.	<i>Geraniaceae</i> フウロソウ科
コウイ	トウモロコシ <i>Zea mays</i> Linné = <i>Zea mays</i> L. ----- キャッサバ <i>Manihot esculenta</i> Crantz	<i>Gramineae</i> イネ科 <i>Euphorbiaceae</i> トウダイグサ科
	ジャガイモ <i>Solanum tuberosum</i> Linné = <i>Solanum tuberosum</i> L. ----- サツマイモ <i>Ipomoea batatas</i> Poir. = <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir. ----- <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	<i>Solanaceae</i> ナス科 <i>Convolvulaceae</i> ヒルガオ科
	イネ <i>Oryza sativa</i> Linné = <i>Oryza sativa</i> L.	<i>Gramineae</i> イネ科
	ベニバナ <i>Carthamus tinctorius</i> Linné = <i>Carthamus tinctorius</i> L.	<i>Compositae</i> キク科
	オタネニンジン <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer = <i>Panax ginseng</i> C. A. Mey. ----- * <i>Panax schinseng</i> Nees	<i>Araliaceae</i> ウコギ科
	ハマズゲ <i>Cyperus rotundus</i> Linné = <i>Cyperus rotundus</i> L.	<i>Cyperaceae</i> カヤツリグサ科
コウベイ	イネ <i>Oryza sativa</i> Linné = <i>Oryza sativa</i> L.	<i>Gramineae</i> イネ科
コウボク	ホオノキ <i>Magnolia obovata</i> Thunberg = <i>Magnolia obovata</i> Thunb. ----- * <i>Magnolia hypoleuca</i> Siebold et Zuccarini = <i>Magnolia hypoleuca</i> Siebold & Zucc. ----- <i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wilson = <i>Magnolia officinalis</i> Rehder & E. H. Wilson ----- <i>Magnolia officinalis</i> Rehder et Wilson var. <i>biloba</i> Rehder et Wilson = <i>Magnolia officinalis</i> Rehder & E. H. Wilson var. <i>biloba</i> Rehder & E. H. Wilson	<i>Magnoliaceae</i> モクレン科
ゴオウ	ウシ <i>Bos taurus</i> Linné var. <i>domesticus</i> Gmelin = <i>Bos taurus</i> L. var. <i>domesticus</i> Gmelin	<i>Bovidae</i> ウシ科

4 日本薬局方収載生薬の学名表記について

ゴシツ	ヒナタイノコズチ <i>Achyranthes fauriei</i> Leveille et Vaniot = <i>Achyranthes fauriei</i> H. Lev. & Vaniot <i>Achyranthes bidentata</i> Blume	<i>Amaranthaceae</i> ヒユ科
ゴシユユ	ゴシユユ <i>Euodia ruticarpa</i> Hooker filius et Thomson = <i>Euodia ruticarpa</i> (A. Juss.) Hook. f. & Thomson * <i>Evodia rutaecarpa</i> Bentham = <i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. <i>Tetradium ruticarpum</i> (A. Juss.) Hartley <i>Euodia officinalis</i> Dode * <i>Evodia officinalis</i> Dode <i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang <i>Euodia bodinieri</i> Dode * <i>Evodia bodinieri</i> Dode <i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. var. <i>bodinieri</i> (Dode) Huang	<i>Rutaceae</i> ミカン科
ゴボウシ	ゴボウ <i>Arctium lappa</i> Linné = <i>Arctium lappa</i> L.	<i>Compositae</i> キク科
ゴマ	ゴマ <i>Sesamum indicum</i> Linné = <i>Sesamum indicum</i> L.	<i>Pedaliaceae</i> ゴマ科
ゴミシ	チョウセンゴミシ <i>Schisandra chinensis</i> Baillon = <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	<i>Schisandraceae</i> マツブサ科
コロシボ	<i>Jateorhiza columba</i> Miers	<i>Menispermaceae</i> ツツラフジ科
コンズランゴ	<i>Marsdenia cundurango</i> Reichenbach filius = <i>Marsdenia cundurango</i> Rchb. f.	<i>Asclepiadaceae</i> ガガイモ科
サイコ	ミシマサイコ <i>Bupleurum falcatum</i> Linné = <i>Bupleurum falcatum</i> L. <i>Bupleurum chinense</i> DC. <i>Bupleurum scorzoniferifolium</i> Willd.	<i>Umbelliferae</i> セリ科
サイシン	ウスバサイシン <i>Asiasarum sieboldii</i> F. Maekawa = <i>Asiasarum sieboldii</i> (Miq.) F. Maek. <i>Asarum sieboldii</i> Miq. ウスグサイシン <i>Asarum sieboldii</i> Miq. var. <i>seoulense</i> Nakai ケイリンサイシン <i>Asiasarum heterotropoides</i> F. Maekawa var. <i>mandshuricum</i> F. Maekawa = <i>Asiasarum heterotropoides</i> (F. Schmidt) F. Maek. var. <i>mandshuricum</i> (Maxim.) F. Maek. <i>Asarum heterotropoides</i> F. Schmidt var. <i>mandshuricum</i> (Maxim.) Kitag.	<i>Aristolochiaceae</i> ウマノスズクサ科
サフラン	サフラン <i>Crocus sativus</i> Linné = <i>Crocus sativus</i> L.	<i>Iridaceae</i> アヤメ科
サンケライ	<i>Smilax glabra</i> Roxburgh = <i>Smilax glabra</i> Roxb.	<i>Liliaceae</i> ユリ科
サンザシ	サンザシ <i>Crataegus cuneata</i> Siebold et Zuccarini = <i>Crataegus cuneata</i> Siebold & Zucc. オオミサンザシ <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge var. <i>major</i> N. E. Brown = <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge var. <i>major</i> N. E. Br.	<i>Rosaceae</i> バラ科
サンシシ	クチナシ <i>Gardenia jasminoides</i> Ellis <i>Gardenia jasminoides</i> Ellis f. <i>longicarpa</i> Z. W. Xie & Okada	<i>Rubiaceae</i> アカネ科
サンシュユ	サンシュユ <i>Cornus officinalis</i> Siebold et Zuccarini = <i>Cornus officinalis</i> Siebold & Zucc.	<i>Cornaceae</i> ミズキ科
サンショウ	サンショウ <i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle = <i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) DC. アサクラザンショウ <i>Zanthoxylum piperitum</i> (L.) DC. f. <i>inermis</i> Makino	<i>Rutaceae</i> ミカン科
サンソウニン	サネブトナツメ <i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>spinosa</i> Hu ex H. F. Chou = <i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>spinosa</i> (Bunge) Hu ex H. F. Chou	<i>Rhamnaceae</i> クロウメモドキ科
サンヤク	ヤマノイモ <i>Dioscorea japonica</i> Thunberg = <i>Dioscorea japonica</i> Thunb. ナガイモ <i>Dioscorea batatas</i> Decaisne = <i>Dioscorea batatas</i> Decne. <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.	<i>Dioscoreaceae</i> ヤマノイモ科
ジオウ	アカヤジオウ <i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz var. <i>purpurea</i> Makino = <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. var. <i>purpurea</i> Makino <i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz = <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	<i>Scrophulariaceae</i> ゴマノハグサ科
シゴカ	エゾウコギ <i>Eleutherococcus senticosus</i> Maximowicz = <i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim. * <i>Acanthopanax senticosus</i> Harms = <i>Acanthopanax senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Harms	<i>Araliaceae</i> ウコギ科

5 日本薬局方収載生薬の学名表記について

ジコッピ	クコ <i>Lycium chinense</i> Miller = <i>Lycium chinense</i> Mill. <i>Lycium barbarum</i> Linné = <i>Lycium barbarum</i> L.	<i>Solanaceae</i> ナス科
シコン	ムラサキ <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini = <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	<i>Boraginaceae</i> ムラサキ科
シツリシ	ハマビシ <i>Tribulus terrestris</i> Linné = <i>Tribulus terrestris</i> L.	<i>Zygophyllaceae</i> ハマビシ科
シャクヤク	シャクヤク <i>Paeonia lactiflora</i> Pallas = <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	<i>Paeoniaceae</i> ボタン科
ジャショウシ	<i>Cnidium monnieri</i> Cusson = <i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cusson	<i>Umbelliferae</i> セリ科
シャゼンシ	オオバコ <i>Plantago asiatica</i> Linné = <i>Plantago asiatica</i> L.	<i>Plantaginaceae</i> オオバコ科
シャゼンソウ	オオバコ <i>Plantago asiatica</i> Linné = <i>Plantago asiatica</i> L.	<i>Plantaginaceae</i> オオバコ科
ジュウヤク	ドクダミ <i>Houttuynia cordata</i> Thunberg = <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	<i>Saururaceae</i> ドクダミ科
シュクシャ	<i>Amomum xanthioides</i> Wallich = <i>Amomum xanthioides</i> Wall. ----- <i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>xanthioides</i> (Wall.) T. L. Wu & Senjen	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
ショウキョウ	ショウガ <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
ショウズク	<i>Elettaria cardamomum</i> Maton	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
ショウマ	サラシナショウマ <i>Cimicifuga simplex</i> Turczaninow = <i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Turcz.	<i>Ranunculaceae</i> キンボウゲ科
	<i>Cimicifuga dahurica</i> Maximowicz = <i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz.) Maxim.	
	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov = <i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom.	
	<i>Cimicifuga foetida</i> Linné = <i>Cimicifuga foetida</i> L.	
	タムシバ <i>Magnolia salicifolia</i> Maximowicz = <i>Magnolia salicifolia</i> (Siebold & Zucc.) Maxim. コブシ <i>Magnolia kobus</i> De Candolle = <i>Magnolia kobus</i> DC.	
<i>Magnolia biondii</i> Pampanini = <i>Magnolia biondii</i> Pamp.		
<i>Magnolia sprengeri</i> Pampanini = <i>Magnolia sprengeri</i> Pamp.		
ハクモクレン <i>Magnolia heptapeta</i> Dandy = <i>Magnolia heptapeta</i> (Buchoz) Dandy * <i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux = <i>Magnolia denudata</i> Desr.		
セネガ <i>Polygala senega</i> Linné = <i>Polygala senega</i> L. ヒロハセネガ <i>Polygala senega</i> Linné var. <i>latifolia</i> Torrey et Gray = <i>Polygala senega</i> L. var. <i>latifolia</i> Torr. & A. Gray	<i>Polygalaceae</i> ヒメハギ科	
センキュウ	センキュウ <i>Cnidium officinale</i> Makino	<i>Umbelliferae</i> セリ科
ゼンコ	<i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	<i>Umbelliferae</i> セリ科
	ノダケ <i>Angelica decursiva</i> Franchet et Savatier = <i>Angelica decursiva</i> (Miq.) Franch. & Sav. * <i>Peucedanum decursivum</i> Maximowicz = <i>Peucedanum decursivum</i> (Miq.) Maxim.	
	コウホネ <i>Nuphar japonicum</i> De Candolle = <i>Nuphar japonicum</i> DC.	
センソ	シナヒキガエル <i>Bufo bufo gargarizans</i> Cantor	<i>Bufo</i> ヒキガエル科
	<i>Bufo melanostictus</i> Schneider	
センナ	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl	<i>Leguminosae</i>
	<i>Cassia acutifolia</i> Delile	マメ科
センブリ	センブリ <i>Swertia japonica</i> Makino = <i>Swertia japonica</i> (Shult.) Makino	<i>Gentianaceae</i> リンドウ科
ソウジュツ	ホソバオケラ <i>Atractylodes lancea</i> De Candolle = <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	<i>Compositae</i> キク科
	<i>Atractylodes chinensis</i> Koidzumi = <i>Atractylodes chinensis</i> (DC.) Koidz.	

6 日本薬局方収載生薬の学名表記について

	上記種の雑種	
ソウハクヒ	マゴフ <i>Morus alba</i> Linné = <i>Morus alba</i> L.	<i>Moraceae</i> クワ科
ソボク	<i>Caesalpinia sappan</i> Linné = <i>Caesalpinia sappan</i> L.	<i>Leguminosae</i> マメ科
ソヨウ	シソ <i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>acuta</i> Kudo = <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>acuta</i> (Thunb.) Kudo チリメンジソ <i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> Decaisne = <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>crispa</i> (Thunb.) Decne.	<i>Labiatae</i> シソ科
ダイオウ	<i>Rheum palmatum</i> Linné = <i>Rheum palmatum</i> L. <i>Rheum tanguticum</i> Maximowicz = <i>Rheum tanguticum</i> Maxim. <i>Rheum officinale</i> Baillon = <i>Rheum officinale</i> Baill. <i>Rheum coreanum</i> Nakai 上記種の種間雑種	<i>Polygonaceae</i> タデ科
タイソウ	ナツメ <i>Zizyphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder = <i>Zizyphus jujuba</i> Mill. var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder	<i>Rhamnaceae</i> クロウメモドキ科
タクシャ	サジオモダカ <i>Alisma orientale</i> Juzepczuk = <i>Alisma orientale</i> (Sam.) Juz. ----- <i>Alisma plantago-aquatica</i> L. var. <i>orientale</i> Sam.	<i>Alismataceae</i> オモダカ科
チクセツニンジン	トチバニンジン <i>Panax japonicus</i> C. A. Meyer = <i>Panax japonicus</i> C. A. Mey.	<i>Araliaceae</i> ウコギ科
チモ	ハナスゲ <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	<i>Liliaceae</i> ユリ科
チョウジ チョウジ油	チョウジ <i>Syzygium aromaticum</i> Merrill et Perry = <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & M. L. Perry * <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg = <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb. <i>Eugenia caryophyllus</i> (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison	<i>Myrtaceae</i> フトモモ科
チョウトウコウ	カギカズラ <i>Uncaria rhynchophylla</i> Miquel = <i>Uncaria rhynchophylla</i> (Miq.) Miq. <i>Uncaria sinensis</i> Haviland = <i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil. <i>Uncaria macrophylla</i> Wallich = <i>Uncaria macrophylla</i> Wall.	<i>Rubiaceae</i> アカネ科
チョレイ	チョレイマイタケ <i>Polyporus umbellatus</i> Fries = <i>Polyporus umbellatus</i> (Pers.) Fries	<i>Polyporaceae</i> サルノシカケ科
チンピ	ウンシュウミカン <i>Citrus unshiu</i> Marcowicz = <i>Citrus unshiu</i> (Swingle) Marcow. ----- <i>Citrus reticulata</i> Blanco Unshiu <i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>Rutaceae</i> ミカン科
テンマ	オニノヤガラ <i>Gastrodia elata</i> Blume	<i>Orchidaceae</i> ラン科
テンモンドウ	クサスギカズラ <i>Asparagus cochinchinensis</i> Merrill = <i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr.	<i>Liliaceae</i> ユリ科
トウガシ	トウガン <i>Benincasa cerifera</i> Savi ----- <i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn. <i>Benincasa cerifera</i> Savi forma <i>emarginata</i> K. Kimura et Sugiyama = <i>Benincasa cerifera</i> Savi f. <i>emarginata</i> K. Kimura & Sugiyama	<i>Cucurbitaceae</i> ウリ科
トウガラシ	トウガラシ <i>Capsicum annum</i> Linné = <i>Capsicum annum</i> L.	<i>Solanaceae</i> ナス科
トウキ	トウキ <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa = <i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag. ホッカイトウキ <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa var. <i>sugiyamae</i> Hikino = <i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag. var. <i>sugiyamae</i> Hikino	<i>Umbelliferae</i> セリ科
トウニン	モモ <i>Prunus persica</i> Batsch = <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch <i>Prunus persica</i> Batsch var. <i> davidiana</i> Maximowicz = <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch var. <i> davidiana</i> (Carrière) Maxim. ----- <i>Prunus davidiana</i> (Carrière) Franch.	<i>Rosaceae</i> バラ科
トウヒ	<i>Citrus aurantium</i> Linné = <i>Citrus aurantium</i> L. ダイダイ <i>Citrus aurantium</i> Linné var. <i> daidai</i> Makino = <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i> daidai</i> Makino ----- <i>Citrus aurantium</i> L. <i>Daidai</i>	<i>Rutaceae</i> ミカン科

7 日本薬局方収載生薬の学名表記について

ドクカツ	ウド <i>Aralia cordata</i> Thunberg = <i>Aralia cordata</i> Thunb.	<i>Araliaceae</i> ウコギ科
トコン	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> A. Richard = <i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot.) A. Rich. <i>Cephaelis acuminata</i> Karsten = <i>Cephaelis acuminata</i> H. Karst.	<i>Rubiaceae</i> アカネ科
トチュウ	トチュウ <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver = <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	<i>Eucommiaceae</i> トチュウ科
トラガント	<i>Astragalus gummifer</i> Labillardiere = <i>Astragalus gummifer</i> Labill.	<i>Leguminosae</i> マメ科
ニガキ	ニガキ <i>Picrasma quassioides</i> Bennet = <i>Picrasma quassioides</i> (D. Don) Benn.	<i>Simaroubaceae</i> ニガキ科
ニクズク	ニクズク <i>Myristica fragrans</i> Houttuyn = <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	<i>Myristicaceae</i> ニクズク科
ニンジン	オタネニンジン <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer = <i>Panax ginseng</i> C. A. Mey. * <i>Panax schinseng</i> Nees	<i>Araliaceae</i> ウコギ科
ニンドウ	スイカズラ <i>Lonicera japonica</i> Thunberg = <i>Lonicera japonica</i> Thunb.	<i>Caprifoliaceae</i> スイカズラ科
バイモ	アミガサユリ <i>Fritillaria verticillata</i> Willdenow var. <i>thunbergii</i> Baker = <i>Fritillaria verticillata</i> Willd. var. <i>thunbergii</i> (Miq.) Baker ----- <i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	<i>Liliaceae</i> ユリ科
バクモンドウ	ジャノヒゲ <i>Ophiopogon japonicus</i> Ker-Gawler = <i>Ophiopogon japonicus</i> (L. f.) Ker Gawl.	<i>Liliaceae</i> ユリ科
ハチミツ	ヨーロッパミツバチ <i>Apis mellifera</i> Linné = <i>Apis mellifera</i> L. トウヨウミツバチ <i>Apis cerana</i> Fabricius	<i>Apidae</i> ミツバチ科
ハッカ ハッカ油	ハッカ <i>Mentha arvensis</i> Linné var. <i>piperascens</i> Malinvaud = <i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinv. ----- <i>Mentha haplocalyx</i> Briq. ----- ハッカ <i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinv. を母種とする交配種	<i>Labiatae</i> シソ科
ハマボウフウ	ハマボウフウ <i>Glehnia littoralis</i> Fr. Schmidt ex Miquel = <i>Glehnia littoralis</i> F. Schmidt ex Miq.	<i>Umbelliferae</i> セリ科
ハンゲ	カラスビシャク <i>Pinellia ternata</i> Breitenbach = <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breitenb.	<i>Araceae</i> サトイモ科
ビヤクゴウ	オニユリ <i>Lilium lancifolium</i> Thunberg = <i>Lilium lancifolium</i> Thunb. ハカタユリ <i>Lilium brownii</i> F. E. Brown var. <i>colchesteri</i> Wilson = <i>Lilium brownii</i> F. E. Br. var. <i>colchesteri</i> (Van Houtte) E. H. Wilson ex Elwes ----- <i>Lilium brownii</i> F. E. Brown var. <i>viridulum</i> Baker <i>Lilium brownii</i> F. E. Brown = <i>Lilium brownii</i> F. E. Br. ----- <i>Lilium pumilum</i> De Candolle = <i>Lilium pumilum</i> DC.	<i>Liliaceae</i> ユリ科
ビヤクシ	ヨロイグサ <i>Angelica dahurica</i> Benth. et Hooker filius ex Franchet et Savatier = <i>Angelica dahurica</i> (Hoffm.) Benth. & Hook. f. ex Franch. & Sav.	<i>Umbelliferae</i> セリ科
ビヤクジュツ	オケラ <i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi ex Kitamura = <i>Atractylodes japonica</i> Koidz. ex Kitam. オオバナオケラ <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi = <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz. ----- * <i>Atractylodes ovata</i> De Candolle = <i>Atractylodes ovata</i> (Thunb.) DC.	<i>Compositae</i> キク科
ビワヨウ	ビワ <i>Eriobotrya japonica</i> Lindley = <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	<i>Rosaceae</i> バラ科
ビンロウジ	ビンロウ <i>Areca catechu</i> Linné = <i>Areca catechu</i> L.	<i>Palmae</i> ヤシ科
ブクリョウ	マツホド <i>Wolfiporia cocos</i> Ryvarden et Gilbertson = <i>Wolfiporia cocos</i> (Schw.) Ryv. & Gilbn. ----- * <i>Poria cocos</i> Wolf = <i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	<i>Polyporaceae</i> サルノコシカケ科
ブシ	ハナトリカブト <i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux オクトリカブト <i>Aconitum japonicum</i> Thunberg = <i>Aconitum japonicum</i> Thunb.	<i>Ranunculaceae</i> キンポウゲ科
ベラドンナコン	<i>Atropa belladonna</i> Linné = <i>Atropa belladonna</i> L.	<i>Solanaceae</i> ナス科
ヘンズ	フジマメ <i>Dolichos lablab</i> Linné = <i>Dolichos lablab</i> L.	<i>Leguminosae</i> マメ科

8 日本薬局方収載生薬の学名表記について

ボウイ	オオツツラフジ <i>Sinomenium acutum</i> Rehder et Wilson = <i>Sinomenium acutum</i> (Thunb.) Rehder & E. H. Wilson	<i>Menispermaceae</i> ツツラフジ科
ボウコン	チガヤ <i>Imperata cylindrica</i> Beauvois = <i>Imperata cylindrica</i> (L.) P. Beauv. ----- <i>Imperata cylindrica</i> (L.) P. Beauv. var. <i>major</i> (Nees) C. E. Hubb.	<i>Gramineae</i> イネ科
ボウフウ	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin = <i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.	<i>Umbelliferae</i> セリ科
ボクソク	クヌギ <i>Quercus acutissima</i> Carruthers = <i>Quercus acutissima</i> Carruth.	<i>Fagaceae</i> ブナ科
	コナラ <i>Quercus serrata</i> Murray	
	ミズナラ <i>Quercus mongholica</i> Fischer ex Ledebour var. <i>crispula</i> Ohashi = <i>Quercus mongholica</i> Fisch. ex Ledeb. var. <i>crispula</i> (Blume) Ohashi	
	アベマキ <i>Quercus variabilis</i> Blume	
ボタンビ	ボタン <i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews * <i>Paeonia moutan</i> Sims	<i>Paeoniaceae</i> ボタン科
ホミカ	<i>Strychnos nux-vomica</i> Linné = <i>Strychnos nux-vomica</i> L.	<i>Loganiaceae</i> マチン科
ボレイ	カキ <i>Ostrea gigas</i> Thunberg = <i>Ostrea gigas</i> Thunb.	<i>Ostreidae</i> イボタガキ科
マオウ	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	<i>Ephedraceae</i> マオウ科
	<i>Ephedra intermedia</i> Schrenk et C. A. Meyer = <i>Ephedra intermedia</i> Schrenk & C. A. Mey.	
	<i>Ephedra equisetina</i> Bunge	
マクリ	マクリ <i>Digenea simplex</i> C. Agardh = <i>Digenea simplex</i> (Wulfen) C. Agardh	<i>Rhodomelaceae</i> フジマツモ科
マシニン	アサ <i>Cannabis sativa</i> Linné = <i>Cannabis sativa</i> L.	<i>Moracea</i> クワ科
モクツウ	アケビ <i>Akebia quinata</i> Decaisne = <i>Akebia quinata</i> (Thunb. ex Houtt.) Decne.	<i>Lardizabalaceae</i> アケビ科
	ミツバアケビ <i>Akebia trifoliata</i> Koidzumi = <i>Akebia trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.	
モッコウ	<i>Saussurea lappa</i> Clarke = <i>Saussurea lappa</i> (Decne.) C. B. Clarke ----- <i>Aucklandia lappa</i> Decne.	<i>Compositae</i> キク科
ヤクチ	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel = <i>Alpinia oxyphylla</i> Miq.	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
ヤクモソウ	メハジキ <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn = <i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	<i>Labiatae</i> シソ科
	<i>Leonurus sibiricus</i> Linné = <i>Leonurus sibiricus</i> L.	
ユウタン	<i>Ursus arctos</i> Linné = <i>Ursus arctos</i> L. その他近縁動物	<i>Ursidae</i> クマ科
ヨクイニン	ハトムギ <i>Coix lacryma jobi</i> Linné var. <i>mayuen</i> Stapf = <i>Coix lacryma jobi</i> L. var. <i>mayuen</i> (Rom. Caill.) Stapf	<i>Gramineae</i> イネ科
リュウガンニク	リュウガン <i>Euphoria longana</i> Lamarck = <i>Euphoria longana</i> Lam. ----- <i>Dimocarpus longan</i> Lour.	<i>Sapindaceae</i> ムクロジ科
リュウタン	トウリンドウ <i>Gentiana scabra</i> Bunge リンドウ <i>Gentiana scabra</i> Bunge var. <i>buergeri</i> (Miq.) Maxim.	<i>Gentianaceae</i> リンドウ科
	<i>Gentiana manshurica</i> Kitagawa = <i>Gentiana manshurica</i> Kitag.	
	<i>Gentiana triflora</i> Pallas = <i>Gentiana triflora</i> Pall.	
	----- エンリンドウ <i>Gentiana triflora</i> Pall. var. <i>japonica</i> Hara	
リョウキョウ	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	<i>Zingiberaceae</i> ショウガ科
レンギョウ	レンギョウ <i>Forsythia suspensa</i> Vahl = <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	<i>Oleaceae</i> モクセイ科
	シナレンギョウ <i>Forsythia viridissima</i> Lindley = <i>Forsythia viridissima</i> Lindl.	
レンニク	ハス <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner = <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	<i>Nymphaeaceae</i> スイレン科
ロジン	<i>Pinus</i> 属諸種植物	<i>Pinaceae</i> マツ科
ロートコン	ハシリドコロ <i>Scopolia japonica</i> Maximowicz = <i>Scopolia japonica</i> Maxim.	<i>Solanaceae</i> ナス科

9 日本薬局方収載生薬の学名表記について

	<i>Scopolia carniolica</i> Jacquin = <i>Scopolia carniolica</i> Jacq.	
	<i>Scopolia parviflora</i> Nakai = <i>Scopolia parviflora</i> (Dunn) Nakai	
ローヤルゼリー	ヨーロッパミツバチ <i>Apis mellifera</i> Linné = <i>Apis mellifera</i> L.	<i>Apidae</i>
	トウヨウミツバチ <i>Apis cerana</i> Fabricius	ミツバチ科

6 基原植物に「その他同属植物」などが含まれる場合は、学名の表記はないが本表に記載している。

7 参考資料

8 寺林進ら：平成20年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告，日本薬局方収載生薬の基原の確認(第2報)日本薬局方の学名
9 表記と分類学で用いる学名表記の比較，医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，41(5)，407-418(2010)。

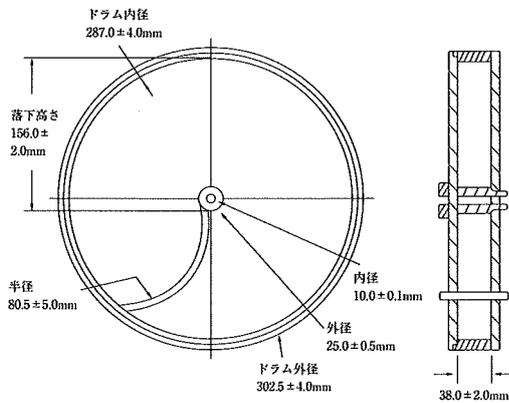
1 錠剤の摩損度試験法

1 錠剤の摩損度試験法

2 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。

3 錠剤の摩損度試験法は、剤皮を施していない圧縮成型錠の摩
4 損度を測定する方法である。ここに記載した試験手順はほとん
5 どの圧縮成型錠に適用できる。摩損度の測定は、錠剤の硬度な
6 ど他の物理的強度の測定を補足するものである。

7 内径283~291mm、深さ36~40mmの内面が滑らかな透明
8 な合成樹脂製で、静電気をおびにくいドラムを用いる(典型的
9 な装置については図参照)。ドラム的一方の側面は取り外しが
10 できる。錠剤はドラムの中央から外壁まで伸びている内側半径
11 75.5~85.5mmの湾曲した仕切り板に沿ってドラムの回転ごと
12 に転がり落ちる。中心軸リング部の外径は24.5~25.5mmとす
13 る。ドラムは、 25 ± 1 rpmで回転する装置の水平軸に取り付け
14 られる。したがって、錠剤は各回転ごとに転がりあるいは滑っ
15 てドラム壁に又は他の錠剤の上に落ちる。



16

17 1錠の質量が650mg以下のときは、6.5gにできるだけ近い量
18 に相当する n 錠を試料とする。1錠の質量が650mgを超え
19 ときは10錠を試料とする。試験前に注意深く錠剤に付着してい
20 る粉末を取り除く。錠剤試料の質量を精密に量り、ドラムに入
21 れる。ドラムを100回転させた後、錠剤を取り出す。試験開始
22 前と同様に錠剤に付着した粉末を取り除いた後、質量を精密に
23 量る。

24 通常、試験は一回行う。試験後の錠剤試料に明らかにひび、
25 割れ、あるいは欠けの見られる錠剤があるとき、その試料は不
26 適合である。もし結果が判断しにくいとき、あるいは質量減少
27 が目標値より大きいときは、更に試験を二回繰り返し、三回の
28 試験結果の平均値を求める。多くの製品において、最大平均質
29 量減少(三回の試験の)が1.0%以下であることが望ましい。

30 もし錠剤の大きさや形によって回転落下が不規則になるなら、
31 錠剤が密集状態にあっても錠剤同士が付着して錠剤の自由落下
32 を妨げることのないよう、水平面とドラムの装置下台との角度
33 が約 10° になるよう装置を調整する。

34 発泡錠やチュアブル錠は、異なった摩損度を示す。吸湿性の
35 錠剤の場合には、適切に湿度が調節された条件が試験のために
36 必要である。

37 多くの試料を同時に試験できるよう仕切り板を二つ持ったド
38 ラムや二つ以上のドラムを備えた装置を利用してもよい。

1 プラスチック製医薬品容器

2 種々のプラスチックが医薬品の容器に使われている。しかし、
3 それが医薬品の有効性と安全性、安定性を損なうものであって
4 はならない。容器の選択にあたっては、添加された物質などを
5 含むプラスチック容器の製造過程に関するすべての情報を得る
6 ことが望ましい。個々のプラスチックはその特有の性質を持つ
7 し、容器に充てんされる医薬品の性質も様々であるので、プラ
8 スチック製医薬品容器の適合性は個別のプラスチックの性質と
9 医薬品の性質の組合せの中で判断されるべきである。この判断
10 は、試作した医薬品製剤の容器が基本要件、すなわち、設計仕
11 様に適合するか否かを試験及び／又は学術文献などに基づいて
12 検証して行うべきである。また、その適合性は適切な品質保証
13 計画に基づいて維持されなければならない。

14 また、プラスチック容器の導入にあたっては、適切な廃棄処
15 理を考慮することが望ましい。

1.1 プラスチック製医薬品容器設計における基本要件

16 容器の材料プラスチックは一定水準以上の品質を有するもの
17 でなければならない。材料組成を保証できないようなりサイク
18 ル・プラスチックは使用してはならない。

19 容器からの溶出物又は移行物が内容医薬品の有効性と安定性
20 を損なってはならない。また、それらの溶出物又は移行物は一
21 定以上の毒性を示してはならない。また、容器から内容医薬品
22 へのモノマーや添加剤などの化学物質の溶出量又は移行量は安
23 全性の見地から十分に低くなければならない。

24 容器は、その用途に見合ったレベルの硬さや柔軟性、耐衝撃
25 性、引っ張り強度、引き裂き強度、曲げ強度、耐熱性などの物
26 理的性質を備える必要がある。

27 保存中に内容医薬品の品質が低下してはならない。すなわち、
28 光に不安定な医薬品の場合には、容器に一定の遮光性が必要で
29 ある。また、酸化されやすい医薬品の場合には、酸素を透過し
30 やすい容器材料は不適切である。また、水溶液医薬品や乾燥を
31 必要とする医薬品の場合には、水蒸気を透過しやすい容器材料
32 は不適切である。また、水以外の溶液の場合でも当該溶媒の透
33 過性に同様の注意が必要である。内容医薬品が容器の表面に吸
34 着したり、容器材料内部に移行したり、通過したりして、医薬
35 品濃度が一定以上減少してはならない。また、容器材料との相
36 互作用によって内容医薬品が変性してはならない。

37 容器は、内容医薬品によって変形したり、劣化したり、変質
38 したりしてはならない。また、貯蔵・運搬時に考えられる高温
39 又は低温、若しくはその繰り返しにあっても、許容できないよ
40 うな容器の機能の低下をきたしてはならない。

41 異物や濁りの有無を目視によって検査する必要がある医薬品
42 の場合には、容器には必要なレベルの透明性が必要である。

43 滅菌を必要とする医薬品にあつては、容器の品質が滅菌前後
44 に変化する可能性があれば、以上の容器の基本要件は滅菌後に
45 満たされる必要がある。滅菌後に、一定以上の新たな毒性物質
46 の残留や生成があつてはならない。また、容器の構造及び材質
47 は、滅菌後の貯蔵・運搬時にあつて内容医薬品の微生物汚染を
48 招くものであつてはならない。

2. 設計段階における容器の毒性評価

49 設計段階において、容器について毒性評価を実施する必要が
50 ある。その際、各種毒性試験の試験方法とそれに基づいた評価

51 基準を設定する。その根拠を明らかにすることが望ましい。試
52 験は試作された容器又はその部分を試料として行うものとする。
53 容器が複数の部分からなり、これらが別の材料からできている
54 場合には、それぞれの材料部分について試験を行う。複合材料
55 (ラミネート、コンポジットなど)の場合は1種類の材料とみな
56 すが、できるだけ内容医薬品が接する面が抽出液などによく接
57 するように工夫して試験することが望ましい。

58 内容医薬品の適用部位による容器の毒性評価に必要な試験項
59 目は次のとおりである。

60 (i) 血液に接触する製剤の容器：急性毒性試験、細胞毒性試
61 験、感作性試験、溶血性試験

62 (ii) 皮膚又は粘膜に接触する製剤の容器：細胞毒性試験、感
63 作性試験

64 (iii) 液状内用薬の容器：細胞毒性試験

65 これらの試験は、国内外の医療用具・医用材料に関する最新
66 の標準試験方法に従って実施する。以下に参考となる標準試験
67 方法を例示する。

2.1. 標準試験方法の例示

2.1.1. 試験の選択

70 (i) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイド
71 ライン 前文

72 (ii) ISO 10993-1: Biological evaluation of medical
73 devices—Evaluation and testing

2.1.2. 急性毒性試験

74 (i) ASTM F750-82: Standard practice for evaluating
75 material extracts by systemic injection in the mice

76 (ii) BS 5736: Part 3 Method of test for systemic toxicity;
77 assessment of acute toxicity of extracts from medical devices

78 (iii) USP XXIV <88> Biological reactivity tests, *in vivo*

2.1.3. 細胞毒性試験

79 (i) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイド
80 ライン I. 細胞毒性試験 10. 医療用具又は材料の抽出液

81 を用いた細胞毒性試験

82 (ii) ISO 10993-5: Biological evaluation of medical
83 devices—Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods

84 (iii) USP XXIV <87> Biological reactivity tests, *in vitro*

2.1.4. 溶血性試験

85 (i) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイド
86 ライン VII. 溶血性試験

87 (ii) ISO 10993-4: Biological evaluation of medical
88 devices—Selection of tests for interaction with blood,
89 Annex D

90 (iii) ASTM F756-82: Standard practice for assessment of
91 hemolytic properties of materials

2.1.5. 感作性試験

92 (i) 医療用具及び医用材料の基礎的な生物学的試験のガイド
93 ライン II. 感作性試験

94 (ii) ISO 10993-10: Biological evaluation of medical
95 devices—Tests for irritation and sensitization

3. 管理単位ごとに保存すべき試験成績

96 製造段階においては、少なくとも以下の試験項目について規
97 格値を設定し、プラスチック製医薬品容器の管理単位ごとに試
98 験成績を保管すべきである。また、規格値の設定の根拠を示す
99 ことが望ましい。ただし、液状以外の内用剤には適用しない。

2 プラスチック製医薬品容器

- 107 (i) 灰化試験：強熱残分，重金属．必要がある場合は特定の
- 108 金属含量(鉛，カドミウムなど)
- 109 (ii) 溶出物試験：pH，紫外吸収スペクトル，過マンガン酸
- 110 カリウム還元性物質，泡立ち，蒸発残留物
- 111 (iii) 細胞毒性試験
- 112 (iv) その他：必要な事項

1 医薬品等の試験に用いる水

1 医薬品等の試験に用いる水

2 医薬品等の試験に用いる水については、日本薬局方の通則
3 20に「試験を行うのに適した水とする。」とされているよう
4 に、当該試験の目的に適う水であることを確認した上で用いる
5 必要がある。

6 この医薬品等の試験に用いる水としては、試験方法中におい
7 て別に規定される場合を除いて、「精製水」，「精製水(容器
8 入り)」又はイオン交換，超ろ過など適切な方法により試験用
9 に製した水を用いればよい。また，ほかの施設などで試験用に
10 製造された水を手入して用いてもよい。

11 日本薬局方の一般試験法中で規定されている試験用の水とし
12 ては，以下のものがある。

- 13 ・アンモニウム試験用水：〈1.02〉アンモニウム試験法(アン
14 モニウム標準液)
- 15 ・エンドトキシン試験用水：〈4.01〉エンドトキシン試験法
- 16 ・微粒子試験用水(注射剤試験用)：〈6.07〉注射剤の不溶性微
17 粒子試験法
- 18 ・微粒子試験用水(点眼剤試験用)：〈6.08〉点眼剤の不溶性微
19 粒子試験法
- 20 ・微粒子試験用水(プラスチック製医薬品容器試験用)：
21 〈7.02〉プラスチック製医薬品容器試験法の微粒子試験

22 日本薬局方の参考情報中で規定されている試験用の水として
23 は，以下のものがある。

- 24 ・アルミニウム試験用水：中心静脈栄養剤中の微量アルミニ
25 ウム試験法
 - 26 ・ICP分析用水：誘導結合プラズマ発光分光分析法
- 27 日本薬局方の試験に関する記載において単に“水”と記載さ
28 れる場合は，通則20に規定された「医薬品等の試験に用いる
29 水」を指す。

1 製薬用水の品質管理

2 医薬品の製造、容器や設備等の洗浄などに使用される水を製
3 薬用水と称する。製薬用水の品質を恒常的に確保するためには、
4 要求される品質の水が供給されることを適切なバリデーション
5 により検証すると共に、日常的な水質管理によりそれを保証し
6 続けることが重要である。

7 1. 製薬用水の種類

8 1.1. 常水

9 「常水」の規格及び試験方法は、日本薬局方の医薬品各条で
10 規定されており、水道法第4条に基づく水質基準に適合するこ
11 とが求められている。「常水」を井水又は工業用水などから各
12 施設において製造する場合は、適切な処理と管理を行うこと
13 より、上記の基準と併せてアンモニウム「0.05mg/L以下」の
14 規格に適合することが求められる。また、一定期間保存して用
15 いる場合は、微生物の増殖抑制を図る必要がある。

16 「常水」は、「精製水」や「注射用水」製造用の原水として
17 用いられるほか、原薬中間体の製造や製薬関連設備の予備洗浄
18 にも用いられる。

19 1.2. 精製水

20 「精製水」及び「精製水(容器入り)」の規格及び試験方法は、
21 日本薬局方の医薬品各条で規定されている。

22 「精製水」は、原水として「常水」を用い、必要な前処理を
23 経て、イオン交換、蒸留、逆浸透(RO: Reverse Osmosis)又は
24 分子量約6000以上の物質を除去できる限外ろ過(UF:
25 Ultrafiltration)などを単独であるいは組み合わせて用いたシ
26 ステムにより製造する。「精製水」の製造にあたっては、適切
27 な微生物管理が必要である。特に、イオン交換、逆浸透又は限
28 外ろ過により製造するときは、それぞれに対応した微生物の増
29 殖抑制を図るか又は定期的な殺菌処理を行う。

30 殺菌処理、薬剤による微生物の増殖抑制又はエンドトキシン
31 含有量を適切な管理基準内に維持するための処理を行った精製
32 水については、目的に応じた規格を別途定め、その規格に適合
33 した水質を維持するための適切な管理を行う。

34 「精製水(容器入り)」は、「精製水」を気密容器に入れたも
35 のである。

36 1.3. 滅菌精製水

37 「滅菌精製水(容器入り)」(別名:滅菌精製水)の規格及び試
38 験方法は、日本薬局方の医薬品各条で規定されている。

39 「滅菌精製水(容器入り)」は、「精製水」を密封容器に入れ
40 て、滅菌したもの、又はあらかじめ滅菌した「精製水」を無菌
41 的な手法により無菌の容器に入れた後、密封したものである。
42 なお、密封容器の代わりにプラスチック製水性注射剤容器を用
43 いてもよいこととされている。

44 1.4. 注射用水

45 「注射用水」及び「注射用水(容器入り)」の規格及び試験方
46 法は、日本薬局方医薬品各条で規定されている。

47 「注射用水」は、「常水」にイオン交換、逆浸透等による適
48 切な前処理を行った水又は「精製水」の、蒸留又は超ろ過
49 (RO/UF: Reverse Osmosis and/or Ultrafiltration)により製造
50 する。蒸留法により製造する場合、飛沫同伴による汚染が起こ
51 らないように留意する。超ろ過法により製造する場合、長期間
52 にわたるバリデーションと綿密な日常管理により、蒸留法によ

53 り製造した水と同等の品質の水が恒常的に製造されることが保
54 証される必要がある。逆浸透膜又は限外ろ過膜を単独であるい
55 は組み合わせて用いた注射用水製造システムのいずれにおいて
56 も、注射用水に適した水が安定して製造されることが、前処理
57 装置を含む製造システム全体によって保証されることが肝要で
58 ある。製造システムに供給される水に関しては、適切なバリデ
59 ーションと日常管理により、原水として適切な水質が維持され
60 ていることを担保する。超ろ過法による製造システムに関して
61 は、水質分析、計器によるモニタリング及び透過水量監視など
62 の日常管理を行うと共に、定期的な膜の外観検査及びエアリー
63 ク試験を実施し、併せて使用した膜の引張り強度、リークの有
64 無や程度について試験を行って膜の劣化の度合いを診断し、膜
65 交換の指標あるいは膜の破断の予知方法とするなど、膜の管理
66 手法を確立しておくことが望ましい。また、これらに加えて、
67 膜の使用条件に見合った適切な交換頻度を定めておくことが望
68 ましい。

69 なお、「注射用水」を製造システム中で一時的に保存する場
70 合、微生物及びエンドトキシンに関する厳密な管理が必要であ
71 る。エンドトキシンについては、規格値として0.25EU/mL未
72 満であることが要求される。

73 「注射用水(容器入り)」は、「注射用水」を密封容器に入れ
74 て滅菌したもの、又はあらかじめ滅菌した「注射用水」を無菌
75 的な手法により無菌の容器に入れた後、密封したものである。
76 なお、密封容器の代わりにプラスチック製水性注射剤容器を用
77 いてもよいこととされている。

78 2. 超ろ過法

79 超ろ過法は、「精製水」又は「注射用水」の製造において、
80 逆浸透膜又は限外ろ過膜を単独であるいは組み合わせて用いた
81 製造システムにより水を精製する方法であり、蒸留法に替わり
82 得る製造方法として用いられる。

83 超ろ過法により「注射用水」を製造するときは、通例、前処
84 理設備、注射用水製造設備及び注射用水供給設備を備えた製造
85 システムを用いる。前処理設備は、原水から固形物、溶存塩類
86 及びコロイド状物質などを除去し、注射用水製造設備の負荷を
87 軽減させるために、注射用水製造設備の前に設置する。本設備
88 は、凝集装置、沈降分離装置、ろ過装置、塩素殺菌装置、酸
89 化・還元装置、残留塩素除去装置、精密ろ過装置、逆浸透装置、
90 限外ろ過装置及びイオン交換装置などを原水の水質に応じて適
91 切に組み合わせて構成される。注射用水製造設備は、前処理水
92 供給装置、紫外線殺菌装置、熱交換装置、膜モジュール、洗
93 浄・殺菌用装置などから構成される。注射用水供給設備は、
94 「注射用水」を一時的に保存するための貯水タンク、配管系、
95 熱交換装置、循環ポンプ、調圧装置などから構成される。なお、
96 超ろ過法により「精製水」を製造する場合においても、製造シ
97 ステムの基本的構成は「注射用水」の場合と同様である。

98 超ろ過法により製造した「注射用水」をシステム内に一時的
99 に保存する場合には、通例、80℃以上の高温で熱循環させる
100 ことにより微生物の増殖を阻止する。

101 超ろ過法においては、原水の水質及び目標とする水質を考慮
102 して、膜の最適な組み合わせを選択する。限外ろ過膜を「精製
103 水」及び「注射用水」の製造に用いるときは、微生物及び分子
104 量約6000以上の物質を除去できる膜モジュールを用いる。

105 3. 製薬用水の選択

106 医薬品製造用の水としては、日本薬局方に定める上記1.1.~

2 製薬用水の品質管理

107 1.4.の範疇の製薬用水の中から使用目的に応じて、最終製品の
108 品質が保証され、製造過程で支障をきたさないものを選択する。
109 表1に原薬及び製剤の仕込み水を選択する場合の基準を例示す
110 る。

111 なお、「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)に代えて「滅
112 菌精製水(容器入り)」又は「注射用水」(又は「注射用水(容器
113 入り)」)を用いることができる。

114 3.1. 製剤

115 微生物やエンドトキシンによる汚染が許されない無菌製剤の
116 製造には、「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)を用い
117 る。ただし、点眼剤と眼軟膏剤の製造には、「精製水」(又は
118 「精製水(容器入り)」)を用いることができる。

119 非無菌製剤の製造には、「精製水」(又は「精製水(容器入
120 り)」)以上の品質の水を用いる。ただし、非無菌製剤で微生物
121 汚染に注意を払わなければならない液剤、軟膏剤、懸濁剤、乳
122 剤、坐剤、エアゾール剤などには、製剤中の保存剤などの影響
123 を加味しながら、微生物学的に適切に管理された「精製水」
124 (又は「精製水(容器入り)」)を用いる。なお、生薬を含有する
125 製剤については、生薬中の生菌数及び製剤において達成すべき
126 微生物限度を考慮した製薬用水の選択が求められる。

127 また、直接的に製品に接する設備表面や容器などの予備洗浄
128 水は、「常水」以上の品質の水とするが、最終リンス水は仕込
129 み水と同等の品質の水とする。

130 3.2. 原薬

131 原薬用の製薬用水の選択に際しては、その原薬が用いられる
132 製剤の特性、製剤工程を考慮し、最終製剤の品質が確保される
133 ように選択しなければならない。

134 原薬の製造に用いる水及び直接的に製品に接する設備表面や
135 容器の洗浄水は、合成や抽出プロセスの初期の段階であっても、
136 理化学的及び微生物学的に管理された「常水」以上の品質の水
137 を用いる。ただし、最終の精製工程では、「精製水」(又は
138 「精製水(容器入り)」)以上の品質の水を用いる。直接的に製品
139 に接する設備表面や容器などの最終リンス水は仕込み水と同等
140 の品質の水とする。

141 無菌原薬の製造用水には、「滅菌精製水(容器入り)」又は
142 「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)を用いる。また、
143 エンドトキシン管理が必要な製剤に使用する原薬で、後の工程
144 にエンドトキシンの除去工程がない場合は、「注射用水」(又
145 は「注射用水(容器入り)」)又はエンドトキシンが適切な水準に
146 管理された「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。

147 4. 製薬用水の品質管理

148 4.1. 概要

149 製薬用水の日常的管理及び定期的管理を実施する上では、初
150 期に製薬用水の製造システム(製薬用水システム)のパリデーシ
151 ョンで要求される品質の水が製造されることが十分に実証され
152 ていることが前提となる。この前提が満たされている場合には、
153 以下の管理手法に従って製薬用水の品質管理を行うことができ
154 る。

155 日常的な管理項目としては、導電率及び有機体炭素(TOC)に
156 よる品質管理が有用であり、定期的管理項目としては、その使
157 用目的によって、上記に加えていくつかの特定不純物、生菌数、
158 エンドトキシン及び不溶性微粒子などを選択し、管理項目とす
159 る。これらの測定頻度は、水質の安定性を考慮して決定する。

160 以下、特に留意すべき微生物学的管理事項並びに理化学的管

161 理事項(導電率及び有機体炭素(TOC))について記載する。なお、
162 その他の管理項目についても必要に応じて試験を行い、それぞ
163 れの品質規格に適合することを確認する必要がある。

164 4.2. サンプルング

165 製薬用水システムが良好な管理下にあり、要求される品質の
166 製薬用水が連続的に製造できていることを保証するためには、
167 適切な頻度でモニタリングを行う必要がある。試験用サンプル
168 は、製造工程及び供給システム内の適切な場所より採取するが、
169 製薬用水システムの稼働状況が反映されるようなサンプルング
170 ポイントを選択する必要がある。なお、サンプルングポイント
171 付近における微生物学的管理の方策は、それぞれの周辺状況に
172 応じて適切に定める。

173 サンプルングの頻度は、製薬用水システムのバリデーショ
174 ンデータに基づいて適切に定める。なお、微生物モニタリングの
175 ために採取した水は、採水後2時間以内に試験に供することが
176 望ましい。2時間以内に試験を行うことができない場合には、
177 2~8℃に保存し、12時間以内に試験を行う。

178 4.3. 警報基準値(アラートレベル)と処置基準値(アクション 179 レベル)

180 製薬用水システムにおいては、その設計仕様内で運転を行う
181 とき、要求される品質の水が連続的に製造されていることを確
182 認するために、微生物学的及び理化学的モニタリングを行う。
183 得られたモニタリングデータを、警報基準値、処置基準値、そ
184 のほかのプロセスの管理値及び目的とする製薬用水の規格限度
185 値と比較すること、並びに管理図に時系列的にプロットして傾
186 向分析を行うことなどにより、システムの運転状況を把握する
187 ことができる。

188 このように、警報基準値及び処置基準値は、適否の判定基準
189 を示すものではなく、製造システムのプロセス制御のために使
190 用されるものである。

191 4.3.1. 警報基準値(アラートレベル)の定義

192 製造システムの運転中、設定された警報基準値を超えるモニ
193 タリングデータが得られたときは、プロセスがその正常な運転
194 状態から逸脱するおそれがあることを示している。警報基準値
195 は、要注意の警告を与えるものであり、その値を超えたとして
196 も、是正措置は必ずしも必要としない。なお、警報基準値の設
197 定は、過去の傾向分析による実測値の「平均値+2σ」又は
198 「処置基準値の70%(生菌数は50%)」のうち、通例、小さい方
199 の値を採用する。

200 4.3.2. 処置基準値(アクションレベル)の定義

201 製造システムの運転中、設定された処置基準値を超えるモニ
202 タリングデータが得られたときは、プロセスがその正常な運転
203 範囲内から逸脱したことを示している。この場合、製造システ
204 ムの運転管理者は、システムを正常な運転範囲内へ復帰させる
205 ための是正措置を講じなければならない。

206 警報基準値及び処置基準値は、プロセス及び製品の品質規格
207 の範囲内で、技術的観点及び要求される製品の品質などを総合
208 的に考慮して設定する。したがって、警報基準値及び処置基準
209 値を超えても、必ずしも製品の品質が損なわれるものではない。

210 4.4. 微生物モニタリング

211 製薬用水システムの微生物モニタリングプログラムの主目的
212 は、製造した水の微生物学的品質劣化を事前に予知し、製品の
213 品質に悪影響を及ぼすことを防ぐことである。したがって、存
214 在する微生物のすべてを検出する必要はないが、成長の遅い微

3 製薬用水の品質管理

215 生物を含めできるだけ広範囲の菌を検出できるようなモニタリ
216ング手法を採用する必要がある。
217 以下に、培養法による製薬用水システムの微生物モニタリン
218グ手法を示す。迅速微生物検出法を採用する場合は、得られる
219生菌数が培養法と同等以上であることをあらかじめ確認してお
220く必要がある。

221 4.4.1. 培地及び培養条件

222 水中には、栄養源の乏しい環境にも適応している多数の従属
223栄養型の中温性細菌が存在する。従属栄養型の細菌は、製薬用
224水システムにおいてバイオフィルムの形成による水質劣化をも
225たらすことが多いため、貧栄養菌の増殖に優れたR2Aカンテ
226ン培地を用いて水質をモニターすることが有用である。一方、
227日常の微生物モニタリングにおいては、水道法第4条に基づく
228水質基準で規定されている標準カンテン培地を用いて30～
22935℃で比較的短時間で増殖可能な一般細菌数を計測し、製薬
230用水システムの微生物学的変動の傾向を把握する方法も広く用
231いられている。

232 表2に生菌数の評価に用いる計測方法、最少試料量、培地、
233培養条件の一例を示す。

234 表2に示された培地を以下に掲げる。

235 (i) 標準カンテン培地

カゼイン製ペプトン	5.0g
酵母エキス	2.5g
ブドウ糖	1.0g
カンテン	15.0g
水	1000mL

236 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅
237菌後のpH6.9～7.1。

238 (ii) R2Aカンテン培地

ペプトン(カゼイン製及び肉製)	0.5g
カザミノ酸	0.5g
酵母エキス	0.5g
ピルビン酸ナトリウム	0.3g
ブドウ糖	0.5g
硫酸マグネシウム七水和物	50mg
溶性デンプン	0.5g
リン酸水素二カリウム	0.3g
カンテン	15.0g
水	1000mL

239 全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅
240菌後のpH7.1～7.3。

241 培地成分には、日本薬局方に規定するもののほか、以下の試
242薬を用いる。

243 (i) カザミノ酸 カゼインを酸により加水分解し、微生物試
244験用に製造したもの。

245 乾燥減量 (2.41) 8%以下(0.5g, 105℃, 恒量)。

246 強熱残分 (2.44) 55%以下(0.5g)。

247 窒素含量 (1.08) 7%以上(105℃, 恒量, 乾燥後)。

248 (ii) ピルビン酸ナトリウム $\text{CH}_3\text{COCOONa}$ 本品は、白色
249～微黄色の結晶性の粉末である。水に溶けやすく、エタノール
250(99.5)又はアセトンに溶けにくい。

251 確認試験

252 (1) 本品につき、赤外吸収スペクトル測定法 (2.25) の臭

253 化カリウム錠剤法により測定するとき、波数 1710cm^{-1} 、
254 1630cm^{-1} 、 1410cm^{-1} 、 1360cm^{-1} 、 1190cm^{-1} 、 1020cm^{-1} 、
255 980cm^{-1} 、 830cm^{-1} 、 750cm^{-1} 、 630cm^{-1} 及び 430cm^{-1} 付近に吸
256収を認める。

257 (2) 本品の水溶液(1→20)はナトリウム塩の定性反応(1)
258(1.09)を呈する。

259 含量 97.0%以上。定量法 本品0.4gを精密に量り、水に
260溶かし、正確に200mLとする。この液20mLをヨウ素瓶中に
261正確に量り、10℃以下に冷却する。冷後、0.05mol/Lヨウ素
262液40mLを正確に加えた後、水酸化ナトリウム溶液(17→
263100)20mLを加え、2時間暗所に放置する。これに、薄めた
264硫酸(1→6)15mLを加えた後、0.1mol/Lチオ硫酸ナトリウム
265液で滴定 (2.50) する(指示薬：デンプン試液)。同様の方法で
266空試験を行い、補正する。

267 0.05mol/Lヨウ素液1mL=1.834mg $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$

268 4.4.2. 培地性能試験

269 R2Aカンテン培地の性能試験には次に示す菌株又はこれら
270と同等と考えられる菌株を使用する。培地性能試験前にこれら
271の菌株を「滅菌精製水」中に接種し、20～25℃に3日間おく。

272 *Methylobacterium extorquens* : NBRC 15911

273 *Pseudomonas fluorescens* : NBRC 15842, ATCC 17386な
274ど

275 「精製水」中で飢餓状態にした菌液を更に「滅菌精製水」で
276希釈し、生菌数50～200CFU/mLの菌液を調製する。使用する
277R2Aカンテン培地に調製した菌液1mLを接種し、20～25℃で4
278～7日間培養するとき、十分な接種菌の増殖が認められなけれ
279ばならない。

280 標準カンテン培地の性能試験には、次に示す菌株又はこれら
281と同等と考えられる菌株を使用する。使用する標準カンテン培
282地に微生物限度試験法 (4.05) に従って調製した菌液1mLを接
283種し、30～35℃で48時間培養するとき、十分な接種菌の増殖
284が認められなければならない。

285 黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) : ATCC 6538,
286 NCIMB 9518, CIP 4.83又はNBRC 13276

287 緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) : ATCC 9027, NCIMB
288 8626, CIP 82.118又はNBRC 13275

289 大腸菌(*Escherichia coli*) : ATCC 8739, NCIMB 8545,
290 CIP 53.126又はNBRC 3972

291 4.4.3. 製薬用水システムの微生物に対する処置基準値

292 製薬用水システムに対して一般的に適正と考えられる微生物
293に対する処置基準値は下記のとおりである。

294 各種製薬用水に対する生菌数の処置基準値

295 「常水」* : 100CFU/mL(水道法第4条に基づく水質基準に
296規定されている規格値)

297 「精製水」 : 100CFU/mL**

298 「注射用水」 : 10CFU/100mL**

299 (*標準カンテン培地を用いての値, **R2Aカンテン培地を
300用いての値)

301 「精製水」に対する処置基準値は、「常水」と同一の値とさ
302れているが、近々、現在の技術レベルから見て適切な基準値を
303設定する予定である。このため、現時点では、各製造施設にお
304いて、別途、独自の処置基準値を定め、より高いレベルでの微
305生物管理を行うことが望ましい。

4 製薬用水の品質管理

306 また、バリデーション及び日常的管理においてこれらの処置
307 基準値を超えた場合には、検出された分離菌の性状検査を行い、
308 システムの殺菌・消毒を施す必要がある。

309 4.5. 理化学的モニタリング

310 製薬用水システムの理化学的モニタリングは、通例、導電率
311 及び有機体炭素(TOC)を指標として行われる。導電率を指標と
312 するモニタリングによれば、混在する無機塩類の総量の概略を
313 知ることができ、TOCを指標とするモニタリング(TOCモニタ
314 リング)によれば、混在する有機物の総量を評価することがで
315 きる。これらの理化学的モニタリングは、基本的に日本薬局方
316 一般試験法に規定される導電率測定法(2.51)及び有機体炭素
317 試験法(2.59)を準用して行われるが、モニタリングのための
318 試験には医薬品各条の試験とは異なる側面があることから、以
319 下にはそれぞれの一般試験法で対応できない部分に対する補完
320 的事項を記載する。

321 なお、各製造施設において、導電率及びTOCを指標とする
322 モニタリングを行う場合、それぞれの指標について適切な警報
323 基準値及び処置基準値を設定し、不測の事態に対する対応手順
324 を定めておく必要がある。

325 4.5.1. 導電率を指標とするモニタリング

326 モニタリング用の導電率測定は、通例、流液型セル又は配管
327 挿入型セルを用いてインラインで連続的に行われるが、製薬用
328 水システムの適切な場所よりサンプリングし、浸漬型セルを用
329 いてオフラインのバッチ試験として行うこともできる。

330 以下に製薬用水システムの運転管理にあたり、導電率試験の
331 結果をどのように判断して運転の可否を決定するか、日本薬局
332 方の導電率測定法(2.51)により標準温度(20℃)で測定が行わ
333 れる場合と米国薬局方のGeneral Chapter(645) WATER
334 CONDUCTIVITYを準用して標準温度以外の温度で測定が行
335 われる場合につき、それぞれの指針を示す。

336 4.5.1.1. 日本薬局方の導電率測定法(2.51)によりモニタ 337 リングを行う場合

338 日本薬局方の導電率測定法(2.51)は、通例、標準温度
339 (20℃)での測定を求めているが、補正式を用いることにより15
340 ~30℃の温度範囲での測定も許容している。「精製水」及び「注
341 射用水」について標準温度での導電率モニタリングを行う場合、
342 推奨される許容導電率(処置基準値)は、下記のとおりである。

343 処置基準値 $1.0\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (20℃)

344 なお、上記の処置基準値は、インラインでのモニタリングを
345 想定して設定したものであり、オフラインのバッチ試験として
346 行う場合には、この処置基準値を変更することができる。

347 4.5.1.2. 米国薬局方の(645) WATER CONDUCTIVITYを準用し 348 てモニタリングを行う場合

349 インラインでの導電率モニタリングでは、通常、測定温度の
350 制御は困難である。したがって、標準温度以外の温度でモニタ
351 リングしようとする場合には、下記の方法を適用する。なお、
352 この方法は米国薬局方の(645) WATER CONDUCTIVITYに
353 記載されている3段階法のうち、第一段階及び第二段階を採用
354 したものである。

355 第一段階(インラインでの測定)

356 (i) 温度非補償方式により試料水の温度および導電率を測定
357 する。

358 (ii) 表3から、測定された温度における許容導電率を求める。
359 測定された温度が表3に記載されている温度の間にある場合は、

360 測定された温度の直ぐ下の温度における値を許容導電率とする。
361 (iii) 測定された導電率が、許容導電率以下であれば、導電率
362 試験適合とする。許容導電率を超える場合には、第二段階に進
363 む。

364 第二段階(オフラインでの測定)

365 (i) 下記の方法により、容器に採水後、かき混ぜることによ
366 って、大気中から二酸化炭素を平衡状態になるまで吸収させ、
367 大気と平衡状態になった試料の導電率を測定する。

368 (ii) 十分な量の試料を適当な容器にとり、かき混ぜる。温度
369 を $25\pm 1^\circ\text{C}$ に調節し、かき混ぜながら、一定時間ごとにこの液
370 の導電率の測定を行う。5分あたりの導電率変化が $0.1\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
371 以下となったときの導電率を本品の導電率(25℃)とする。

372 なお、導電率の測定が25℃ではなく、15~30℃の範囲にあ
373 る25℃以外の温度 T で行われた場合は、次の補正式を用いて
374 25℃における導電率 $\kappa_{25}(\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1})$ に換算する。

$$375 \kappa_{25} = \kappa_T \times \{1 + 0.021(25 - T)\}$$

376 κ_T : 温度 $T(^{\circ}\text{C})$ における導電率の実測値($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)

377 T : 測定温度($^{\circ}\text{C}$)

378 (iii) 前項で求めた導電率(25℃)が $2.1\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下であれば、
379 導電率試験適合とし、それを超える場合は不適合と判定する。

380 4.5.2. 有機体炭素(TOC)を指標とするモニタリング

381 「精製水」及び「注射用水」の有機体炭素(TOC)の規格限度
382 値はいずれも「0.50mg/L以下」(500ppb以下)とされているが、
383 製薬用水の各製造施設は、製薬用水システムの運転管理にあ
384 り、別途警報基準値と処置基準値を定めてTOCモニタリング
385 を行うことが望ましい。

386 推奨されるTOCの処置基準値は、下記のとおりである。

387 処置基準値 $\leq 300\text{ppb}$ (インライン)、

388 $\leq 400\text{ppb}$ (オフライン)

389 水道水(「常水」)のTOCの許容基準値は「3mg/L以下」
390 (3ppm以下)(水道法第4条に基づく水質基準)であるが、上記の
391 管理基準を考慮し、製薬用水製造の原水として使われる水につ
392 いても、各製造施設において適切な警報基準値及び処置基準値
393 を設けてTOCモニタリングによる水質管理を実施することが
394 望ましい。

395 なお、日本薬局方では有機体炭素試験法(2.59)を定めてお
396 り、通例、これに適合する装置を用いてTOCの測定を行うが、
397 高純度の水(イオン性の有機物や分子中に窒素、イオウ、リン
398 又はハロゲン原子を含む有機物が含まれていない純度の高い
399 水)を原水として用いる場合に限り、米国薬局方のGeneral
400 Chapter(643) TOTAL ORGANIC CARBON 又は欧州薬局
401 方のMethods of Analysis 2.2.44. TOTAL ORGANIC
402 CARBON IN WATER FOR PHARMACEUTICAL USEに定
403 める装置適合性試験に適合する装置を製薬用水システムの
404 TOCモニタリングに用いることができる。

405 ただし、二酸化炭素を試料水から分離せずに測定した有機物
406 の分解前後の導電率の差から有機体炭素量を求める方式の装置
407 は、試料水中にイオン性の有機物が含まれている場合、若しく
408 は分子中に窒素、イオウ、リン又はハロゲン原子を含む有機物
409 が含まれている場合には、マイナス又はプラスの影響を受ける
410 ことがあるので、測定対象の水の純度や装置の不具合発生時の
411 汚染リスクを考慮して適切な装置を選択する。

412 4.6. 注射用水の一時的保存

413 注射用水の一時的な保存については、微生物の増殖を厳しく
414 抑制するために高温で循環するなどの方策をとると共に、汚染
415 並びに品質劣化のリスクを考慮し、バリデーションの結果に基
416 づいて適切な保存時間を設定する。

417 5. 容器入りの水の品質管理に関する留意事項

418 製品として流通する容器入りの水(「精製水(容器入り)」、
419 「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」)の品質
420 管理に関しては、別途、留意すべき事項がいくつかある。

421 5.1. 滅菌した容器入りの水の製法について

422 「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」の製
423 法としては、次の二つの異なる方法がある。

424 (i) 「精製水」又は「注射用水」を密封容器に入れた後、滅
425 菌する。

426 (ii) あらかじめ滅菌した「精製水」又は「注射用水」を無菌
427 的な手法により無菌の容器に入れた後、密封する。

428 製造された容器入りの水の無菌性を保証するには、(i)の製
429 法では、最終の滅菌工程についてバリデーションを行えばよい
430 のに対して、(ii)の製法では、すべての工程についてバリデー
431 ションを行う必要がある。これは、(ii)の製法があらかじめ
432 過滅菌等の方法によって滅菌したものを“無菌的に”容器に入れ
433 て密封することにより、無菌性を保証しようとするものである
434 ためである。

435 5.2. 容器中での保存に伴う水質変化

436 5.2.1. 無機性不純物(導電率を指標として管理)

437 バルクの精製水又は注射用水の導電率が $1.0\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 以下で
438 管理されている場合であっても、それを容器に入れたときには、
439 容器への充てん時の空気との接触や保存中におけるプラスチック
440 膜透過に伴う空気中の二酸化炭素の溶け込み及び保存中にお
441 ける容器からのイオン性物質の溶出が原因となって、導電率が
442 上昇する。特に、小容量のガラス容器を用いる場合には、保存
443 中における導電率の変化に注意する必要がある。

444 5.2.2. 有機性不純物(過マンガン酸カリウム還元性物質又は
445 有機体炭素(TOC)を指標として管理)

446 日本薬局方では、容器入りの水(「精製水(容器入り)」、
447 「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」)中の有機性
448 不純物に対しては、古典的な過マンガン酸カリウム還元性物質
449 による管理を求めている。容器入りの水に対するこの規定は、
450 バルクの水において、TOCによる管理(限度値「 0.50mg/L 以
451 下」(500ppb以下))を規定していることと対照的である。これ
452 は、容器中での保存により、TOC量が著しく増加する事例が
453 あり、バルクの水に整合させてTOCにより規格を設定するこ
454 とが困難と判断されたことによるものである。特に、小容量の
455 プラスチック製容器入りの水については、保存中における容器
456 からの溶出物の増加に十分注意する必要がある。

457 容器入りの水において、過マンガン酸カリウム還元性物質に
458 よる有機性不純物の管理を求めているのは、容器の材質(ガラ
459 ス、ポリエチレン、ポリプロピレンなど)やサイズ(0.5~
460 2000mL)及び保存期間の如何によらず、同一の試験法を用い
461 て試験できるようにするための止むを得ない措置としてとられ
462 たものであり、溶存する有機性不純物の限度試験として最適な
463 ものとして規定されているわけではない。医薬品の製造業者の
464 責任において、過マンガン酸カリウム還元性物質試験の代替法
465 として有機体炭素試験を採用し、TOCにより品質管理を行う

466 ことが望ましい。TOCにより品質管理を行う場合、下記のよ
467 うな目標値により管理することが望ましい。

468 内容量が10mL以下のもの：TOC 1500ppb以下

469 内容量が10mLを超えるもの：TOC 1000ppb以下

470 ポリエチレン、ポリプロピレン等のプラスチック製医薬品容
471 器入りの水については、容器からのモノマー、オリゴマー、可
472 塑剤等の溶出がまず懸念されるが、プラスチックにはガス透過
473 性や水分透過性もあることから、アルコールなどの低分子の揮
474 発性有機物や窒素酸化物などの低分子の大気汚染物質の透過に
475 よる汚染が起こりうるので、保存場所・保存環境にも留意する
476 必要がある。

477 5.2.3. 微生物限度(総好気性微生物数)

478 「精製水(容器入り)」には無菌性が求められているわけでは
479 ないが、保存期間中を通して総好気性微生物数の許容基準
480 「1mL当たり 10^2CFU 」に適合するためには、衛生的あるいは
481 無菌的に製造する必要がある。また、流通上、微生物汚染には
482 特段の注意が必要である。加えて、開封後はできるだけ短期間
483 に使いきるように努めることが望ましい。

484 総好気性微生物数の許容基準「1mL当たり 10^2CFU 」は、
485 「精製水」(バルク)の生菌数の処置基準値と同じであるが、精
486 製水製造システムにおける微生物モニタリングとは違い、主に
487 保存期間中に起こる可能性のある環境由来の微生物による汚染
488 を検出するために、ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカン
489 テン培地を用いて試験を行う。

490 5.3. 容器入りの水を入手して医薬品の製造や試験に用いる場
491 合の注意事項

492 市販の「精製水(容器入り)」、「滅菌精製水(容器入り)」又
493 は「注射用水(容器入り)」を入手して、医薬品又は治験薬の製
494 造用水、医薬品試験用の水として利用することができるが、下
495 記の事項に留意する必要がある。

496 (i) 製品の受入試験又は製造業者から提供された当該製品の
497 試験成績書により日局各条への適合を確認した後、速やかに使
498 用すること

499 (ii) 医薬品の製造に使用する場合は、当該医薬品の製造工程
500 の一環としてプロセスバリデーションを実施しておくこと、ま
501 た、治験薬の製造に使用する場合には、その品質に影響がない
502 ことを確認しておくこと

503 (iii) 滅菌した容器入りの水については、一回使いきりを原則
504 とし、保存後の再使用はしないこと

505 (iv) 開封直後からヒト及び試験室環境等による汚染又は水質
506 変化が急速に進むことを前提として、使用目的に合わせた標準
507 操作手順書を作成しておくこと

6 製薬用水の品質管理

表1 製薬用水(仕込み水)の選択基準

区分	製薬用水区分	適用区分	備考
製剤	「注射用水」 (又は「注射用水(容器入り)」)	注射剤, 点眼剤, 眼軟膏剤	
	「精製水」 (又は「精製水(容器入り)」)	点眼剤, 眼軟膏剤	微生物汚染に注意する必要がある点眼剤, 眼軟膏剤については, 滅菌又は超ろ過などの処理を行って生菌数を低く抑えた「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いること。
		エアゾール剤, 液剤, エキス剤, エリキシル剤, カプセル剤, 顆粒剤, 丸剤, 懸濁剤・乳剤, 坐剤, 散剤, 酒精剤, 錠剤, シロップ剤, 浸剤・煎剤, 貼付剤, チンキ剤, トローチ剤, 軟膏剤, パップ剤, 芳香水剤, リニメント剤, リモナーゼ剤, 流エキス剤, ローション剤, 経皮吸収型製剤	微生物汚染に注意すべき液剤, 軟膏剤, 懸濁剤, 乳剤, 坐剤, エアゾール剤などは, 微生物学的に適切な管理を行った「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いること。
原薬	「注射用水」 (又は「注射用水(容器入り)」)	無菌原薬, 製剤工程で無菌化する原薬	
	「精製水」 (又は「精製水(容器入り)」)	一般原薬, 製剤工程で無菌化する原薬, 原薬中間体	製剤工程で無菌化する原薬の製造において, 後工程で脱エンドトキシン処理がない場合は, 低エンドトキシンの「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いること。
	「常水」	原薬中間体	

508

表2 製薬用水の生菌数評価法

方法	製薬用水		
	「常水」	「精製水」	「注射用水」
計測方法	平板混積法又はメンブランフィルター法	平板混積法又はメンブランフィルター法	メンブランフィルター法
最少試料量	1.0mL	1.0mL	100mL
培地	標準カンテン培地	R2A カンテン培地, 標準カンテン培地	R2A カンテン培地, 標準カンテン培地
培養期間	標準カンテン培地: 48~72 時間(又はそれ以上)	R2A カンテン培地: 4~7 日間(又はそれ以上) 標準カンテン培地: 48~72 時間(又はそれ以上)	R2A カンテン培地: 4~7 日間(又はそれ以上) 標準カンテン培地: 48~72 時間(又はそれ以上)
培養温度	標準カンテン培地: 30~35℃	R2A カンテン培地: 20~25℃ 又は 30~35℃ 標準カンテン培地: 30~35℃	R2A カンテン培地: 20~25℃ 又は 30~35℃ 標準カンテン培地: 30~35℃

509

表3 第一段階 異なる測定温度における許容導電率*

温度(℃)	許容導電率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	温度(℃)	許容導電率 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
0	0.6		
5	0.8	55	2.1
10	0.9	60	2.2
15	1.0	65	2.4
20	1.1	70	2.5
25	1.3	75	2.7
30	1.4	80	2.7
35	1.5	85	2.7
40	1.7	90	2.7
45	1.8	95	2.9
50	1.9	100	3.1

* 温度非補償方式での導電率測定に對してのみ適用する。

510

1 第十六改正日本薬局方における国際調和

1 第十六改正日本薬局方における国際調和

- 2 日本薬局方、欧州薬局方(The European Pharmacopoeia)及
- 3 び米国薬局方(The United States Pharmacopeia)での調和合
- 4 意に基づき規定した試験法及び医薬品各条は、次のとおりであ
- 5 る。
- 6 薬局方調和事項の欄には薬局方調和合意文書の調和事項を、
- 7 第十六改正日本薬局方の欄には第十六改正日本薬局方の項目名
- 8 などを記載する。備考欄には、第十六改正日本薬局方と、薬局
- 9 方調和事項との差違などを必要に応じて記載する。
- 10 なお、各表の冒頭に記載した調和年月は当該試験法及び医薬
- 11 品各条が調和された年月を示している。また、調和事項の改正
- 12 及び修正を行った場合は、()内にRev. 及びCorr.の回数を記
- 13 載する。

2 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2005年8月 (Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Residue on Ignition/Sulphated Ash Test (Introduction)	2.44 強熱残分試験法 (前書き)	日本薬局方独自記載事項： 当該試験法に関する説明 日本薬局方医薬品各条における記載事項に関する説明等
Procedure	1. 操作法	

14

調和年月：2007年10月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Characterisation of Crystalline and Partially Crystalline Solids by X-ray Powder Diffraction (XRPD) (Introduction)	2.58 粉末X線回折測定法 (前書き)	日本薬局方独自記載： 当該試験法に関する説明
Principle	1. 原理	
Instrument	2. 装置	
Instrument set-up	2.1 装置の校正	
X-ray radiation	2.2 X線放射	
Radiation protection	2.3 放射線防護	
Specimen preparation and mounting	3. 試料の調製と取付け	
Specimen preparation	3.1 試料の調製	
Specimen mounting		試料の取付けは規定しない。
Effect of specimen displacement		
Effect of specimen thickness and transparency		
Control of the instrument performance	4. 装置性能の管理	
Qualitative phase analysis (Identification of phases)	5. 定性分析(相の同定)	
Quantitative phase analysis	6. 定量分析	
Polymorphic samples	6.1 多形試料	
Methods using a standard	6.2 標準試料を用いる方法	
Estimate of the amorphous and crystalline fractions	7. 非晶質と結晶の割合評価	
Single crystal structure	8. 単結晶構造解析	
Figure 1 Diffraction of X-rays by a crystal according to Bragg's law	図1 ブラッグの法則に基づいた結晶によるX線回折	
Figure 2 X-ray powder diffraction patterns collected for 5 different solid phases of a substance (the intensities are normalized)	図2 ある物質の五つの異なる固相で認められた粉末X線パターン(強度は規格化しである)	
Figure 3 Geometric arrangement of the Bragg-Brentano parafocusing geometry	図3 ブラッグ-ブレンターノ集中法光学系の配置図	

15

3 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2009年6月 (Rev. 1-Corr. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	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	
	(前書き)	日本薬局方独自記載事項： 当該測定法に関する説明
Bulk density	1. かさ密度	
Method 1 : Measurement in a graduated cylinder	1.1. 第1法(メスシリンダーを用いる方法)	
Procedure	1.1.1. 操作法	
Method 2 : Measurement in a volumeter	1.2. 第2法(ポリュメーターを用いる方法)	
Apparatus	1.2.1. 装置	
Procedure	1.2.2. 操作法	
Method 3 : Measurement in a vessel	1.3. 第3法(容器を用いる方法)	
Apparatus	1.3.1. 装置	
Procedure	1.3.2. 操作法	
Tapped density	2. タップ密度	
Method 1	2.1. 第1法	
Apparatus	2.1.1. 装置	
Procedure	2.1.2. 操作法	
Method 2	2.2. 第2法	
Procedure	2.2.1. 操作法	
Method 3	2.3. 第3法	
Procedure	2.3.1. 操作法	
Measures of powder compressibility	3. 粉体の圧縮性の尺度	
Figure 1 Volumeter	図1 ポリュメーター	
Figure 2 Measuring vessel (left) and cap (right)	図2 測定用容器 (左) と補助円筒 (右)	
Figure 3	図3 タッピング装置	

4 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2003年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Specific Surface Area (Introduction)	3.02 比表面積測定法 (前書き)	日本薬局方独自記載事項：当該試験法に関する説明
Multi-point measurement	1. 解析法	
Single-point measurement	1.1. 多点法	
Sample preparation	1.2. 一点法	
Outgassing	2. 試料の調製	
Adsorbate		
Quantity of sample		
Method 1 : The dynamic flow method	3. 測定法	
Method 2 : The volumetric method	3.1. 第1法：動的流動法	
Reference materials	3.2. 第2法：容量法	
Figure 1 Schematic diagram of the dynamic flow method apparatus	4. 標準物質	
Figure 2 Schematic diagram of the volumetric method apparatus	図1 動的流動法装置の概略図	
	図2 容量法装置の概略図	

17

調和年月：2007年5月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Gas Pycnometric Density of Solids (Introduction)	3.03 粉体の粒子密度測定法 (前書き)	日本薬局方独自記載事項： 測定法の対象を記載
Apparatus	1. 装置	
Method	2. 装置の校正	測定温度の部分は操作法に記載
Expression of the results	3. 操作法	
Figure 1 Schematic diagram of a gas pycnometer	図1 気体置換型ピクノメーター(粒子密度測定装置)の模式図	

18

調和年月：2004年6月(第1法)／2007年5月(Rev. 1)(第2法)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考	
	3.04 粒度測定法 (前書き)	日本薬局方独自記載事項： 当該試験法に関する説明	
Optical microscopy	1. 第1法 光学顕微鏡法		
Apparatus	1.1. 装置		
Adjustment	1.1.1. 調整		
Illumination	1.1.1.1. 照明		
Visual characterization	1.1.1.2. 目視による評価		日本薬局方独自記載事項： 粒子径の測定方法に関する説明
Photographic characterization	1.1.1.3. 写真による評価		
Preparation of the mount	1.2. 試料の調製		
Crystallinity characterization	1.3. 観察		
Limit Test of particle size by microscopy	1.3.1. 結晶性の評価		
Particle size characterization	1.3.2. 顕微鏡法による粒子径の限度試験		
Particle shape characterization	1.3.3. 粒子径の評価		
General observations	1.3.4. 粒子形状の評価		
Figure 1 Commonly used measurements of particle size	1.3.5. 一般的観察		
Figure 2 Commonly used descriptions of particle shape	図1 一般的に用いられる粒子径		
	図2 一般的に用いられる粒子形状の記述		
Analytical sieving	2. 第2法 ふるい分け法	日本薬局方独自記載事項： 当該試験法に関する説明	
Principles of analytical sieving	ふるい分け法の原理		
Test sieves	2.1. 操作		
Test specimen	2.1.1. 試験用ふるい		
	2.1.2. 測定用試料		

5 第十六改正日本薬局方における国際調和

Agitation methods	2.1.3. 振とう法	
Endpoint determination	2.1.4. 終点の決定	
Sieving methods	2.2. ふるい分け法	
1) Mechanical agitation dry sieving method	2.2.1. 機械的振とう法(乾式ふるい分け法)	
2) Air entrainment methods air jet and sonic sifter sieving	2.2.2. 気流中飛散法(エアー・ジェット法及びソニック・シフター法)	
Interpretation	2.3. 結果の解析	
Figure 1 Commonly used measurements of particle size	図1 一般的に用いられる粒子径	
Figure 2 Commonly used descriptions of particle shape.	図2 一般的に用いられる粒子形状の記述	
Table 1 Size of standard sieve series in range of interest	表1 関係する範囲における標準ふるいの目開き寸法	

19

調和年月：2009年10月 (Rev. 1-Corr. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Bacterial Endotoxins Test	4.01 エンドトキシン試験法	
(Introduction)	(前書き)	
Apparatus	1. 器具 2. 溶液の調製	
Preparation of standard endotoxin stock solution	2.1. エンドトキシン標準原液の調製	
Preparation of standard endotoxin solution	2.2. エンドトキシン標準溶液の調製	
Preparation of sample solutions	2.3. 試料溶液の調製	日本薬局方独自記載事項： 医療用具からの試料溶液調製方法に関する記述を削除
Determination of maximum valid dilution	3. 最大有効希釈倍数の求め方	
Gel-clot technique	4. ゲル化法	
(1) Preparatory testing	4.1. 予備試験	
(i) Test for confirmation of labeled lysate sensitivity	4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験	
(ii) Test for interfering factors	4.1.2. 反応干渉因子試験	
(2) Limit test	4.2. 限度試験法	
(i) Procedure	4.2.1. 操作法	
(ii) Interpretation	4.2.2. 判定	
(3) Quantitative test	4.3. 定量試験法	
(i) Procedure	4.3.1. 操作法	
(ii) Calculation and interpretation	4.3.2. エンドトキシン濃度の算出及び判定	
Photometric quantitative techniques	5. 光学的定量法	
(1) Turbidimetric techniques	5.1. 比濁法	
(2) Chromogenic technique	5.2. 比色法	
(3) Preparatory testing	5.3. 予備試験	
(i) Assurance of criteria for the standard curve	5.3.1. 検量線の信頼性確認試験	
(ii) Test for interfering factors	5.3.2. 反応干渉因子試験	
(4) Test	5.4. 定量	
(i) Procedure	5.4.1. 操作法	
(ii) Calculation	5.4.2. エンドトキシン濃度の算出	
(iii) Interpretation	5.4.3. 判定	
Reagents, test solutions		(9.41) 試薬・試液に規定
Amoebocyte lysate		
Lysate TS		
Water for bacterial endotoxins test (BET)		
Table 1	表1	
Table 2	表2	
Table 3	表3	
Table 4	表4	

20

調和年月：2009年6月 (Rev. 1-Corr. 1) (I 生菌数試験) / 2008年6月 (Rev. 1) (II 特定微生物試験)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	4.05 微生物限度試験法	
Microbiological Examination of Non-sterile Products: Microbial Enumeration Tests	I. 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験	
1 Introduction	(前書き)	
2 General procedures	1. 基本手順	
3 Enumeration methods	2. 生菌数測定法	
4 Growth promotion test, suitability of the counting method and negative controls	3. 培地性能, 測定法の適合性及び陰性対照	
4-1 General considerations		
4-2 Preparation of test strains	3.1. 試験菌の調製	
4-3 Negative control	3.2. 陰性対照	
4-4 Growth promotion of the media	3.3. 培地性能	
4-5 Suitability of the counting method in the presence of product	3.4. 製品存在下での測定法の適合性	
4-6 Results and interpretation	3.5. 結果及び判定	
5 Testing of products	4. 製品の試験	
5-1 Amount used for the test	4.1. 試験量	
5-2 Examination of the product	4.2. 製品の試験	
5-3 Interpretation of the results	4.3. 結果の判定	
Table 1 Preparation and use of test micro-organisms	表 I-1 試験菌の調製と使用法	
Table 2 Common neutralising agents for interfering substances	表 I-2 阻害物質に対する一般的な中和剤／中和法	
Table 3 Most-probable-number values of micro-organisms	表 I-3 微生物の最確数	
II Microbiological Examination of Non-sterile Products: Test for Specified Micro-organisms	II. 非無菌製品の微生物学的試験：特定微生物試験	
1 Introduction	(前書き)	
2 General procedures	1. 基本手順	
3 Growth promoting and inhibitory properties of the media, suitability of the test and negative controls	2. 培地性能, 試験法の適合性及び陰性対照	
3-1 Preparation of test strains	2.1. 試験菌の調製	
3-2 Negative control	2.2. 陰性対照	
3-3 Growth promotion and inhibitory properties of the media	2.3. 培地の性能試験	
3-4 Suitability of the test method	2.4. 試験法の適合性	
4 Testing of products	3. 製品の試験	
4-1 Bile-tolerant gram-negative bacteria	3.1. 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌	
4-2 Escherichia coli	3.2. 大腸菌	
4-3 Salmonella	3.3. サルモネラ	
4-4 Pseudomonas aeruginosa	3.4. 緑膿菌	
4-5 Staphylococcus aureus	3.5. 黄色ブドウ球菌	
4-6 Clostridia	3.6. クロストリジア	
4-7 Candida albicans	3.7. カンジダ・アルビカンス	
5 Recommended solutions and culture media	4. 推奨される溶液及び培地	
Table II-1 Growth promoting, inhibitory and indicative properties of media	表 II-1 培地の発育促進, 選択及び鑑別特性	
Table II-2 Interpretation of results	表 II-2 結果の判定	

7 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2009年6月 (Rev. 1-Corr. 3)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Sterility	4.06 無菌試験法	
(Introduction)	(前書き)	
Precautions against microbial contamination	1. 微生物汚染に対する予防措置	
Culture media and incubation temperatures	2. 培地及び培養温度	
Media for the test may be prepared as described below, or equivalent commercial media may be used provided that they comply with the growth promotion test		
Fluid thioglycollate medium	(i) 液状チオグリコール酸培地	
Soya-bean casein digest medium	(ii) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地	
The media used comply with the following tests, carried out before or in parallel with the test on the product to be examined	3. 培地の適合性	
Sterility	3.1. 無菌性	
Growth promotion test of aerobes, anaerobes and fungi	3.2. 好気性菌、嫌気性菌及び真菌に対する培地性能試験	
Method suitability test	4. 手法の適合性試験	
Membrane filtration	4.1. メンブランフィルター法	
Direct inoculation	4.2. 直接法	
Test for sterility of the product to be examined The test may be carried out using the technique of membrane filtration or by direct inoculation of the culture media with the product to be examined	5. 製品の無菌試験	
Membrane filtration	5.1. メンブランフィルター法	
Aqueous solutions	(i) 水性液剤	
Soluble solids	(ii) 水溶性固形剤	
Oils and oily solutions	(iii) 油及び油性液剤	
Ointments and creams	(iv) 軟膏剤及びクリーム	
Direct inoculation of the culture medium	5.2. 直接法	
Oily liquids	(i) 油性液剤	
Ointments and creams	(ii) 軟膏剤及びクリーム	
Catgut and other surgical sutures for veterinary use		日本薬局方対象品外
Observation and interpretation of results	6. 観察と結果の判定	
Application of the test to parenteral preparations, ophthalmic and other non-injectable preparations required to comply with the test for sterility	7. 無菌試験への適合が要求される注射剤及び眼軟膏剤、点眼剤等の非注射剤への試験の適用	
Minimum number of items to be tested	8. 最少供試個数	
Table 1 Strains of the test micro-organisms suitable for use in the growth promotion test and the method suitability test	表 1 培地性能試験及び手法の適合性試験に適している試験用菌株	
Table 2 Minimum quantity to be used for each medium	表 2 各培地当たりの最少試料採取量	
Table 3 Minimum number of items to be tested	表 3 最少供試個数	非調和事項：大容量製剤を表示量 100mL 以上と規定。

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Uniformity of Dosage Units	6.02 製剤均一性試験法	
(Introduction)	(前書き)	日本薬局方独自記載事項： 液剤に関して補足説明 有効成分を含まない部分の補足説明
Content uniformity	1. 含量均一性試験	

8 第十六改正日本薬局方における国際調和

Solid dosage forms	(i) 固形製剤	
Liquid dosage forms	(ii) 液剤	
Calculation of acceptance value	1.1. 判定値の計算	
Mass variation	2. 質量偏差試験	日本薬局方独自記載事項： 有効成分濃度が均一であることを仮定
Uncoated or film-coated tablets	(i) 素錠又はフィルムコーティング錠	
Hard capsules	(ii) 硬カプセル剤	
Soft capsules	(iii) 軟カプセル剤	
Solid dosage forms other than tablets and capsules	(iv) 錠剤とカプセル剤以外の固形製剤	
Liquid dosage forms	(v) 液剤	"in conditions of normal use. If necessary, compute the equivalent volume after determining the density." を削除
Calculation of acceptance value	2.1. 判定値の計算	
Criteria	3. 判定基準	
Solid and liquid dosage forms	(i) 固形製剤及び液剤	
Table 1 Application of content uniformity (CU) and mass variation (MV) test for dosage forms	表 1 含量均一性試験及び質量偏差試験の各製剤への適用	日本薬局方独自記載事項： (分包品、凍結乾燥製剤等)、(完全に溶解した液)の補足説明の追記
Table 2	表 2	"at time of manufacture", "For purposes of this Pharmacopoeia" を削除

23

調和年月：2004年6月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Test for Extractable Volume of Parenteral Preparations (Introduction)	6.05 注射剤の採取容量試験法 (前書き)	
Single-dose containers	1. 単回投与注射剤	
Multi-dose containers	2. 分割投与注射剤	
Cartridges and prefilled syringes	3. カートリッジ剤又は充てん済シリンジ剤	
Parenteral infusions	4. 輸液剤	

24

調和年月：2004年6月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Particulate Matter in Injectables (Introduction)	6.07 注射剤の不溶性微粒子試験法 (前書き)	
Method 1. Light obscuration particle count test	1. 第1法 光遮蔽粒子計数法	
	1.1. 装置	日本薬局方独自記載事項： 装置の検証回数を記載
	1.1.1. 校正	日本薬局方独自記載事項
	1.1.1.1. 手動法	日本薬局方独自記載事項
	1.1.1.2. 電気法	日本薬局方独自記載事項
	1.1.1.3. 自動法	日本薬局方独自記載事項
	1.1.2. 試料容量精度	日本薬局方独自記載事項
	1.1.3. 試料流量	日本薬局方独自記載事項
	1.1.4. 計数精度	日本薬局方独自記載事項
	1.1.4.1. 粒径分解能	日本薬局方独自記載事項
	1.1.4.2. 計数率	日本薬局方独自記載事項
	1.1.4.3. 閾値設定濃度	日本薬局方独自記載事項
General precautions	1.2. 一般的注意事項	
Method	1.3. 操作法	
Evaluation	1.4. 判定	日本薬局方独自記載事項： 判定基準を表示量 100mL 以上と未満に区分
Method 2. Microscopic particle count test	2. 第2法 顕微鏡粒子計数法	
	2.1. 装置	
General precautions	2.2. 一般的注意事項	
Method	2.3. 操作法	
Evaluation	2.4. 判定	日本薬局方独自記載事項： 判定基準を表示量 100mL 以上と未満に区分
1. Circular diameter graticule	3. 試薬 図 1 円形直径目盛り	日本薬局方独自記載事項

25

調和年月：2007年10月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Disintegration	6.09 崩壊試験法	日本薬局方独自記載事項： 当該試験法に顆粒剤，シロップ用剤及び丸剤を設定
Apparatus	1. 装置	
Basket-rack assembly	(i)試験器	日本薬局方独自記載事項： 試験器について変更可能な部分を例示
Disks	(ii)補助盤 (iii)補助筒	日本薬局方独自記載事項
Procedure	2. 操作法 2.1. 即放性製剤 2.2. 腸溶性製剤	日本薬局方独自記載事項： 顆粒剤，シロップ剤及び丸剤の試験法を設定 試験液として水の使用可能 試験器を試験液から出す時間を設定 試料の崩壊基準を設定 顆粒剤の操作法を規定 日本薬局方独自記載事項： 腸溶性製剤の試験方法を設定
Figure 1 Disintegration apparatus	図1 崩壊試験装置 図2 補助筒	日本薬局方独自記載事項

26

調和年月：2008年11月 (Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Dissolution	6.10 溶出試験法	日本薬局方独自記載事項： 試験の目的として生物学的非同等性を防ぐことを追加
Apparatus	1. 装置	
Apparatus 1 (Basket apparatus)	1.1. 回転バスケット法の装置(装置1)	
Apparatus 2 (Paddle apparatus)	1.2. パドル法の装置(装置2)	日本薬局方独自記載事項： シンカーは、医薬品各条に規定されている場合のみ使用可能
Apparatus 3 (Reciprocating cylinder)	規定しない。	
Apparatus 4 (Flow-through cell)	1.3. フロースルーセル法の装置(装置3)	
Apparatus suitability	2. 装置の適合性	
Procedure	3. 操作	
Apparatus 1 or 2	3.1. 回転バスケット法及びパドル法	
Immediate-release dosage forms	3.1.1. 即放性製剤	
Procedure	(i)操作	
Dissolution medium	(ii)試験液	
Time	(iii)試験時間	
Extended-release dosage forms	3.1.2. 徐放性製剤	
Procedure	(i)操作	
Dissolution medium	(ii)試験液	
Time	(iii)試験時間	
Delayed-release dosage forms	3.1.3. 腸溶性製剤	
Procedure	(i)操作	調和文書では操作方法AとBいずれかを使用する
Method A		
Method B		
Time	(ii)試験液 (iii)試験時間	日本薬局方独自記載事項 日本薬局方独自記載事項： 溶出試験第1液，第2液による試験時間を具体的に記載
Apparatus 3	規定しない。	
Immediate-release dosage forms		
Procedure		
Dissolution medium		
Time		
Extended-release dosage forms		
Procedure		
Dissolution medium		
Time		
Delayed-release dosage forms		
Procedure		

Time		
Apparatus 4	3.2. フロースルーセル法	
Immediate-release dosage forms	3.2.1. 即放性製剤	
Procedure	(i)操作	
Dissolution medium	(ii)試験液	
Time	(iii)試験時間	
Extended-release dosage forms	3.2.2. 徐放性製剤	
Procedure	(i)操作	
Dissolution medium	(ii)試験液	
Time	(iii)試験時間	
Delayed-release dosage forms		
Procedure		
Time		
Interpretation	4. 判定	日本薬局方独自記載事項： 各条中、Q 値設定の場合は判定法 1 設定されていない場合は判定法 2
Immediate-release dosage forms	4.1. 即放性製剤	日本薬局方独自記載事項： 判定法 2 を設定
	4.1.1. 判定法 1	
	4.1.2. 判定法 2	
Extended-release dosage forms	4.2. 徐放性製剤	日本薬局方独自記載事項： 判定法 2 を設定
	4.2.1. 判定法 1	
	4.2.2. 判定法 2	
Delayed-release dosage forms	4.3. 腸溶性製剤	非調和事項： 試験液が異なる Q 値についての記載から不整合部分を削除 日本薬局方独自記載事項： 判定法 2 を設定
	4.3.1. 判定法 1	Q 値は各条にて規定された旨を記載
	4.3.2. 判定法 2	
Acceptance Table 1	判定基準表 1	
Acceptance Table 2	判定基準表 2	
Acceptance Table 3	判定基準表 3	
Acceptance Table 4	判定基準表 4	
Figure 1 Apparatus 1. Basket stirring element	図 1 装置 1. 回転軸及びバスケットの部分	
Figure 2 Paddle stirring element	図 2 装置 2. 回転軸及びパドルの攪拌翼部分	
Figure 2a Alternative sinker	図 2a シンカーの仕様例	
Figure 3 Apparatus 3	規定しない。	
Figure 4 Apparatus 4 (top) large cell for tablets and capsules (bottom) tablet holder for the large cell	図 3 装置 3 (上) 錠剤及びカプセル用の大型フロースルーセル (下) 大型フロースルーセル用の錠剤ホルダー	
Figure 5 Apparatus 4 (top) small cell for tablets and capsules (bottom) tablet holder for the small cell	図 3 装置 3 (上) 錠剤及びカプセル用の小型フロースルーセル (下) 小型フロースルーセル用の錠剤ホルダー	

11 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2002年9月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Ethanol	エタノール	
Identification A	確認試験としては規定しない。	示性値として比重が規定されている。
Identification B	確認試験	
Relative density	比重	15°Cの比重で規定されている。
Appearance	純度試験(1)溶状	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Volatile impurities	純度試験(3)揮発性混在物	
Absorbance	純度試験(4)他の混在物	
Residue on evaporation	純度試験(5)蒸発残留物	
Storage	貯法	

27

調和年月：2002年9月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Ethanol, Anhydrous	無水エタノール	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験としては規定しない。	示性値として比重が規定されている。
Identification B	確認試験	
Relative density	比重	15°Cの比重で規定されている。
Appearance	純度試験(1)溶状	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Volatile impurities	純度試験(3)揮発性混在物	
Absorbance	純度試験(4)他の混在物	
Residue on evaporation	純度試験(5)蒸発残留物	
Storage	貯法	

28

調和年月：2003年11月 (Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Sodium Chloride	塩化ナトリウム	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Identification B	確認試験(2)	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Sulphates	純度試験(3)硫酸塩	
Phosphates	純度試験(4)リン酸塩	
Bromides	純度試験(5)臭化物	
Iodides	純度試験(6)ヨウ化物	
Ferrocyanides	純度試験(7)フェロシアン化合物	
Iron	純度試験(9)鉄	
Barium	純度試験(10)バリウム	
Magnesium and alkaline-earth metals	純度試験(11)マグネシウム及びアルカリ土類金属	
Aluminium	規定しない。	
Nitrites	規定しない。	
Potassium	規定しない。	
Loss on drying	乾燥減量	
Assay	定量法	

29

調和年月：2008年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Carmellose	カルメロース	
Definition	基原	
Identification (1)	確認試験(1)	
Identification (2)	確認試験(2)	
Purity (1) Chloride	純度試験(1)塩化物	
Purity (2) Sulfate	純度試験(2)硫酸塩	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	

30

調和年月：2003年7月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Carboxymethylcellulose Calcium	カルメロースカルシウム	
Definition	基原	
Identification A	確認試験(1)	
Identification B	確認試験(2)	
Identification C	確認試験(3)	
Identification D	確認試験(4)	
Alkalinity	純度試験(1)アルカリ	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Limit of chloride	純度試験(2)塩化物	
Limit of sulfate	純度試験(3)硫酸塩	

31

調和年月：2001年10月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Croscarmellose Sodium	クロスカルメロースナトリウム	
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	
Settling volume	沈降試験	
Degree of substitution	置換度	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Packaging and storage	貯法	

32

調和年月：2003年11月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Citric Acid, Anhydrous	無水クエン酸	
Definition	成分の含量規定	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Sulphates	純度試験(2)硫酸塩	
Oxalic acid	純度試験(3)シュウ酸	
Readily carbonisable substances	純度試験(5)硫酸呈色物	
Aluminium	規定しない。	
Water	水分	
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

33

12 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2003年11月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Citric Acid Monohydrate	クエン酸水和物	
Definition	成分の含量規定	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Sulphates	純度試験(2)硫酸塩	
Oxalic acid	純度試験(3)シュウ酸	
Readily carbonisable substances	純度試験(5)硫酸呈色物	
Aluminium	規定しない	
Water	水分	
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

34

35

調和年月：2003年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Saccharin	サッカリン	
Definition	成分の含量規定	
Limit of benzoate and salicylate	純度試験(3)安息香酸塩及びサリチル酸塩	
Readily carbonisable substances	純度試験(5)硫酸呈色物	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Assay	定量法	
Packaging and storage	貯法	

36

調和年月：2004年2月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Saccharin Sodium	サッカリンナトリウム水和物	
Definition	成分の含量規定	
Identification B, C	確認試験(2)	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Limit of benzoate and salicylate	純度試験(4)安息香酸塩及びサリチル酸塩	
Readily carbonizable substances	純度試験(6)硫酸呈色物	
Water	水分	
Assay	定量法	

37

調和年月：2001年10月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Cellacafate	セラセフェート	
Definition	アセチル基及びカルボキシベンゾイル基の含量規定	
Identification	確認試験	
Viscosity	粘度	
Limit of free acid	純度試験(2)遊離酸	
Water	水分	
Residue on ignition	強熱残分	
Phthalyl content	定量法(1)カルボキシベンゾイル基	
Content of acetyl	定量法(2)アセチル基	
Packaging and storage	貯法	

38

調和年月：2005年5月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Microcrystalline Cellulose	結晶セルロース	
Definition	基原	
Identification A	確認試験(1)	
Identification B	確認試験(3)	
pH	pH	
Water-soluble substances	純度試験(2)水可溶物	
Ether-soluble substances	純度試験(3)ジエチルエーテル可溶物	
Conductivity	導電率	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Bulk density	かさ密度	

39

調和年月：2005年5月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Powdered Cellulose	粉末セルロース	
Definition	基原	
Labeling	平均重合度の表示規定	
Identification A	確認試験(1)	
Identification B	確認試験(3)	
pH	pH	
Water-soluble substances	純度試験(2)水可溶物	
Ether-soluble substances	純度試験(3)ジエチルエーテル可溶物	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	

40

調和年月：2008年6月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Talc	タルク	
Definition	基原、マグネシウムの含量規定	
Identification	確認試験	
Acidity and alkalinity	純度試験(1)酸及びアルカリ	
Aluminium	純度試験(5)アルミニウム	
Calcium	純度試験(7)カルシウム	
Iron	純度試験(4)鉄	
Lead	純度試験(6)鉛	
Magnesium	定量法	
Loss on ignition	強熱減量	

41

調和年月：2007年10月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Wheat Starch	コムギデンプン	
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	
Total protein	規定しない	
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	
Loss on drying	乾燥減量	
Sulphated ash	強熱残分	

42

13 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2006年10月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Rice Starch	コメデンプン	
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	

43

調和年月：2007年10月(Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Corn Starch	トウモロコシデンプン	
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	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Limit of iron	純度試験(1)鉄	
Limit of oxidizing substances	純度試験(2)酸化性物質	
Sulfur dioxide determination	純度試験(3)二酸化イオウ	

44

調和年月：2007年10月(Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Potato Starch	バレイショデンプン	
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	
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	
Loss on drying	乾燥減量	
Sulphated ash	強熱残分	

45

調和年月：2005年5月(Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Sodium Starch Glycolate	デンプングリコール酸ナトリウム	
Definition	基原、ナトリウムの含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Identification B	確認試験(3)	
pH	pH	
Loss on drying	乾燥減量	
Limit of iron	純度試験(2)鉄	
Limit of sodium chloride	純度試験(4)塩化ナトリウム	
Limit of sodium glycolate	純度試験(3)グリコール酸ナトリウム	
Assay	定量法	

46

47

調和年月：2008年6月(Rev. 3)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Anhydrous Lactose	無水乳糖	
Definition	基原	
Clarity and color of solution	純度試験(1)溶状	
Specific rotation	旋光度	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Water	水分	
Protein and light-absorbing impurities	純度試験(4)たん白質及び光吸収物質	
Content of alpha and beta anomers	異性体比	

48

調和年月：2008年6月(Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Lactose Monohydrate	乳糖水和物	
Definition	基原	
Clarity and color of solution	純度試験(1)溶状	
Identification	確認試験	
Specific rotation	旋光度	
Acidity or alkalinity	純度試験(2)酸又はアルカリ	
Residue on ignition	強熱残分	
Water	水分	
Protein and light-absorbing impurities	純度試験(4)たん白質及び光吸収物質	

49

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Ethyl Parahydroxybenzoate	パラオキシ安息香酸エチル	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Acidity	純度試験(2)酸	
Related substances	純度試験(4)類縁物質	システム適合性は規定しない。
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

50

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Butyl Parahydroxybenzoate	パラオキシ安息香酸ブチル	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Acidity	純度試験(2)酸	
Related substances	純度試験(4)類縁物質	システム適合性は規定しない。
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

51

14 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Propyl Parahydroxybenzoate	パラオキシ安息香酸プロピル	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Acidity	純度試験(2)酸	
Related substances	純度試験(4)類縁物質	システム適合性は規定しない。
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

52

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Methyl Parahydroxybenzoate	パラオキシ安息香酸メチル	
Definition	成分の含量規定	
Identification A	確認試験(1)	
Appearance of solution	純度試験(1)溶状	
Acidity	純度試験(2)酸	
Related substances	純度試験(4)類縁物質	システム適合性は規定しない。
Sulphated ash	強熱残分	
Assay	定量法	

53

54

調和年月：2003年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Hydroxypropyl Methylcellulose	ヒプロメロース	
Definition	メトキシ基及びヒドロキシプロポキシ基の含量規定	
Labeling	粘度の表示規定	
Identification (1)	確認試験(1)	
Identification (2)	確認試験(2)	
Identification (3)	確認試験(3)	
Identification (4)	確認試験(4)	
Identification (5)	確認試験(5)	
Viscosity	粘度	
Method 1	第1法	
Method 2	第2法	
pH	pH	
Heavy metals	純度試験 重金属	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Assay	定量法	

55

調和年月：2006年6月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Hypromellose Phthalate	ヒプロメロースフタル酸エステル	
Definition	基原、カルボキシベンゾイル基の含量規定	
Packaging and storage	貯法	
Viscosity	粘度	
Water	水分	
Residue on ignition	強熱残分	
Chloride	純度試験(1)塩化物	
Limit of free phthalic acid	純度試験(3)フタル酸	
Phthalyl content	定量法	

56

調和年月：2008年6月 (Rev. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Benzyl Alcohol	ベンジルアルコール	
Definition	成分の含量規定	
Refractive index	屈折率	
Acidity	純度試験(2)酸	
Benzaldehyde and other related substances	純度試験(3)ベンズアルデヒド及び他の類縁物質	
Peroxide value	純度試験(4)過酸化値	
Residue on evaporation	純度試験(5)蒸発残留物	
Assay	定量法	

57

調和年月：2005年11月 (Rev. 1)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Methylcellulose	メチルセルロース	
Definition	メトキシ基の含量規定	
Labeling	粘度の表示規定	
Identification (1)	確認試験(1)	
Identification (2)	確認試験(2)	
Identification (3)	確認試験(3)	
Identification (4)	確認試験(4)	
Identification (5)	確認試験(5)	
Viscosity	粘度	
Method 1	第1法	
Method 2	第2法	
pH	pH	
Heavy metals	純度試験 重金属	
Loss on drying	乾燥減量	
Residue on ignition	強熱残分	
Assay	定量法	

58

調和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Anhydrous Dibasic Calcium Phosphate	無水リン酸水素カルシウム	
Definition	成分の含量規定	
Identification(1)	確認試験(1)	
Identification(2)	確認試験(2)	
Acid insoluble substances	純度試験(1)酸不溶物	
Chloride	純度試験(2)塩化物	
Sulfate	純度試験(3)硫酸塩	
Carbonate	純度試験(4)炭酸塩	
Barium	純度試験(6)バリウム	
Loss on ignition	強熱減量	
Assay	定量法	

59

15 第十六改正日本薬局方における国際調和

調和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Dibasic Calcium Phosphate	リン酸水素カルシウム水和物	
Definition	成分の含量規定	
Identification (1)	確認試験(1)	
Identification (2)	確認試験(2)	
Acid insoluble substances	純度試験(1)酸不溶物	
Chloride	純度試験(2)塩化物	
Sulfate	純度試験(3)硫酸塩	
Carbonate	純度試験(4)炭酸塩	
Barium	純度試験(6)バリウム	
Loss on ignition	強熱減量	
Assay	定量法	

60

調和年月：2007年5月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Powder Fineness	粉体の細かさ表示法	

61

調和年月：2004年6月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Powder Flow	粉体の流動性	
(Introduction)	(前書き)	
Angle of repose	1. 安息角測定法	
Basic methods for angle of repose	1.1 基本的測定法	
Variations in angle of repose methods	1.2 基本的測定法の変法	
Angle of repose general scale of flowability	1.3 安息角に関する流動性の一般的尺度	
Experimental considerations for angle of repose	1.4 測定に関して留意すべき点	
Recommended procedure for angle of repose	1.5 推奨される測定手順	
Compressibility index and Hausner ratio	2. 圧縮度及び Hausner 比測定法	
Basic methods for compressibility index and Hausner ratio	2.1 基本的測定法	
Experimental considerations for the compressibility index and Hausner ratio	2.2 測定に関して留意すべき点	
Recommended procedure for compressibility index and Hausner ratio	2.3 推奨される測定手順	
Flow through an orifice	3. オリフィスからの流出速度測定法	
Basic methods for flowthrough an orifice	3.1 基本的測定法	
Variations in methods for flow through an orifice	3.2 基本的測定法の変法	
General scale of flowability for flow through an orifice	3.3 オリフィスからの流出速度に関する流動性の一般的尺度	
Experimental considerations for flow through an orifice	3.4 測定に関して留意すべき点	
Recommended procedure for flow through an orifice	3.5 推奨される測定手順	
Shear cell methods	4. せん断セル法	
Basic methods for shear cell	4.1 基本的測定法	
Recommendations for shear cell	4.2 推奨される事項	
Table 1 Flow properties and corresponding angle of repose	表 1 流動特性と対応する安息角	
Table 2 Scale of flowability	表 2 流動性の尺度	

調和年月：2008年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Particle-size Analysis by Laser Light Diffraction	レーザー回折法による粒子径測定法	
Introduction	(前書き)	
Principle	1. 原理	
Instrument	2. 装置	
Development of the method	3. 測定法の予備的検討	
Sampling	3.1. サンプリング	
Evaluation of the dispersion procedure	3.2. 分散法の評価	
Optimisation of the liquid dispersion	3.3. 液体中での分散の最適化	
Optimisation of the gas dispersion	3.4. 気体中での分散の最適化	
Determination of the concentration range	3.5. 濃度範囲の決定	
Determination of the measuring time	3.6. 測定時間の決定	
Selection of an appropriate optical model	3.7. 適正な光学モデルの選択	
Validation	3.8. バリデーション	
Measurement	4. 測定	
Precautions	4.1. 測定前の注意事項	
Measurement of the light scattering of dispersed sample(s)	4.2. 分散試料の光散乱の測定	
Conversion of scattering pattern into particle-size distribution	4.3. 散乱パターンの子径分布への変換	
Replicates	4.4. 繰返し回数	
Reporting of results	5. 結果の記録	
Control of the instrument performance	6. 装置の性能管理	
Calibration	6.1. 校正	
Qualification of the system	6.2. システムの適合性評価	
Figure 1 Example of a set-up of laser light diffraction instrument	図1 レーザー回折装置の構成例	
Note	注1 注2	調和文書の冒頭の一文を注2として記載

63

64

調和年月：2002年9月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Amino Acid Analysis	アミノ酸分析法	
Apparatus	装置	

General precautions	一般的注意	
Reference standard material	標準物質	
Calibration of instrumentation	装置の校正	
Repeatability	再現性	
Sample preparation	試料調製	
Internal standards	内標準物質	
Protein hydrolysis	たん白質の加水分解	
Method 1	方法1	
Hydrolysis solution	加水分解液	
Procedure	操作法	
Method 2	方法2	
Hydrolysis solution	加水分解液	
Vapor phase hydrolysis	気相加水分解	
Method 3	方法3	
Hydrolysis solution	加水分解液	
Vapor phase hydrolysis	気相加水分解	
Method 4	方法4	
Oxidation solution	酸化液	
Procedure	操作法	
Method 5	方法5	
Hydrolysis solution	加水分解液	
Liquid phase hydrolysis	液相加水分解	
Method 6	方法6	
Hydrolysis solution	加水分解液	
Vapor phase hydrolysis	気相加水分解	
Method 7	方法7	
Reducing solution	還元液	
Procedure	操作法	
Method 8	方法8	
Stock solutions	原液	
Reducing solution	還元液	
Procedure	操作法	
Method 9	方法9	
Stock solutions	原液	
Carboxymethylation solution	カルボキシメチル化溶液	
Buffer solution	緩衝液	
Procedure	操作法	
Method 10	方法10	
Reducing solution	還元液	
Procedure	操作法	
Method 11	方法11	
Reducing solutions	還元液	
Procedure	操作法	
Methodologies of amino acid analysis general principles	アミノ酸分析の方法論とその基本原理	
Method 1-Postcolumn ninhydrin detection general principle	方法1 ニンヒドリンによるポストカラム検出法	
Method 2-Postcolumn OPA fluorometric detection general principle	方法2 OPAによるポストカラム蛍光検出法	
Method 3-Precolumn PITC derivatization general principle	方法3 PITCプレカラム誘導体化法	
Method 4-Precolumn AQC derivatization general principle	方法4 AQCプレカラム誘導体化法	
Method 5-Precolumn OPA derivatization general principle	方法5 OPAプレカラム誘導体化法	
Method 6-Precolumn DABS-Cl derivatization general principle	方法6 DABS-Clプレカラム誘導体化法	
Method 7-Precolumn	方法7 FMOC-Clプレ	

FMOCl derivatization general principle	カラム誘導体化法
Method 8-Precolumn NBD-F derivatization general principle	方法 8 NBD-F プレカラム誘導体化法
Data calculation and analysis	データの計算と解析
Calculations	計算
Amino acid mole percent	アミノ酸のモル%
Unknown protein samples	未知たん白質試料
Known protein samples	既知たん白質試料

65

調和年月：1999年10月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	
Characteristics of polyacrylamide gels	1. ポリアクリルアミドゲルの特性	
Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis	2. 変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動	
Reducing conditions	2.1. 還元条件	
Non-reducing conditions	2.2. 非還元条件	
Characteristics of discontinuous buffer system gel electrophoresis	3. 不連続緩衝液系ゲル電気泳動の特徴	
Preparing vertical discontinuous buffer SDS-polyacrylamide gels	4. 垂直不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製	
Assembling of the gel moulding cassette	4.1. ゲル形成カセットの組立	
Preparation of the gel	4.2. ゲルの調製	
Mounting the gel in the electrophoresis apparatus and electrophoretic separation	4.3. 電気泳動装置へのゲルの取り付け及び泳動分離	
Detection of protein in gels	5. ゲル中のたん白質の検出	
Coomassie staining	5.1. クーマシー染色	
Silver staining	5.2. 銀染色	
Drying of stained SDS polyacrylamide gels	6. 染色した SDS-ポリアクリルアミドゲルの乾燥	
Molecular mass determination	7. 分子量の測定	
Validation of the test	8. 実施した試験の適合性(バリデーション)	
Quantification of impurities	9. 不純物の定量	
Reagents, test solutions	10. 試薬・試液	
Blocking solution	停止試液	
Coomassie staining solution	クーマシー染色試液	
Destaining solution	脱色試液	
Developer solution	現像試液	
Fixing solution	固定試液	
Silver nitrate reagent	硝酸銀試液, 銀染色用	
Trichloroacetic acid reagent	トリクロロ酢酸試液, 固定用	
Table 1 Preparation of resolving gel	表 1 分離ゲルの調製	67
Table 2 Preparation of stacking gel	表 2 濃縮ゲルの調製	68

66

調和年月：2010年6月(Corr. 2)

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
Capillary Electrophoresis	参考情報 キャピラリー電気泳動法	
Apparatus	装置	
Capillary zone electrophoresis	1. キャピラリーゾーン電気泳動法	
Optimisation	分離の最適化	
Instrumental parameters	機器に関するパラメーター	
Voltage	(1) 電圧	
Polarity	(2) 極性	
Temperature	(3) 温度	
Capillary	(4) 毛細管	
Electrolytic solution parameters	電解質溶液に関するパラメーター	
Buffer type and concentration	(1) 緩衝液の種類と濃度	
Buffer pH	(2) 緩衝液の pH	
Organic solvents	(3) 有機溶媒	
Additives for chiral separations	(4) キラル分離のための添加物質	
Capillary gel electrophoresis	2. キャピラリーゲル電気泳動法	
Characteristics of gels	ゲルの特徴	
Capillary isoelectric focusing	3. キャピラリー等電点電気泳動法	
Loading step	(1) Loading step	
loading in one step	(i) ワンステップ添加	
sequential loading	(ii) 連続的な添加	
Focusing step	(2) 集束	
Mobilisation step	(3) 移動	
Optimisation	最適化	
Voltage	(1) 電圧	
Capillary	(2) 毛細管	
Solutions	(3) 溶液類	
Micellar electrokinetic chromatography (MEKC)	4. ミセル動電クロマトグラフィ- (MEKC)	
Optimisation	最適化	
Instrumental parameters	機器に関するパラメーター	
Voltage	(1) 電圧	
Temperature	(2) 温度	
Capillary	(3) 毛細管	
Electrolytic solution parameters	電解質溶液に関するパラメーター	
Surfactant type and concentration	(1) 界面活性剤の種類と濃度	
Buffer pH	(2) 緩衝液の pH	
Organic solvents	(3) 有機溶媒類	
Additives for chiral separations	(4) 光学分離用添加物質	
Other additives	(5) その他の添加剤	
Quantification	定量分析	
Calculations	計算	
System Suitability	適合性パラメーター	
Apparent number of theoretical plates	理論段数	
Resolution	分離度	
Symmetry factor	ピークの対称性	
Signal-to-noise ratio	シグナル・ノイズ比	

調和年月：2002年9月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	

Total Protein Assay	たん白質定量法	
Method 1	方法 1 (紫外吸収法)	
Standard solution	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Procedure	操作法	
Light-scattering	光散乱	
Calculations	計算法	
Method 2	方法 2 (Lowry 法)	日本薬局方独自記載事項：脚注に公定書名を記載
Standard solutions	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Blank	対照液	
Reagents and solutions	試薬・試液	
Copper sulfate reagent	硫酸銅試液	
SDS solution	SDS 試液, 5 %	
Sodium hydroxide solution	水酸化ナトリウム溶液	
Alkaline copper reagent	アルカリ性銅試液	
Diluted folin-ciocalteu's phenol reagent	希フオリン試液	
Procedure	操作法	
Calculations	計算法	
Interfering substances	妨害物質	
Sodium deoxycholate reagent	デオキシコール酸ナトリウム試液	
Trichloroacetic acid reagent	トリクロロ酢酸試液	
Procedure	操作法	
Method 3	方法 3 (Bradford 法)	
Standard solutions	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Blank	対照液	
Coomassie reagent	クーマシー試液	
Procedure	操作法	
Calculations	計算法	
Method 4	方法 4 (ピシニコニン酸法)	
Standard solutions	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Blank	対照液	
Reagents	試薬・試液	
BCA reagent	BCA 試液	
Copper sulfate reagent	硫酸銅試液	
Copper-BCA reagent	銅・BCA 試液	
Procedure	操作法	
Calculations	計算法	
Method 5	方法 5 (Biuret 法)	
Standard solutions	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Blank	対照液	
Biuret reagent	ビウレット試液	
Procedure	操作法	
Calculations	計算法	
Interfering substances	妨害物質	
Comments	解説	

Method 6	方法 6 (蛍光法)	
Standard solutions	標準溶液	
Test solution	試料溶液	
Blank	対照液	
Reagents	試薬・試液	
Borate buffer	ホウ酸緩衝液	
Stock OPA reagent	OPA 試液原液	
OPA reagent	OPA 試液	
Procedure	操作法	
Calculations	計算法	
Method 7	方法 7 (窒素測定法)	
Procedure A	操作法 A	
Procedure B	操作法 B	
Calculations	計算法	

69

調和年月：2002年9月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Isoelectric Focusing	等電点電気泳動法	
Theoretical aspects	理論	
Practical aspects	操作	
Apparatus	装置	
Isoelectric focusing in polyacrylamide gels: detailed procedure	ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法：操作の詳細	
Preparation of the gels	平板ゲルの調製法	
1) 7.5 per cent polyacrylamide gel	7.5%ポリアクリルアミドゲル	
2) Preparation of the mould	型枠の組み立て	
Method	方法	
Variations to the detailed procedure (subject to validation)	本試験法の細部の変更 (検証の必要な項目)	
Validation of iso-electric focusing procedures	等電点電気泳動操作法の検証	
Specified variation to the general method	本法の規定の変更	
Point to consider	注意	
Figure - Mould	図 装置	
Reagents	試薬・試液	
Fixing solution for isoelectric focusing in polyacrylamide gel	ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液	
	クーマシー染色試液	日本薬局方独自記載事項
	脱色液	日本薬局方独自記載事項

70

調和年月：2002年9月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Peptide Mapping	ペプチドマップ法	
Purpose and scope	(前書き)	
The peptide map	1. ペプチドマップ	
Isolation and purification	2. 分離と精製	
Selective cleavage of peptide bonds	3. ペプチド結合の選択的切断	
Pretreatment of sample	3.1. 試料の前処理	
Pretreatment of the cleavage agent	3.2. 切断剤の前処理	
Pretreatment of the protein	3.3. たん白質の前処理	
Establishment of optimal digestion conditions	3.4. 至適消化条件の設定	
pH	(i) pH	
Temperature	(ii) 温度	
Time	(iii) 反応時間	
Amount of cleavage agent	(iv) 切断剤の量	
Chromatographic separation	4. クロマトグラフィーによる分離	
Chromatographic column	4.1. 分離用カラム	
Solvent	4.2. 溶媒	
Mobile phase	4.3. 移動相	
Gradient selection	4.4. グラジエント法の選択	
Isocratic selection	4.5. アイソクラティック法の選択	
Other parameters	4.6. その他のパラメーター	
Validation	4.7. システム適合性	
Analysis and identification of peptides	5. ペプチドの分析と確認	
Table 1 – Examples of cleavage agents	表 1 切断剤の例	
Table 2 – Techniques used for the separation of peptides	表 2 ペプチドの分離方法	

71

調和年月：2005年11月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Microbiological Examination of Non-sterile Products:	非無菌医薬品の微生物学的品質特性	日本薬局方独自記載事項： 1. 定義 2. 試験の適用除外 3. 試料の採取方法及び試験の実施頻度 4. 微生物管理計画書
Acceptance criteria for pharmaceutical preparations and substances for pharmaceutical use	5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値	日本薬局方独自記載事項： 微生物許容基準値に関する説明 日本薬局方独自記載事項： 6. 生薬及び生薬を配合した製剤に対する微生物許容基準値
Table 2. Acceptance criteria for microbiological quality of non-sterile substances for pharmaceutical use	表 1 非無菌医薬品原料の微生物学的品質に対する許容基準値	
Table 1. Acceptance criteria for microbiological quality of non-sterile dosage forms	表 2 非無菌製剤の微生物学的品質に対する許容基準値	
	表 3 主薬及び生薬を配合した製剤の微生物学的品質に対する許容基準値	日本薬局方独自記載事項

72

調和年月：2004年2月

薬局方調和事項	第十六改正日本薬局方	備考
	参考情報	
Tablet Friability	錠剤の摩損度試験法	

73

1 「原子量表(2010)」について

2 元素の原子量は1961年、「質量数12の炭素(^{12}C)の質量を
3 12(端数無し)としたときの相対質量とする」と決められた。以
4 来、質量分析法等の物理的手法による各元素の核種の質量と同
5 位体組成の測定データは質、量ともに格段に向上した。国際純
6 正・応用化学連合(IUPAC)の、原子量及び同位体存在度委員会
7 (CIAAW)では、新しく測定されたデータの収集と検討をもと
8 に原子量表の改定を行い、2年ごと(奇数年)に新しい原子量表
9 を発表している。これを受けて、日本化学会原子量委員会では、
10 IUPACの原子量表をもとに毎年4月にその年の原子量表を発表
11 している。以下に示す2010年版の原子量表の数値はIUPACか
12 ら2007年に発表された原子量の改定^{*1}に基づいている。さら
13 に詳しいことはIUPACの原子量及び同位体存在度委員会の報
14 告書^{*2}及び総説^{*3}を参照していただきたい。

15 原子量表に記載されている各元素の原子量の値は、表の前文
16 に書かれているように、地球上に起源を持ち、天然に存在する
17 物質中の元素に対する値である。原子量は単核種元素(一つの
18 安定核種からなる元素)以外の元素では光の速度のような自然
19 界の定数ではなく、その元素を含む物質の起源や処理の仕方な
20 どによって変わりうるものである。これは原子量がそれぞれの
21 元素を構成している安定核種の相対存在度(同位体比)に依存す
22 るからである。測定技術の進歩によって、各元素の同位体存在
23 度は必ずしも一定ではなく、地球上で起こる様々な過程のため
24 に変動し、それが原子量に反映することがわかってきた。その
25 結果、元素間で原子量の精度に差が生じることになった。原子
26 量表で各原子量の値に続く()の中に示した数字は、その原子
27 量の最後の桁の値に対する不確かさである。例えば水素の場合
28 の1.00794(7)は 1.00794 ± 0.00007 を意味する。

29 単核種元素の原子量は最も正確で、精度も高い。それは、単
30 核種元素は複数の安定同位体をもたないために同位体比を考慮
31 する必要がないからである。このような元素の原子量は、物理
32 的手法で求めたそれぞれの核種の質量^{*4}をもとに一定の基準で
33 不確かさを考慮して決められる。

34 元素の中には地球上で採取された試料の大部分ではある一定
35 の同位体組成を示すが、ある特定の試料ではそれらの値と異な
36 った同位体組成を示すものがある。このような元素には注に
37 “g”と記し、試料によってはこれらの元素の原子量として原
38 子量表の値をそのまま使うことができないことを示す。これに
39 対して、例えば酸素のように、空気、海水、陸水、岩石など
40 種々の形態で地球上に存在し、これらの物質間で同位体組成が
41 変動しているため、どれか1つの値に収束できない元素がある。
42 注の“r”は、このように同位体組成の測定技術がどんなに進
43 歩しても精度のよい原子量を与えることができない元素に付け
44 られている。一方、元素によっては人為的に同位体分別を受け
45 たものが試薬として一般に利用されている可能性がある。代表
46 的な元素として、水素、リチウム、ホウ素、ウランなどがある。
47 注の“m”はこのような元素に付けられており、特に原子量が
48 問題となるような場合には試薬のラベルを参照するなどして注
49 意する必要がある。

50 ^{*1} IUPAC Inorganic Chemistry Division, CIAAW :
51 Standard Atomic Weights Revised. *Chem. Int.*, **29**,

52 18(2007).

53 ^{*2} IUPAC Inorganic Chemistry Division, CIAAW : Atomic
54 Weights of the Elements 2007, *Pure Appl. Chem.*, **81**,
55 2131(2009).

56 ^{*3} J. R. De Laeter *et al.* : Atomic Weights of the
57 Elements : Review 2000. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 683(2003).

58 ^{*4} G. Audi *et al.* : The AME 2003 Atomic Mass
59 Evaluation(II). Tables, graphs and references. *Nucl. Phys.*
60 *A*, **729**, 337(2003).

1 原子量表(2010)

1 原子量表(2010)

- 2 (元素の原子量は、質量数12の炭素(¹²C)を12とし、これに対
 3 する相対値とする。但し、¹²Cは核及び電子が基底状態にある
 4 中性原子である。)
 5 多くの元素の原子量は一定ではなく、物質の起源や処理の仕
 6 方に依存する。原子量とその不確かさ*は地球上に起源をもち、
 7 天然に存在する物質中の元素に適用される。この表の脚注には、
 8 個々の元素に起こりうるもので、原子量に付随する不確かさを
 9 越える可能性のある変動の様式が示されている。原子番号112
 10 から118までの元素名は暫定的なものである。

元素名	元素記号	原子番号	原子量	脚注
アインスタイニウム*	Es	99		
亜鉛	Zn	30	65.38(2)	r
アクチニウム*	Ac	89		
アスタチン*	At	85		
アメリシウム*	Am	95		
アルゴン	Ar	18	39.948(1)	g r
アルミニウム	Al	13	26.9815386(8)	
アンチモン	Sb	51	121.760(1)	g
硫黄	S	16	32.065(5)	g r
イッテルビウム	Yb	70	173.054(5)	g
イットリウム	Y	39	88.90585(2)	
イリジウム	Ir	77	192.217(3)	
インジウム	In	49	114.818(3)	
ウラン*	U	92	238.02891(3)	g m
ウンウンオクテチウム*	Uuo	118		
ウンウンクアジウム*	Uuq	114		
ウンウントリウム*	Uut	113		
ウンウンヘキシウム*	Uuh	116		
ウンウンペンテチウム*	Uup	115		
エルビウム	Er	68	167.259(3)	g
塩素	Cl	17	35.453(2)	g m r
オスミウム	Os	76	190.23(3)	g
カドミウム	Cd	48	112.411(8)	g
ガドリニウム	Gd	64	157.25(3)	g
カリウム	K	19	39.0983(1)	
ガリウム	Ga	31	69.723(1)	
カリホルニウム*	Cf	98		
カルシウム	Ca	20	40.078(4)	g
キセノン	Xe	54	131.293(6)	g m
キュリウム*	Cm	96		
金	Au	79	196.966569(4)	
銀	Ag	47	107.8682(2)	g
クリプトン	Kr	36	83.798(2)	g m
クロム	Cr	24	51.9961(6)	
ケイ素	Si	14	28.0855(3)	r
ゲルマニウム	Ge	32	72.64(1)	
コバルト	Co	27	58.933195(5)	
コペルニシウム*	Cn	112		
サマリウム	Sm	62	150.36(3)	g
酸素	O	8	15.9994(3)	g r
ジスプロシウム	Dy	66	162.500(1)	g
シーボーギウム*	Sg	106		
臭素	Br	35	79.904(1)	
ジルコニウム	Zr	40	91.224(2)	g
水銀	Hg	80	200.59(2)	
水素	H	1	1.00794(7)	g m r
スカンジウム	Sc	21	44.955912(6)	
スズ	Sn	50	118.710(7)	g
ストロンチウム	Sr	38	87.62(1)	g r
セシウム	Cs	55	132.9054519(2)	
セリウム	Ce	58	140.116(1)	g
セレン	Se	34	78.96(3)	r
ダームスタチウム*	Ds	110		
タリウム	Tl	81	204.3833(2)	
タングステン	W	74	183.84(1)	
炭素	C	6	12.0107(8)	g r
タンタル	Ta	73	180.94788(2)	
チタン	Ti	22	47.867(1)	
窒素	N	7	14.0067(2)	g r
ツリウム	Tm	69	168.93421(2)	
テクネチウム*	Tc	43		
鉄	Fe	26	55.845(2)	
テルビウム	Tb	65	158.92535(2)	
テルル	Te	52	127.60(3)	g
銅	Cu	29	63.546(3)	r
ドブニウム*	Db	105		
トリウム*	Th	90	232.03806(2)	g

2 原子量表(2010)

元素名	元素記号	原子番号	原子量	脚注
ナトリウム	Na	11	22.98976928(2)	
鉛	Pb	82	207.2(1)	g r
ニオブ	Nb	41	92.90638(2)	
ニッケル	Ni	28	58.6934(4)	r
ネオジム	Nd	60	144.242(3)	g
ネオン	Ne	10	20.1797(6)	g m
ネプツニウム*	Np	93		
ノーベリウム*	No	102		
バークリウム*	Bk	97		
白金	Pt	78	195.084(9)	
ハッシウム*	Hs	108		
バナジウム	V	23	50.9415(1)	
ハフニウム	Hf	72	178.49(2)	
パラジウム	Pd	46	106.42(1)	g
バリウム	Ba	56	137.327(7)	
ビスマス*	Bi	83	208.98040(1)	
ヒ素	As	33	74.92160(2)	
フェルミウム*	Fm	100		
フッ素	F	9	18.9984032(5)	
プラセオジウム	Pr	59	140.90765(2)	
フランシウム*	Fr	87		
プルトニウム*	Pu	94		
プロトアクチニウム*	Pa	91	231.03588(2)	
プロメチウム*	Pm	61		
ヘリウム	He	2	4.002602(2)	g r
ベリリウム	Be	4	9.012182(3)	
ホウ素	B	5	10.811(7)	g m r
ボーリウム*	Bh	107		
ホルミウム	Ho	67	164.93032(2)	
ポロニウム*	Po	84		
マイトネリウム*	Mt	109		
マグネシウム	Mg	12	24.3050(6)	
マンガン	Mn	25	54.938045(5)	
メンデレビウム*	Md	101		
モリブデン	Mo	42	95.96(2)	g r
ユウロビウム	Eu	63	151.964(1)	g
ヨウ素	I	53	126.90447(3)	
ラザホージウム*	Rf	104		
ラジウム*	Ra	88		
ラドン*	Rn	86		
ランタン	La	57	138.90547(7)	g
リチウム	Li	3	[6.941(2)] [†]	g m r
リン	P	15	30.973762(2)	
ルテチウム	Lu	71	174.9668(1)	g
ルテニウム	Ru	44	101.07(2)	g
ルビジウム	Rb	37	85.4678(3)	g
レニウム	Re	75	186.207(1)	
レントゲニウム*	Rg	111		
ロジウム	Rh	45	102.90550(2)	
ローレンシウム*	Lr	103		

r : 通常の地球上の物質の同位体組成に変動があるために表記の原子量より精度の良い値を与えることができない。表中の原子量は通常の物質すべてに適用されるものとする。

- # : 不確かさは()内の数字で表され、有効数字の最後の桁に対応する。例えば、亜鉛の場合の65.38(2)は65.38±0.02を意味する。
- * : 安定同位体のない元素(前ページの下段の表参照)。これらの元素については原子量が示されていないが、プロトアクチニウム、トリウム、ウランは例外で、これらの元素は地球上で固有の同位体組成を示すので原子量が与えられている。
- † : 市販品中のリチウム化合物中のリチウムの原子量は6.939から6.996の幅をもつ(「元素の同位体組成表2010」の注bを参照)。より正確な原子量が必要な場合は、個々の物質について測定する必要がある。
- g : 当該元素の同位体組成が正常な物質が示す変動幅を越えるような地質学的試料が知られている。そのような試料中では当該元素の原子量とこの表の値との差が、表記の不確かさを越えることがある。
- m : 不詳な、あるいは不適切な同位体分別を受けたために同位体組成が変動した物質が市販品中に見いだされることがある。そのため、当該元素の原子量が表記の値とかなり異なることがある。

1 安定同位体のない元素

1 安定同位体のない元素

2 この表は、原子量表(2010)で*を付した安定同位体のない元

3 素についてまとめたものである。

原子番号	元素名	元素記号	同位体の質量数 [†]
43	テクネチウム	Tc	97,98,99
61	プロメチウム	Pm	145,146,147
83	ビスマス	Bi	209
84	ポロニウム	Po	208,209,210
85	アスタチン	At	210,211
86	ラドン	Rn	210,211,222
87	フランシウム	Fr	212,222,223
88	ラジウム	Ra	226,228
89	アクチニウム	Ac	225,227
90	トリウム	Th	230,232
91	プロトアクチニウム	Pa	231,233
92	ウラン	U	233,234,235,236,238
93	ネプツニウム	Np	236,237
94	プルトニウム	Pu	238,239,240,241,242,244
95	アメリシウム	Am	241,243
96	キュリウム	Cm	243,244,245,246,247,248
97	バークリウム	Bk	247,249
98	カリホルニウム	Cf	249,250,251,252
99	アインスタイニウム	Es	252,254
100	フェルミウム	Fm	253,257
101	メンデレビウム	Md	258,260
102	ノーベリウム	No	255,259
103	ローレンシウム	Lr	251,261,262
104	ラザホージウム	Rf	265,267
105	ドブニウム	Db	267,268
106	シーボーギウム	Sg	265,271
107	ボーリウム	Bh	267,272
108	ハッシウム	Hs	269,277
109	マイトネリウム	Mt	268,276
110	ダームスタチウム	Ds	280,281
111	レントゲニウム	Rg	279,280
112	コペルニシウム	Cn	283,285
113	ウンウントリウム	Uut	283,284
114	ウンウンクアジウム	Uuq	288,289
115	ウンウンペンチウム	Uup	287,288
116	ウンウンヘキシウム	Uuh	291,292,293
118	ウンウンオクテウム	Uuo	294

[†] 現在確認されている質量数の例で、ビスマスを除く元素については下記文献1のTable3に基づく。ビスマスについては下記文献2に基づき、放射性元素と判断した。

1. IUPAC Inorganic Chemistry Division, CIAAW : Atomic Weights of the Elements 2007. *Pure Appl. Chem.*, 81, 2131(2009).
2. P. de Marcillac *et al.* : Experimental Detection of α -particles from the Radioactive Decay of Natural Bismuth. *Nature*, 422, 876(2003).

1 Standard Atomic Weights 2010

2 (Scaled to $A_r(^{12}\text{C}) = 12$, where ^{12}C is a neutral atom in its nuclear and electronic ground state)

3 The atomic weights of many elements are not invariant but depend on the origin and treatment of the material. The
 4 standard values of $A_r(\text{E})$ and the uncertainties (in parentheses, following the last significant figure to which they are
 5 attributed) apply to elements of natural terrestrial origin. The footnotes to this table elaborate the types of variation
 6 which may occur for individual elements and which may be larger than the listed uncertainties of values of $A_r(\text{E})$. Names
 7 of elements with atomic number 112 to 118 are provisional.

Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes	Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes
Hydrogen	H	1	1.00794(7)	g m r	Praseodymium	Pr	59	140.90765(2)	
Helium	He	2	4.002602(2)	g r	Neodymium	Nd	60	144.242(3)	g
Lithium	Li	3	[6.941(2)] [†]	g m r	Promethium*	Pm	61		
Beryllium	Be	4	9.012182(3)		Samarium	Sm	62	150.36(2)	g
Boron	B	5	10.811(7)	g m r	Europium	Eu	63	151.964(1)	g
Carbon	C	6	12.0107(8)	g r	Gadolinium	Gd	64	157.25(3)	g
Nitrogen	N	7	14.0067(2)	g r	Terbium	Tb	65	158.92535(2)	
Oxygen	O	8	15.9994(3)	g r	Dysprosium	Dy	66	162.500(1)	g
Fluorine	F	9	18.9984032(5)		Holmium	Ho	67	164.93032(2)	
Neon	Ne	10	20.1797(6)	g m	Erbium	Er	68	167.259(3)	g
Sodium	Na	11	22.98976928(2)		Thulium	Tm	69	168.93421(2)	
Magnesium	Mg	12	24.3050(6)		Ytterbium	Yb	70	173.054(5)	g
Aluminium	Al	13	26.9815386(8)		Lutetium	Lu	71	174.9668(1)	g
Silicon	Si	14	28.0855(3)	r	Hafnium	Hf	72	178.49(2)	
Phosphorus	P	15	30.973762(2)		Tantalum	Ta	73	180.94788(2)	
Sulfur	S	16	32.065(5)	g r	Tungsten	W	74	183.84(1)	
Chlorine	Cl	17	35.453(2)	g m r	Rhenium	Re	75	186.207(1)	
Argon	Ar	18	39.948(1)	g r	Osmium	Os	76	190.23(3)	g
Potassium	K	19	39.0983(1)		Iridium	Ir	77	192.217(3)	
Calcium	Ca	20	40.078(4)	g	Platinum	Pt	78	195.084(9)	
Scandium	Sc	21	44.955912(6)		Gold	Au	79	196.966569(4)	
Titanium	Ti	22	47.867(1)		Mercury	Hg	80	200.59(2)	
Vanadium	V	23	50.9415(1)		Thallium	Tl	81	204.3833(2)	
Chromium	Cr	24	51.9961(6)		Lead	Pb	82	207.2(1)	g r
Manganese	Mn	25	54.938045(5)		Bismuth*	Bi	83	208.98040(1)	
Iron	Fe	26	55.845(2)		Polonium*	Po	84		
Cobalt	Co	27	58.933195(5)		Astatine*	At	85		
Nickel	Ni	28	58.6934(4)	r	Radon*	Rn	86		
Copper	Cu	29	63.546(3)	r	Francium*	Fr	87		
Zinc	Zn	30	65.38(2)	r	Radium*	Ra	88		
Gallium	Ga	31	69.723(1)		Actinium*	Ac	89		
Germanium	Ge	32	72.64(1)		Thorium*	Th	90	232.03806(2)	g
Arsenic	As	33	74.92160(2)		Protactinium*	Pa	91	231.03588(2)	
Selenium	Se	34	78.96(3)	r	Uranium*	U	92	238.02891(3)	g m
Bromine	Br	35	79.904(1)		Neptunium*	Np	93		
Krypton	Kr	36	83.798(2)	g m	Plutonium*	Pu	94		
Rubidium	Rb	37	85.4678(3)	g	Americium*	Am	95		
Strontium	Sr	38	87.62(1)	g r	Curium*	Cm	96		
Yttrium	Y	39	88.90585(2)		Berkelium*	Bk	97		
Zirconium	Zr	40	91.224(2)	g	Californium*	Cf	98		
Niobium	Nb	41	92.90638(2)		Einsteinium*	Es	99		
Molybdenum	Mo	42	95.96(2)	g r	Fermium*	Fm	100		
Technetium*	Tc	43			Mendelevium*	Md	101		
Ruthenium	Ru	44	101.07(2)	g	Nobelium*	No	102		
Rhodium	Rh	45	102.90550(2)		Lawrencium*	Lr	103		
Palladium	Pd	46	106.42(1)	g	Rutherfordium*	Rf	104		
Silver	Ag	47	107.8682(2)	g	Dubnium*	Db	105		
Cadmium	Cd	48	112.411(8)	g	Seaborgium*	Sg	106		
Indium	In	49	114.818(3)		Bohrium*	Bh	107		
Tin	Sn	50	118.710(7)	g	Hassium*	Hs	108		
Antimony	Sb	51	121.760(1)	g	Meitnerium*	Mt	109		
Tellurium	Te	52	127.60(3)	g	Darmstadtium*	Ds	110		
					Roentgenium	Rg	111		

2 Standard Atomic Weights 2010

Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes	Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes
Iodine	I	53	126.90447(3)		Copernicium*	Cn	112		
Xenon	Xe	54	131.293(6)	g m	Ununtrium*	Uut	113		
Caesium(Cesium)	Cs	55	132.9054519(2)		Ununquadium*	Uuq	114		
Barium	Ba	56	137.327(7)		Ununpentium*	Uup	115		
Lanthanum	La	57	138.90547(7)	g	Ununhexium*	Uuh	116		
Cerium	Ce	58	140.116(1)	g	Ununoctium*	Uuo	118		

* : Element has no stable isotopes.

† : Commercially available Li materials have atomic weights that range between 6.939 and 6.996 ; if a more accurate value is required, it must be determined for the specific material.

g : Geological specimens are known in which the element has an isotopic composition outside the limits for normal material. The difference between the atomic weight of the element in such specimens and that given in the table may exceed the stated uncertainty.

m : Modified isotopic compositions may be found in commercially available material because it has been subjected to an undisclosed or inadvertent isotopic fractionation. Substantial deviations in atomic weight of the element from that given in the table can occur.

r : Range in isotopic composition of normal terrestrial material prevents a more precise $A_r(E)$ being given ; the tabulated $A_r(E)$ value should be applicable to any normal material.

©2010日本化学会 原子量小委員会