

資料No. 2－1

参考情報・附録改正（案）

令和7年10月8日
日本薬局方部会

1 G0. 医薬品品質に関する基本的事項

2 医薬品原薬及び製剤の品質確保の基本的考え方〈G0-1-172〉

4 はじめに

5 医薬品原薬及び製剤の品質は、一般的にその設計・開発段階、
6 製造段階から得られた知見を、適切に原料・資材管理、製造工
7 程管理及び規格等に反映し、GMP管理下で製造及び試験され
8 ることにより保証される。通則に示されるように、日局の医薬
9 品の適否は、医薬品各条の規定、通則、生薬総則、製剤総則及
10 び一般試験法の規定によって判定するものの、それに加えて
11 GMPの遵守、原料・資材の管理及び製造工程管理は、日局の
12 医薬品の品質を実際の製造において保証する上で必要な要素で
13 ある。

14 本参考情報は、化学合成及び半合成の抗生物質等を含む化学
15 物質、合成ペプチド、オリゴヌクレオチド並びに生物薬品(バ
16 イオテクノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)を主な対
17 象とした医薬品原薬及び製剤の品質確保の方策に関する一般的
18 考え方をまとめ、局方各条にこれら医薬品を収載する際の原則
19 的な考え方を示したものである。放射性医薬品、生薬、植物製
20 剤及び動植物由来の原料を含む生薬製剤を対象としないものの、
21 本考え方はいずれの医薬品にとっても有益である。

22 基本的考え方

23 近年、原料・資材の管理を含む製造工程における管理及び最
24 終製品(原薬又は製剤)の品質試験を相互補完的に行うことで医
25 薬品の品質を確保するという管理戦略に従って医薬品の品質管
26 理が実施されることが主流となりつつある。この管理戦略は品
27 質リスクマネジメント(QRM: Quality Risk Management)に
28 従って立てられるが、まず重要品質特性(CQA: Critical
29 Quality Attribute)、すなわち要求される製品品質を保証する
30 ために必要な特性又は性質であって、適切な限度内、範囲内、
31 分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特
32 性又は性質を特定することが必要である。次いでそのCQAが
33 定められた範囲や限度、分布内に入ることを規格試験、工程内
34 試験や様々な方策を用いて保証することにより、最終的に医薬
35 品品質が確保されることになる。

36 規格及び試験方法は、管理戦略の中の要素の一つであり、必
37 ずしも全てのCQAを規格に含める必要はない。CQAは、(1)規
38 格及び試験方法に含まれ、最終製品を試験し保証する(定期的
39 試験／スキップ試験(後述)の設定を含む)、又は(2)規格及び試
40 験方法に含まれるが、製造工程における管理(例えば、リアル
41 タイムリリース試験(後述))を通して保証する、あるいは(3)規
42 格及び試験方法には含まれないが、出発物質・原材料、製造工
43 程等における管理を通して保証することができる。(3)の例と
44 しては、頑健な製造工程に対する効果的な管理により、特定の
45 不純物が許容できるレベル内で管理されていること又は容認で
46 けるレベル以下まで効率的に除去されることが保証可能であり、
47 最終製品を対象とした純度試験の実施を必要とせず、最終製品
48 の規格及び試験方法にそれを含めなくてもよい場合等がある。
49 この場合、局方収載品目では、CQAに関連する製造工程管理
50 について、必要であれば各条における製造要件にその管理方法
51 及び管理値を示す。

52 あるCQAにどのような管理戦略を適用すべきかは、製造工
53 程の理解とリスクに応じて、QRMにより個別に決定される。

54 1. 製造工程管理

55 1.1. 製造工程に対する留意点

56 規格に適合し、CQAを満たす原薬又は製剤の製造を可能に
57 する製造工程を確立し、一貫性のある製造・品質管理等を適切
58 に行うには、製造方法の適切な設計や製造工程が有する能力の
59 確認と把握が重要である。

60 このような観点から、製造工程の各種の管理基準値は、開発
61 初期から実生産規模の製造に至る間の全ての過程で得られた情
62 報に基づいたものとすると共に、QRMによる製造工程の評価、
63 検証、照査等によってその妥当性が確認される必要がある。

64 工程内試験は、最終製品を対象とした規格試験ではなく、原
65 薬や製剤の製造工程中で実施される試験のことである。工程内
66 試験は、原薬又は製剤の品質に影響を及ぼす可能性の大きい製
67 造ステップでの品質確認のため、又は製造工程が適切に作動し
68 ていることの確認のために実施するものである。また、工程内
69 試験はCQAの評価に用いられる場合もある。

70 工程内試験は、通常、当該工程の品質に対するリスクに応じ、
71 適切に設定されるものであるが、重要度が相対的に低い製造ス
72 テップでも、製造業者が社内での処置基準値を用いて、製造工
73 程が一定に保持されていることを評価することは重要である。
74 医薬品開発段階及び製造工程の評価／検証の段階で得たデー
75 タを根拠にして、製造工程に対して設定すべき暫定的処置基準
76 値が設定され、この基準値は、医薬品製造販売承認後の製造経験
77 及び蓄積されたデータに基づき、更に適切に見直していくべき
78 ものである。

79 1.2. 原料・資材(出発物質、添加剤、包装材料等)に対する留 80 意点

81 原薬(又は製剤)の製造に使用する原料・資材は、その使用目
82 的になかった品質基準を満たす必要があり、CQAの保証に必
83 要な規格及び試験方法の設定が適宜必要となる。特に生物由来
84 原料／原材料に関しては、慎重な評価を行い、有害な内感性感
85 染性物質又は外来性感染性物質の有無を確認しなければならない
86 場合がある。工程中でアフィニティクロマトグラフィー(例
87 えばモノクローナル抗体を用いたクロマトグラフィー)を使用
88 する場合には、抗体を作製する過程及びそれをクロマトグラ
89 フィー用担体とする際に生成する可能性がある製造工程由来不
90 純物や、混入する可能性がある汚染物質が当該原薬や製剤の品
91 質及び安全性を損なわないことを担保できるよう、適切なリス
92 ク対策を講じておく必要がある。

93 製剤化の際に(場合によっては原薬の製造の際に)使用する添
94 加剤及び一次包装材料の品質は、当該医薬品の特性に応じ、必
95 要な規格を設定し、管理することが必要である。これらに日局
96 で規格及び試験方法が設定されている場合には、日局の基準を
97 最低限満たす必要がある。日局に収載されていない添加剤等
98 に関しては、適切な規格及び試験方法を別途設定する必要がある。

99 2. 製品の品質試験(規格及び試験方法)

100 「規格及び試験方法」とは、試験項目、用いる分析方法及び
101 その方法で試験したときの規格値／適否の判定基準(数値で表
102 した限度値又は範囲若しくはその他の基準)を示したものと
103 して定義される。日局各条の規格及び試験方法は、日局原薬及び
104 製剤がその使用目的にかなっていると判定するために必要な品
105 質特性をセットにして定めたものである。「日局各条規格に適

合する」とは、日局原薬及び製剤について、一般試験法又は医薬品各条に示された各試験方法に従って試験するときに、日局の規定中、性状の項並びに製剤に関する貯法及び有効期間の項を除いた、全ての規格値／適否の判定基準に適合するということである。

ただし、基本的考え方の項で記載したように、原薬及び製剤の各条規格及び試験方法は、その品質及びその恒常性を確保するための方策の一要素である。他の要素としては、開発段階での医薬品の十分な特性解析(規格及び試験方法の多くは、これを基盤とするものである)や製造工程の評価、更にその検証、照査、原料・資材及び製造工程の管理等といった製造・品質管理(すなわちGMPの遵守)が挙げられる。

3. 定期的試験／スキップ試験

定期的試験やスキップ試験は、試験されなかったロットであっても、その製品について設定された全ての判定基準に適合していなければならないことをよく理解した上で、出荷時の特定の試験を、ロットごとではなく、あらかじめ定められたロット数ごと又はあらかじめ定められた期間ごとに行うことである。この概念を適用する場合には、事前に行政当局にその妥当性を示し承認を受ける必要がある。この概念は、例えば、経口固形製剤における残留溶媒の試験及び微生物学的試験に適用できるものであろう。製造販売承認申請時には限られたデータだけしか得られていないこともあるので、この試験の実施は、通常、承認後に検討されるものである。試験を行った場合に、定期的試験を行うに当たって設定された判定基準に適合しないようなことがあれば、どのような不適合であっても、それを適切な形で行政当局に報告する必要がある。これらのデータから、全てのロットに対する試験が必要と判断される場合には、ロットごとの出荷試験を再開すべきである。

4. リアルタイムリリース試験及びパラメトリックリリース

リアルタイムリリース試験とは、工程内データ(工程内試験の結果のほか、工程パラメーターに係るデータを含む)に基づいて、工程内製品や最終製品の品質を評価し、その品質が許容されることを保証する試験である。リアルタイムリリース試験は規格及び試験方法の一種であり、通常あらかじめ評価されている物質(中間製品)特性と工程管理との適切な組み合わせから構成される。リアルタイムリリース試験を当局に申請し、承認された場合には、出荷可否決定を最終製品試験の結果に基づき行う代わりに、リアルタイムリリース試験の結果に基づき行う。

リアルタイムリリース試験の設定により、必ずしも最終製品に対する試験の設定自体が不要になるとは限らない。測定機器の故障により工程内データが取得できなかった場合や安定性を評価する場合など、何らかの理由で最終製品試験の実施が求められることもあることから、出荷可否決定をリアルタイムリリース試験で行う場合であっても、最終製品試験を規格として設定しておく必要がある。また、当該試験を実施した場合にはこれに適合する必要がある。

同様に、リアルタイムリリース試験により製造販売承認された医薬品が局方各条に収載された場合には、リアルタイムリリース試験をその医薬品の出荷可否決定に引き続き用いることができるが、リアルタイムリリース試験が保証する最終製品の品質特性に関して、最終製品に対して設定された規格及び試験方法が局方試験として設定される必要がある。また、各条に規格及び試験方法が収載された医薬品であっても、リアルタイムリ

リース試験を当局に新たに製造販売承認申請(あるいは製造販売承認事項一部変更承認申請)し、承認された場合には、局方試験の代わりにリアルタイムリリース試験の結果に基づき出荷可否決定を行うことができる。なお、局方試験を実施した場合にはこれに適合する必要がある。また、いずれの場合においても、局方試験が設定された場合のリアルタイムリリース試験については、既に対象となるCQAに対する管理基準が示されていることから、改めて各条における製造要件に試験方法及び判定基準を示す必要はない。

リアルタイムリリース試験を出荷可否決定のための試験として採用した場合には、その結果が規格外になる、又は規格外に向かう傾向が認められたからといって、最終製品試験によって安易に代替すべきではない。いかなる場合であれ、リアルタイムリリース試験の結果が規格外又は規格外に向かう傾向が認められた場合には、その原因について適切に究明調査を行い、是正措置を講じる必要がある。また、リアルタイムリリース試験が規格外となった場合は、機器の故障等の分析上の不具合が原因であることが明白となった場合を除き、原則製品出荷はできない。規格外に向かう傾向が認められた場合は、調査結果に基づき、出荷可否を慎重に行うことが必要となる。

パラメトリックリリースはリアルタイムリリースの一つと考えることができ、最終段階で滅菌を行う製剤の出荷可否決定を無菌試験結果に代えて滅菌工程に係る工程内データをもって行うことがその一つの例である。この場合、各ロットの出荷は、製剤製造の最終滅菌段階での特定のパラメーター、例えば、温度、圧力及び時間が満足しうる値を示していることを確認した上で行う。限られた数の最終製品についての無菌試験の結果に基づく出荷可否決定よりも、上述のパラメーターを用いたパラメトリックリリースの方が、製品の無菌性保証の観点から信頼性は高い。なお、パラメトリックリリースの場合も、安定性試験時や収去試験時に必要となるため、最終製品試験の設定が必要となる。パラメトリックリリースに用いる工程内データが許容範囲外となった場合、製品の出荷はできない。リアルタイムリリース試験と異なる点は、例えば最終滅菌工程パラメーターのデータ取得が機器の故障等の分析上の不具合など何らかの理由によりできなかった場合の対応である。すなわち、データ取得の不備はその滅菌工程自体の保証ができていないことを意味することから、最終製品に対する無菌試験による代替は原則適用できないこととなる。

1 品質リスクマネジメントの基本的考え方〈G0-2-170〉

3 はじめに

品質リスクマネジメント(QRM: Quality Risk Management)は医薬品品質システム(PQS: Pharmaceutical Quality System)の重要な構成要素である。PQSは品質に関して企業の指揮及び管理を行うための品質システムであり、品質システムは国際規格ISO 9001, ISO 14001, ISO 27001等の基本概念となっている。PQSは、PDCAサイクル(計画Plan→実行Do→評価Check→改善Act)による業務の維持、継続的改善等をその骨子とするものであり、ICH Q10ガイドラインに基本理念として取り入れられた。QRMは、原薬、製剤、生物薬品(生物起源由来医薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品)を含むあらゆる医薬品の品質確保に適用できるものである。QRMは、製品及び製造工程についての最新の知識及び理解を反映した管理戦略とあいまって、品質に関わるリスクへの柔軟かつ確実な対応を可能とし、一貫した品質の医薬品製造の実現及び維持に資するものである。

医薬品そのものの設計上の品質に関わるリスクは、日本薬局方収載時に評価され、その結果は医薬品各条規格に反映される。しかし、医薬品各条に規定される同じ医薬品であっても、製造方法が異なれば、それに応じて生じる品質に関わるリスクも異なることから、実際の医薬品の開発及び製造においては、そうした製造上の品質に関わるリスクについて適切な評価及び管理が行われていることが必要である。また、医薬品の品質に関わるリスクは、そのライフサイクル、すなわち医薬品の初期開発から、市販を経て製造販売中止に至るまでの過程に応じて、定期的に再評価されるべきであり、その結果に基づき適切な対策を講じることが必要である。

QRMと日本薬局方との関係について付言すれば、医薬品品質を適正に保持するためには、日本薬局方の規格試験の実施に加え、原料・資材の変更、その他、製造・品質管理上の変更において生じる、規格試験のみでは十分に管理できない隠れたリスクを適切にコントロールするための方策を立て、実施することが重要である。リスクの再評価の結果によっては、日本薬局方で規定されている規格試験の改定が必要となる場合も考えられる。

1. QRMの意義

一般に、リスクとは危害の発生する確率とそれが顕在化した場合の重大性の組み合わせであると認識されている。しかし、利害関係者ごとに認識しているリスクの種類と大きさが異なっているかもしれず、多様な利害関係者の間でリスクマネジメントの適用について共通の認識を得ることは困難である。医薬品に関していえば、患者、医療従事者、行政、企業等多様な利害関係者が存在しているものの、QRMを適用することにより患者を保護するということが最優先されるべきである。

医薬品及びその成分の製造や使用には、必然的にある程度のリスクが伴う。品質に関するリスクは、その全体のリスクの一部分である。医薬品の品質を維持するための要素は、臨床試験で使用された時のものと一貫していなければならないというよ

うに、医薬品の品質は、その製品ライフサイクルを通して維持されていなければならない。有効なQRMの取り組みは、開発及び製造中の品質問題を特定し、リスクへの予防的な手段を提供し、結果として患者に対しより高品質な医薬品を提供することにつながる。さらにQRMを実施することで、品質問題が生じた場合の対策の質、意思決定の早さを改善させることができる。また、行政は企業の潜在リスクへの対応能力を確認でき、また、それが規制当局の薬事監視能力に好影響を与えうる。

QRMについては、常に形式に従ったリスクマネジメントプロセスの運用が適切であるとは限らず、また必要というわけでもない。形式にとらわれないリスクマネジメントプロセスも許容される。QRMを適切に使用すれば、規制要件の遵守が容易になるが、製薬企業が遵守すべき規制要件がなくなったり、企業と規制当局間の適切なコミュニケーションに置き換わったりするものではない。

2. 適用範囲

QRMは、原薬、製剤、生物薬品[生物起源由来医薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品(製剤、生物起源由来医薬品及びバイオテクノロジー応用医薬品への原料、溶剤、添加剤、包装及び表示材料の使用を含む)]のライフサイクル全般における、開発、製造、配送、査察及び承認申請/審査のあらゆる側面に適用しうる。

3. QRMの原則

QRMの二つの主要原則は以下のとおりである。

- ・品質に対するリスクの評価は、科学的知見に基づき、かつ最終的に患者保護に帰結されるべきである。
- ・QRMプロセスにおける労力、形式、文書化の程度は当該リスクの程度に相応すべきである。

4. 一般的なQRMのプロセス

QRMとは、医薬品のライフサイクルにわたる品質に関わるリスクのアセスメント、コントロール、コミュニケーション、レビューに対する系統立ったプロセスである。QRMの一つのモデル例を図1に示す。図中の枠内の各要素のうち、強調すべきものは事例によって異なるかもしれないが、頑健なプロセスでは、これら全ての要素が特定のリスクの程度に適切に対応したレベルで組み込まれると考えられる。プロセスのどの時点でも意思決定が必要になる可能性があるため、図中には意思決定ノードが示されていない。これらの意思決定は、その決定を裏付ける情報に基づき、前のステップに戻り、更なる情報を求めたり、リスクモデルを変更したり、さらにはリスクマネジメントプロセスを終結する場合もある。

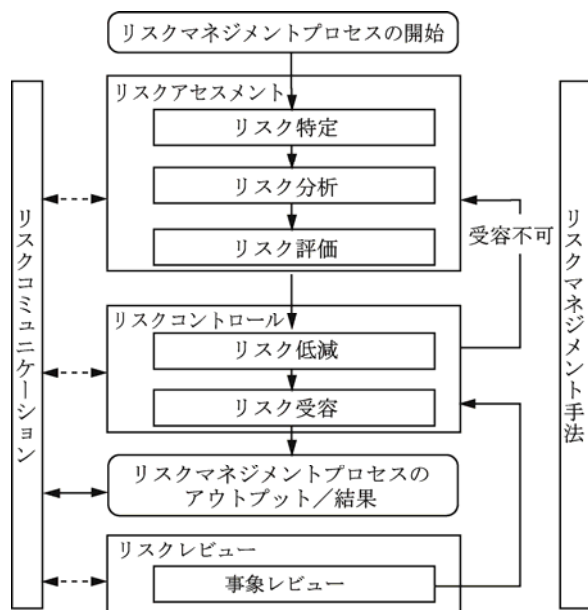


図1 QRMの概要

4.1. QRMのプロセスの開始

QRMは、リスクに関する科学に基づいた決定を調整、促進、改善するように設計された体系的なプロセスを含むべきである。QRMプロセスを開始、計画するために用いられるステップには、以下が考えられる。

- ・課題及びリスクの可能性を特定する適切な仮定も含むリスクに関する質問を定義すること。
- ・当該リスクアセスメントに関連する潜在的なハザード(危害の潜在的な原因)、危害又は健康への影響に関する背景情報及びデータを集約すること。
- ・リーダーと必要な資源を明確にすること。
- ・リスクマネジメントプロセスの実実施計画、成果物及び意思決定の適切な水準を明確にすること。

上記において責任者(意思決定者)は、組織内の様々な機能及び部門にわたるQRMを調整する義務を負う。また、QRMプロセスの定義づけ、適切な経営資源の投入、QRMプロセスのレビューなどを確実に実施する責務を負う。

4.2. リスクアセスメント

リスクアセスメントはハザードの特定及びこれらハザードへの曝露に伴うリスクの分析及び評価から構成される。ステップには、「リスク特定」、「リスク分析」、「リスク評価」が含まれる。

リスクアセスメントの目的に対してリスクを明確に定義する一助として、以下の三つの基本的な質問が役立つ場合が多い。

1. 何がうまくいかないかもしれないのか。
2. うまくいかない可能性はどれくらいか。
3. うまくいかなかった場合、どんな結果(重大性)となるのか。

「リスク特定」とは、リスクに関する質問又は問題点の記述を参照しながらハザードを特定するために体系的に情報を利用することである。情報には過去のデータ、論理的分析、寄せられた意見、利害関係者の懸念等が含まれうる。リスクの特定とは、起こりうる結果の特定を含めて「何がうまくいかないかもしれないのか」という質問を取り扱うことである。これが、

QRMプロセスの次のステップの基礎となる。

「リスク分析」とは、特定されたハザードに関連するリスクの推定である。それは、危害が生じる確率とその重大性を定性的又は定量的に結びつけるプロセスである。一部のリスクマネジメント手法においては、危害を検出する能力(検出性)もリスク推定の因子に含まれる。

「リスク評価」では、特定、分析されたリスクを所定のリスク基準に従って比較する。リスク評価では、前述の三つの基本的な質問全てに対する証拠の確実さを考慮する。

リスクアセスメントの結果は、リスクの定量的な算定か、リスク範囲の定性的な表現のどちらか一方である。リスクを定量的に表現する場合、発生の可能性は数値により表される。一方、リスクは「高」「中」「低」等の定性的な記号を使って表現することもできるが、それらの記号はできるだけ詳細に定義されるべきである。時として、リスクランキングにおいて、更に明確に記述するために「リスクスコア」が用いられる。定量的なリスクアセスメントにおいては、リスク算定は、一定のリスク発生環境における特定の(危害の)事象の起こりやすさを示す。このように定量的なリスク算定では、一時に一つの特定の事象を算定するのに有用である。一方、リスクマネジメントの手法によっては、相対リスクの測定手段を用いて多様なレベルの重大性と確率を組み合わせ、相対リスクの総合的な推定を行うこともある。リスクスコアプロセスの中間段階では、定量的なリスク算定が採用されることもある。

4.3. リスクコントロール

「リスクコントロール」には、リスクを低減及び受容するための意思決定が含まれる。リスクコントロールの目的はリスクを受容できるレベルまで減らすことである。リスクコントロールのための労力は当該リスクの重大性に比例すべきである。意思決定者は、リスクコントロールの最適なレベルを知るために費用便益分析等、異なる方法を使用することがある。

リスクコントロールは以下のような質問に焦点を合わせる必要がある。

- ・リスクは受容レベルを超えているか。
- ・リスクを低減、除去するために何ができるか。
- ・利益、リスク、資源の間のバランスをどの程度にするのが良いか。
- ・特定のリスクを制御した結果、新たなリスクが発生しないか。

「リスク低減」では、品質に関わるリスクが規定した(受容可能な)レベルを超えた場合(図1参照)の、そのリスクを低減又は回避するプロセスに着目する。リスク低減は、危害の重大性や発生の確率を軽減するための行為を含むことがある。リスクコントロール方策の一部としてハザードや品質に関わるリスクの検出性を改善するプロセスが用いられる場合もある。リスク低減方策の実施により、新たなリスクがシステムの中に生じたり、既存の他のリスクの重大性が増加したりする場合がある。そのため、リスク低減のプロセスを実行した後は、可能性のあるリスクの変化を特定及び評価するためにリスクアセスメントに戻ることが妥当である場合がある。

「リスク受容」とはリスクを受容する意思決定である。リスク受容は、残留リスクを受容するための形式に従った意思決定、又は残留リスクが明確になっていない場合には受動的な意思決定となる可能性がある。ある種の危害に対しては、最良のQRM

183 を実践しても、完全にはリスクを取り除くことはできないかも
184 しない。このような状況下では、適切なQRM方策が適用さ
185 れており、品質に関わるリスクは規定された(受容可能な)レ
186 ヴルまで低減されているということで合意に達するかもしれない。
187 この(規定した)受容可能なレベルは多くの要因に依存しており、
188 個別に決定されるべきである。

189 4.4. リスクコミュニケーション

190 「リスクコミュニケーション」とは、リスクとそのマネジメ
191 ントに関しての情報を、意思決定者とそれ以外の人との間で共
192 有することである。関係者はリスクマネジメントプロセスのど
193 の段階においても情報共有ができる(図1、破線矢印参照)。リ
194 スクマネジメントプロセスのアウトプット／結果は適切に伝達
195 され、かつ文書化されるべきである(図1、実線矢印参照)。コ
196 ミュニケーションには、規制当局と企業間、企業と患者間、企
197 業内、業界内、規制当局内等、様々な利害関係者間でのコミュ
198 ニケーションが含まれることがある。情報の内容は、品質に対
199 するリスクの有無、本質、形態、発生の確率、重大性、受容可
200 能性、管理、対応、検出性、その他の側面等に関するかもしれ
201 ない。コミュニケーションは、個別にかつ全てのリスク受容に
202 対して実施される必要はない。企業と規制当局間において、
203 QRMの意思決定に関するコミュニケーションは、法規制やガ
204 イダンスに規定されているような既存の方法を用いて実行され
205 ることがある。

206 4.5. リスクレビュー

207 リスクマネジメントは、品質マネジメントプロセスの継続的
208 な一部であるべきであり、事象のレビューや監視のための仕組
209 みを働かせるべきである。

210 リスクマネジメントプロセスのアウトプット／結果は、新し
211 い知見や経験に基づいて見直すべきである。一度、QRMを開
212 始した後は、もともとのQRMの決定を左右する恐れのある事
213 象に対しては、そのリスクマネジメントプロセスを継続して活
214 用すべきである。なお、これら事象には計画されたもの(製品
215 レビュー、査察、監査、変更管理の結果等)も計画されていな
216 いもの(不良調査や回収で判明した根本原因等)も含まれる。見
217 直す頻度はリスクの程度に応じるべきである。リスクレビュー
218 は、リスク受容決定の再検討を含む場合もある(4.3.参照)。

219 5. まとめ

220 QRMの厳密さや形式の程度は、利用できる知識の量を反映
221 すべきであり、また対応する問題の複雑さ及び重大性に比例す
222 べきである。

223 QRMは、それが品質システムに統合されると、科学的根拠
224 に基づく現実的な意思決定を支援するプロセスとなる。ただし、
225 適切にQRMを使用したとしても、企業が遵守すべき規制要件
226 が免除されるわけではない。

227 6. QRMに関する用語

228 意思決定者：適切かつタイムリーな品質リスクマネジメントに
229 関する決定を行う能力及び権限を有する人又は人々。

230 危害：健康への被害。製品品質の不良又は安定供給の欠如によ
231 る被害を含む。

232 検出性：ハザードの存在、出現、事実を発見又は決定する能力。

233 重大性：ハザードから生じうる結果の大きさ。

234 ハザード：危害の潜在的な原因(ISO/IEC Guide 51)。

235 製品ライフサイクル：初期開発から市販を経て製造販売中止に
236 至るまでの製品寿命の全過程。

237 品質：製品、システム又は工程に関わる本質的性質の組合せが
238 要求事項を満たす程度。医薬品原薬あるいは製剤の場合は、意
239 図した用途への適切さのこと。同一性、含量、物質の純度のよ
240 うな特性を指すこともある。

241 品質システム：品質方針を実行し、品質目標への適合を保証す
242 るシステムに関わるあらゆる側面の総和。

243 品質リスクマネジメント(QRM)：製品ライフサイクルを通じ
244 て、医薬品の品質に関わるリスクについてのアセスメント、コ
245 ントロール、コミュニケーション、レビューからなる系統立っ
246 たプロセス。

247 要求事項：患者やその代弁者(医療従事者、規制当局、国会議
248 員等)により明確化された又は暗黙のニーズ又は期待。本参考
249 情報においての要求事項とは、法令上、立法上、若しくは規制
250 上の要求事項のみならず、上記のようなニーズ及び期待を含む
251 もとする。

252 利害関係者：リスクに影響を与え、リスクの影響を受け、又は
253 リスクの影響を受けると認識する個人、グループ又は組織。意
254 思決定者もまた利害関係者である場合がある。本参考情報の目
255 的においては、主要な利害関係者とは、患者、医療従事者、規
256 制当局、企業を指す。

257 リスク：危害の発生の確率とそれが発生したときの重大性の組
258 合せ(ISO/IEC Guide 51)。

259 リスクアセスメント：リスクマネジメントプロセスの中で、リ
260 スクに関わる決定を支持する情報を整理する系統立ったプロセ
261 ス。ハザードの特定、及びそれらハザードへの曝露に伴うリス
262 クの分析と評価からなる。

263 リスクコミュニケーション：リスク及びリスクマネジメントの
264 情報を意思決定者及び他の利害関係者の間で共有すること。

265 リスクコントロール：リスクマネジメントの意思決定を実施す
266 る行動(ISO Guide 73)。

267 リスク受容：リスクを受容する意思決定(ISO Guide 73)。

268 リスク低減：危害の発生の確率及びその危害の重大性を低減す
269 るための行動。

270 リスク特定：リスクへの質問又は問題の記述を参照して、危害
271 の潜在的な原因(ハザード)を特定するための情報を系統立てて
272 使用すること。

273 リスク評価：リスクの重大性を決めるため、定量的又は定性的
274 な尺度を使い、推定されたリスクを一定のリスク基準と比較す
275 ること。

276 リスク分析：特定されたハザードに関連するリスクの推定。

277 リスクマネジメント：リスクのアセスメント、コントロール、
278 コミュニケーション、レビューの各作業に対し、品質マネジメ
279 ントの方針、手順、実施を系統立てて適用すること。

280 リスクレビュー：リスクに関わる新しい知見や経験を(適切なら
281 ば)考慮して、リスクマネジメントプロセスのアウトプット
282 /結果を見直し、監視すること。

283

1 化学合成される医薬品原薬及びその製剤の不純物に関する考え方〈G0-3-181〉

1. 化学合成医薬品中に含まれる不純物の種類とその管理に際して準拠すべきガイドライン

化学合成医薬品中に存在する不純物は、有機不純物、無機不純物及び残留溶媒に大別される。新有効成分含有医薬品では、以下に示す医薬品規制調和国際会議(以下「ICH」という)で合意されたガイドラインに基づきこれらの不純物は管理されている。すなわち、有機不純物については、原薬は平成9年4月1日以降の製造承認申請から、また、製剤は平成11年4月1日以降の製造承認申請から、それぞれ「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドラインについて(平成7年9月25日薬審第877号)」(以下「ICH Q3Aガイドライン」という)¹⁾並びに「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドラインについて(平成9年6月23日薬審第539号)」(以下「ICH Q3Bガイドライン」という)²⁾に基づいて規格が設定されている。一方、無機不純物については、日局の基準値や既知の安全性データに基づいて設定されていたところであるが、平成29年4月1日以降の製造販売承認申請から「医薬品の元素不純物ガイドラインについて(平成27年9月30日薬食審査発0930第4号)」(以下「ICH Q3Dガイドライン」という)が、残留溶媒については、平成12年4月1日以降の製造承認申請から「医薬品の残留溶媒ガイドラインについて(平成10年3月30日医薬審第307号)」(以下「ICH Q3Cガイドライン」という)が適用されている。不純物の中でもDNA反応性不純物については、主として平成28年1月15日以降の製造承認申請から「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性(変異原性)不純物の評価及び管理ガイドラインについて(平成27年11月10日薬生審査発1110第3号)」が適用されている。また、有機不純物の一種である光学対掌体については、ICH Q3Aガイドラインは対象外としているものの、その後公表された「新医薬品の規格及び試験方法の設定について(平成13年5月1日医薬審発第568号)」(以下「ICH Q6Aガイドライン」という)では管理すべき不純物として規定され、測定可能な場合にはICH Q3Aガイドラインの原則に従い、管理されるべきであるとされた。

品質確保の観点から新有効成分含有医薬品以外の医薬品においても上記ガイドラインに準じた不純物の管理が求められているところであり、製造販売承認申請(あるいは製造販売承認事項一部変更承認申請)がなされる場合に適宜これらのガイドラインが適用される。残留溶媒は日局17の通則で、全ての日局収載医薬品が医薬品各条において規定する場合を除き、原則として一般試験法の残留溶媒に係る規定に従って管理されなければならないことが明記され、管理されることとなった。また、元素不純物に関しては日局への取込みとして試験法と管理方法の収載を段階的に進めてきた。日局18では、通則34の項においてICH Q3Dガイドラインに基づく元素不純物に係る規定を設け、併せて一般試験法「元素不純物試験法(2.66)」と参考情報「製剤中の元素不純物の管理」を統合すると共にICH Q3Dガイドラインの改正を反映した一般試験法「元素不純物(2.66)」を収載した。

2. 有機不純物の管理に関するICH Q3A及びQ3Bガイドラインの考え方

ICH Q3A及びQ3Bガイドラインは、新薬の開発段階において得られる情報を基に有機不純物の規格値を設定することを求めている。ICH Q3Aガイドラインでは、原薬中の不純物について、化学的観点並びに安全性の観点から検討対象とすべき事項に言及している。ICH Q3BガイドラインはQ3Aガイドラインを補完するものであり、基本的考え方は同一である。化学的観点の事項としては、不純物の分類と構造決定と報告の方法、規格の設定及び分析法の検討が含まれ、安全性の観点の事項としては、安全性試験及び臨床試験に用いられた原薬のロット中に全く存在しなかったか、あるいはかなり低いレベルでしか存在しなかった不純物の安全性を確認するための指針が含まれている。

安全性の確認とは、規格に設定された限度値のレベルでの個々の不純物又は不純物全体の安全性を立証するために必要なデータを集めて評価する作業のことである。不純物の判定基準の妥当性に関する安全性の側面からの考察を製造販売承認申請時の添付資料に記載することとする。既に安全性試験や臨床試験で十分安全であることが確かめられている新原薬中に存在しているすべての不純物については、試験に用いられた試料中に存在するレベルまでは安全性が確認されたものと通常考えることができる。

ガイドラインに従い得られたデータに基づき、個別規格設定不純物、個別規格が設定されない不純物及び不純物総量が設定される。原薬の場合、個別規格を設定しない不純物の閾値は、1日当たりの原薬の摂取量に依存して定められており、最大1日投与量が2 g以下の場合0.10%と規定されており、0.10%を超える不純物は個別規格を設定する必要がある。

また、製剤に関しては、ICH Q3Bガイドラインでは、原薬の分解生成物又は原薬と添加剤若しくは一次包装との反応による生成物を対象としている。したがって、原薬中の分解生成物以外の有機不純物(副生成物や合成中間体など)は、製剤中の不純物として認められたとしても既に原薬の規格として管理されていることから、個別規格を設定する必要はないが、製剤中で増加する分解生成物は規格を設定する必要がある。

3. 日局収載品目における有機不純物の管理の原則

従前より、日局においては、ICH Q3A及びQ3Bガイドラインに従って不純物を管理していた医薬品については日局収載時にICH Q3A及びQ3Bガイドラインに従って、個別規格設定不純物、個別規格が設定されない不純物及び不純物総量が設定されている(なお、収載時期が古くこれらガイドラインが適用される前に収載された医薬品についてはこの限りでない。ただし、これらの日局収載医薬品であっても、新たに製造販売承認申請などがなされる場合には、必要に応じてICH Q3A及びQ3Bガイドラインに準じた不純物の管理が求められる場合がある)。設定に際しては、原案作成会社から提出される開発時の分析データに加え、製造が安定した後の商業生産時のロットの不純物の分析データが評価の対象となる。安全性の評価は、承認時に実施されていることから、日局収載時に改めて実施されることはない。

ICH Q3A及びQ3Bガイドラインでは、化学的合成法で製造される原薬及びこの原薬を用いて製造される製剤中の不純物を対象としており、日局においても同様に、生物薬品(バイオテ

クノロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品)、ペプチド、オリゴヌクレオチド、放射性医薬品、醗酵生成物、醗酵生成物を原料とした半合成医薬品、生薬及び動植物由来の医薬品は対象としない。

ICH Q3A及びQ3Bガイドラインの原則に従って評価された有機不純物を日局純度試験として収載する際に、日局の運用上の合理性を考慮し、独自の修正がなされている。①例外的な場合を除き不純物標準品は設定されず、不純物を液体クロマトグラフィーで同定する場合には、原薬に対する不純物の相対保持時間により行われる。②高純度の医薬品で特定されない不純物(0.1%以下)のみが設定されている場合、不純物総量の設定は通例免除される。③規格値を実測値ベースのみで設定すると、多数の不純物が少しずつ異なる規格値を有することになる場合は、代表的な少数の規格値から構成されるように考慮する。④不純物の化学構造情報や化学名は開示しない。これらの措置により、不純物標準品を使用することなく不純物の管理が可能であり、高純度の医薬品に関しては、システム適合性試験を簡略化することを可能としている。

一方、相対保持時間を利用して不純物を同定する方法は、カラム依存的であり、適切なカラムが入手できないと分析が困難になることから、日局17では、原薬の純度試験の設定に際して、不純物標準品を用いる分析方法も並行して認めることとした。さらに、原則として光学対掌体を含め、不純物の情報として化学名及び構造式を日局においても開示する方針とされた。

なお、ICH Q3Aガイドラインでも言及されているように、不純物の構造決定は不完全な場合も存在する。そのため、各条中のその他の項で開示する化学構造は、NMRなどにより確定されている構造の他、合成経路などから推定される化学的に妥当な構造を含めて示している。その際、立体化学が確定していない場合には、当該部分の構造は波線を用いて表記し、当該炭素に結合している水素は記載せず(構造を示すうえで必須である場合を除く)、化学名には*R*体と*S*体、*E*体と*Z*体の別を記載しないこととする。

製剤の有機不純物に対する純度試験に関しても日局に収載される際に独自の配慮がなされる場合がある。日局においても、製剤中の不純物として、原薬と添加剤若しくは一次包装との反応による生成物に由来する不純物が規定される。これら不純物は、処方依存性であり、異なる処方では、生成してこない場合もある。多様な処方を許容する公定書である日局においては、一律に各条において規定することが適当でない場合には、「別に規定する」として承認の際の規定に委ねられる場合がある。

新たに日局各条に医薬品を収載する際に不純物の規格を見直す場合には、以下の考え方に従って不純物の規格値が再検討される場合がある。すなわち、ICH Q6Aガイドラインは、製造販売承認申請時に得られているデータには限りがあり、それが判定基準を設定するのに影響を及ぼし得ることを考慮する必要があることを指摘している。不純物に関しても、製造段階では、開発段階で得られた不純物のプロファイルと異なる不純物プロファイルが得られることがあり、製造段階における不純物プロファイルの変化については、必要に応じて考慮されるべきであるとされている。この考えに従い、日局収載時に規格設定の対象となる不純物については、開発段階で得られる情報のほか、製造段階における不純物プロファイルの変化がある場合にはその情報、更に製品製造が安定生産に至った後の段階(以下「安

定製造段階」という)での情報も考慮される。

しかしながら、安定製造段階で十分に低いレベルとなった、若しくは検出されなくなった不純物について、個別規格設定の候補化合物リストからむやみに外すことは望ましくない。日局収載医薬品については、医薬品各条の規格に適合することで医薬品として認められることになるが、原案作成会社の原薬とは製造方法が同一ではない後発医薬品等の場合、不純物のプロファイルが異なり、それらの不純物を含有することも想定されるからである。日局収載時に開発段階で検出された結果に基づき情報を提供することは、日局医薬品として流通する原薬及び製剤に含まれる不純物を網羅することにつながる可能性がある。したがって、安定製造段階で十分に低いレベルとなった、若しくは検出されなくなった不純物について、日局の個別規格設定リストから外す際には、ICH Q3A及びQ3Bガイドラインの考え方にに基づき安全性の観点から十分に設定の必要性が検討される。

また、不純物標準物質を用いて不純物を特定する方法で承認された原薬については、日局各条においても、原則として、特定された不純物が同定可能となるように適切に規格及び試験方法を設定することが望ましい。なお、製造時における不純物の管理に関しては、出荷試験、工程内試験及び工程パラメーターの管理を含め適切な管理戦略を設定し、不純物を管理することが可能である。

4. 参考資料

- 1) ICH: Guideline for Q3A, Impurities in New Drug Substances.
- 2) ICH: Guideline for Q3B, Impurities in New Drug Products.

1 医薬品の安定性試験の実施方法〈G0-4-171〉

1. 序論

医薬品が製造されてから患者に投与されるまでの間、その品質が保持されていることが不可欠であり、品質が保持されていることを保証するために安定性試験を行う。安定性試験を実施することで、温度、湿度、光等の様々な環境要因の影響の下での医薬品の品質の経時的変化を評価し、その結果に基づき、原薬のリテスト期間、製剤の有効期間及び医薬品の保存条件の設定に必要な情報を得る。

原薬のリテスト期間とは、原薬が定められた条件の下で保存された場合に、その品質が規格内に保持されていると想定される期間であり、当該原薬が製剤の製造に使用できる期間をいう。この期間を超えて保存された原薬のロットを製剤の製造に使用する場合は、規格への適合性を確認し、速やかに使用する。原薬のロットは複数回再確認することができる。ただし、不安定であることが知られている抗生物質等の原薬については、リテスト期間より有効期間を設定するほうが適切である。また、製剤の有効期間とは、製剤が定められた条件下で保存されたときに、規格を満たしていることが想定される期間をいう。

本参考情報は、主として化学薬品の原薬及び製剤の安定性試験を行う際に設定可能な標準の実施方法を示すものであるが、化学薬品以外の医薬品の安定性試験においても参考にすることができる。なお、試験対象となる物質の特性や、特殊な科学的理由のために実際に直面しうる状況に対しては、柔軟に対応する必要がある。科学的に妥当な理由がある場合には、本参考情報以外の適切な方法を用いて評価することもできる。

2. 試験条件

医薬品の安定性試験として苛酷試験、長期保存試験、加速試験及び必要があれば中間的試験を行う。

2.1. 苛酷試験

原薬の苛酷試験は、生成の可能性がある分解生成物を同定し、分解経路や医薬品本来の安定性を明らかにするために行う。また、安定性試験に用いる分析方法の開発及びその妥当性を評価するのにも役立つ。苛酷試験は、加速試験の保存温度条件よりも10℃ずつ高くなっていく温度条件(例えば、50℃、60℃、...)、又は、適切な湿度条件(例えば、75%RH以上)で実施する。同時に、酸化及び光分解による影響についても検討する。溶液又は懸濁液中では、広い範囲のpH領域における加水分解に対する反応性を検討する。

製剤の苛酷試験は、苛酷条件の影響を評価するために行う。光安定性試験や特定の製剤(例えば、定量吸入式製剤、クリーム剤、乳剤、冷蔵保存の液剤など)については、特殊試験を行う。

2.2. 長期保存試験、加速試験及び中間的試験

長期保存試験は、原薬のリテスト期間及び製剤の有効期間を設定するために、定められた保存条件下で行う試験である。

加速試験は原薬及び製剤の化学的変化又は物理的変化を促進する保存条件を用いて行う試験である。加速試験の成績は、長期保存試験成績と共に、定められた保存方法で長期間保存した場合の化学的影響を評価するのに利用できる。同時に輸送中に

起こり得る保存方法からの短期的な逸脱の影響の評価にも利用できる。

中間的試験は、25℃において長期間保存する原薬や製剤について、化学的分解や物理的変化を緩やかに加速するように計画された試験であり、30℃/65%RHの条件下で行う。中間的試験は、加速試験において「明確な品質の変化」が認められた場合に追加で実施される。

長期保存試験及び加速試験並びに必要なに応じて中間的試験は、3ロット以上の基準ロットについて実施する。原薬の基準ロットは最終的な製造方法及び製造工程を反映して製造されたロットで、その品質は実生産で製造されるものの品質を反映する必要がある。生産スケールロット又はパイロットスケールロット以上でなくてはならない。市販するものと同一の包装又はそれに準じて包装したのに対して試験する。製剤の基準ロットは、市販予定製剤と同一処方、同一の包装(必要ならば二次包装及び容器ラベルを含める)とする。製造工程は実生産で適用される方法を反映するものとし、市販予定製剤と同等な品質で、かつ同じ品質規格を満たすものとなるようにする。3ロットのうちの2ロットはパイロットスケール以上とし、他の1ロットは、正当化できれば小規模でも差し支えない。もちろん、基準ロットは、生産スケールロットでもよい。可能ならば、製剤の各ロットは、異なる原薬ロットを使用して製造する。ここで、パイロットスケールロットとは実生産に適用される製造方法、製造工程を十分に反映して製造されたものであり、経口製剤においては、通常、少なくとも実生産スケールの10分の1又は10万錠(カプセル)のいずれか大きい方をパイロットスケールとする。

表1に試験に用いられる保存条件を記す。

表1 異なる保存条件及び包装の医薬品の安定性試験における保存条件

保存条件及び包装	長期保存試験	加速試験	中間的試験
一般的な原薬及び製剤	25±2℃/60±5% RH 又は 30±2℃/65±5% RH ¹⁾	40±2℃/75±5% RH	30±2℃/65±5% RH ²⁾
冷蔵庫で保存する原薬及び製剤 ³⁾	5±3℃	25±2℃/60±5% RH	—
冷凍庫で保存する原薬及び製剤 ⁴⁾	−20±5℃	—	—
−20℃以下で保存される原薬及び製剤	個別に妥当な保存条件の下で試験を実施する		
水分及び溶媒が透過しない不透水性の容器に入れられた製剤	相対湿度を調整する必要はない		
半透過性の容器に包装された製剤 ⁵⁾	25±2℃/40±5% RH 又は 30±2℃/35±5% RH ⁶⁾	40±2℃/25% RH 以下	30±2℃/65±5% RH ⁷⁾

¹⁾ 試験者は、長期保存試験として25±2℃/60±5%RH又は30±2℃/65±5%RHのどちらの条件で行うかを決定する。

²⁾ 加速試験において「明確な品質の変化」が認められた場合、中間的な条件で追加の試験を実施する。ただし、30±2℃/65±5%RHが長期保存条件の場合は、中間的条件はない。ここで、原薬についての「明確な品質の変化」とは、規格からの逸脱が認められた場合をいう。製剤についての「明確な品質の変化」とは、次に掲げる場合である。

- 試験開始時から含量が5%以上変化した場合、生物学的又は免疫学的方法を用いるときは、力価が判定基準から逸脱した場合
- 特定の分解生成物が判定基準を超えた場合

88 3. 外観、物理的項目及び機能性試験が判定基準から逸脱した場合(例えば、色、
89 相分離、再懸濁性、ケーキング、硬度、1回当たりの投与量)、しかし、加速試験
90 条件下では、物理的特性の変化(例えば、坐剤の軟化、クリーム の融解)が予想さ
91 れることもある。
92 さらに、剤形により必要に応じて
93 4. pHが判定基準を逸脱した場合
94 5. 溶出試験(12投与単位)で判定基準を逸脱した場合
95 6. 以下に示すような物理的な変化は、加速条件において認められることがあるが、
96 他の項目に「明確な品質の変化」がない場合には、これらは中間的試験が要求さ
97 れる「明確な品質の変化」とはみなされない。
98 ・融点 が明確に示されている場合に、37℃で溶けるよう設計された坐剤の軟化
99 ・「明確な品質の変化」の原因が架橋によることが明らかである場合に、ゼラチ
100 ンカプセル又はゲルコーティング錠の12個に対して溶出が判定基準を満たさな
101 いこと。
102 さらに、他の項目に「明確な品質の変化」がないことを確認する際には、他の項
103 目がこれらの物理的な変化の影響を受ける可能性についても考慮しなければなら
104 ない。
105 ③ 半透過性容器に包装された製剤の場合、水分損失の程度を評価できる適切な情報
106 を提出する。冷蔵庫で保存する原薬及び製剤の加速試験において、測定開始後3
107 箇月以内に「明確な品質の変化」が認められた場合、あえて6箇月まで試験を継
108 続する必要はない。
109 ④ 輸送中や保管中等における保存方法からの短期的な逸脱の影響を説明するため、
110 上昇させた温度(例えば、5±3℃又は25±2℃)で適切な期間にわたる試験を実施
111 する。
112 ⑤ 半透過性容器に包装された、水を基剤又は溶剤とした製剤の場合、水分損失の程
113 度を評価できるように低湿度の条件で試験を行う。非水性溶剤を基剤又は溶剤と
114 した製剤については、水を基剤又は溶剤とした製剤と同様の方法を開発し、試験
115 を実施する。
116 ⑥ 試験者は、長期保存試験として25±2℃/40±5%RH又は30±2℃/35±5%RH
117 のどちらの条件で行うかを決定する。
118 ⑦ 加速試験において、6箇月の試験で水分損失以外に、「明確な品質の変化」が認
119 められた場合、中間的な条件で追加の試験を実施する。水分の損失のみに「明確
120 な品質の変化」が認められる場合は、中間的な条件における試験は必要とされな
121 いが、製剤を25℃で40%の参照相対湿度条件下で保存した場合に、有効期間を通
122 じて水分の損失に係る「明確な品質の変化」を認めないことを示さなければなら
123 ない。ただし、30±2℃/35±5%RHが長期保存条件の場合は、中間的な条件はな
124 い。ここで、半透過性の容器に容れられた製剤についての水分の損失に係る「明
125 確な品質の変化」とは、40℃/25%RH以下、3箇月間に相当する保存の後に、
126 5%の水分の損失が認められた場合である。しかし、小容器(1 mL以下)又は、単
127 回投与製剤については、根拠があれば、40℃/25%RH以下、3箇月間に相当す
128 る保存の後に、5%以上の水分損失があっても許容されることがある。

129 3. 測定項目及び測定時期

130 安定性試験の測定項目として、保存により影響を受けやすい
131 測定項目及び品質、安全性又は有効性に影響を与えるような測
132 定項目を選定する。測定方法としては、安定性試験に用いる方
133 法として適合性が検証された分析方法を採用する。測定の繰り
134 返しの必要性及び回数は、バリデーション試験の結果に基づき
135 決定する。

136 長期保存試験における測定時期は、原薬及び製剤の安定性の
137 特性を十分に把握できるように、1年以上のリテスト期間を設
138 定する原薬及び1年以上の有効期間を設定する製剤については、
139 通常、1年目は3箇月ごと、2年目は6箇月ごと、その後はリテ
140 スト期間及び有効期間を通して1年ごととする。また、加速試
141 験にあっては試験開始時と終了時を含めて、6箇月の試験につ
142 き3回以上(例えば、0、3、6箇月)行うことが望ましい。加速試
143 験において品質の明確な変化が示されたために、中間的な条件
144 での試験が必要になった場合には、試験開始時と終了時を含め
145 て、12箇月の試験につき4回以上(例えば、0、6、9、12箇月)
146 行うことが望ましい。

147 複数の試験要因(例えば、含量、容器サイズないし容れ目等)
148 の組合わせを持つ製剤について安定性試験を行うとき、妥当で
149 あれば、測定時点の一部について測定を省略する、又は要因の
150 組合わせの一部について測定を省略する減数試験(マトリキシ
151 ング法やブラケットティング法)を適用できる。ブラケットティ
152 グ法は中間的な水準にある検体の安定性は試験された両極端の
153 安定性により示されるとの仮定に基づいている。全測定時点に

154 おいて、例えば、含量、容器サイズないし容れ目等の試験要因
155 について、両極端の検体についてのみ測定する安定性試験の手
156 法である。ブラケットティング法は、製剤の処方が同一か、又は
157 極めて類似している含量違いの場合に適用することができる。
158 例えば、(1)異なるサイズのカプセルに同一の混合末を充填し
159 て製造した含量違いのカプセル剤、(2)同一の顆粒で量を変え
160 て製造した含量違いの錠剤、(3)着色剤や香料といったような
161 マイナーな添加剤の処方のみが異なる含量違いの経口液剤など
162 である。また、ブラケットティング法は、他の条件が一定で容器
163 サイズ又は容れ目だけが異なる同じ包装に適用することができ
164 る。ブラケットティング法は、試験するために選択された含量、容
165 器サイズないし容れ目が、安定性の面からみた実質的な両極端
166 であることが示されなければ適用することはできない。表2に
167 ブラケットティング法の試験計画例を示す。試験計画例は説明の
168 ために示したものであり、全てのケースにおいてこの手法が唯
169 一の試験計画、又は最も適切な試験計画と考えるべきではない。
170 マトリキシング法は、ある測定時点における全検体の安定性
171 は各部分集合の安定性により代表されているという仮定に基づ
172 いている。ある特定の測定時点で全ての要因の組合わせの全検
173 体のうち選択された部分集合を測定し、連続する二つの測定時
174 点では、全ての要因の組合わせのうちの異なる部分集合を測定
175 する安定性試験の手法である。マトリキシング法は、同一又は
176 極めて類似した製剤処方間での含量違いの評価に適用すること
177 ができる。例えば、(1)異なるサイズのカプセルに同一の混合
178 末を充填して製造した含量違いのカプセル剤、(2)同一の顆粒
179 で量を変えて製造した含量違いの錠剤、(3)着色剤や香料とい
180 ったようなマイナーな添加剤の処方のみが異なる含量違いの
181 経口液剤などである。適用できる他の例として、同一の製法と
182 設備で製造されたロット間、同一の包装のサイズないし容れ目
183 違いなどがある。表3にマトリキシング法の試験計画例を示す。
184 試験計画例は説明のために示したものであり、全てのケースに
185 おいてこの手法が唯一の試験計画、又は最も適切な試験計画と
186 考えるべきではない。

187 表2 ブラケットティング法の試験計画例

含 量		50 mg			75 mg			100 mg		
ロット		1	2	3	1	2	3	1	2	3
容器 サイズ	15 mL ビン	T	T	T				T	T	T
	100 mL ビン									
	500 mL ビン	T	T	T				T	T	T

188 T: 測定サンプル

表3 含量の異なる2種の製剤に適用する試験計画の例
「測定時点を一／2省略したマトリキシング法」

測定時点(月)		0	3	6	9	12	18	24	36
含量	S1	ロット1	T	T		T	T		T
		ロット2	T	T		T	T		T
		ロット3	T		T		T		T
	S2	ロット1	T		T		T		T
		ロット2	T	T		T	T		T
		ロット3	T		T		T		T

T: 測定サンプル

189 4. 光安定性試験

190 光安定性試験は原薬又は製剤が本来有する光に対する特性を
191 評価するために行う苛酷試験である。

192 4.1. 光源

193 光安定性試験に用いる光源は、次に示す二つのオプションの

194 光源のいずれかを用いることができる。

195 (i) オプション1 D_{65} 又は ID_{65} の放射基準に類似の出力を示
196 すように設計された光源。例えば、可視光と紫外放射の両方の
197 出力を示す昼光色蛍光ランプ、キセノンランプ、ハロゲンラン
198 プなどがある。

199 (ii) オプション2 このオプションを採用する場合には、次
200 の白色蛍光ランプと近紫外蛍光ランプによる照射を同一の試料
201 を用いて行わなければならない。

202 ①ISO10977 (1993)に類似の出力を示す白色蛍光ランプ

203 ②320 ～ 400 nmにスペクトル分布をもち、350 ～ 370 nm
204 に放射エネルギーの極大を示す近紫外蛍光ランプ。320 ～
205 360 nm及び360 ～ 400 nmの波長域のそれぞれに有意な
206 量の放射エネルギーを示すものであること。

207 4.2. 曝光量及び曝光条件

208 原薬の光安定性試験は、強制分解試験と光安定性を確認する
209 ための試験(以下「確認試験」という。)の二つからなる。強制
210 分解試験は、分析法を開発したり、分解経路を解明するために
211 その物質の全般的な光感受性を評価するために行う。分析法の
212 バリデーションのためには、原薬自体のほか、単純な溶液又は
213 懸濁液を用いて強制分解試験を行う。強制分解試験では、原薬
214 の光感受性や使用する光源の強度に応じた曝光条件を用いるこ
215 とができる。分析法の開発やバリデーションが目的であるなら、
216 分解がかなり認められたときには曝光を打ち切って、試験を終
217 了してもよい。光に対して安定な物質については、適切な量の
218 曝光を行ったらその時点で試験を終了してもよい。これらの実
219 験計画は、試験者の判断に任せられるが、曝光量の妥当性が明
220 示される必要がある。原薬の確認試験は、取扱い、包装及び表
221 示に必要な情報を得るために行われる。確認試験における曝
222 光量は、原薬と製剤の結果を直接比較できるように、総照度
223 として120万lx・h以上及び総近紫外放射エネルギーとして200
224 W・h/m²以上でなければならない。曝光にあたり、試料の昇華、
225 蒸発、融解等の物理的状態の変化による影響が最小になるよう
226 に試料を冷却したり、密封した容器に入れるなどの努力をしな
227 なければならない。用いる容器は試験試料の曝光をできるだけ妨
228 げないものとし、試料との間の相互作用等試験の妨げの原因と
229 なるものを避ける。原薬について試験を行う場合は適切なガラ
230 ス又はプラスチック製の皿状容器に入れ、必要な場合には適切
231 な透明なカバーで覆う。粉末の原薬の場合は一般的には3 mm
232 以下の厚さになるように容器中に広げる。液状の原薬は、化学
233 的に不活性で透明な容器に入れて曝光する。一次包装から取り
234 出した製剤について試験する場合には、原薬について述べた条
235 件と同様の方法で試料を配列する。試料は、光源に曝される面
236 積が最大になるように配置する。例えば、錠剤、カプセル剤等
237 は単一の層になるように広げて配置する。直接に曝光するのが
238 実際的でない場合には(例えば、製剤が酸化されるために)、適
239 切に保護できる不活性で透明な容器(例えば、石英)に試料を入
240 れる。一次包装に入れた製剤又は最終包装の製剤についての試
241 験が必要な場合には、曝光が最も均一になるように、試料を水
242 平に又は光路に対して直角になるように配置する。容積の大き
243 い包装の製剤(例えば、調剤用の包装)を試験するときには、試
244 験条件を調節することが必要な場合もある。

245 5. 安定性データ評価

246 安定性データ評価は、長期保存試験及び加速試験並びに必要
247 に応じて中間的試験のデータ及び必要ならば参考資料(開発時

248 の原薬や製剤を用いた安定性試験成績等)を評価して、原薬又
249 は製剤の品質及び性能に影響を与えやすい重要な品質項目を決
250 める。各項目は別々に評価し、それぞれの評価結果に基づいて
251 リテスト期間又は有効期間を提示するために全体的な評価を行
252 う。経時的に変化する定量的測定項目のデータからリテスト期
253 間又は有効期間を求める場合、母平均の曲線の95%信頼限界
254 が判定基準と交叉する時期をもって決定することができる。リ
255 テスト期間又は有効期間は、個々の項目に対して予測した期間
256 を超えて提示してはならない。

1 医薬品包装における基本的要件と用語〈G0-5-170〉

本参考情報は、医薬品の品質保証の観点から、さらには国際調和の視点¹⁾も加味しながら、医薬品包装に求められる基本的要件を記載すると共に、包装において用いられる用語及びその定義等について記載する。

なお、本参考情報において、医薬品包装若しくは包装は、医薬品を容器に入れること又は入れた状態を含む。また、本参考情報は、製剤の包装に関連する事項を中心として記載するが、原薬又は添加物の輸送、保管等における品質確保にも適用可能な事項を含んでいる。

1. 医薬品包装における基本的要件

医薬品包装は、有効期間にわたって規定される医薬品の品質規格を保証できるよう、開発段階における包装適格性の評価に基づき、包装の要件を定めることが重要である。医薬品包装の適格性は、製品ライフサイクルを通じ、開発段階で定められた包装の要件に基づき維持されなければならない。

製剤の包装においては、品質確保に加え、適正な使用及び投与時の安全性確保に適していることも考慮する必要がある。製剤包装の適格性評価に求められる厳格性は、静脈投与、経口投与又は経皮投与など投与経路に応じたリスクの程度により異なる。また、製剤包装の適格性評価に求められる厳格性は、注射剤、液剤、半固形剤、固形剤などの剤形に応じた一次包装との相互作用に起因するリスクの程度により異なる。

1.1. 包装の設計段階における適格性評価及び要件の規定

製剤の設計段階で評価すべき包装適格性には、保護(Protection)、適合性(Compatibility)、安全性(Safety)及び機能(Performance)の要素が含まれる。

ここでは、包装設計の流れに基づいて、適格性として評価すべき基本的な項目を記載する。

1.1.1. 包装に用いる資材の安全性

プラスチック容器、ガラス容器などの一次包装に用いる資材(以下「一次包材」という。)からの高分子樹脂のモノマー、添加剤、金属不純物などの溶出物又は移行物が医薬品の安全性を損なってはならない。内容医薬品へのこれらの化学物質の溶出量又は移行量は安全性の見地から十分に低くなければならない。

医薬品と直接接する容器等の一次包材は、参考情報「プラスチック製医薬品容器及び輸液用ゴム栓の容器設計における一般的な考え方と求められる要件〈G7-2-162〉」などに基づき、供給者等において原料や構成成分の毒性等の品質評価が適切に実施されたものを用いる。包装設計に際しては、包材の品質評価に係る情報を供給者等から可能な限り得ることが望ましい。

1.1.2. 内容医薬品との適合性

一次包装は、製剤の有効期間にわたって医薬品の品質を低下させるものであってはならない。内容医薬品が一次包装の表面に吸着したり内部に移行したりすることにより、医薬品濃度が一定以上変動することがあってはならない。また、一次包装との相互作用によって医薬品が変質するようなことがあってはならない。

一次包装は、内容医薬品によって変形したり、劣化したり、変質したりするものであってはならない。

一次包装との適合性は、包装の設計段階において、候補となる個別の包材と内容医薬品の組合せの中で、他の評価項目と併せて検討する。試作した一次包装が包装適格性、すなわち、水分や光からの保護、一次包装への収着、一次包装からの溶出物等の課題に対して設計仕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検討し、適切な包材を選択する。一次包材の選択に際しては、必要に応じて二次包装を含めた適格性評価も行う。

1.1.3. 包装による保護

包装は、内容医薬品の損失、風解、潮解、蒸発などを防止し、医薬品の特性に応じて防湿性、遮光性、ガスバリア性を付加して内容医薬品を保護できるものでなければならない。一次包装のみでは内容医薬品の品質を確保することができない場合には、二次包装も含めて複数の包材を組み合わせ、医薬品の品質を確保する。なお、注射剤、点眼剤などの容器には、異物混入が目視で確認できるような透明性の高い包材を用いることが望ましい。

加水分解されやすいなど水分が品質に影響を与えるおそれのある医薬品に関しては、乾燥剤を用いた包装や、一次包装等にガスバリア性の包材を用いるなどの防湿包装とすることができ。水分の蒸散により品質が変化しおそれのある製剤では、容器等の一次包装にガスバリア性の包材を用いることができる。酸化されやすい医薬品に関しては、空気中の酸素等から医薬品の品質を保護するために、脱酸素剤を用いた包装や、容器等の一次包装に低気体透過性の包材を用いることができる。

包装による保護は、包装設計段階において評価を行い、最終的には安定性試験により確認する。また、輸送時等における物理的な衝撃に耐えうることもについても検証する必要がある。

1.1.4. 容器の完全性(微生物汚染防止)

包装は、医薬品の特性及び選択した剤形の特性に応じて、内容医薬品を微生物汚染から保護できるものでなければならない。特に無菌製剤に用いる容器に関しては、容器と栓の嵌合(かんごう)性試験などにより、一次包装の完全性を確認する必要がある。

滅菌を必要とする医薬品にあつては、製剤の滅菌後も、一次包装が上記の安全性、適合性及び保護の適格性を満している必要がある。滅菌後の製剤に、一定以上の毒性物質の残留や生成があつてはならない。また、一次包装の構造及び材質は、滅菌後の保管・輸送時において医薬品の微生物汚染を防ぐものでなければならない。

1.1.5. 包装の機能

包装は、識別性、使用性及び廃棄についても配慮して設計されなければならない。

識別性としては、患者に医薬品が正しく確実に投与又は使用されるような表示、高齢者でも容易に識別できる表示などの配慮が必要である。タンパレジスタント包装、チャイルドレジスタント包装など誤飲誤用やいたずらを防ぐためにわかりやすい表示や容器を工夫することが望ましい。

使用性としては、調剤における取扱いの容易さ、投与量の少ない小児への調剤の容易さ、投与又は使用における容器からの取出しやすさ、投与性、保管収納性、携帯性など投与製剤ごとに考慮することが望ましい。

104 包装関連の廃棄においては、資源の有効利用に留意し、容器
105 包装リサイクル法や各地方公共団体のルールに従い、廃棄物の
106 減量に努める必要があることから、容器の選択や検討において
107 は廃棄への配慮が必要である。なお、一次包装においては、材
108 料組成が保証されないリサイクル包材を使用してはならない。

109 1.1.6. 包装の要件

110 製剤の設計段階において包装適格性の検討に使用された試験
111 法、評価手法に基づき、包装適格性を維持する上で必要かつ十
112 分な品質管理の項目を設ける。一般に包装の要件は、資材の材
113 質の管理、規格及び試験方法及び工程内試験等から構成される。

114 1.2. 医薬品包装の設計段階における適格性評価の具体例

115 設計段階における包装の適格性評価の具体例を以下に示す。

116 1.2.1. 経口固形製剤に用いる包装の適格性評価

117 経口固形製剤の包装を選択する時には、以下の試験を包装の
118 適格性評価に含める。

119 ・瓶等を用いる場合は、選択した栓との開栓トルクの測定に
120 より評価を行う。

121 ・PTP包装、ストリップ包装等を用いる場合は、水蒸気透
122 過性試験を行う。

123 1.2.2. 注射剤に用いる容器の適格性評価

124 注射剤に用いる容器を選択する時には、以下の試験を容器の
125 適格性評価に含める。

126 ・アンプルを用いた注射剤は、ピンホール試験を行い、完全
127 性を確認する必要がある。

128 ・アンプルを除くバイアル／ゴム栓、ガラス製充填済みシリ
129 ンジなどを用いた注射剤は、嵌合性試験を行い、容器とし
130 ての完全性を確認する必要がある。

131 ・注射剤に用いるプラスチック製医薬品容器(充填済みシリ
132 ンジ、プラスチックボトル、プラスチックバックなど)は、
133 製剤の有効期間にわたって「微生物が混入しない気密容
134 器」であることを確認する必要がある。

135 1.2.3. 容器栓システムの金属不純物に係る適格性評価

136 注射剤、液剤又は半固形剤において、用いる一次包材からの
137 金属不純物の溶出が疑われる場合には、原子吸光光度法
138 (2.23)、誘導結合プラズマ発光分光分析法及び誘導結合プラ
139 ズマ質量分析法(2.63)などを用いて、製剤中に含まれる金属
140 不純物の量が安全性の見地から十分に低いことを確認する必要
141 がある。

142 1.2.4. キット製品の適格性評価

143 充填済みシリンジ剤、注射用カートリッジ剤、定量吸入式吸
144 入粉末剤などの投与デバイスを用いる場合には、製品使用状況
145 に可能な限り近い条件下において正確な用量が再現性をもって
146 投与されることを検証する必要がある。

147 1.2.5. 遮光包装の適格性評価

148 有効成分が光の影響を受けやすく、処方設計で製剤の品質に
149 与える光の影響を克服することが困難な製剤は、容器を含む遮
150 光包装の検討を行う。苛酷試験としての光安定性試験等を用い、
151 適切な遮光包装を選択したことを検証する必要がある。

152 1.3. 包装工程開発に伴う包材の選択、変更管理及び安定性モ 153 ニタリング等

154 包装による医薬品の品質保証を適切に維持するためには、設
155 計段階で実施した適格性評価に加えて、包装工程開発及びそれ
156 に続く生産段階において、適切な変更管理が行われ、安定性モ

157 ニタリング等を通じて包装の要件の適切性を確認する必要があ
158 る。

159 一次包材の供給者等による材質変更等は適切に管理されるべ
160 きである。そのためにも、これらの包材の製造時に添加された
161 物質に関する情報などを含む容器の製造過程に関する全ての情
162 報を得ることが望ましい。

163 最終的に選択された医薬品の包装が設計通りに要件を満たし
164 ているかどうかについて評価を行い、満たしていない場合には
165 変更管理を通じて包装形態又は包材の変更を行う必要がある。

166 1.3.1. 包装工程開発における包材の選択、変更

167 包装工程の開発時には、包装設計段階において定められた要
168 件を満たすことに加え、生産適性、異物や昆虫などの付着しに
169 くさも勘案して包材を選択する。最終的に選択された包装につ
170 いては、保管・輸送時の温度変化や、輸送時の衝撃等に耐えう
171 ることを検証する。

172 包材については、一般試験法7. 容器・包装材料試験法の該
173 当する試験法を行い、また、一般試験法に記載のない試験につ
174 いては適切に試験法を設定し、適否の判定を行う。

175 1.3.2. 安定性モニタリング等

176 安定性モニタリング又は保管された参考品を通じて、包装が
177 製剤の安定性に悪影響を及ぼしていないことを確認しなければ
178 ならない。包装が製剤の安定性等の品質に影響を及ぼす可能性
179 が示された場合には、品質を確保可能な適切な包装、管理を選
180 定し、それを用いたロットの品質をモニターし、必要に応じ変
181 更管理を通じて包装を改善する。

182 1.4. 医薬品の包装工程における品質の維持管理の具体例

183 医薬品の包装の適格性を維持するためには、工程管理試験等
184 を実施し、包装の要件が出荷時に満たされていることを確認す
185 る必要がある。

186 以下にその具体例を示す。

187 1.4.1. 経口固形製剤の具体例

188 PTP包装された錠剤は、設計通りにシールの完全性が確保
189 されているかどうかについて、PTPシートの気密試験(例えば、
190 水中減圧試験)等により確認する必要がある。

191 1.4.2. 注射剤の具体例

192 ・アンプルを用いた水性注射剤は、ピンホールのないことを
193 確認する必要がある。

194 ・注射剤に用いるプラスチック製医薬品容器(充填済みシリ
195 ンジ、プラスチックボトル、プラスチックバックなど)は、
196 市場に出荷する際には、設計通りに微生物が混入しない気
197 密容器として生産されていることを確認する必要がある。

198 2. 医薬品包装に関する用語

199 2.1. 基本的な用語

200 一次包装(primary packaging)：有効成分、添加剤又は製剤と
201 直接接触する包装であり、内容物に対し、物理的又は化学的な
202 変化を与えてはならない。一次包装は、医薬品の品質を保持す
203 ると共に利便性などの機能を付与することができる。

204 一次包装の例として、注射剤における「直接の容器」である
205 アンプル、錠剤又はカプセル剤における「内袋」であるPTP
206 包装などがある。

207 外部の容器又は外部の被包(outside container or outside
208 wrapper)：医薬品の直接の容器又は直接の被包が販売・授与
209 のために更に包装され、かつ法令²⁾に規定された表示が付され
210 ているもの。

211 気密容器(tight container)：通常の取扱い、運搬又は保存状態
 212 において、固形又は液状の異物が混入せず、内容医薬品の損失、
 213 風解、潮解又は蒸発を防ぐことができる容器。気密容器の規定
 214 がある場合には、密封容器を用いることができる。(通則44)
 215 気密容器として使用されることが多い容器、包装の例として、
 216 プラスチック樹脂を用いた容器(瓶、バイアル、シリンジ、プ
 217 リスター包装(PTP包装など)、ストリップ包装など)などがある。
 218 最終包装(final packaging or marketed packaging)：医薬品
 219 の販売・授与のための包装であり、法令^{2,3)}に規定された表示
 220 等を施して市場出荷される製品としての形態。
 221 放射線滅菌法を用いる場合に、最終包装で照射を行うことが
 222 ある。
 223 資材⁴⁾(labeling and packaging materials)：製品の容器、被
 224 包及び表示物(添付文書を含む)。
 225 直接の被包(immediate wrapper)：医薬品がじかに収められ
 226 た容れ物(紙、布、プラスチック、アルミ袋など)。法令³⁾に規
 227 定された表示等を施した上で、そのままの形態で販売・授与で
 228 きる。そのままの形態では販売・授与されず、法令³⁾に規定さ
 229 れた表示を付す必要のない直接の被包の例として内袋がある。
 230 医薬品とじかに接触する直接の被包は一次包装ともいう。
 231 直接の容器(immediate container)：医薬品がじかに収められ
 232 た固形の容れ物(缶、瓶、アンプル、バイアル、チューブ、点
 233 眼剤用容器、箱など)。法令³⁾に規定された表示等を施した上で、
 234 そのままの形態で販売・授与できる。なお、錠剤のように内袋
 235 としてPTP包装品を更に紙箱に入れた場合には、紙箱が直接
 236 の容器となる。
 237 医薬品とじかに接触する直接の容器は一次包装ともいう。
 238 内袋(inner bag)：例えば防湿や遮光等を目的として被包の下
 239 に用いるプラスチックの袋、散剤を1回分の服用量ずつ収めた
 240 薬袋等である。ポリ袋、ストリップ包装、プリスター包装
 241 (PTP包装など)、坐剤プラスチックコンテナなどをいう。なお、
 242 医薬品とじかに接触する内袋は直接の被包に該当するが、その
 243 ままの形態で販売・授与されない場合は、法令³⁾に規定された
 244 表示を付す必要はない。
 245 医薬品とじかに接触する内袋は一次包装ともいう。
 246 二次包装(secondary packaging)：一次包装を補うための単一
 247 又は複数の包装であり、有効成分、添加剤又は製剤と直接接
 248 触しない。二次包装は、医薬品の品質を保持すると共に医薬品の
 249 使用時の過誤防止並びに利便性などの機能を付与することがで
 250 きる。
 251 被包(wrapper)：紙、布、プラスチック、アルミ袋のような柔
 252 軟な材料による入れ物・包みを指す。医薬品の被包の例として、
 253 薬袋、ポリ袋、ストリップ包装、プリスター包装(PTP包装な
 254 ど)などがある。
 255 表示物⁵⁾(labeling)：法令^{2,3)}により規定された表示等を施した
 256 もので、製品のラベル及び添付文書。
 257 封(sealing)：法令⁶⁾により、封を開かねば医薬品を取り出すこ
 258 とができず、かつ、その封を開いた後は容易に原状に復するこ
 259 とができないように施すもの。
 260 包装⁷⁾(packaging)：医薬品の通常の取扱い、運搬、保存又は
 261 使用などに当たって、その品質を維持するための適切な材料、
 262 容器、被包。また、これらの材料、容器、被包に医薬品を収納
 263 すること及びそれらを施す技術、又は施した状態。

264 密封容器(hermetic container)：通常の取扱い、運搬又は保存
 265 状態において、気体の侵入しない容器。(通則45)
 266 密封容器として、注射剤においては、アンプルのほか、容器
 267 栓システムであるバイアル／ゴム栓、ガラス製のプレフィルド
 268 シリンジなどが、その他剤形では、両面アルミ製のプリスター
 269 包装(PTP包装など)、金属製の押出しチューブなどが使用され
 270 ることがある。
 271 密閉容器(well-closed container)：通常の取扱い、運搬又は保
 272 存状態において、固形の異物が混入することを防ぎ、内容医薬
 273 品の損失を防ぐことができる容器。密閉容器の規定がある場合
 274 には、気密容器を用いることができる。(通則43)
 275 密閉容器として使用されることが多い容器、包装の例として、
 276 柔軟な材料で作られた一つの開口部をもつ紙類又はプラスチッ
 277 クを用いた袋など、また、金属又はプラスチック樹脂を用いた
 278 缶などがある。
 279 容器(container)：医薬品を入れるもので、栓、蓋なども容器
 280 の一部である。容器は内容医薬品に規定された性状及び品質に
 281 対して影響を与える物理的、化学的作用を及ぼさない。(通則
 282 42)
 283 医薬品容器との例として、缶、瓶(ボトル)、チューブ、アン
 284 プル、バイアル、箱などがある。
 285 容器栓システム(container closure system)：有効成分、添加
 286 剤又は製剤と直接接触する一次包装に用いる資材及びその他の
 287 構成材料からなる包装形態。容器栓システムは内容医薬品との
 288 組み合わせで考えるべきもので、一次包装のみで品質が保証で
 289 きない場合には、二次包装に用いる資材も含まれる。
 290 2.2. 個別の包装又は容器に関する用語
 291 アンプル(ampule)：注射剤などの薬液又は凍結乾燥した内容
 292 医薬品などを封入する透明又は着色のガラス製又はプラスチッ
 293 ク製の容器。通例、口部を熔閉又は熔着して封じる。
 294 押出しチューブ⁷⁾(collapsible tube)：一方の端に、ノズルとキ
 295 ャップがあり、他方は閉じられており、軟膏等の内容物を押し
 296 出せる柔軟性を持つ容器。金属チューブ、プラスチックチュー
 297 ブ、ラミネートチューブなどがある。
 298 シリンジ(syringe)：外筒(バレル)、ガスケット、押し子(プ
 299 ランジャー)、トップキャップからなる容器。注射針を含む場合
 300 もある。充填済みシリンジ剤に用いられる。
 301 ストリップ包装⁷⁾(strip packaging)：錠剤、カプセル剤、散剤、
 302 顆粒剤などを2枚の材料の間にじかに挟み込み、その周囲を接
 303 着した包装。略してSP包装ともいう。医薬品がじかに収めら
 304 れているため、内袋、一次包装に該当する。
 305 バイアル(vial)：注射剤などに用いる透明又は着色のガラス製
 306 又はプラスチック製の容器。瓶の一種である。ゴム栓及びアル
 307 ミキャップを用い封をする。
 308 PTP包装⁷⁾(press through packaging)：プリスター包装の一種
 309 で、プラスチック成形品の開口部をアルミ箔などの押し出し性
 310 の良い材料を用いた包装。カプセル剤、錠剤などがじかに収め
 311 られているため、内袋、一次包装に該当する。
 312 ピロータイプ包装⁷⁾(pillow type packaging)：袋状の包装の一
 313 種であり、例えば、材料の縦の中央部を貼り合わせ、上下の端
 314 をシールした包装。一次包装のみで品質確保が困難な場合に、
 315 水分や光からの保護のためアルミニウム箔などがラミネートさ
 316 れた複合フィルムを利用したものを二次包装として用いること
 317 が多い。

318 プラスチックバッグ(plastic bag)：ポリエチレン，ポリプロピ
 319 レン等の樹脂を単独又は複合の材料として用い，一つ又は複数
 320 の開口部をもつ柔軟な容器。通例，栓体としてゴム栓を用いる。
 321 主として輸液剤のような容量の大きな注射剤の容器として用い
 322 る。

323 ブリスター包装⁷⁾(blister packaging)：プラスチック又はアル
 324 ミ箔のシートを加熱成形して，1個又は複数個のくぼみを作り，
 325 その中に製剤を入れ，開口部をプラスチックフィルム又はシー
 326 ト，アルミ箔などで覆い，周辺部を基材に接着又は固定した包
 327 装。製剤を取り出すときには，フィルムや箔などを剥離して行
 328 う形態のものをいい，カプセル剤，錠剤，充填済みシリンジ剤，
 329 複数個のアンプルを入れたキット製品等で用いられる。

330 なお，錠剤等がじかに収められている場合は，内袋，一次包
 331 装に該当する。

332 分包品(single-dose packages)：1回使用量ずつ包装したもの。
 333 例えば，散剤又は顆粒剤を1回分の服用量ずつ収めたストリッ
 334 プ包装がこれに当たる。

335 2.3. 包装機能に関する用語

336 ガスバリア包装⁷⁾(gas barriered packaging)：目的とする気体
 337 の透過を抑制する機能をもたせた包装。低気体透過性の包装。

338 遮光容器／遮光包装(light resistant container and
 339 packaging)：通常の取扱い，運搬又は保存状態において，内
 340 容医薬品の品質に光が影響を与える場合に，光の透過を防ぎ保
 341 護するための容器又は包装。(通則46)

342 着色した容器を用いる場合のほか，シュリンクフィルムで容
 343 器を覆う場合もある。

344 タンパレジスタント包装⁷⁾(tamper-resistant packaging,
 345 tamper-proof packaging)：人が無意識に扱った場合，又は悪
 346 意をもって“いたずら”をした場合にも危険を生じないような
 347 工夫を施した包装。

348 チャイルドレジスタント包装⁷⁾(child-resistant packaging,
 349 child-proof packaging)：小児の誤飲事故防止を目的とし，誤っ
 350 て開封，開栓，開包等ができないようになっており，かつ成人
 351 が適正に使用することが可能な包装。

352 防湿包装⁷⁾(moisture-proof packaging)：医薬品を湿気の影響
 353 から保護する目的で防湿機能を有する材料を用い，必要に応じ
 354 て乾燥剤を入れ，内部を乾燥状態に保つ包装。

355 3. 参考資料

356 1) FDA Guidance for Industry: Container Closure
 357 Systems for Packaging Human Drugs and Biologics, May
 358 1999.

359 2) 平成26年11月25日施行「医薬品，医療機器等の品質，有
 360 効性及び安全性の確保等に関する法律」(以下「医薬品医療
 361 機器法」という)第51条。

362 3) 「医薬品医療機器法」 第50条。

363 4) 平成16年12月24日厚生労働省令第179号「医薬品及び医薬
 364 部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」第二条
 365 第2項。

366 5) 平成25年8月30日付薬食監麻発0830第1号厚生労働省医薬
 367 食品局監視指導・麻薬対策課長通知「医薬品及び医薬部外品
 368 の製造管理及び品質管理の基準に関する省令の取扱いについ
 369 て」。

370 6) 「医薬品医療機器法」 第58条。

371 7) JIS Z 0108：2012，包装－用語。

1 クオリティ・バイ・デザイン(QbD)、品質リスクマネジメント(QRM)及び医薬品品質システム(PQS)に関連する用語集 (G0-6-172)

1. はじめに

本用語集の目的はICH Q8からQ11までの、いわゆるQカルテットと呼ばれる一連のガイドラインにおいて品質保証の概念の構築に用いられる用語について定義を示し、概念を説明することである。ここに示されている用語はICHの長年にわたる議論の結果定められた用語であり、ガイドラインの示す科学と品質リスクマネジメントに基づく体系的な品質保証の概念を理解する上で最も重要なものである。一般的な用法とは必ずしも一致していない場合もあるが、医薬品の薬事手続きという場においては以下の定義が用いられることを念頭に置く必要がある。以下、ICH Q8から順番にQ11に至るまでの用語を示す。なお、複数のICHガイドラインで説明されている用語については、該当の文末の括弧内に重複するガイドライン名を記した。

2. 用語集

【ICH Q8ガイドライン】

管理戦略(Control Strategy)：最新の製品及び製造工程の理解から導かれる、製造プロセスの稼動性能及び製品品質を保証する計画された管理の一式。管理は、原薬及び製剤の原材料及び構成資材に関連するパラメーター及び特性、設備及び装置の運転条件、工程管理、完成品規格及び関連するモニタリング並びに管理の方法及び頻度を含み得る(ICH Q10, Q11)。管理戦略は開発手法の違いによらず必要であるが、クオリティ・バイ・デザインの開発手法を用いることにより、試験、モニタリング、又は管理をより上流の工程で実施することが可能となる。

クオリティ・バイ・デザイン(QbD : Quality by Design)：事前の目標設定に始まり、製品及び工程の理解並びに工程管理に重点をおいた、立証された科学及び品質リスクマネジメントに基づく体系的な開発手法。

継続的工程確認(Continuous Process Verification)：製造工程の性能を継続的にモニタリングし評価する、プロセスバリデーションの代替法であり、初回及び継続的な商業生産のプロセスバリデーション実施計画に適用可能である(ICH Q11)。一般に、初回のプロセスバリデーションについては、継続的工程確認はQbDの手法が適用された場合においてより適しているが、工程に関する広範な知識が商業生産の実績を通じて得られた場合にも用いることができる。

工程の頑健性(Process Robustness)：ある工程が、材料の変動性や工程自体及び装置の変更に対して、品質にマイナスの影響を与えることなく耐えられることを示す(ICH Q11)。

重要工程パラメーター(CPP : Critical Process Parameter)：工程パラメーターのうち、その変動が重要品質特性に影響を及ぼすもの、したがって、その工程で要求される品質が得られることを保証するためにモニタリングや管理を要するもの。

重要品質特性(CQA : Critical Quality Attribute)：要求される製品品質を保証するため、適切な限度内、範囲内、分布内であるべき物理学的、化学的、生物学的、微生物学的特性又は性質(ICH Q11)。例えば、ICH Q8では、経口固形製剤の一般的

なCQAとしては、製剤の純度、製剤含量、薬物放出性及び安定性に影響を及ぼす特性を例示しているが、純度や製剤含量、薬物放出性それ自体もCQAに含めることが通常である。

正式な実験計画(Formal Experimental Design)：工程に影響する諸要因と、その工程のアウトプットとの関係を判断するための構造化・組織化された方法。「実験計画法(DoE : Design of Experiments)」としても知られる。検討すべき要因はリスクアセスメント作業や既に得られている知識から導かれる場合がある。

デザインスペース(DS : Design Space)：品質を確保することが立証されている入力変数(原料の性質など)と工程パラメーターの多元的な組み合わせと相互作用。このデザインスペース内で運用することは変更とはみなされない。デザインスペース外への移動は変更とみなされ、通常は承認事項一部変更のための規制手続きが開始されることになる。デザインスペースは申請者が提案し、規制当局がその評価を行って承認する(ICH Q10, Q11)。デザインスペースは、ライフサイクルにわたって、新たな知識が得られるごとに更新することができる。一変量実験のみから得られる立証された許容範囲(PAR)では、工程パラメーター間、原料特性間、あるいは工程パラメーター／原料特性間の相互作用に関する理解が欠如している可能性があるため、PARをただ組み合わせてもデザインスペースとはならないことに留意すべきである。

品質(Quality)：製品、システム、又は工程に係る本質的性質の組み合わせが要求事項を満たす程度(ICH Q6A, Q8, Q10)。原薬あるいは製剤に適用した場合は、原薬や製剤の意図した用途への適切さのこと。同一性、含量、物質の純度のような特性を指すこともある(ICH Q6A, Q8, Q9, Q10)。

プロセス解析工学(工程解析システム)(PAT : Process Analytical Technology)：最終製品の品質保証を目標として原材料や中間製品／中間体の重要な品質や性能特性及び工程を適時に(すなわち製造中に)計測することによって、製造の設計、解析、管理を行うシステム。

目標製品品質プロファイル(QTPP : Quality Target Product Profile)：製剤の安全性及び有効性を考慮した場合に要求される品質を保証するために達成されるべき、製剤の期待される品質特性の要約であり、当該製品の設計基準を記述したものと解釈される。製品開発の設計の基盤として用いられる(ICH Q8)。
ライフサイクル(Lifecycle)：初期開発から市販を経て製造販売中止に至るまでの製品寿命の全過程(ICH Q11)。

リアルタイムリリース試験(RTRT : Real Time Release Testing)：工程内データに基づいて、工程内製品や最終製品の品質を評価し、その品質が許容されることを保証する試験。通常、あらかじめ評価されている物質(中間製品)特性と工程管理との妥当な組み合わせが含まれる(ICH Q11)。パラメトリックリリースもリアルタイムリリース試験の一種であるが、この場合には、特定の性質について、原料や検体の試験を行うより、むしろ工程データに基づいている。詳細については、参考情報「医薬品原薬及び製剤の品質確保の基本的考え方 (G0-1-172)」を参照されたい。

立証された許容範囲(PAR : Proven Acceptable Range)：ある一つの工程パラメーターについて、他のパラメーターを一定とするとき、その範囲内での操作であれば関連する品質基準を満たすものが得られるとして特定された範囲。

105 【ICH Q9ガイドライン】

106 意思決定者 (Decision Maker(s)) : 適切かつタイムリーな品質
107 リスクマネジメントに関する決定を行う能力及び権限を有する
108 人又は人々。
109 危害 (Harm) : 健康への被害。製品品質の不良又は安定供給の
110 欠如による被害を含む。
111 傾向 (Trend) : 変動の方向又は変化率を参照する統計用語。
112 検出性 (Detectability) : ハザードの存在, 出現, 事実を発見又
113 は決定する能力。
114 重大性 (Severity) : ハザードから生じうる結果の大きさ。
115 製品ライフサイクル (Product Lifecycle) : 初期開発から市販を
116 経て製造販売中止に至るまでの製品寿命の全過程。
117 ハザード (Hazard) : 危害の潜在的な原因 (ISO/IEC Guide 51)。
118 品質システム (Quality System) : 品質方針を実行し, 品質目
119 標への適合を保証するシステムに係るあらゆる側面の総和。
120 要求事項 (Requirements) : 患者やその代弁者 (医療従事者, 規
121 制当局, 国会議員など) により明確化された又は暗黙のニーズ
122 又は期待。ICH Q9 においての要求事項とは, 法令上, 立法上,
123 あるいは規制上の要求事項のみならず, 上記のようなニーズ及
124 び期待を含むものとされる。
125 利害関係者 (Stakeholder) : リスクに影響を与え, リスクの影
126 響を受け, 又はリスクの影響を受けると認識する個人, グルー
127 プ又は組織。意思決定者もまた利害関係者である場合がある。
128 本ガイドラインの目的においては, 主要な利害関係者とは, 患
129 者, 医療従事者, 規制当局, 企業を指す。
130 リスク (Risk) : 危害の発生の確率とそれが発生したときの重
131 大性の組み合わせ (ISO/IEC Guide 51)。
132 リスクアセスメント (Risk Assessment) : リスクマネジメント
133 プロセスの中で, リスクに係る決定を支持する情報を整理する
134 系統だったプロセス。ハザードの特定, 及びそれらハザードへ
135 の曝露に伴うリスクの分析と評価からなる。
136 リスクコミュニケーション (Risk Communication) : リスク及
137 びリスクマネジメントの情報を意思決定者及び他の利害関係者
138 の間で共有すること。
139 リスクコントロール (Risk Control) : リスクマネジメントの意
140 思決定を実施する行動 (ISO Guide 73)。
141 リスク受容 (Risk Acceptance) : リスクを受容する意思決定
142 (ISO Guide 73)。
143 リスク低減 (Risk Reduction) : 危害の発生の確率及びその危
144 害の重大性を低減するための行動。
145 リスク特定 (Risk Identification) : リスクへの質問又は問題の
146 記述を参照して, 危害の潜在的な原因 (ハザード) を特定するた
147 めの情報を系統立てて使用すること。
148 リスク評価 (Risk Evaluation) : リスクの重大性を決めるため,
149 定量的又は定性的な尺度を使い, 推定されたリスクを一定のリ
150 スク基準と比較すること。
151 リスク分析 (Risk Analysis) : 特定されたハザードに関連する
152 リスクの推定。
153 リスクマネジメント (Risk Management) : リスクのアセスメ
154 ント, コントロール, コミュニケーション, レビューの各作業
155 に対し, 品質マネジメントの方針, 手順, 実施を系統立てて適
156 用すること。
157 リスクレビュー (Risk Review) : リスクに係る新しい知見や経
158 験を (適切ならば) 考慮して, リスクマネジメントプロセスのア

159 ウトプット/結果を見直し, 監視すること。

160 【ICH Q10ガイドライン】

161 イノベーション (Innovation) : 新規な技術又は方法論の導入。
162 医薬品品質システム (PQS : Pharmaceutical Quality
163 System) : 品質に関して製薬企業を指揮及び管理するマネジメ
164 ントシステム (ISO 9000:2005 に基づく ICH Q10 の定義)。
165 外部委託作業 (Outsourced Activities) : 委託者との文書化さ
166 れた合意事項の下で, 受託者により実行される作業。
167 管理できた状態 (State of Control) : 管理の組合せが継続する
168 製造プロセスの稼働性能及び製品品質について恒常的な保証を
169 提供する状態。
170 業績評価指標 (Performance Indicators) : 組織, プロセス又は
171 システムの稼働性能を示すために, 品質目標の定量化に用いら
172 れる測定可能な値で, ある地域では「性能測定基準
173 (Performance Metrics)」と呼ばれる。
174 継続的改善 (Continual Improvement) : 要求事項を満たす能
175 力を高めるために繰り返し行われる活動 (ISO 9000:2005)。
176 上級経営陣 (Senior Management) : 企業又は製造サイトに対
177 して, その企業又は製造サイトの資源を動員する責任と権限を
178 持ち, 最高レベルで指揮し, 管理する人 (ISO 9000:2005 に部
179 分的に基づく ICH Q10 定義)。
180 製造プロセスの能力 (Capability of a Process) : 当該製品の要
181 求事項を満たす製品を実現する製造プロセスの能力。工程能力
182 (Process Capability) の概念は, 統計用語においても定義され
183 得る (ISO 9000:2005)。
184 製品実現 (Product Realisation) : 患者及び医療従事者のニー
185 ズ並びに規制当局 (承認事項の遵守を含む) 及び内部顧客の要求
186 事項を満たす適切な品質特性を有する製品の達成。
187 是正措置 (Corrective Action) : 検知された不適合又は他の望
188 ましくない状況の原因を除去する措置。注: 予防措置は発生を
189 防止するために講じられるのに対し, 是正措置は再発を防止す
190 るために講じられる (ISO 9000:2005)。
191 達成のための手法 (Enabler) : 目標を達成するための手段を提
192 供する手法又はプロセス。
193 知識管理 (Knowledge Management) : 製品, 製造プロセス及
194 び構成資材の情報を獲得し, 分析し, 保管し, 及び伝播するた
195 めの体系的取り組み。
196 品質計画 (Quality Planning) : 品質目標を設定すること並び
197 にその品質目標を達成するために必要な, 運用上のプロセス及
198 び関連する資源を規定することに焦点を合わせた品質マネジメ
199 ントの一部 (ISO 9000:2005)。
200 品質方針 (Quality Policy) : 上級経営陣により正式に表明され
201 た, 品質に関する組織の全体的な意図及び方向
202 (ISO 9000:2005)。
203 品質マニュアル (Quality Manual) : 組織の品質マネジメント
204 システムを規定する文書 (ISO 9000:2005)。
205 品質目標 (Quality Objectives) : 品質方針及び戦略を測定可能
206 な活動に変換するための手段。
207 品質リスクマネジメント (QRM : Quality Risk
208 Management) : 製品ライフサイクルを通じて, 医薬品の品質
209 に係るリスクについてのアセスメント, コントロール, コミュ
210 ニケーション, レビューからなる系統だったプロセス (ICH Q9,
211 Q10)。詳細については, 参考情報「品質リスクマネジメント
212 の基本的考え方 (G0-2-170)」を参照されたい。

213 フィードバック／フィードフォワード (Feedback/
214 Feedforward) : プロセス又はシステムを, その結果又は効果
215 によって修正し, 又は管理すること. フィードバック／フィ
216ードフォワードは, プロセスの管理戦略に対して技術的に, ま
217た, 品質マネジメントに対して概念的に適用することができる.
218 フィードバックは結果をさかのぼって前のプロセスに反映させ
219 (例: 前工程の原料の供給量の制御), フィードフォワードは結
220果をそれよりも後の工程(例: 後工程の乾燥時間の制御)に反映
221させることである.

222 変更マネジメント (Change Management) : 変更を提案し, 評
223価し, 承認し, 実施し, 及びレビューする体系的取り組み.

224 予防措置 (Preventive Action) : 起こり得る不適合又は他の望
225ましくない起こり得る状況の原因を除去する措置. 注: 是正措
226置は再発を防止するために講じられるのに対し, 予防措置は発
227生を防止するために講じられる(ISO 9000:2005).

228 【ICH Q11ガイドライン】

229 化学変換工程 (Chemical Transformation Step) : 化学薬品に
230おいて, 前駆体の分子構造から原薬の化学構造の合成に関係す
231るステップのことである. 一般的に, これらはC-X又はC-C
232結合が形成されるか切断されることを含む.

233 混入汚染物質 (Contaminants) : 原薬及び製剤の製造工程には
234本来存在しないはずのもので, 外来性の物質 (例えば, 化学物
235質, 生化学的な物質, 微生物など) すべてを指す(Q6B).

236 3. 参考資料

- 237 1) ICH: Guideline for Q8(R2), Pharmaceutical
238 Development.
- 239 2) ICH: Guideline for Q9, Quality Risk Management.
- 240 3) ICH: Guideline for Q10, Pharmaceutical Quality System.
- 241 4) ICH: Guideline for Q11, Development and Manufacture
242 of Drug Substances (Chemical Entities and
243 Biotechnological/Biological Entities).
- 244 5) ICH: Quality Implementation Working Group, Points to
245 Consider (R2), ICH-Endorsed Guide for ICH Q8/Q9/Q10
246 Implementation.
- 247 6) ICH: Quality Implementation Working Group on Q8, Q9
248 and Q10 Questions & Answers (R4).

1 G1. 理化学試験関連

2 分析法バリデーション〈G1-1-130〉

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、分析法の妥当性を示すことができる。

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

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

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。分析法には、分析の手順、標準試料の調製法、試薬・試液の調製法、留意事項、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、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

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)

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ラメーターの定義と評価方法の例を次に示す。

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、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必要である。

頑健性(Robustness)は、分析法バリデーションで検討する分

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

真度とは、分析法で得られる測定値の偏りの程度のこと、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

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とする。

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

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準誤差の値から、真度の95%信頼区間を計算する。この区間が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とを確認する。

2.2. 精度(Precision)

2.2.1. 定義

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。

精度は、繰り返し条件が異なる三つのレベルで表され、それぞれ、併行精度、室内再現精度及び室間再現精度という。

(i) 併行精度(Repeatability/Intra-assay precision)：併行精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロットなど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。

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

(iii) 室間再現精度(Reproducibility)：室間再現精度とは、試験室を変えて、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

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には、例えば、大量の製剤を均質とみなせるまで混合粉碎した検体、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を、均質な検体として用いる。

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要因について検討する。

各レベルの精度の分散、標準偏差、相対標準偏差、分散の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

106 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
107 析法の採否を決定する。

108 2.3. 特異性 (Specificity)

109 2.3.1. 定義

110 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、
111 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
112 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
113 によりこれを補うこともできる。

114 2.3.2. 評価方法

115 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
116 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
117 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
118 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
119 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
120 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
121 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
122 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
123 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。

124 2.4. 検出限界 (Detection limit)

125 2.4.1. 定義

126 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
127 の量又は濃度のことである。検出限界では定量できるとは限ら
128 ない。

129 2.4.2. 評価方法

130 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
131 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
132 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
133 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
134 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
135 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
136 式により求めることができる。

$$137 \quad DL = 3.3\sigma / slope$$

138 DL : 検出限界

139 σ : ブランク試料の測定値の標準偏差

140 $slope$: 検出限界付近の検量線の傾き

141 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
142 にノイズ・レベルを用いることができる。

143 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
144 る。

145 2.5. 定量限界 (Quantitation limit)

146 2.5.1. 定義

147 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
148 低の量又は濃度のことである。定量限界の分析対象物を含む試
149 料の測定値の精度は、通例、相対標準偏差で表して10%である。

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。

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

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る。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 た領域のことである。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る。

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 ーターは、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。

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 システム適合性 (G1-2-181)

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

1. システム適合性の意義

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

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

2. システム適合性設定時の留意事項

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

例えば、液体クロマトグラフィーやガスクロマトグラフィーを用いた定量的な純度試験の場合には、システムの性能(試験対象物質を特異的に分析し得ることの確認)、システムの再現性(繰返し注入におけるばらつきの程度の確認)、検出の確認(限度値レベルでのレスポンスの数値的信頼性の確認)などの項目について設定する。ただし、面積百分率法において、マトリックスの影響が評価され、分析対象物の性質を考慮して管理すべき最低濃度レベルの溶液を用いる等、適切な検出の確認が設定されている場合、システムの再現性の規定が不要な場合がある。

クロマトグラフィーにおけるシステム適合性の規定は、クロマトグラフィー総論 (2.00)、又は、液体クロマトグラフィー (2.01) に従う。

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー (2.01)」に記載されたシステム適合性の規定を補完する事項について下に記載する。

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システムの再現性について

2.1.1. 許容限度値の設定

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー (2.01)」

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

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

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

(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慮して、適切に設定する。試料溶液を希釈し、0.5 ~ 1.0%の有効成分濃度の溶液を調製して、システム再現性の試験に用いる場合には、通例、「2.0%以下」を目安として適切に設定する。

なお、上記の目安は、ガスクロマトグラフィーの場合には適用しない。

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

日本薬局方一般試験法「液体クロマトグラフィー (2.01)」のシステム適合性の項に「繰返し注入の回数は6回を原則とするが、グラジエント法を用いる場合や試料中に溶出が遅い成分が混在する場合など、1回の分析に時間がかかる場合には、6回注入時とほぼ同等のシステムの再現性が担保されるように達成すべきばらつきの許容限度値を厳しく規定することにより、繰返し注入の回数を減らしてもよい。」と規定されている。これと関連して、システムの再現性の試験の質を落とさずに繰返し注入の回数を減らす方法を以下に示した。この方法により、必要な場合には、繰返し注入の回数を減らして設定することができ、また変更可能である。

システムの再現性の試験の質を繰返し注入の回数が6回($n=6$)の試験と同等に保つために、 $n=3 \sim 5$ の試験で達成すべきばらつきの許容限度値を下記の表に示した。

しかしながら、繰返し注入の回数を減らすということは、システムの再現性を確認する上での1回の試験の重みが増すということであり、装置が適切に維持管理されることがより重要となることに留意する必要がある。

表 システムの再現性の試験の質を $n=6$ の試験と同等に保つために $n=3 \sim 5$ 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)					
$n=6$ の試験に規定されたばらつきの許容限度値		1.0%	2.0%	3.0%	4.0%	5.0%	10.0%
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。

1 液の色に関する機器測定法〈G1-4-181〉

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。
 なお、三薬局方で調和されていない部分のうち、調和合意において、調和の対象とされた項中非調和となっている項の該当箇所は「◇」で、調和の対象とされた項以外に日本薬局方が独自に規定することとした項は「◇」で囲むことにより示す。
 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

1. 原理

測定される物質の色は第一にその物質の吸収特性に依存する。しかし、光源の違い、光源のスペクトルのエネルギー、測定者の視感度、サイズの違い、背景の違い及び見る方向の違いのような種々の条件によっても色の見え方は異なる。色相、明度(又は輝度)及び彩度は色の三属性とされている。決められた条件のもとで機器分析を行えば色の数値化は可能である。どのような色の機器分析においても、ヒトの目が3タイプの受容体を通して色を見るということに基づいている。
 色の測定において、機器分析法は目視による色の主観的な観察よりも客観的なデータを得ることができる。適切な保守管理及び校正を行うことで機器分析法により正確で、精度よく、更に経時的に変化しない一定の色の測定値を得ることができる。正常な色覚を持つヒト被験者による広範囲なカラーマッチング実験を通して、分散係数(荷重係数)を可視スペクトル範囲のそれぞれの波長で求めて、その波長の光による各受容体の相対的な刺激量を求めた。国際照明委員会(CIE)は、測色標準観測者が対象(視野)を認識する光源及び光の角度を考慮したモデルを開発した。溶液の色の目視テストにおいては視角2°の視野及び散乱昼光を用いる必要がある。ヒトの目の平均的な感受性は $\bar{x}_\lambda$ 、 $\bar{y}_\lambda$ 及び $\bar{z}_\lambda$ の分散係数で表される(図1)。

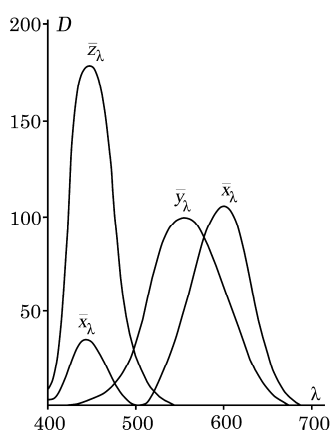


図1 CIE視角2°の視野でのヒトの目の平均的感受性(D: 分散係数; λ: 波長nm)

全ての色における各受容体タイプの刺激量は3刺激値(X, Y及びZ)によって定義される。
 分散係数と3刺激値(X, Y及びZ)の関係は次の積分で表される。◇日本産業規格Z 8120の定義によると、一般に可視光の波長範囲の短波長限界は360 ~ 400 nm, 長波長限界は760 ~

830 nmにあると考えてよい。◇

$$X = k \int_0^{\infty} \bar{x}_\lambda S_\lambda d\lambda$$

$$Y = k \int_0^{\infty} \bar{y}_\lambda S_\lambda d\lambda$$

$$Z = k \int_0^{\infty} \bar{z}_\lambda S_\lambda d\lambda$$

$$k = 100 / \int_0^{\infty} \bar{y}_\lambda S_\lambda d\lambda$$

k: 一つの受容体タイプと使用した光源を特徴付ける基準化係数

S_λ : 光源の相対分光分布

$\bar{x}_\lambda$, $\bar{y}_\lambda$ 及び $\bar{z}_\lambda$: CIE 視角2°の視野の測色標準観測者におけるカラーマッチング分散係数

$\bar{f}_\lambda$: 物質の分光透過率係数 T_λ

λ : 波長(nm)

実際の3刺激値の計算において、積分は次式に示すように近似的な和で求める。

$$X = k \sum_{\lambda} T_{\lambda} \bar{x}_{\lambda} S_{\lambda} \Delta \lambda$$

$$Y = k \sum_{\lambda} T_{\lambda} \bar{y}_{\lambda} S_{\lambda} \Delta \lambda$$

$$Z = k \sum_{\lambda} T_{\lambda} \bar{z}_{\lambda} S_{\lambda} \Delta \lambda$$

$$k = \frac{100}{\sum_{\lambda} S_{\lambda} \bar{y}_{\lambda} \Delta \lambda}$$

3刺激値を用いてCIEのLab色空間座標: L^* (明度又は輝度), a^* (赤色-緑色)及び b^* (黄色-青色)を計算することができる。これらは次のように定義される。

$$L^* = 116 f(Y/Y_n) - 16$$

$$a^* = 500 [f(X/X_n) - f(Y/Y_n)]$$

$$b^* = 200 [f(Y/Y_n) - f(Z/Z_n)]$$

ここで、

$$X/X_n > (6/29)^3 \text{ のとき } f(X/X_n) = (X/X_n)^{1/3}$$

それ以外の場合は

$$f(X/X_n) = 841/108 (X/X_n) + 4/29$$

$$Y/Y_n > (6/29)^3 \text{ のとき } f(Y/Y_n) = (Y/Y_n)^{1/3}$$

それ以外の場合は

$$f(Y/Y_n) = 841/108 (Y/Y_n) + 4/29$$

$$Z/Z_n > (6/29)^3 \text{ のとき } f(Z/Z_n) = (Z/Z_n)^{1/3}$$

それ以外の場合は

$$f(Z/Z_n) = 841/108 (Z/Z_n) + 4/29$$

72 X_n , Y_n 及び Z_n は精製水の3刺激値である.

73 分光光度法において, 透過率は, 可視スペクトルの全範囲の
74 異なる任意の波長で得られる. そしてそれらの値と視角2°の視
75 野の測色標準観測者及びCIE標準光源Cの荷重係数 $\bar{x}_\lambda$, $\bar{y}_\lambda$ 及
76 び $\bar{z}_\lambda$ を使って3刺激値を計算する(CIEの刊行物参照).

77 2. 分光光度法

78 装置に添付されている操作法に従い適切に分光光度計を操作
79 し, 10 nm以下の間隔で少なくとも400 nmから700 nmで透過
80 率 T を求める. 透過率は%で表わせる. 3刺激値 X , Y 及び Z 並
81 びに色空間座標 L^* , a^* 及び b^* を計算する.

82 3. 色調の測定

83 装置に添付されている操作法に従い装置の校正を行う. シス
84 テムの性能試験は装置の使用状況によって各測定前又は決めら
85 れた間隔ごとに行う. そのために測定範囲において適切な標準
86 物質(装置の製造元が求める保証されたフィルター又は標準液)
87 を用いる.

88 装置の操作法に従い操作し, 同じ測定条件(例えば, セル長,
89 温度など)で検液と標準液を測定する.

90 透過率の測定には, 標準として精製水を用い, 可視スペクト
91 ルの全ての波長で透過率を100.0%とする.

92 CIE標準光源Cの荷重係数 $\bar{x}_\lambda$, $\bar{y}_\lambda$ 及び $\bar{z}_\lambda$ を使い, 色空間座
93 標 $L^*=100$, $a^*=0$ 及び $b^*=0$ に対する3刺激値を適切に計算す
94 る.

95 標準測定は, 精製水又は新たに調製した色の比較液の色空間
96 座標を用いて行われるか, 若しくは同じ条件で測定された装置
97 の製造元のデータベースにあるそれぞれの色空間座標を用いて
98 行われる.

99 検液が濁っていたり, 霞んでいたたりしているときは, ろ過又
100 は遠心分離する. ろ過又は遠心分離しない場合は, 濁りや霞を
101 結果として報告する. 気泡が入らないようにし, 入った場合は
102 除去する.

103 色, 色差又は決められた色との差に関して, 機器分析法を用
104 いて二つの溶液を比較する. 検液 t と色の比較液 r の色差 ΔE^*_{tr}
105 を次式で求める.

$$106 \Delta E^*_{tr} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

107 ここで, ΔL^* , Δa^* 及び Δb^* は色空間座標における差である.

108 CIE Lab 色空間座標の代わりにCIE LCh 色空間座標を用いる
109 こともできる.

110 4. $L^*a^*b^*$ 色空間内の位置の評価

111 測定機器から $L^*a^*b^*$ 色空間の範囲内で検液の実際の位置に
112 関する情報が得られる. 適切なアルゴリズムを用いることによ
113 って, 対応する色の比較液との比較(「検液は色の比較液XYと
114 同じ」又は「検液は色の比較液XYに近い」若しくは「検液は
115 色の比較液XYとXZの間」など)ができる.

1 クロマトグラフィーのライフサイクル各ステージにおける管理戦略と変更管理の考え方(クロマトグラフィーのライフサイクルにおける変更管理)〈G1-5-181〉

医薬品の分析法(分析手法)は、目的に適った試験結果を与えるよう設定されなければならない。このことは、分析法のデザインから、開発、適格性評価、そして継続的検証に至るまでの分析法ライフサイクル全体において考慮される必要がある。医薬品開発の特に製造管理及び品質管理の分野においては、品質リスクアセスメントによるライフサイクル全体にわたる系統立った品質確保の取り組みが実践されている(参考情報「品質リスクマネジメントの基本的考え方」〈G0-2-170〉)。同様の取り組みを分析法のライフサイクル各ステージにおける管理戦略として適用する取り組みが示されている¹⁾⁴⁾。

医薬品やその構成成分、不純物の分析手法の中で各種クロマトグラフィーが汎用されている。このような中、クロマトグラフィーを用いた試験法に関する国際調和に伴い、分析条件の変更に関する手引きが示された(クロマトグラフィー総論〈2.00〉)。しかし、分析条件変更の要因やタイミングは様々であり、ライフサイクル全般における位置づけを考慮した変更管理が必要となる。そこで、本参考情報では、クロマトグラフィーのライフサイクル各ステージにおける管理戦略策定の方法論を段階ごとに概括し、分析法の変更を含む分析法の管理がより効率的に行われることを目的とする。下記に示す方法論は、新たな規制要件の追加や緩和を意図するものではなく、従来、試験室で行われてきた作業を系統的に文書化したものととらえることができる。また、公的試験検査機関での医薬品品質試験においても本文書に記載の変更管理の考え方が参考となる。

1. 試験の目的に適う試験結果を与える分析法

分析法をデザイン・開発する前に、まずは、分析法開発の目的・目標(目標プロファイル)が暫定的に設定され、開発後期にかけて最終化されていく。クロマトグラフィーを有効成分などの定量分析に用いる場合は、報告される結果が、不純物や添加剤などの存在下で、表示量を含む一定の範囲にわたり、ある真度と精度により分析対象物を定量できなければならない。また、不純物の定量試験では、報告の閾値³⁾から規格限度値の120%の範囲内で、試料中に存在する様々な成分の存在下で、ある真度と精度により不純物を定量できなければならない。5項で述べるように、例えば、不純物プロファイルの変化などにより、分析法を変更する、あるいは分析法自体が不要となることもあるが、この分析法の目標プロファイルはライフサイクル全般にわたり、分析性能特性が適切であるかどうかの指標となり得る³⁾。ここで、分析性能特性とは、主として、参考情報「分析法バリデーション」〈G1-1-130〉の“分析能パラメーター”で評価される特性である。(日本薬局方に規定する試験法では、医薬品各条に示された規格値や判定基準が目標プロファイルとなり得る。)

2. クロマトグラフィー案の策定と開発

分析法の目標プロファイルが提案されると、これを基に分析法の案を策定し、分析法の確立を行う。確立の過程においては、

リスクアセスメントを行うことで、分析システムを含む一連の分析操作における変動要因とそれらが報告値に与える影響の理解が深まる。特性要因図(石川ダイアグラム)などの手法により変動要因を探り、その原因を探り、排除していくことになる。その際、真度や精度だけでなく、それらに影響を与える特異性や直線性など、目標プロファイルで提案した関連する様々な分析能パラメーターの妥当性が確認される。一連の妥当性確認により、分析法の目標となるプロファイルはキーとなる分析性能特性に反映され³⁾、同時にそれらの実験の結果から、変動要因を特定し、分析法を修正していくことが可能になる。また、実験計画法(DOE)などにより、変動要因間の関係性を明らかにすると共に、分析法が異なった状況で行われた場合に起こり得る変動の程度を調べることができる。そして、管理すべき変動要因とその許容可能な変動範囲が明確になり、分析法が最適化されていく。この分析法策定の過程で取得された適切な実験結果を、バリデーションデータに代わるものとして使用できる場合がある。

リスクアセスメントの結果から管理戦略を策定する。管理項目としては、例えば、温度、試料溶液の安定性、繰返し回数なども含まれるだろう。後述のようにシステム適合性の要件もあるだろう。

変数的な変動要因(例えば移動相pHやカラムサイズ)として管理できない、分析法に残されている変動要因の影響を評価するため、適切なチェック試験としてシステム適合性試験(System suitability test)が設定される(参考情報「システム適合性」〈G1-2-181〉)。したがって、システム適合性試験は、以下に記す分析性能の適格性評価段階では、最小限の管理手法として考慮されるべきである。システム適合性試験は、影響され得る分析性能特性に焦点を当てて、目標プロファイルの要件を満たすと考えられることが保証されるように設定される必要がある。システム適合性試験では、例えば、分離度やシンメトリ係数などが設定される。

3. 適格性評価の準備段階

変動要因の明確化、集積された知識により、分析法の管理戦略が提案され、分析能力が適格となる準備が整う。

すなわち、既に日本薬局方に規定する試験法が存在する場合は、当該試験法をベースとして、更に実際の分析を行う試験室でどの程度追加の変動要因があるか、どこまで事前の情報が得られているかをあらかじめ把握・検討する必要がある。追加の変動要因には、例えば、試料、試薬、施設、機器、更に、それらの変動に伴い生じ得る繰返しの回数が挙げられる。日本薬局方に規定する試験法を適用する際、多くの場合は試験者が当該分析法の開発の間に得られた知識や理解を有していないため、試験者はこの追加の変動要因に起因するリスクの可能性を認識し、分析性能の適格性評価などにより、上記リスクが適切に軽減されるように保証する必要がある。(独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトで公開されているカラム情報などは事前の情報として有用だろう。)

4. 分析性能の適格性評価

適格性評価の目的は、日常的に使用される試験室で分析法が目標プロファイルを常に満たすことを確認することである。適格性評価のための試験実施に当たっては、プロトコールが作成され、手順書と適切な管理に従って実行される。試験の結果、例えば、報告値のばらつきが目標プロファイルの要件を超える

恐れがある場合には、当該試験室に対して管理戦略が最適化されているか検討し、変動要因を特定し、分析法の管理戦略が改善・改訂されることもある。日常的に使用される試験室で分析法開発がなされた場合、分析性能の適格性評価を省略できる場合がある。

日本薬局方に規定する試験法適用の際も、実験室や機器が異なれば、異なる管理戦略が必要になる。日本薬局方に規定する試験法を実施する試験室における適格性評価のために、医薬品各条中の規格値や判定基準の意図する目標プロファイルに合うように分析法の品質リスクマネジメントのプロセスが考慮されるべきである。

日本薬局方に規定する試験法適用時の適格性評価では、分析法を確立する際と同程度に分析能パラメーターの妥当性確認を再度行うことは必須ではないが、参考情報の「分析法バリデーション」(G1-I-130)にある分析能パラメーターのうち適切なものを用いて適格性を確認する必要がある。実施内容は、分析法のタイプ、関連する機器などを考慮する。さらに、試験試料に由来する要素に留意すべきである。例えば、日本薬局方に規定する試験法適用の際に、原薬及び製剤により異なる可能性のある不純物は、当該試験法の「特異性」に影響を与え得る。システム適合性試験で分離度が設定されている場合は、まずは、分離度で影響を確認し、特異性が低下している場合には、分析結果に与える影響を精査する。分析性能が低下している場合は、分析条件の検討が必要になるであろう。その他、特に製剤の添加剤が異なることにより、分析対象物質への妨害(特異性)、検出(検出限界)、添加回収率(真度)、定量値のばらつき(精度)に影響を与える可能性があるため、システム適合性試験や参考情報の「分析法バリデーション」(G1-I-130)にある分析能パラメーターのうち適切なものを用いて適格性評価を行う。

5. 分析法の継続的な検証

1) 日常的なモニタリング：この段階では、分析法の性能に関わるデータ、例えば、分析結果、システム適合性への適否、規格値からのずれや特定の傾向などのデータを収集し、解析する。もし、システム適合性への不適合、規格値からのずれや特定の傾向が明らかになった場合には、その原因解明に向けて検討を行い、修正や予防対策が行われなければならない。

2) 分析法の変更：医薬品の製造と同様、分析法にも継続した改善活動や異なる環境での分析のために、変更を加えることもあるであろう。日本薬局方に規定する試験法を新たに適用する場合も、現在ある装置やカラムに合わせた変更が必要になる場合もあるであろう。さらに1)の日常的なモニタリングの結果、分析法の変更が必要となることも想定される。変更の程度に応じて、その変更が試験結果に及ぼす影響を評価するための作業内容や作業量は異なる。以下に想定される変更の事例を挙げる。

①分析法開発時に評価した分析手法の許容可能な変動範囲内で変更する場合は、その変更の影響評価はケースバイケースで行い、変更後の分析手法が目標プロファイルを常に満たしていることを確認することが必要である(ただし、分析法開発時にこのような変動範囲について検討していない場合には当てはまらない。)。なお、個々の条件変更は許容可能な変動範囲内であっても、複数の条件を変更することにより、以下の②と同様の対応を必要とする場合もある。

②分析法開発時に評価した分析手法の許容可能な変動範囲を

超えて変更する場合は、リスクアセスメントを必要とするであろう。また、分析法開発時に品質リスクマネジメントにより変更許容範囲が検討されていない場合も、分析条件を変更する場合は、リスクアセスメントが必要となる。リスクアセスメントは、どの分析性能特性(分析能パラメーター)が変更により影響を受ける可能性があるかを考慮する。そして、変更により、分析性能が目標プロファイルを外れないことを確認するために適格性評価を行う(4.を参照)。具体的には、参考情報「分析法バリデーション」(G1-I-130)の分析能パラメーターのうち変更の影響を受ける可能性がある分析能パラメーターを用いて検証する。変更の影響を受ける可能性がある分析能パラメーターが、システム適合性試験の1項目として設定されている場合は、当該分析能パラメーターについてシステム適合性試験を用いて検証できる場合もある。さらにクロマトグラフィーにおけるカラムサイズや移動相組成などの変更においては、クロマトグラフィー総論(2.00)の「クロマトグラフィー条件の調整」を参考にし、変更の際に適切に分析性能の検証を行う。

③試験室を変更する、あるいは日本薬局方に規定する試験法を新たに適用する場合は、分析装置、試験者、試薬などの変化に伴い分析性能特性に影響を受ける可能性があるため、リスクアセスメントを行い、適切な適格性評価を行う(3., 4.を参照)。一方、同じ試験室において分析装置やカラムの更新、試験者の交替などを行う場合には、変更した分析システムにより、少なくともシステム適合性の試験を行って、変更前後で同等の結果が得られることを確認する。

④新しい分析法や技術へ変更する場合には、新しい手法が目標プロファイルに合致するか示すために、新しい分析法の開発時に適格性評価を行う必要がある(2., 3., 4.を参照)。

⑤目標プロファイルに影響するような変更(例えば、規格値の変更、元の目標プロファイルで考慮していなかった不純物などの新たな分析物を測定するための手法への変更)の必要が出てきた場合は、目標プロファイルを更新し、分析法が新しい目標プロファイルの要求を満たすかどうか評価するために、現在の分析法と適格性評価の見直しが必要になるであろう(1., 2., 3., 4.を参照)。

分析法の変更が目的に合う試験結果を与えるかどうかを確認するための作業の程度は、①変更に伴うリスク、②当該分析法について得られている知識、③管理戦略、に依存する。どのような変更をしたとしても、程度の差はあれリスクアセスメントを行い、これにより変更された分析法が試験法の目的に合う(つまり、目標プロファイルで規定された範囲の)結果を与えることを確認する。

6. 参考資料

- 1) G.P. Martin, et al., Pharmacopeial Forum 39 (5), (2013).
- 2) Proposed New USP General Chapter: The Analytical Procedure life cycle<1220>, Pharmacopeial Forum 43 (1), (2017).
- 3) K.L. Barnett, et al., Pharmacopeial Forum 42 (5), (2016).
- 4) E. Kovacs, et al., Pharmacopeial Forum 42 (5), (2016).
- 5) ICH: Guideline for Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances.

1 原子間力顕微鏡によるナノ粒子のサイズ及び 形態解析法 (G1-9-182)

原子間力顕微鏡法(AFM : Atomic Force Microscopy)は、カンチレバーに装着されたナノメートルオーダーの曲率半径を持つ微小な探針(図1)と試料表面の原子間に働く力を検出することでナノ粒子の画像を取得し、そのサイズや形態、表面形状を解析する解析手法である。大気中及び液中で実施することが可能である。また、ナノ粒子の剛性などの力学的特性を測定することも可能である。AFMはナノテクノロジーを応用した医薬品の特性解析に利用されている。

1. 装置及び動作原理

1.1. AFM装置

AFMは、半導体レーザー、AFMヘッド(カンチレバーが装着される機器の構成部分)、探針の付いたカンチレバー、試料ステージ、分割フォトダイオード受光部などから構成され、カンチレバーに照射するレーザーのアラインメントを適切に実施できるよう、光学顕微鏡及び荷電結合素子(Charge Coupled Device : CCD)カメラを搭載したものをを用いる(図1)。このAFMシステムは除振台に設置し、測定に影響を及ぼす振動を防止する。

1.2. AFM動作原理

AFMの動作原理の一般的な概要は以下のとおりである(図1)。

- 1) 半導体レーザーがカンチレバーの背面に照射され、反射されたレーザー光は分割フォトダイオード受光部で常にモニターされている。
- 2) カンチレバーが試料の表面近傍に近づくと、表面間力(引力又は斥力)により生じる曲げモーメントに応じてカンチレバーがたわむ。このたわみは分割フォトダイオード受光部におけるレーザー検出位置の上下変位として計測される。
- 3) カンチレバーのたわみが一定となるように、試料ステージ又はAFMヘッドに付随しているピエゾ駆動装置によってカンチレバー―試料表面間の z 軸方向での距離を制御しながら、試料の x , y 方向に対してカンチレバーが走査される。

以上の1) ~ 3)の動作原理に基づき、ピクセルごとに高さ情報が保存されたAFM画像が得られる。実際の画像取得では、測定対象のナノ粒子は平らな固体基板上に固定されており、粒子の高さは基板表面から測定された値になる。ナノ粒子のサイズ測定において、対象粒子が球状であると仮定すると、AFMで測定される高さは、粒子の直径に相当することになる。さらに校正用標準試料を利用することにより、AFM画像における z 軸方向の高さ情報は高い真度と精度を有する。一方、AFM画像の側方次元(x , y)情報は、校正の困難さや探針の形状による影響を考慮する必要がある。

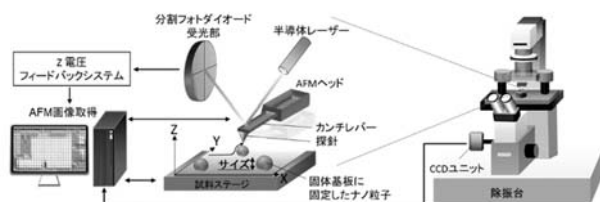


図1 代表的な原子間力顕微鏡システムと画像取得用PCの概略図¹⁾

1.3. その他の装置

防音ボックス：外部音による振動の影響を避けるために、原子間力顕微鏡システムを収容する防音ボックスを利用する場合がある。

UV照射洗浄装置：カンチレバーを洗浄する場合に利用できる。

温度制御装置：温度を一定に保つ必要がある試料測定に利用できる。

2. 測定

AFMによるナノ粒子のサイズ測定は、一般に以下の手順で実施される。

2.1. 測定試料の調製

測定対象のナノ粒子を適当な溶媒に適切な濃度となるように分散させた試料を調製する。溶媒・濃度はナノ粒子が安定に分散状態を保持するよう設定する。

2.2. ナノ粒子を固定するための基板の準備

AFMにより画像を取得する上で、観察対象試料の固体基板への固定は必須である。観察対象試料の物理的・化学的特性により適切な基板を選択することは、観測粒子数や形態など、最適な条件を検討する際の重要な要素である。

高さ測定において安定したベースラインを確保するために、基板の表面粗さは測定対象の粒子に比較して十分に平らでなければならない。測定対象の粒子サイズの5%以下の表面粗さ(表面の凹凸について、中心線からの偏差の絶対値平均である算術平均粗さ)であることが望ましい。また、ナノ粒子を容易に固定するために基板表面の物性が比較的均一であることが重要である。

一般に、安定に分散しているナノ粒子の表面は正又は負に帯電しており、それら粒子の固体基板への固定は、静電的相互作用によることが多い。例えば、負荷電のポリスチレン標準ナノ粒子は、正に帯電した固体基板表面へ容易に固定できる。粒子と基板間の表面間力がファンデルワールス相互作用や疎水性相互作用に依存する、固定する対象粒子が柔らかく基板との相互作用により変形・崩壊が生じるなど、特に相互作用が複雑になる場合には、固体基板の選択に多くの検討が必要になる。代表的な基板として、市販されているAFM測定用の高品質マイカ(muscovite mica)、金(111)蒸着マイカ、単結晶性シリコンなどが挙げられる。これらの基板は原子レベルで平坦であり、基板表面の荷電状態を制御するための表面処理が可能である。例えば、負に帯電したナノ粒子を固定する場合には、0.3 vol%の3-アミノプロピルトリエトキシシラン(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)水溶液で正に帯電するように表面処理を行うことが可能である。その他、表面粗さが約5 nm以下の比較的平坦なカバーガラスが市販されており、測定対象の粒子サイズが約100 nm以上の場合には基板として用いることができる。使用する基板の表面粗さを把握するために、あらかじめAFMにより画像を取得しておくことが望ましい。

2.3. ナノ粒子の固体基板への固定

適切な基板にナノ粒子の液体試料を滴下し、粒子が基板に固定されるのに十分な時間、インキュベーションを行う。空气中

98 で画像の取得を行う場合には、インキュベーション後に基板を
99 超純水でリンスして塩などの余分な成分を除き乾燥させる。

100 2.4. AFM画像の取得

101 2.4.1. 測定モードの選択

102 ナノ粒子は、静電的相互作用やファンデルワールス相互作用
103 などの弱い分子間相互作用により基板に固定されている。その
104 ため、AFMの測定モードによって側方次元にかかる力を最小
105 限に抑えることが重要である。この要件に適した測定モードの
106 一つに、インターミッテントコンタクトモード(ダイナミック
107 モード、タッピングモード、ダイナミックフォースモード、振
108 幅変調モードとも呼ばれる)が挙げられ、市販されているほと
109 んどのAFMで利用可能である。一方、近年、カンチレバーを
110 加振しない非共振の測定モード(フォースカーブマッピング)が、
111 特に柔らかい試料の観察や力学的特性(硬さなど)の測定に用い
112 られることもある。

113 インターミッテントコンタクトモードでは、カンチレバーホ
114 ルダーに取り付けられた小さなピエゾ素子によってカンチレバ
115 ーを共振周波数付近の振動数で上下に振動させる。振動振幅は、
116 探針-試料間距離に極めて敏感であり、探針が試料表面に接触
117 すると、カンチレバーの運動エネルギーは試料側に散逸し、急
118 激に振動振幅が小さくなる。この振動振幅が一定になるように
119 探針-試料間距離をフィードバック制御しながら絶えず上下振
120 動させて試料中の粒子表面を走査するために、側方次元にかか
121 る力がほとんど生じないという利点がある。そのため、動きや
122 すい試料、凹凸のある試料、柔らかな試料、表面への吸着があ
123 る試料などにも有効な測定モードである。ナノ粒子のサイズ測
124 定は、空気中及び液中のいずれの環境でもインターミッテント
125 コンタクトモードによって可能である。以降は、インターミッ
126 テントコンタクトモードによる画像取得方法を述べる。

127 2.4.2. カンチレバーの選択

128 カンチレバー及びその先端に取り付けられている探針の特性
129 及び形状は、AFMの感度と解像度を決定する重要な因子であ
130 る。留意すべき点を以下に挙げる。

131 AFMで得られる画像には、探針形状と試料粒子形状の両者
132 に由来する要因が含まれる。つまり、探針の形状は高さ測定に
133 影響を与えないが、 x 、 y 方向での形状表示に影響を与えるため、
134 ナノ粒子の x 、 y 方向でのサイズ情報の扱いには注意が必要であ
135 り、探針形状によるアーチファクトを最小化するために、10
136 nm以下の先端半径をもった探針の使用が推奨される。

137 安定したカンチレバーの励起振動は、インターミッテントコ
138 ンタクトモードによる試料表面の画像化に重要な要素であり、
139 探針-試料粒子間の付着力(例えば、毛管力、ファンデルワール
140 ス力、静電力)を克服することができる大きな剛性(高いバネ
141 定数)をもつカンチレバーの使用が望ましい。一方で、カンチ
142 レバーの接触による力で粒子が変形する可能性があるため、測
143 定対象粒子の剛性に比較して小さい剛性(低いバネ定数)のカ
144 ンチレバーを用いることが望ましい。共振周波数の高いカンチレ
145 バーを使用すると、走査の感度が良くなり測定時間を短縮でき
146 るが、通常その剛性(バネ定数)は大きいために測定対象粒子へ
147 のダメージに留意が必要である。また、大気中観察及び液中観
148 察で、カンチレバー剛性の使い分けが必要なことがある。これ
149 らの点を考慮して、カンチレバーの選択を行い、必要に応じて
150 カンチレバーの最適化を行う。

151 2.4.3. AFM画像の取得

152 調製した試料をAFMの試料ステージにセットし、AFM画像
153 を取得する。AFM画像は x 、 y 平面座標と垂直 z 座標の情報を持
154 つ。画像の取得及び解析の際には、 x 、 y 平面のデータポイント
155 数、すなわちピクセル数を考慮する必要がある。例えば、一辺
156 200ピクセルの10 μm $\times$ 10 μm 画像を得た場合、1ピクセル当
157 りのサイズは50 nm $\times$ 50 nmとなる。この設定条件では、
158 50 nm以下の粒子を識別することができない。したがって、測
159 定対象の物質のサイズを考慮してスキャンサイズを設定する。
160 測定の際、一般的には1粒子当たり10ピクセル以上となるよう
161 にスキャンサイズを設定することが望ましい。AFMによる粒
162 子の平均サイズと粒度分布の解析では、代表的な粒子を無作為
163 に抽出していることを保証することが重要になる。一般的に、
164 少なくとも100個程度のナノ粒子のサイズを測定することや、
165 また、単一の視野での測定の作為性を避けるために、視野を変
166 えて画像を取得することが推奨される。画像取得中に画像の質
167 が突然悪くなった場合には、カンチレバーが汚染されたり磨耗
168 したりしていることが原因であることが多いので、カンチレバ
169 ーを洗浄又は交換することを検討する。

170 ナノ粒子を固定していない基板を用意し、同じ条件でAFM
171 画像の取得を行う。これにより、測定対象とするナノ粒子と誤
172 って判断してしまう可能性のあるアーチファクト又は異物が、
173 計測作業や基板そのものから混入していないことを保証するこ
174 とができる。

175 3. 画像解析とナノ粒子のサイズ(高さ)計測

176 取得したAFM画像は、AFM機器メーカーにより提供されて
177 いるソフトウェアを用いて、試料の設置や装置の熱ドリフトな
178 どに由来する画像上の高さの傾きを補正した後、解析を行う
179 (他の開発者によるAFM画像解析ソフトウェアも利用可能であ
180 る)。ナノ粒子のサイズ測定において、必須となるデータ解析
181 の操作について述べる。

182 3.1. 断面形状解析によるサイズ測定

183 ソフトウェアの断面形状解析ツールを用いると、画像中の任
184 意の部分に引いた線に沿った垂直方向の断面形状プロファイル
185 を取得することができ、水平・垂直方向の距離の測定が可能で
186 ある。断面形状プロファイルを取得すれば、ナノ粒子の高さだ
187 けでなく、ナノ粒子の凝集性も知ることができる。また、ナノ
188 粒子周辺の基板部分における傾き補正の適切性に関する情報を
189 得ることができる。画像中の各ナノ粒子について断面形状解析
190 を行い、粒子の高さを測定する。高さ測定の基準点は、全デー
191 タの最下点を基準に取る方法、走査方向に対して粒子形状の立
192 ち上がりの際を基準点とする方法、測定者が任意に基準を設定
193 する方法などがある。いずれを採用する場合でも同じ条件で一
194 連の測定を行う。試料調製に伴うアーチファクトの影響を避け
195 るために、明らかな異物粒子や粒子同士を区別できない大きな
196 凝集物は粒子サイズの平均値を算出する際に除外する。

197 3.2. 自動粒子解析によるサイズ測定

198 ソフトウェアを用いて粒子を自動で認識し、粒子サイズ測定
199 を一括して短時間で行うことが可能である。粒子の認識は、ユ
200 ーザーが設定する高さの閾値に基づき行われる。すなわち、設
201 定値以上の高さを持つ粒子は解析に含まれ、設定値以下の高さ
202 の粒子は解析から除外される。また、明らかな異物の粒子や粒
203 子同士を区別できない大きな凝集物はソフトウェア上で選択し
204 解析対象から除外できる。以上の操作後、基板の高さを基準と

した個々の粒子における最大高さが自動的に測定される。自動粒子解析を行う際には、解析対象となる画像の傾き補正が適切に行われた状態でなければ、結果に人為的な影響が出てしまうので注意する。自動粒子解析を行う際、結果が正しく出力されているかを断面形状解析による結果と照らし合わせて妥当性を確認しておくようにする。自動解析ソフトによるナノ粒子の平均高さは、断面形状解析による平均高さよりも大きくなる傾向にある。なお、ソフトウェアには、画像中における粒子個々の占有面積から粒子サイズを解析するものもある。この場合、粒子サイズは面積相当直径として解析される。

3.3. 真球以外の形状を有するナノ粒子の解析

粒子サイズを評価するにあたり、粒子が基板に固定されたときに変形が起きる場合や、対象となる粒子の形状が球形でない場合には、高さとは別に、粒子解析ソフトを利用しながら他のパラメーターの追加解析を検討することも重要であろう。例えば、粒子が基板に固定されたときに変形が起きる場合には、基板への固定前後で体積が一定であると仮定し、体積相当直径がサイズ評価パラメーターとして利用できるであろう(図2A)。加えて、面積相当直径や、高さ／面積相当直径比によって対象粒子の変形した形状についての情報を得ることもできる(図2A)。また、対象粒子が楕円形状である場合には、粒子が楕円に相当すると仮定した場合の長径及び短径を測定することが可能であり、更に短径／長径比を用いることで粒子の扁平率から形状について評価することもできる(図2B)。側方(x,y)次元の情報が入り込む粒子が球形でない場合の解析においては、カンチレバーの先端曲率の影響を大きく受けるため、校正用格子を用いたカンチレバー先端形状の評価などを行い、十分注意する。

択し、鋭い探針を使って少なくとも三つの異なる場所で測定したステップ高さの平均値を、校正用格子で保証されている高さの値と比較する。

測定された平均値が保証された値と大きく異なる場合、製造業者などによるピエゾ駆動装置のz変位の再校正について検討する必要がある。

一方、近年のAFMでピエゾ素子に測長センサーを付随させた装置では、ピエゾ素子がどれだけ伸縮したかを精密に測ることができるため、高さzは常に測定されている。つまり、常に高さ補正・変位補正を続けている制御方法を有する装置も存在する。

参考資料

- 1) 加藤くみ子ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 50, 634-640 (2019).
- 2) ASTM E2859-11 : 2017, Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles using Atomic Force microscopy.

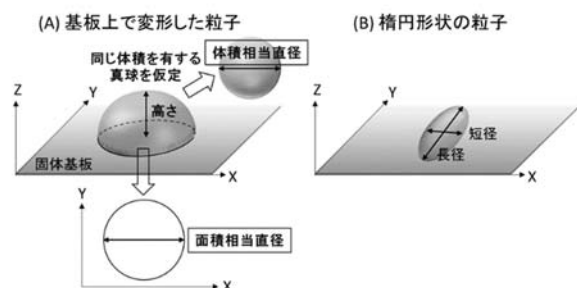


図2 基板上で変形した粒子(A)及び(B)における形状評価¹⁾

3.4. サイズデータの報告

測定されたナノ粒子のサイズ(高さ)分布と、その平均値及び標準偏差を報告する。測定に関わる因子はナノ粒子のサイズ測定結果に影響を与えるため、ナノ粒子の固定化方法、カンチレバー、測定モード、測定環境が空気中か液中か、測定したナノ粒子の個数及びサイズの解析方法に関する情報を記載すべきである。

4. AFMの性能確認

AFMでは、カンチレバーのz位置を、ピエゾ素子の伸縮によって距離制御している。その伸縮は印加した電圧に対して非線形性やヒステリシスなどの性質を有している。従来のAFMでは、ピエゾ素子に印加した電圧から高さzを求めている。しかし、上記の性質のために、高さが保証された実際の試料を測って検量線などを作成し「高さ補正」をする必要がある。例えば、測定するナノ粒子の高さに近いステップ高さの校正用格子を選

1 日本薬局方における秤量の考え方〈G1-6-182〉

日本薬局方一般試験法「計量器・用器〈9.62〉」のはかり(天秤)及び分銅の項において、日本薬局方におけるはかり(天秤)及び分銅は、国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確保された校正を実施しておくことが要求されている。

計量計測におけるトレーサビリティとは、「個々の校正が、測定不確かさに寄与する、文書化された切れ目のない校正の連鎖を通して、測定結果を計量参照に関連付けることができる測定結果の性質」¹⁾と定義されている。計量計測トレーサビリティの源として最も上位のものは、メートル(長さ)、キログラム(質量)、秒(時間)、アンペア(電流)、ケルビン(熱力学的温度)、カンデラ(光度)、モル(物質質量)の国際単位系(SI)基本単位であるが、はかり(天秤)の場合、質量に関してトレーサビリティが保証される校正が実施されていることが基本となる。トレーサビリティの要素には、a)切れ目のない比較の連鎖、b)測定不確かさ、c)文書化、d)技術能力、e)国際単位系(SI)への参照、f)校正があるが、本項では、このf)を要求している。また、日本薬局方で使用されるはかり(天秤)には、繰返し性(併行精度)の要件、正確さ(真度)の要件とともに、国際単位系(SI)へのトレーサビリティが確保された校正の実施が規定されており、これらを満たすことで、秤量結果が、国際単位系(SI)トレーサブルな結果になり得る。

一方、日本薬局方における計量では、常に国際単位系(SI)トレーサブルな結果を求めているわけではない。これは、日本薬局方に使用する標準品、標準物質のほとんどが、国際単位系(SI)トレーサブルでないマスバランス法による計量により値付けされていることから明らかである。日本薬局方における分析は、決められた規則に従って実行し、規格(値)を満たすかどうか判断するために実施するものである。

すなわち、医薬品各条での定量規格が99.0%以上とされていれば、医薬品各条に定められた定量法に従って分析するとき、有効数字を考慮して、その分析値が98.95%以上であれば、日本薬局方に適合となることから、有効数字4桁目まで正確に秤量可能であることが重要となる。通常、10 µgの桁まで表示されるセミマイクロ化学はかり(セミマイクロ化学天秤)では、上記の規則に従って校正されていたとしても、読取限度桁では、130%以上の誤差(±13 µg以上の誤差)があることが知られている²⁾。したがって、そのセミマイクロ化学はかり(セミマイクロ化学天秤)が、例えば定量法の実施時に、試料や標準品などを約0.1 g秤量する際、風袋も合わせて50.65432 gと表示したとすると、100 µgの桁である3は、ほぼ正確であると考えられることから、十分に定量法に使用する試料や標準品などの秤量に使用可能となる。日本薬局方における多くの定量法では、必要とする有効数字は最大4桁であるが、例えば0.10%の水分含量や4.0%の乾燥減量であれば、算出に必要な有効数字は3桁、0.1%の強熱残渣分であれば2桁となる。そのため、分析を実施する際に使用するはかり(天秤)は、これらの有効数字を満たすものを使用することが必要となる。言い換えれば、日本薬局方においては、目的に応じた考え方(fit for purpose)に沿って計量を実施することが重要となる。したがって、確認試験や純度試験としての

呈色反応に使用する0.2 gの医薬品を秤量する際には、使用するはかり(天秤)の有効数字は2桁あれば十分である。一方で、ウルトラマイクロ化学はかり(ウルトラマイクロ化学天秤)を使用して定量NMRで純度規定を行う試薬について5 mg程度秤量する場合、風袋も合わせて例えば25.2345 mgと表示したとすると、1 µgの桁である4は、ほぼ正確であると考えられる。純度の算出に使用する有効数字は3桁であることから、風袋の重さが20 mg程度であったとしても、試薬の秤量値としては4桁目がほぼ正確となり、十分使用可能となる。また、もし、マイクロ化学はかり(マイクロ化学天秤)しか保有していない場合でも、試薬を10 mg以上秤量すれば、有効数字4桁目までほぼ正確であると考えられる。

他方、秤量する際には、どのような誤差が生じているかの理解が重要となる。適切に校正されたはかり(天秤)では、秤量時の誤差を生じる要因として、感度変化、繰返し性、直線性、偏置などがある。感度変化は、その場所に加わる重力加速度の変化や温度ドリフトなどにより生じる。はかり(天秤)を移設した場合には、その場所に加わる重力加速度が異なるため、感度調整が必要な場合がある。特に、電子式はかり(天秤)は、電磁力と自由落下の加速度(重力)との釣り合いで補正され、質量が表示されるため、移設する前の場所で感度調整されたはかり(天秤)は、移設先の環境が違えば、実際とは異なった質量を表示する。また、環境の変化によっても表示値は変化するため、はかり(天秤)の内部分銅や、外部分銅を用いて感度調整を行う必要がある。

繰返し性は、同一試料をはかり(天秤)の計量皿へ複数回はかり取り取った際の表示値のまとまり度合いで、10 µg以下の桁まで読み取れる高い表示分解能を有するはかり(天秤)の性能評価に必須な特性である。

日本薬局方一般試験法「計量器・用器〈9.62〉」のはかり(天秤)及び分銅の項に示された繰返し性(併行精度)の要件により得られる結果から、そのはかり(天秤)のそのときの最小計量値が推定される。国際単位系(SI)トレーサブルな秤量とするためには、そのはかり(天秤)において、最小計量値より大きな質量のはかり取りを行うことが目安となる。

最小計量値は、そのはかり(天秤)の設置環境(設置場所の振動の有無など)、秤量時の温度変化などの影響を受けるため、経常的に最小計量値を記録しておくことは、正確な秤量にとって重要となる。なお、最小計量値とは、風袋を含めない、はかり(天秤)の精度さを確保するための秤量の下限を示す推定値であり、繰返し性(併行精度)の要件によって得られた標準偏差を用いて、最小はかり取り量の精密さを確保するために繰返し性(併行精度)が0.10%以下であることを要求している。すなわち、国際単位系(SI)トレーサブルな秤量を行う場合、最小計量値以上のはかり取りを行う必要がある。はかり(天秤)における繰返し性(併行精度)に影響を与える可能性のある要因は次のとおりである。

- 1) 最小計量値は、はかり(天秤)の性能であり、この値は環境の変化や時間の経過とともに変化する可能性がある。
- 2) 測定者が異なれば、はかり取りの方法も異なる場合がある。つまり、測定者ごとに決定される最小計量値が異なる場合がある。
- 3) 有限回数の繰返し標準偏差は、真の標準偏差の推定値であり、現実には特定できないことに留意する。

4) 最小計量値の決定は、既定の試験法に完全には合致しない場合がある。

5) 使用する風袋容器が環境によって質量に影響を与える場合には、最小計量値に影響を与える可能性がある。

これらの要因から、多くの場合、最小計量値よりも大きな値ではかり取りを行う必要がある。つまり、はかり(天秤)を使用した現実的な最小はかり取り量は、最小計量値よりもある程度大きく設定すべきである。

直線性誤差は、ゼロ点から最大秤量点までをほぼ等しく分割した各点における理想直線からの偏りの程度である。感度誤差は、直線性誤差も考慮したゼロ点からの直線の傾きの度合いであり、一般にゼロ点から最大秤量点に近づくほど誤差は相対的に大きくなり、環境変化に連動して顕著である。したがって、正確さ(真度)の要件では、許容される感度誤差を確認するため、はかり取りを行う範囲の上限付近、あるいははかり(天秤)の最大秤量値を若干下回る程度の質量の分銅を用いる。偏置誤差は、はかり(天秤)の中心から、離れた場所に荷重を加えた際の表示値の変化の程度であり、試料や採取容器が特殊な形状でなければ、配慮する必要性は低い。通常、環境における正確さ(真度)の評価には、感度、直線性及び偏置の三つの誤差が含まれるが、誤差の伝播則(二乗和の平方根)により合否基準0.10%は、次の式²⁾を満たすことになる。

$$0.10\% \approx \sqrt{\text{感度誤差}0.05\%^2 + \text{直線性誤差}0.05\%^2 + \text{偏置誤差}0.05\%^2}$$

したがって、正確さ(真度)の要件では、1回の分銅ののせ降ろしにより得られたはかり(天秤)の表示値と分銅の質量値の差として0.05%以下を要求している。言い換えれば、感度誤差に0.05%、直線性誤差に0.05%を配分しているといえる。

上記の誤差を考慮すると、はかり(天秤)の点検としては、少なくとも、はかり(天秤)の最大秤量値の5%付近に対する精密さと、最大秤量値付近(又は使用範囲の最大値付近)に対する正確さ(真度)を確認する目的で、繰返し性(併行精度)の要件と、感度誤差(正確さ(真度))の要件を実施することが求められている。なお、繰返し性(併行精度)の確認には、質量変化のない分銅を使用し、正確さ(真度)の確認には国際単位系(SI)トレーサブルな校正証明書付きの分銅を使用する。正確さ(真度)の要件を満たさない場合には、そのはかり(天秤)について不確かさ³⁾の値が得られるトレーサビリティが確保された校正を行う必要性が生じる。

144 参考資料

- 1) ISO/IEC Guide 99: 2007, 国際計量計測用語－基本及び一般概念並びに関連用語(VIM).
- 2) Reichmuth. A and Fritsch. K, Pharmaceutical Engineering 29(6), 46-58 (2009).
- 3) ISO/IEC Guide 98-3: 2008, 測定の不確かさ－第3部:測定における不確かさの表現の手引(GUM:1995).

1 はかり(天秤)の校正, 点検と分銅 (G1-7-182)

2 使用するはかり(天秤)が要求される性能を満たすことを評価
 3 するための定期的な(機器導入据付時を含む)校正では, 国際単
 4 位系(SI)へのトレーサビリティを確保することを目的として,
 5 質量の標準として使用する分銅と測定機器として用いるはかり
 6 (天秤)について, 不確かさが付随した校正結果の取得が必要と
 7 なる。校正結果の妥当性の確保のためには, 校正が国際的技術
 8 ガイドライン(ISO/IEC 17025など)に準じて行われていること
 9 が必要で, それに伴い適正に文書化された校正証明書を取得す
 10 ることまでが推奨される。

11 分銅は日本産業規格(JIS B 7609)¹⁾に準拠して, はかり(天秤)
 12 の要求を満たす公称値や精度等級を有するものを選択する。合
 13 否判定基準によっては, 点検用分銅の公称値のみを使用すれば
 14 十分な場合があるが, 点検用分銅の公称値のみを使用する場合,
 15 分銅の表示量と精度等級で決定される最大許容誤差がはかり
 16 (天秤)の正確さ(真度)の合否判定基準の3分の1を超えてはなら
 17 ない。又は点検用分銅の協定質量値(温度20℃における分銅の
 18 密度を8000 kg/m³, 空気の密度を1.2 kg/m³とみなした場合の
 19 質量値)を考慮する場合, その校正の拡張不確かさは合否判定
 20 基準の3分の1を超えてはならない。点検に複数の分銅を使用
 21 する場合, 分銅の校正の不確かさを総和する必要がある。その
 22 合計が合否判定基準の3分の1を超えてはならない。なお, 偏
 23 置や繰返し性の点検では, 校正された分銅の使用は任意である
 24 が, 点検中に分銅の質量が変化しないことを確実にすること。

25 外部分銅を使用した点検は, はかり(天秤)が要求仕様を満た
 26 していることを確実にする。はかり(天秤)の点検は個々の標準
 27 操作手順に基づいて行われ, 点検の頻度及び間隔は, 試験法や
 28 秤量に伴うリスクによって異なる。内部分銅を使用した自動又
 29 は手動で操作される感度誤差の調整は, 外部分銅を使用した点
 30 検を部分的に置き換えることができる。

31 以下の表にはかり(天秤)に関して, 機器特性ごとの確認事項,
 32 求め方及び合否判定基準を示す。

特性	確認事項	求め方	合否判定基準
感度誤差	分銅の質量値と表示値の偏差	最大秤量値付近の分銅の質量値と表示値の差を分銅の質量値で除した値	0.05%以下
直線性誤差	仕様範囲全体における質量値と表示値の偏差	仕様範囲(ゼロ点から最大秤量点)の3～6点に分割された各点の分銅の質量値と表示値の偏差の最大値	0.05%以下
偏置誤差	計量皿の中心から偏心した位置で秤量した際の質量値と表示値の偏差	中心へ分銅を置いた際の表示値と計量皿の四方へ分銅を置いた際の分銅の表示値の偏差の最大値。その際, 分銅は最大秤量値の30%以上の質量値であること。	0.05%以下
繰返し性	同じ条件(手順, 測定者, 場所など)及び短時間で同一試料を繰返しはかり取った際の, 表示値のまとまり度合い	100 mg以上で, 最大秤量値の5%程度の質量値である分銅を10回以上のせ降ろすことにより得られた表示値の標準偏差から計算する。	0.10%以下

33 なお, 取引証明に使用するはかり(天秤)のうち特定計量器の

34 検定及び検査に使用する基準分銅は, 基準分銅の検査において,
 35 校正結果の値付け及び不確かさを含めた結果の評価を実施して
 36 いない点で, 国際単位系(SI)トレーサブルな分銅ではなく, 局
 37 方で使用するはかり(天秤)の正確さ(真度)の確認には使用でき
 38 ない。

39 参考資料

40 1) 国際勧告 OIML R111-1:2004; 日本規格協会, JIS B
 41 7609:2008, 分銅

1 はかり(天秤)の設置環境、基本的な取扱方法と秤量時の留意点 (G1-8-182)

はかり取る質量は通常、最小計量値より大きい質量を目安とし、はかり取りを行う前に、秤量に使用する器具類の準備及び整理整頓(清掃)を行い、はかり(天秤)の感度調整を行う。以下に、はかり(天秤)の設置環境、基本的な取扱方法及び秤量時の留意点を記す。

1. はかり(天秤)の設置環境

はかり(天秤)は広すぎない部屋で、振動源、通風箇所、室内電灯の放射熱及び直射日光を受ける壁面を避けた、常時、周囲の環境が変化しない場所に設置することが望ましい。また、振動の影響が小さいとされる部屋の隅又は大きな柱の傍で使用することが理想的であり、はかり(天秤)が据付けされる計量台(除振台、防振台など)はそれ自身に十分な質量があり、計量台へ重量物などの負荷を加えても上下のひずみがなく堅ろうで、磁性及び帯電性に配慮されていることが望ましい。特に、読取限度桁が0.1 mg以下のはかり(天秤)は、ヒトの感覚では感じるができない微振動の試料自身への伝搬や、微振動にはかり(天秤)の計量センサーが反応することで、表示値に不安定性を起すため、設置又は移設する際には注意を払うことが必要となる。保全管理の面においても、はかり(天秤)の機器部品の劣化を避けるため、結露の要因となる急激な温度変化がない環境が必要となる。また、電子機器であるはかり(天秤)の設置環境は温度5～40℃、かつ相対湿度20～80%、静電気などの影響を考慮する場合は相対湿度45%以上が望ましい。

2. はかり(天秤)の使用前の動作確認

はかり(天秤)を使用する前には、次に示す事項について確認を行う。

2.1. 予熱待機時間の確保

電源供給後、検出器の内部温度を安定化させるために予熱待機時間を確保する。予熱待機時間は、読取限度桁が10 mg以上の場合には30分間以上、1 mgの場合には1時間以上、0.1 mgの場合には2時間以上、0.01 mg以下の場合には半日以上を確保することが望ましい。

2.2. 据付状態の確認

はかり(天秤)に装備されている水平器の気泡が中心位置にあるなど、水平器にて水平であることを確認する。水平調整の際には、はかり(天秤)が不安定でないかの確認及び計量台と接しているはかり(天秤)の足と設置面に隙間がないか目視確認することが望ましい。

2.3. 感度調整の実施

感度調整機能を備えた(調整用内部分銅が装備された)はかり(天秤)の場合、表示器のゼロ点及び最大秤量値付近について周辺温度の状態に応じて適切な感度調整を行うことが可能である。分解能が高いほど感度変化の影響は大きくなり、感度変化による測定誤差は、一般的にゼロ点から秤量する質量付近まで相対的に大きくなる。感度調整機能を備えていない機器については、最大秤量値付近の分銅を用いて、感度調整を手動で実施することが望ましい。

3. 清掃

目的物以外のはかり取りを避けるため、清掃を定期的に行う。はかり(天秤)の構造を理解し、簡易的に分解して清掃が可能な場合は、ガラスクリーナー、毛羽立ちのない布などを用いて各部をこまめに清掃し、計量皿及び計量室内は清浄な状態を保つ。

4. 計量結果に影響する外的要因の排除

計量結果に影響を及ぼす外的要因は、可能な限り排除する。吸湿、吸着、揮発又は蒸発しやすい試料の場合は、秤量値に偏りが生じないように試料の特性に応じた対策をとる必要がある。例えば、吸湿性のある試料を秤量する場合には、はかり(天秤)を恒温恒湿ボックス内に設置し、事前に試料を一定の温湿度条件になじませた後に秤量すると、再現性の良い秤量が可能となる。試料そのものの性質以外に計量結果に影響を与える外的要因について以下に記す。

4.1. 計量皿周辺と試料(採取容器を含む)間の温度差

試料の冷蔵保管、異なる温度の室外からの持ち込み、熱処理、体温による熱伝導などによって、計量皿周辺と試料間に温度差が生じる。試料及び採取容器が計量室内の温度よりも高い場合は、計量皿付近に上向きの微量な風(対流)が発生し、その現象が試料及び採取容器を押し上げる力となり表示値の減少又は不安定性を生じさせる。温度関係が逆の場合は、相対して逆の傾向が表れる。これらの現象は計量皿周辺に起こる物理的現象であるため、はかり(天秤)に風防が備えられていたとしても避けられない。したがって、はかり(天秤)の計量室内と試料、採取容器の温度が、可能な限り同等な条件ではかり取りを行う。

4.2. 空調などによる風

空調機から吹き出す風、計量室への人の出入り、及び測定者のはかり取り操作に伴って生じる空気の流れが計量皿に当たると、表示値が不安定になる。このような風の影響を抑えるには、風防を設けて、風が計量皿に直接当たらないようにする。あるいは、風が当たらないような場所に移設する。風が直接的にはかり(天秤)に吹き当たるような状態で開閉ドアを備えているはかり(天秤)を使用する際は、必要以上に開閉ドアを大きく開けないことが重要である。

4.3. 静電気

摩擦によって帯電しやすい粉体などの試料及び採取容器を用いる場合、又は計量室内が相対湿度40%以下の低湿度状態である場合では、はかり(天秤)との電荷の力の作用によって表示値が上方又は下方に変動するため計量結果に影響を与える。このような静電気への対策として、計量室の湿度を45%以上に保つ、蓄積された静電気の消散を待つ、採取容器を帯電防止加工に変更するなどが挙げられる。これらの対策が取れない場合には、イオナイザーなどの帯電した電荷を中和させる、又は消散を促進する器具を用いて可能な限り除電を行った後に、測定を行うことを推奨する。ただし、除電の際、表示値の不安定性を起す風を計量皿に直接吹きかけるような器具の使用は避ける。

1 G2. 物性関連

2 固体又は粉体の密度〈G2-1-190〉

3 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
4 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
5 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
6 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
7 される。

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

10 (2) 粒子密度 開孔部のない空隙、又は気体により置換され
11 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。

12 (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
13 体の体積として評価されることから、みかけ密度とも称され
14 る。通常、疎充填時の粉体の密度は疎充填かさ密度、タップ
15 充填時の密度はタップ充填かさ密度と定義される。

16 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、
17 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
18 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
19 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
20 であるか、その一部が非晶質である場合、試料の調製法、処理
21 法又は保存によって変化し得る。したがって、二つの固体又は
22 粉体が化学的には同一物質であっても、それらの固体構造が違
23 えば、異なる密度を与える。固体又は粉体粒子の密度は、粉末
24 状医薬品及び医薬品原料の重要な物理的特性であることから、
25 日本薬局方では、粒子密度は「粉体の粒子密度測定法
26 〈3.03〉」、かさ密度は「かさ密度測定法〈3.01〉」として、そ
27 れぞれの密度測定法を規定している。

28 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
29 り、通例、 g/cm^3 で表す($1 \text{ g}/\text{cm}^3 = 1000 \text{ kg}/\text{m}^3$)。

30 結晶密度(Crystal Density)

31 ある物質の結晶密度とは、分子の充填配列の基本部分に属さ
32 ない、全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、例えば、単結晶のX線回折データ
37 又は粉末X線回折データの指標化によって得られる結晶学的
38 データ(単位格子の体積と組成)から与えられる。

39 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、
40 その比(質量/体積)として与えられる。

41 粒子密度(Particle Density)

42 粒子密度は、結晶密度に加えて粒子内の空隙(粒子内部の開
43 じた空隙及び開孔部はあるが気体が侵入できない空隙)も粒子
44 体積の一部と評価して求められる密度である。すなわち、粒子
45 密度は測定された体積に依存し、体積の評価は測定法に依存す
46 る。粒子密度の測定は、日本薬局方では「粉体の粒子密度測定
47 法〈3.03〉」として、ピクノメーター法を規定している。

48 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ー
49 を用いて、質量既知の固体又は粉体の体積を置換された気体の
50 体積に等しいものと評価することにより求める。ピクノメータ
51 ー法による密度の測定においては、気体の侵入が可能な開孔部

52 のある空隙は粉体の体積とみなされないが、気体が侵入できな
53 い密閉状態にある空隙は粉体の体積の一部とみなされる。ヘリ
54 ウムは分子サイズが小さく、開孔部のあるほとんどの空隙に侵
55 入できるため、粒子密度測定用気体として推奨される。したが
56 って、粉体のピクノメーター法による粒子密度は、一般には結
57 晶密度とあまり違わない。このため、この方法による粒子密度
58 は、非晶質又は部分的に結晶性である試料の真密度の最良の推
59 定値とみなされ、製造工程中にある医薬品粉末の製造管理に広
60 く役立てることができる。しかし、この測定法は、測定中に昇
61 華、脱溶媒和又は(吸着水などの)脱離に起因して気体を放出す
62 る固体には適さない。

63 かさ密度(Bulk Density)

64 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
65 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
66 層中での粒子の空間配列と充填の度合いに依存する。

67 また、粉体のかさ密度は粉体層の僅かな揺動によっても、そ
68 の空間配列が変化するため、再現性よくかさ密度を測定するこ
69 とは極めて難しい。したがって、かさ密度の測定値を示す場合、
70 測定条件と共に、どのように測定したかを明記することが重要
71 である。

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

77 B. タップ充填かさ密度は、粉体を入れたメスシリンダーを機
78 械的にタップすることにより求められる。初期の疎充填体積
79 を測定した後、メスシリンダーを一定の測定条件(タップ速
80 度及び落下高さ)で機械的に規定の回数タップし、連続する2
81 回の測定間で体積変化が許容範囲内となるまで測定を繰り返
82 す(定質量法)。別に日本薬局方では、タップ充填された一定
83 容量の粉体の質量を測定することにより、タップ充填かさ密
84 度を求める方法(定容量法)も規定している。

85

1 粉体の細かさの表示法〈G2-2-171〉

2 本表示法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した表示法である。
3 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
4 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

5 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
6 子の大多数が75 μmより大きい場合に適しているが、より小さ
7 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
8 合には用いることができる。レーザー回折・散乱法も一般的に
9 用いられる測定法であり、広い粒子径範囲に適用可能である。
10 積算分布は分析用ふるい又は他の方法により測定され、粒子径
11 については次のように表示される。

12 x_{90} ：積算ふるい下分布90%に相当する粒子径
13 x_{50} ：メジアン径(50%の粒子がこの値より小さく、50%の粒
14 子がこの値より大きい。)
15 x_{10} ：積算ふるい下分布10%に相当する粒子径

16 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
17 ともできる。

18 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
19 分布を基に $Q_r(x)$ を定義する。

20 $Q_r(x)$ ：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

21 そこで、定義より： $x = x_{90}$ なら $Q_r(x) = 0.90$
22 $x = x_{50}$ なら $Q_r(x) = 0.50$
23 $x = x_{10}$ なら $Q_r(x) = 0.10$ となる。

24 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
25 することもできる。

細かさによる粉体の分類

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

1 粉体の流動性〈G2-3-182〉

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。
三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

医薬品では幅広く粉体を利用されることから、粉体の流動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、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ようとする努力を面倒にしているからである。本項では、医薬品に最も多く用いられる粉体の流動性の評価法について記述する。医薬品粉体の流動性を適切に評価できる単純で簡便な測定法はないが、本項では、幾つかの試験法の標準化を提案している。粉体の流動性評価に広く用いられている四つの試験項目及び測定法、すなわち、「1.安息角」、「2.圧縮度又はHausner比」、「3.オリフィスからの流出」、及び「4.せん断セル法」である。実験的に考慮すべき重要な事項は同じであるので、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、更に再現性がある感度が良く、意味のある結果が得られなければならない。これらいずれの手法を用いた測定でも、複数回の測定が望ましい。繰返しになるが、ある一つの流動性測定法では、製薬用途で遭遇する広範囲な流動性を適切に又は完全に評価できない。製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用することが適切な評価につながる。

1. 安息角

安息角は、粉体の流動性を評価するために幾つかの科学分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粉体の分離・偏析や圧密又はエアレーションのために、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、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。

安息角は、次項で述べる方法のいかににかかわらず、形成さ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元的角度である。

1.1. 安息角測定法

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いにより次のように分類される。

- (i) 粉体を流下させる漏斗の高さを基底板に対して固定しておくか、又は堆積体が形成されるにつれて漏斗の高さを変える。
- (ii) 堆積体が形成される基底板の直径を一定とする(すなわち、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底板の直径を変える。

上記の基本的な測定法に加えて、以下のような変法も用いられている。

- (i) 排出安息角：一定の直径を持つ円板上にある過剰量の粉体を容器から排出させることによって測定する。円板上に形成された円錐から、排出安息角を測定する。
- (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を分離している面によって定義される。

1.2. 安息角に関する流動性の程度

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違いはあるが、Carr¹⁾による分類(表1)は有用である。処方設計において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、製造に適さないことが多い。

表1 流動性の程度と対応する安息角¹⁾

流動性の程度	安息角(°)
極めて良好	25～30
良好	31～35
やや良好(架橋防止対策不要)	36～40
普通(架橋の限界点あり)	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

1.3. 測定に関して留意すべき点

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。この点に関して、次のような重要な点が挙げられている。

- (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、衝撃によるゆがみは軽減される。
- (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”を用いて円錐を形成させるとよい。これは、円錐を形成させる粉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。

1.4. 推奨される測定手順

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斗の高さを変えると良い。この場合、漏斗が動くので、振動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約2～4 cmの位置に保つ。対称性のある円錐を首尾よく又は再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 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

圧縮度とこれに密接に関係するHausner比は、粉体の粒子サイズや粒子形状、真密度、表面積、含水率、付着性などに影響されるため、粉体の流動特性を予測することができる。圧縮

度及びHausner比は、粉体の疎充填体積とタップ充填体積から算出される。詳細はかさ密度測定法〈3.01〉を参照すること。

2.1. 圧縮度及びHausner比測定法

圧縮度とHausner比の測定法はやや異なるが、基本的な手順は、同一の粉体試料について疎充填体積 V_0 と、これ以上の体積変化が生じなくなるまで試料をタップした後の最終タップ充填体積 V_t を測定することである。次式により圧縮度とHausner比を計算する。

$$\text{圧縮度} = (V_0 - V_t) / V_0 \times 100$$

$$\text{Hausner比} = V_0 / V_t$$

圧縮度とHausner比は、疎充填かさ密度(ρ_{untapped})とタップ充填かさ密度(ρ_{tapped})の測定値を用いて、次式により求めることもできる。

$$\text{圧縮度} = (\rho_{\text{tapped}} - \rho_{\text{untapped}}) / \rho_{\text{tapped}} \times 100$$

$$\text{Hausner比} = \rho_{\text{tapped}} / \rho_{\text{untapped}}$$

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って、圧密率が測定されることもある。圧縮度とHausner比について、広く報告されている流動性の程度を表2に示す。

表2 流動性の程度と対応する圧縮度及びHausner比

圧縮度(%)	流動性の程度	Hausner比
1 ~ 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

圧縮度とHausner比は粉体に固有な特性値ではなく、用いた測定法に依存する。疎充填体積 V_0 、最終タップ充填体積 V_t 、疎充填かさ密度 ρ_{untapped} 、及びタップ充填かさ密度 ρ_{tapped} の測定に影響するため考慮すべき重要な点は以下のとおりである。

- (i) 用いたメスシリンダーとホルダーの直径と質量
- (ii) タップ充填かさ密度を得るための粉体のタップ回数
- (iii) タップの高さ
- (iv) 試験に用いた粉体の質量
- (v) タップ中のメスシリンダー内における粉体試料の回転

3. オリフィスからの流出

粉体の流出は多くの因子に依存するが、そのうちの幾つかは粒子自体の特性に関係しており、また他の幾つかは測定法に関係する。粉体の流動度の測定には、(粉体がアーチングを生じ、それ以上流出することができなくなるオリフィス径である“アーチング径”を評価することにより)オリフィスからの粉体の流出性とその流出速度を観測する方法が使用されてきた。ここで特に重要なことは、自由流動性のある粉体であっても脈動型の流動パタ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、粒子径及び粒子密度に対する流出速度に関係する幾つかの実験式が提案されている。粉体のアーチング径の評価は、粉体が凝集性を有する場合も自由流動性を有する場合も適用できるが、オリフィスからの流出速度の測定は、自由流動性を有する粉体のみ適用可能である。

オリフィスからの流出速度は、一般には多種類の容器(円筒状容器、ファネル、ホッパー)のいずれにおいても、これらか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。流出速度の測定は間けつ又は連続的に行うことができる。

3.1. オリフィスからの流出試験法

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は、三つの重要な実験の変数に基づいて次のように分類できる。

(1) 粉体を入れた容器の種類 一般的な容器は円筒状容器、ファネル又はホッパーである。

(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。

(3) 流出速度の測定法 流出速度は、ある種の記録装置が付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、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できる(例えば、100 gの粉体がオリフィスを通過するのに要する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0.1 g単位までの粉体の質量)。

3.2. オリフィスからの流出試験法の変法

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、高密度の粉体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填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、これは結果の解析を複雑にする。ロータリー錠剤機の運転条件を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る。

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。

3.3. 測定に関して留意すべき点

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

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

3.4. 推奨される測定手順

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粉体のみに用いることができる。したがって、付着性粉体には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。流出速度は間歇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際、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装置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、粉体層が横滑りし始める直前のせん断応力と垂直応力の関係を表す破壊包絡線、内部摩擦角、非限界降伏力、粉体の凝集、フローファンクションのような種々の関連する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。これらの方法を用いることにより、ホッパーや貯槽用容器の限界寸法を適切に求めることができる。

4.1. 測定法

せん断セルの第一のタイプは、上下に二分割できる固定セルと可動セルとの境にせん断面を形成させる並進せん断セルに相当する。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、粉体層をせん断するのに要する力を測定する。並進せん断セルは円筒型又は矩形状の箱型である。

第二のタイプのせん断セルは、回転せん断セルに相当する。これには、円筒型のものと環状型のものがある。これらは、試料量が少なくて済むなど、並進せん断セルを上回る幾つかの利点がある。しかし、設計上、回転せん断セルの周囲に近い試料の方が、より内側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。

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。

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種多様であるので、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全て記載しておく。

5. 参考資料

- 1) Carr, R.L., Chem. Eng. 72, 163-168 (1965).

1 セン断セル法による粉体の流動性測定法 (G2-5-181)

医薬品の製造においては、混合機への原料投入や打錠機への粉体充填など、粉体の搬送及び供給を伴う工程が多い。粉体の流動性は、質量や含量均一性などの製剤特性に関連することから、医薬品の品質に大きな影響を与える。製剤処方及び製造工程、並びに製造装置を適切に設計するためにも、粉体の流動性評価は重要である。セン断セル法は粉体の流動性評価に有用な試験法の一つで、幅広い応力条件下で測定が行えるため、粉体動摩擦角や単軸崩壊応力、フローファンクションなどの、医薬品の製造における様々な粉体挙動の予測に役立つパラメータを求めることができる。

1. 原理

ホッパーなどからの流出において粉体は、粒子同士の付着・凝集や複雑な表面形状による互いの動きへの干渉などのため、外から力が加えられても速やかに流れ出すとは限らず、加える力が十分に大きくなると急に流れ始めるようになる。また、容器中の準静的な条件下での粉体の流動性は、圧密応力に強く依存する。圧密とは、粉体層に荷重を加えて、そのかさ体積を減少させ、粉体層のかさ密度又は空間率を変化させる操作をいう。セン断セル法は、圧密した粉体に垂直応力を負荷しながら横滑りさせたとき、静止状態から流動状態に移行する過程の粉体の挙動、すなわち横滑りし始める直前の最大セン断応力や定常流動状態の動的摩擦力を測定する試験法である。

荷重下の粉体の流動性は、圧密の程度(かさ密度又は空間率、 ϵ)、垂直応力(σ)及びセン断応力(τ)の三つの条件によって決まる。三条件の関係を三次元的に表した図をロスコー状態図(図1)といい、セン断セル法は、このロスコー状態図あるいはロスコー状態図を構成する破壊包絡線を得るための試験法である。

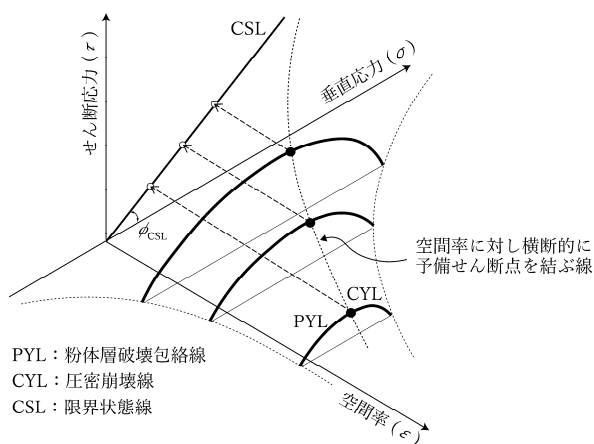


図1 ロスコー状態図

2. 装置

セン断セル法には、定荷重法と定容積法の二つの測定方法がある。どちらの方法でも、使用する装置は通例、セン断セル、試料に垂直応力を負荷するための分銅やプレス装置、試料をセン断するための機構、垂直応力及びセン断応力を計測するロードセルからなる。

2.1. セン断セル

セン断セルは、上下に二分割できる容器(セル)に充填した粉体を、垂直応力を負荷しながら横滑りさせ、粉体層の内部にセン断面を生じさせることのできる構造を持つものが多い。定荷重法の場合、上部セルに嵌合する蓋はセン断応力が負荷されると上下し、粉体の収容容積が変化する。定容積法では、蓋を押し込むプレス機などにより蓋の位置が固定される。

セン断セルは、セン断応力を与える運動が並進か回転かにより、2種類に分類される。

2.1.1. 並進セン断セル

並進セン断セルでは、上部あるいは下部セルの一方を固定し、他方を直線的に水平移動(並進)させて、二つのセルに充填した粉体層にセン断応力を負荷する。セン断面は、下部セル中の粉体とリング状の上部セル中の粉体の境界に生じる。並進セン断セルには、円筒型のもの(図2)と試料を上下2枚の平板ではさんだ側壁のないものがあり、前者の代表例としてジェニケセル、後者の代表例として平行平板セルが挙げられる。

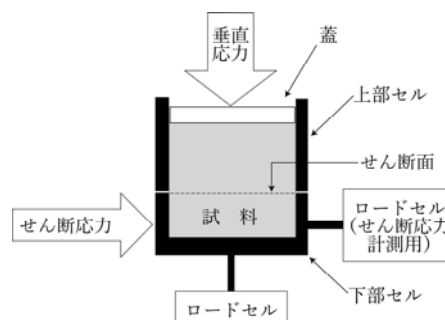


図2 並進セン断セルの例

2.1.2. 回転セン断セル

回転セン断セルでは、上下一対のセルの一方を固定し、他方を回転運動させて、二つのセルに充填した粉体層にセン断応力を負荷する。円筒型のものと環状型のもの(図3)がある。いずれの回転セン断セルでも、粉体がセル内壁との界面で滑らないよう、セルの内側に何らかの表面加工を施してある場合が多い。回転セルの試料に接する面には複数の刃を放射状に取り付けるなどして、粉体を噛み込む作りになっている。粉体を充填した固定セルに回転セルを押し入れて回転させることにより、回転セル直下の粉体層にセン断面が形成される。

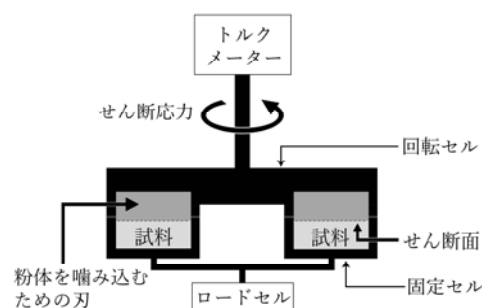


図3 回転セン断セルの例

2.2. その他の構成部分

ロードセルは、バネや圧電素子などを利用したセンサーで、荷重やトルクを検出し、加えられた力を電気信号に変換する装置である。ロードセル及び試料に垂直応力を負荷するための分

銅などは、計量トレーサビリティの保証された標準によって定期的に校正を行う。

3. 測定

測定環境は、温度 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ が推奨される。試料は、測定ごとに新しいものを用いる。ただし、圧密履歴を経っていないことが明白な試料や希少な試料について、再使用した旨の記載を残す場合は、この限りではない。スパーテルや試料の最大粒子径より大きい目開きのふるいなどを用いて、静かにせん断セルに試料を充填する。このとき、粉体層内に空洞が生じないように注意する。充填した試料の表面は、スパーテルなどでならしておく。定荷重法では、1回の測定中は空間率を一定にして試験を行うため、初めに試料の圧密(予圧密)を行う。ジェニケセルなどを用いた定荷重法における測定の手順を、図4に模式図で示す。試験に先立ち、垂直方向の予圧密応力

(σ_{pre})を負荷しながら、せん断応力が定常値(τ_{pre})になるまで予備せん断を行う(図4(a)A)。定荷重法では予備せん断中、粉体の容積が減少あるいは場合によっては増加し、定常状態に至ると一定になる。言い換えれば、ある垂直応力の条件下でせん断応力が定常値になった粉体層の空間率は、その粉体の流動特性から一つに決まる。以下の本試験では、この空間率を有する試料についての測定を行う。せん断応力をゼロとした後 σ_{pre} の垂直応力を取り除き、新たに垂直応力(σ_{sx} , $x = 1, 2, 3 \dots$)を負荷してせん断応力を測定する(図4(a)B)。せん断応力を徐々に増加させたとき、粉体層が横滑りし始める直前の最大せん断応力が τ_{sx} ($x = 1, 2, 3 \dots$)である。 σ_{pre} 以下の3~5点の σ_{sx} においてA~Bの操作を繰り返し、得られた結果から粉体層破壊包絡線(PYL: powder yield locus, 図4(b))を描くことができる。

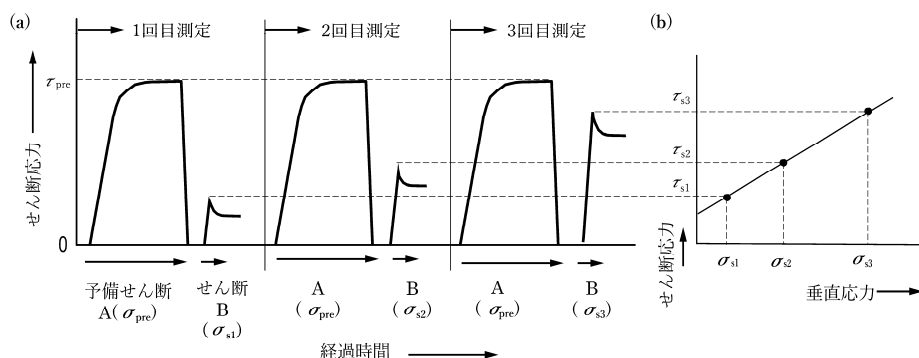


図4 測定中の垂直応力及びせん断応力の時間経過図(a)と粉体層破壊包絡線(b)の例

一方、定容積法では、プレス機などで蓋の位置を制御して空間率を所定値に保ちながら、垂直応力を徐々に変化させて、せん断応力を連続的に測定する。常に一定の空間率で測定が可能のため、せん断により粉体層が圧密崩壊する垂直応力領域では、図1中の圧密崩壊線(CYL: consolidation yield locus)が得られる。PYLとCYLは予備せん断点を共有し、1本の破壊包絡線(YL: yield locus)としてつながる。

4. データ解析

せん断応力には、粉体が流動していない(静的)状態で測定される値と、流動している(動的)状態で測定される値がある。

前項の図4(b)で示した各(σ_{sx} , τ_{sx})を結ぶ近似線は、圧密した粉体層が横滑りし始める直前、つまり静的な状態での垂直応力に対するせん断応力の関係を表し、PYLと呼ばれる。ここに、垂直応力 σ_{pre} を負荷して行った予備せん断により定常状態に至ったときのせん断応力 τ_{pre} をプロットする(図5)。この点は、動的な状態における測定値で、予備せん断点と呼ばれる。次に、垂直応力軸上に中心を持つ、予備せん断点を通りPYLに接する円(図5中の大きい方の半円)と原点を通りPYLに接する円(図5中の小さい方の半円)を描く。垂直応力軸上に中心を持ちPYLに接する円を、モール円と呼ぶ。

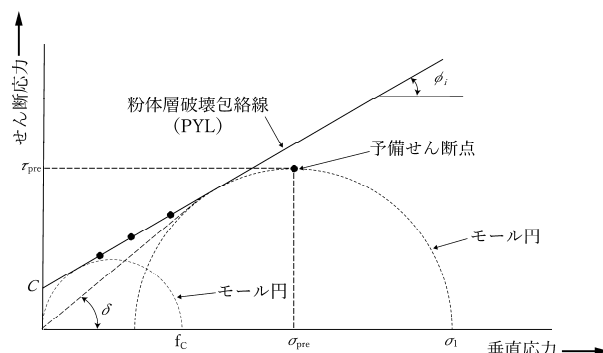


図5 粉体層破壊包絡線からの各種パラメーターの求め方

粉体の流動性を記述する各種パラメーターは、PYLとモール円から求められる。

4.1. せん断付着力($\mathcal{O}$)

PYLと τ 軸の交点の値であり、垂直応力が負荷されていない状態でのせん断応力に相当する。

4.2. 内部摩擦角(ϕ)

PYLと σ 軸がなす角度。PYLの勾配($\tan \phi$)は、測定を行った圧密条件下での、粉体粒子同士の摩擦係数である。

4.3. 有効内部摩擦角(δ)

原点を通り、図5中の大きい方のモール円に接する直線が σ 軸となす角度。粉体の流動が定常状態にあるときの、内部摩擦力の相対的な指標として用いられることがある。

4.4. フローファンクション (FF)

図5中の大きい方のモール円の最大主応力(σ_1)と、小さい方のモール円の最大主応力(単軸崩壊応力： f_c)の比(σ_1/f_c ： ff_c)は、粉体の流動性を定性的に分類する際の指標として用いられることがある(表1)。同一の試料について複数の圧密条件下で測定した σ_1 と f_c の関係から得られる線図、すなわちFFは、ホッパーを設計する際などの粉体の流動性解析に活用される。

表1 流動性の一般的な分類

ff_c	流動性
<1	流動しない
1 ~ 2	付着性が高く、流動しにくい
2 ~ 4	付着性があり、やや流動しにくい
4 ~ 10	流動しやすい
10<	極めて流動しやすい

上記の各パラメーターは、所定の空間率を有する試料において測定された垂直応力とせん断応力の関係を表す図5から求められるため、同じ粉体でも、圧密の程度が異なれば、違う値になることに注意する必要がある。

一方、図1の限界状態線(CSL：critical state line)は、複数の空間率で得られた予備せん断点(図中の黒丸)を $\sigma - \tau$ 面上に投影して得られる線で、原点を通る直線になる。動的な状態における垂直応力とせん断応力の関係を示すCSLは、測定に用いる装置の種類に依存せず、粉体の流動特性を反映する。CSLと σ 軸のなす角度を粉体動摩擦角(ϕ_{CSL})といい、小さいほど流動性が高いことを示す。

5. 結果の報告

同一条件での測定は、得られる値のばらつきに応じた適当な回数繰り返し行い、その平均値を結果とする。測定結果は、表2に挙げる項目と共に報告する。

表2 結果報告に記載する項目例

項目	内容
一般的事項	測定日時、測定者名、試料名、使用した装置(機種、型式・製造会社)とセルの種類、測定法(定荷重法又は定容積法)など
試料関連事項	粒子径及び粒子径分布、粒子径測定法の種類、かさ密度、水分含量、乾燥処理条件など
測定条件	測定時の温度及び相対湿度、使用したセルのサイズ、試料量、予圧密条件、せん断速度など
測定結果	本試験における測定回ごとの垂直応力とせん断応力、破壊包絡線を描いた $\sigma - \tau$ 図、粉体動摩擦角などの解析で得られた各種パラメーターの値
その他の特記事項	予圧密応力や測定回数などを通常の設定から変更した場合、あるいは試料を再使用した場合には、その旨の記載

1 溶解度測定法〈G2-6-190〉

溶解度は、溶質が溶媒中に溶解可能な上限の濃度であり、添加物や薬物などの取扱いや特性を考慮する上で重要な情報を与える。本測定法は、固体の医薬品原薬の溶解度として一般に用いられる平衡溶解度について、その測定における主な留意点を示すとともに、Biopharmaceutics Classification System (BCS)に基づく分類などに用いる際の標準的な方法を示す。

固体の溶質が溶媒中に均一に混合され、溶液を形成している状態を溶解しているといい、特に過剰量の溶質の存在下で、溶解した溶質と溶解していない溶質が動的平衡にある溶液(飽和溶液)の濃度を平衡溶解度という。平衡溶解度に達するまでの一過性の過飽和や不完全溶解の状態における濃度(見かけの溶解度)は、平衡溶解度より高値又は低値を示すことがある。溶解度の単位は、モル濃度、モル分率、モル比、w/w, w/vなどが用いられる。なお、ナノ粒子や特殊な可溶化技術を用いた試料のほか、沈降やフィルター過による除去が困難な粒子を含む試料、高分子化合物など、本測定法での評価が適切でない試料には本測定法を適用しない。

本測定法により得られる溶解度は、試料の物理化学的特性(例：表面積、粒子径、結晶形、溶媒和化合物)や溶媒の特性(例：pH、極性、表面張力、界面活性剤の有無、共溶媒、イオンの種類)及び測定法に係るパラメーター(例：温度、時間、攪拌方法)の影響を受ける。そのため、溶解度の測定に当たっては、これらを十分に考慮し、溶解度評価の目的に応じて測定条件を設定する。

本測定法では、次に示すフラスコ振とう法を用いる。また、妥当性が示された他の方法も用いることができる。

1. 溶媒の選定

目的に応じて溶媒の種類やpH、組成(緩衝液や界面活性剤の種類と濃度など)を決定する。例えば、水やメタノールなどの溶媒は、薬物の一般的な特性評価を目的に用いられる。また、BCS分類など、薬物の消化管吸収やバイオアベイラビリティの予測を目的とする場合は、当該部位の環境を考慮した生理学的pH範囲(pH 1.2～6.8)の溶媒の使用が推奨される。目的に応じて規定された溶媒と異なる組成の溶媒を使用する場合は、その組成に加え、必要に応じてイオン強度を計算し、溶解度の結果とともに明記する。

2. 懸濁液の調製

栓付きフラスコ又はバイアルに溶媒及び試料を加え、懸濁液を調製する。少なくとも3回の溶解度の結果が得られるように、3検体以上の独立した試料を用いる。

溶媒及び試料の量を正確に量る必要はないが、試料は飽和溶液を得るのに十分な量とする。速やかに平衡溶解度に達するよう試料の表面積をできるだけ大きくするため、溶媒への添加前に粉碎や篩過による粉末化を行う。若しくは溶媒への添加後に超音波処理を行うことができる。試料溶液調製の際には、溶媒や処理の影響による結晶形の変化に注意する。

3. 飽和溶液の調製

懸濁液中の試料の溶解が平衡に達するまで適切な方法で攪拌後、溶解していない試料を除去し、飽和溶液を得る。

試験時間は、平衡に達するのに十分な時間を考慮して設定し、溶解平衡を判断可能な間隔で複数回サンプリングする。複数の

時点における濃度の変化が小さい場合(例：24時間当たりの変化が5%未満、若しくは1時間当たりの変化が0.2%未満)、平衡に達していると判断することができる。見かけの溶解度が平衡溶解度に達していることを確認するため、同じ懸濁液を同じ方法で更にかき混ぜ(例：追加で24時間)、濃度を確認しておくことが推奨される。溶解度の高低と平衡に達するまでの時間に相関はないことに留意する。

溶解していない試料の除去は、静置若しくは遠心分離により沈降させた後、溶解していない試料を取り込まないように注意して上澄液を分取する。必要に応じて、適切なフィルターを用いて上澄液をろ過する。ピペットや容器などへの試料の吸着に留意する。攪拌中及び攪拌後の懸濁液の沈降操作中の温度は、目的に応じて設定し、必要な制御を行う(例：±0.5℃)。

試料添加前及び平衡化終了時の溶液のpHを測定しておく。試料の溶解に伴って溶液のpHが変化する場合、溶媒の種類や評価の目的に応じてpHの調整が必要な場合がある。若しくは、より緩衝能が高い溶媒を用いることが望ましい。

4. 溶液中の薬物濃度測定と結晶形の確認

溶液中の溶質濃度を、液体クロマトグラフィー(2.01)、紫外可視吸光度測定法(2.24)、又は他の適切な方法により定量的に測定する。溶媒中で試料が分解する場合は、試料と分解物を区別して分析する必要がある。分析中の試料の沈殿や析出を避けるため、必要に応じて分析前に希釈する。

懸濁液中における試料の結晶形の変化の有無を、適切な方法(例：粉末X線回折測定法、ラマンスペクトル測定法、近赤外吸収スペクトル測定法、示差走査熱量測定法)により確認することが推奨される。結晶形の変化が見られた場合、データの解釈は目的に応じて判断する。

5. 参考資料

- 1) US Pharmacopeia (2024), <1236> Solubility Measurements.

1 G3. 生物薬品関連

2 バイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)の品質確保の基本的考え方 (G3-1-180)

4 はじめに

5 本参考情報は、ICH Q8からQ11までの、いわゆるQカルテッ
6 トと呼ばれる一連のガイドライン並びにバイオテクノロジー
7 応用医薬品(以下「バイオ医薬品」という。)の品質に関する
8 Q5A～Q5E及びQ6Bガイドライン¹⁻⁶⁾における推奨事項に基づ
9 き、医薬品の品質確保の考え方のうち、特にバイオ医薬品に特
10 有の要素を中心に、品質確保の基本的考え方を示すものである。
11 医薬品原薬及び製剤の品質確保の方策に関する一般的な考え方
12 は、参考情報「医薬品原薬及び製剤の品質確保の基本的考え方
13 (G0-1-172)」に記載されている。

14 本参考情報の適用範囲は、遺伝子組換え技術や細胞培養技術
15 などを用いて製造されるペプチド、タンパク質、それらの誘導
16 体、及びそれらを構成成分とするバイオ医薬品とする。本参考
17 情報に示す考え方は、その他の生物薬品の品質確保にも参考に
18 なる。

19 バイオ医薬品では、細胞による生合成過程を製造工程に利用
20 していることから、分子構造上不均一なものが産生される可能
21 性が本質的に存在する。また、糖鎖修飾などの翻訳後修飾のほ
22 か、酸化や脱アミド化など、製造工程や保存中に様々な修飾を
23 受ける可能性がある。バイオ医薬品の原薬に残存する可能性の
24 ある不純物には、生産に用いた細胞に由来するタンパク質のよ
25 うに分子多様性を有するものが含まれるほか、ウイルスなどの
26 汚染物質が混入するリスクがある。このような品質特性は、製
27 造工程中の様々な要因によって変動し得る。

28 バイオ医薬品の品質を確保するには、上記の特性を考慮し、
29 適切な品質管理戦略を構築する必要がある。その際、参考情報
30 「品質リスクマネジメントの基本的考え方 (G0-2-170)」が有
31 用である。まずは、徹底的な特性解析により品質特性を明らか
32 にする。次いで、目標とする製品品質プロファイルを考慮した
33 重要品質特性の特定と、重要品質特性を適切な範囲内、限度内、
34 分布内に収めるための品質管理戦略を構築する。開発期間中や
35 製造販売開始後に製造工程を変更する場合は、変更前後の製品
36 の同等性/同質性評価を実施し、変更が有効性・安全性に有害
37 な影響を及ぼさないことを検証して、変更の妥当性を確認する。
38 バイオ医薬品の製造や分析に関する技術は日々進歩しており、
39 製品ライフサイクルを通じて製品品質を継続的に改善していく
40 ことが望ましい。

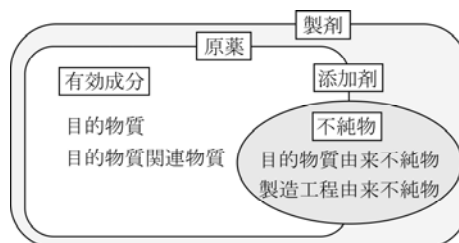
41 1. バイオ医薬品の品質評価・管理

42 1.1. 品質評価

43 1.1.1. 特性解析

44 医薬品の特性解析は、重要品質特性の特定と品質管理戦略の
45 構築のために不可欠なステップである。バイオ医薬品の特性解
46 析では、構造及び物理的・化学的性質、生物活性、目的物質の分
47 子変化体、製造工程由来不純物等について、可能な限り詳細な
48 解析を行う。目的物質とは、予期した構造を有するタンパク質
49 であり、DNA配列から期待されるタンパク質、しかるべき翻
50 訳後修飾から期待されるタンパク質、あるいは意図的な加工・
51 修飾操作から期待されるタンパク質を指す。目的物質の分子変

52 化体のうち、生物活性、有効性及び安全性の点で目的物質に匹
53 敵する性質を持つものを目的物質関連物質、持たないものを目
54 的物質由来不純物に分類できる。有効成分は目的物質と目的物
55 質関連物質で構成され、一般に、バイオ医薬品の有効成分には
56 不均一性がある(図1)。



57 図1 バイオ医薬品の構成成分

58 * バイオ医薬品では、原薬中に、有効成分の安定化のための緩衝液成
59 分等の添加剤が含まれる。
60

61 a. 構造及び物理的・化学的性質

62 アミノ酸配列及びアミノ酸組成、末端アミノ酸配列、スルフ
63 ヒドリル基及びジスルフィド結合、糖組成・糖鎖構造、糖化、
64 酸化、脱アミド化等に関して解析を行う。糖タンパク質におけ
65 る糖鎖は、構造の安定化、生物活性、抗原性、体内動態等と関
66 連があるとされ、そのプロファイルは製造工程の変動の影響を
67 受けやすい。単糖分析、オリゴ糖分析/糖鎖プロファイリング、
68 糖ペプチド分析、グリコフォーム分析等によって詳細に解析す
69 る必要がある。酸化や脱アミドなどにより生じる分子変化体は、
70 ペプチドマップ法により分析できる。電荷プロファイルは、イ
71 オン交換クロマトグラフィーや等電点電気泳動により評価でき
72 る。分子不均一性は、培養工程だけでなく、それ以降の原薬及
73 び製剤の製造中や保存中にも生じるため、不均一性の程度及び
74 プロファイルを特性解析し、工程パラメーターの変動が分子不
75 均一性に及ぼす影響を評価するなど、製造工程の理解を深める
76 ことが品質管理戦略の構築に有用である。

77 物理的・化学的性質については、分子量や分子サイズ、モル吸
78 光係数などに関して解析を行う。円偏光二色性、フーリエ変換
79 赤外吸収スペクトルやNMRなどの分光学的手法、あるいは、
80 示差走査熱量測定などの熱力学的手法によって、目的物質の二
81 次構造や高次構造に関する情報が得られる。

82 b. 生物活性

83 生物活性は、有効成分が特定の生物学的効果を発揮するため
84 の特異的な機能やその程度を表す指標である。上述したように、
85 バイオ医薬品は、有効成分の分子量が大きく構造が複雑で、多
86 様な分子種の混合物であり、理化学分析により高次構造を確定
87 することが困難であるため、通常、目的とする構造を形成して
88 いることの確証は生物活性で得られる。生物活性を測定するた
89 めの生物学的試験には、生化学的試験(酵素活性の測定、結合
90 活性の測定等)、細胞応答性試験のほか、動物を用いる試験な
91 どが挙げられ、有効成分の特性、対象疾患における作用機序や
92 薬理作用を考慮して設定する。例えば、有効成分が酵素の場合
93 は酵素活性、増殖因子の場合は細胞増殖促進作用、抗体の場合
94 は、抗原との結合活性、抗原の中和活性、抗体依存性細胞傷害
95 活性、補体依存性細胞傷害活性等を評価する。

96 生物学的試験では、標準物質と試料から得られた応答を比較
97 して、力価を単位若しくは標準物質に対する相対的な活性(%)
98 として表す。力価とは、当該医薬品の特性に基づく生物活性を

99 定量的に表す尺度である。力価測定に用いられる生物活性は、
100 原則として、臨床上期待される作用と同様あるいは類似のもの
101 が望ましい。臨床上期待される作用と生物学的試験における活
102 性との相関は、薬力学試験又は臨床試験において確認しておく
103 必要がある。

104 c. 目的物質の分子変化体(目的物質関連物質及び目的物質由
105 来不純物)

106 原薬及び製剤の特性解析において、含まれる分子変化体の構
107 造と生物活性・結合活性などを可能な限り解析する。分子量が
108 大きく構造が複雑な製品においては、目的物質関連物質及び目
109 的物質由来不純物を明確に分離することが難しく、原薬や製剤
110 中に含まれる個々の分子変化体の割合を管理することが困難な
111 場合、適切な分析法で得られるプロファイル(オリゴ糖プロフ
112 ァイルや電荷プロファイル)を明らかにする。目的物質由来不
113 純物に分類される代表的な分子変化体は、凝集体(多量体)及び
114 切断体である。その他に脱アミド体、異性体、酸化体、ジスル
115 フィド結合ミスマッチ体や糖化体などが目的物質由来不純物と
116 されることがある。凝集体及び切断体は、サイズ排除クロマト
117 グラフィーやSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS
118 キャピラリーゲル電気泳動などにより含まれる割合を評価する。

119 d. 製造工程由来不純物

120 製造工程由来不純物は、細胞基材に由来するもの(宿主細胞
121 由来タンパク質や宿主細胞由来DNA)、細胞培養液に由来する
122 もの(抗生物質やインスリンなど)、細胞培養以降の工程である
123 目的物質の抽出、分離、加工、精製工程及び製剤化工程に由来
124 するもの(プロテインA等のクロマトグラフィー用担体のリガ
125 ンド、酵素、化学修飾試薬、溶媒等)に分類される。製造工程
126 由来不純物については、工程パラメーターの管理により不純物
127 が恒常的に除去されることを保証できる場合、あるいは、工程
128 内試験が設定される場合は、原薬及び製剤に規格値を設定する
129 必要がない場合もある。薬理作用を示す物質や免疫原性を有す
130 る可能性のある物質などは、特に注意が必要である。

131 1.1.2. 重要品質特性の特定

132 特性解析によって明らかにされた各品質特性について、その
133 変動が、有効性・安全性に及ぼす影響と不確かさに関してリス
134 クレベルを見積り、管理すべき重要品質特性を特定する。例え
135 ば、①生物活性又は有効性、②体内動態、③免疫原性、④安全
136 性の観点から、各品質特性の影響の大きさと不確かさのスコア
137 の積を求め、一定のスコア以上の品質特性を重要品質特性とす
138 ることがよく行われる。リスクレベルは、有効性・安全性に及
139 ぼす影響の重大性と起こりやすさから見積もることもできる。

140 1.2. 品質管理戦略の構築

141 品質管理戦略では、特定された重要品質特性を目標とする限
142 度内、範囲内、分布内に収めるための管理の一式を規定する。
143 品質管理戦略には、原材料の管理、製造工程の管理、規格及び
144 試験方法並びに安定性試験などが含まれる。重要品質特性の許
145 容範囲や目標とする管理基準は、特性解析結果、規格及び試験
146 方法によるロット分析結果、安定性試験結果、並びに臨床試験
147 の結果等に基づいて設定する。安定性試験のうち、苛酷試験及
148 び加速試験において強制的に劣化した試料の品質特性(例えば、
149 切断体、酸化体や脱アミド体といった分子変化体の含まれる割
150 合など)と生物活性の解析結果は、各重要品質特性の許容範囲
151 や管理基準の設定に有用である。バイオ医薬品の製法開発の過
152 程では、重要品質特性に影響する原材料特性や工程パラメータ

153 ーを特定し、それぞれについて、重要品質特性が目標とする範
154 囲内となるよう、製造工程の管理手法を構築する。これらの結
155 果に基づいて、原材料規格、工程パラメーター管理、工程内試
156 験、原薬あるいは製剤の規格及び試験方法等からなる適切な品
157 質管理戦略を構築する。

158 1.2.1. 原材料の管理

159 バイオ医薬品の原材料には、セル・バンク、培養工程に用い
160 る培地、培地添加物、精製工程に用いる樹脂・クロマトグラフィー
161 用担体、緩衝液、洗浄液やフィルター、修飾工程に用いる
162 PEG化試薬、製剤化工程に用いる添加剤などが含まれる。

163 a. セル・バンクの評価と管理(遺伝子発現構成体の評価を含
164 む)

165 細胞基材は、通例、マスター・セル・バンクからワーキン
166 グ・セル・バンクという2段階方式のセル・バンクで管理し、
167 特性解析試験及び純度試験を実施することで、その特性を明ら
168 かにすると共に、細胞基材が医薬品製造に適したものであること
169 を確認する。また、生産に使用可能な*in vitro*細胞齢の上限
170 においても同様の評価を行い、培養期間中の細胞基材の安定性
171 を確認する。純度試験では、セル・バンクに外来性の微生物因
172 子等の混入がないことを評価する(ウイルスについては1.2.3.参
173 照)。特性解析試験では、細胞の形態や生細胞数、目的タンパ
174 ク質の発現などのほか、遺伝子発現構成体を導入した細胞株の
175 場合は、遺伝子発現構成体のコピー数や挿入・欠失、目的タン
176 パク質をコードする塩基配列などを評価する。

177 b. その他の原材料の管理

178 製造工程で使用する原材料は、その使用目的にかかった基準
179 を満たしていることを確認して用いる。血清や酵素など、ヒト
180 あるいは動物に由来する原材料を用いる場合は、「生物由来原
181 料基準」に適合していることを確認する。

182 1.2.2. 製造工程の管理

183 バイオ医薬品の製造工程は、主に培養工程と精製工程からな
184 る原薬の製造工程と、製剤化工程で構成される。培養工程や精
185 製工程の工程パラメーターが、不均一性プロファイル及び不純
186 物プロファイル等に影響する可能性があるため、製造工程の十
187 分な理解と適切な管理方法(工程パラメーターの設定と評価、
188 工程内試験等)の構築が品質の恒常性維持に必須である。構築
189 された製造工程は、プロセス・バリデーション/プロセス評価
190 によって適格性を確認する。通常、プロセス・バリデーション
191 は実生産スケールで検討されるが、ウイルス除去/不活化能の
192 評価や精製カラムの再使用回数の検討などにおいて、適格性が
193 確認された小規模モデルで検討することができる。

194 a. 工程パラメーターの管理

195 各製造工程の管理すべき工程パラメーターとその管理範囲は、
196 それまでの製造実績と一変量実験に基づいて設定するか、体系
197 的な手法により明らかにされた工程パラメーターと重要品質特
198 性との関係に基づいて設定する。後者の手法により製造工程を
199 開発する際には、各工程パラメーターの各重要品質特性への影
200 響に関するリスクレベルを見積り、各重要品質特性が許容範囲
201 を超えないように、各工程パラメーターの管理範囲を設定する。
202 品質管理戦略の構築に当たりリスクレベルを検討する際には、
203 当該パラメーターの変動が重要品質特性に及ぼす影響の重大性、
204 及び影響が生じる確率に加え、生じた影響の検出可能性につい
205 ても考慮する。管理すべき工程パラメーターの例として、培養
206 工程では温度、培地添加物濃度、溶存酸素濃度、溶存二酸化炭

素濃度、pH、攪拌速度、培養時間など、精製工程では、カラムのサイズ、負荷量、緩衝液組成、流速などがあげられる。精製工程パラメーターの許容範囲は、不均一性プロファイルや不純物除去効率への影響を考慮して設定する。また、培養工程における細胞密度、生存率や、精製工程における回収率などの各工程の特性が一定の範囲内となるよう管理することも、品質確保のために必要と考えられる。品質への影響が特に大きい工程は重要工程と位置付けられる。重要工程の主な例としては、生産培養の工程、ウイルス不活化及び除去工程、アフィニティークロマトグラフィー工程などがあげられる。

b. 工程内試験

バイオ医薬品の品質管理において、製造工程由来不純物やウイルス、外来性の感染性因子などの汚染物質の混入に対し、工程内試験での管理が可能あるいは適切と考えられる。工程内試験の例として、生産培養後の外来性ウイルス試験、ウイルス除去フィルターや無菌ろ過フィルターの完全性試験、宿主細胞由来タンパク質や宿主細胞由来DNAなど製造工程由来不純物の試験、バイオペン試験などがあげられる。工程内試験も、分析法バリデーションなどの適切な方法で妥当性を評価する。

1.2.3. 混入汚染物質の評価と管理

混入汚染物質とは、製造工程には本来存在しないはずのものと、外来性の化学物質や生化学的な物質、あるいは微生物類のようなものを指す。安全性確保の観点から、汚染物質の混入は厳に避けるべきであり、適切な製造工程を構築した上で、上述したように、原材料管理、工程内試験あるいは規格及び試験方法により適正に管理する必要がある。

ウイルスは、製造過程から外来性因子として混入する可能性はあるほか、用いる細胞基材に内在性因子として存在している可能性がある。生物由来原料を用いる製品に特有のウイルス汚染を防ぎ、安全性を確保するための合理的な方策として、以下の三つの主要な相補的アプローチを講じる。1) ヒトに対して感染性や病原性を示す可能性のあるウイルスの存在を否定するために、細胞株、その他培地成分を含む原材料を選択し、試験すること。2) 製造工程の感染性ウイルス不活化/除去能力を評価すること。3) 製造工程の適切な段階において、感染性ウイルス否定試験を行うこと。詳細は参考情報「日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件 (G3-13-190)」に記載されている。

1.2.4. 規格及び試験方法

a. 規格及び試験方法の設定根拠

規格及び試験方法に採用する項目及び試験法は、構築された品質管理戦略に応じて異なる。規格値/適否の判定基準の設定根拠を明らかにする必要がある。規格値/適否の判定基準は、臨床試験に用いたロットから得られたデータ、製造の一定性を示すために用いたロットから得られたデータ、及び安定性試験データ、並びに製品の開発段階で得られた適切なデータに基づいて設定し、その根拠を示す必要がある。

b. 性状

原薬及び製剤の物理的状態(例えば、固体、液体)、色を定性的に規定する。製剤が溶液である場合は透明度についても規定する。

c. 確認試験

有効成分の分子構造上の特徴や特有の性質に基づいて特異的な試験を設定する。同一性を確認するために、通例、原薬では2種類以上の試験(理化学的試験、生物学的試験、免疫化学的試

験等)が設定される。製剤では1種類の試験で十分であると考えられるが、製品によっては2種類以上の試験が必要となる場合もある。

d. 示性値

示性値として設定する特性には、糖鎖、電荷、分子量・分子サイズなどがある。目的物質関連物質と目的物質由来不純物を分離するのが困難で、純度試験として設定できない場合など、不均一性プロファイルを示性値として規定する。代表的な例には、糖鎖プロファイルや電荷プロファイルなどが挙げられる。その他、原薬及び製剤の品質を確保する上で重要となる特性について試験を設定する。試験項目の例としては、pHや浸透圧などがある。

e. 純度試験

純度は、通常、複数の分析方法の組み合わせにより評価する。不純物に関する試験方法の選択及び最適化に際しては、目的物質及び目的物質関連物質を、不純物(目的物質由来不純物と製造工程由来不純物)から分離すること、あるいは識別できることに重点を置くべきである。

f. 生物活性

バイオ医薬品の規格及び試験方法には、通例、生物活性に関する試験が必要である。有効成分の作用機序を考慮し、特性解析に用いられた手法の中から適したものを、生物活性試験として設定する。規格値は、溶液中の力価を指標とする場合は、単位/mLで表し、タンパク質量当たりの力価を指標とする場合は、単位/mgで表す。タンパク質量当たりの力価は、比活性と呼ばれる。これらのほか、標準物質と比活性を比較し、これを百分率(%)で表示して、規格値とする場合もある。近年、単位を設定せず、標準物質との比活性の比(%)を規格値として設定する例が増えている。

g. 定量法

原薬や製剤に含まれる有効成分の含量は、タンパク質含量(質量)あるいは力価(単位)で表される。製品品質の重要な要素であるので、適切な定量法を用いて測定する。タンパク質含量を求める試験には、参考情報「タンパク質定量法 (G3-12-172)」に掲載されている方法、HPLCを用いて標準物質とピーク面積を比較する方法等が用いられる。力価の測定には、生物学的試験が用いられる。

理化学的試験法により、高次構造に関する情報を含めて、当該製品に関する十分な物理的・化学的情報が得られ、かつ生物活性との適切な相関が証明されていること、更に十分に確立された製造実績がある場合には、力価を求める生物学的試験を理化学的試験法に置き換えることができる。インスリン類等では、HPLCを用いた定量法により、単位の表示された標準物質とピーク面積を比較することで、試料中の有効成分の含量(単位)を求めることとされている。

h. 製剤試験

剤形に応じた製剤試験を実施する。バイオ医薬品の多くは注射剤であるため、無菌試験、エンドトキシン試験、採取容量試験、不溶性微粒子試験及び不溶性異物検査などを実施する。

1.2.5. 安定性試験

a. 試験条件

バイオ医薬品の有効期間の設定は、通常、申請する製品の実保存期間、実保存温度における長期保存試験の成績に基づいて行う。加速試験及び苛酷試験により、有効期間設定の補足情報

や品質変化の機構解明に有用な情報が得られるほか、分析法の妥当性や、輸送中などの条件の影響を評価できる。

b. 測定項目

バイオ医薬品の保存中には生物活性の低下や物理的・化学的性質の変化が生じる可能性があるため、安定性試験においては、様々な分析手法により総合的に品質特性を評価する必要がある。通常、特性解析において解析した項目や用いた分析方法などを用いて、生物活性や分子不均一性、目的物質由来不純物に関連した項目など、製品の特性に応じて、安定性の变化を評価できる適切な項目及び試験方法を実施する。

2. 製造工程の変更に伴う同等性／同質性評価

バイオ医薬品の製造工程を変更する際には、変更された製造工程で製造された最終製品の品質・有効性・安全性を確保するため、同等性／同質性の評価作業を実施する。同等性／同質性とは、必ずしも変更前後の品質特性が全く同じであることを意味するものではなく、変更前後の品質特性の類似性が高いこと、ならびに品質特性に何らかの差異があったとしても、既存の知識から最終製品の有効性・安全性には有害な影響を及ぼさないであろうことが十分に保証できることを意味する。品質特性の比較のみで同等性／同質性を判定できない場合には、非臨床試験や臨床試験を組み合わせて評価を実施する。

2.1. 同等性／同質性評価作業に関する留意事項

変更前後の同等性／同質性を立証する試験をどの程度まで実施すべきかは、変更した製造工程、製法変更が品質特性に及ぼす影響に関するリスクレベル、試験に用いる分析方法の適切さ、非臨床及び臨床上の経験に基づいた品質特性と安全性及び有効性との関係等を配慮して検討する。製品の同等性／同質性の判断は、特性解析データ、タンパク質の変化・分解状況により製品間の差異が生じている可能性を検証した安定性データ、製造の恒常性を証明するために用いたロットデータ、これまでに蓄積された製造工程変更による品質特性の変動と安全性及び有効性との関連に関するロットデータ、製品の非臨床あるいは臨床上の特徴及び臨床適応症などを配慮して行う。

2.2. 品質に関する留意事項

既に実施した特性解析の全てあるいはその一部(一部とした場合は、その妥当性を説明する必要がある)を再度実施することで、変更前後の品質特性を直接比較し、同等性／同質性を判断するのに必要なデータを取得する。ただし、変更前後で不均一性や不純物プロファイルに差異が認められた場合など、追加的な特性解析によって差異の意味を評価する必要がある。同じ品質特性項目を評価する場合にも、複数の分析方法や測定原理の異なる分析方法を適用し、製造工程の変更により生じる可能性のある品質特性の変化を最大限検出できるよう、工夫する必要がある。また、製造工程の些細な変更でも、製品の安定性に影響する可能性があるため、品質特性に影響する可能性のある製造工程を変更する際は、製品の安定性に及ぼす影響も評価する。

2.3. 製造工程に関する留意事項

製造工程変更後の工程管理が、変更前と比較して、同等以上に効果的に製品の品質を保証できることを確認する。計画した製造工程変更がその下流工程へ与える影響、及びそれらの各工程に関連する品質特性へ与える影響について慎重に検討することが重要である。変更後の工程は、必要に応じて再度プロセス・バリデーション／プロセス評価を実施する。

3. 参考資料

- 1) ICH: Guideline for Q5A(R1), Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin.
- 2) ICH: Guideline for Q5B, Quality of Biotechnological Products: Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of R-DNA Derived Protein Products.
- 3) ICH: Guideline for Q5C, Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products.
- 4) ICH: Guideline for Q5D, Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products.
- 5) ICH: Guideline for Q5E, Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Changes in Their Manufacturing Process.
- 6) ICH: Guideline for Q6B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products.

1 アミノ酸分析法〈G3-2-171〉

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。
三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

アミノ酸分析法は、タンパク質、ペプチド、その他の医薬品のアミノ酸組成やアミノ酸含量を測定する方法をいう。タンパク質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分子であり、そのアミノ酸配列はタンパク質やペプチドの特性を規定している。タンパク質は通常特定のコンフォメーションを持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されていることもある。アミノ酸分析法は、タンパク質やペプチドの定量、同定、構造解析に利用でき、ペプチドマップ法におけるペプチド断片の評価、タンパク質やペプチド中の異常アミノ酸の検出などにも利用できる。分析する前にタンパク質又はペプ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ノ酸は一般に誘導体化して分析する。

2 装置

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ければならない。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(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。使用する装置はアミノ酸分析専用のものが望ましい。

3 一般的注意

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、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。混入の可能性のある微生物や溶媒中に存在する異物は使用前にろ過して除き、蓋をした容器に保存し、分析装置は直射日光の当たらない場所に設置する。

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。ピペットチップは蓋のある箱に保管し、素手でチップをつまんだりしないこと。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回数は制限すること。

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。装置の全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表に従って清掃あるいは交換する。

4 標準物質

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に、タンパク質又はペプチドの標準品/標準物質を対照として試料と共に分析する。この目的のためのタンパク質としては高純度のウシ血清アルブミンが用いられる。

5 装置の校正

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内の幾つかの異なる濃度に標準アミノ酸混液を希釈し、これ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る。

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ミノ酸1 nmol当たりの平均ピーク面積又は平均ピーク高さとして算出する。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。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に対照標準物質の分析によって十分に吟味され頻繁に更新されている必要がある。

6 再現性

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(例えば、6回以上)分析を繰り返し、各アミノ酸の保持時間及びピーク面積の相対標準偏差(RSD)を求める。更に、実験者を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、標準液の希釈操作も毎回行う。標準タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン)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しば行われる。変動(すなわち、RSD)を評価することによって、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、実験者の技量や癖などがある。バリデーションは、関連する全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タンパク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、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うがよい。タンパク質試料から緩衝液成分を除去する一般的な方法には、1)逆相HPLC装置に試料を注入し、有機性の揮発性溶媒でタンパク質を溶出させ、これを真空遠心分離で乾燥させる；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(例えば、アセトン)でタンパク質を沈殿させる；5)ゲルろ過、などがある。

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。加水分解の前にタンパク質溶液に正確な既知量の内標準物質を添加すると、タンパク質溶液からのアミノ酸の一般的な回収率が内標準物質の回収率から得られる。しかし、タンパク質中のアミノ酸の遊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分解中の挙動はタンパク質に含まれるアミノ酸と同じではない。したがって、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価な自然界に存在しない α -アミノ酸がよい。しかも、加水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イシン、ニトロチロシン又は α -アミノ酪酸がある。

141 タンパク質の加水分解

142 タンパク質及びペプチドのアミノ酸分析にはこれら試料の加水分解が必要である。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。ガラス製加水分解管は、1 mol/L塩酸中で1時間煮沸するか、硝酸又は塩酸／硝酸混液(1:1)に浸して洗浄する。洗浄した加水分解管は高純度の水で洗い、更にHPLC用メタノールで洗う。その後、乾燥器で一夜乾燥し、使用するまで覆いをして保存する。ガラス容器を500℃で4時間乾熱して汚染物を除去してもよい。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タンパク質試料を加水分解する最も一般的な方法である。この加水分解方法は幾つかの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、セリンとトレオニンの一部破壊され、メチオニンは酸化され、システイ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、通常その回収率は低い)。加水分解容器の内部を適切な真空度(0.0267 kPa以下)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結合のうち、Ile-Ile、Val-Val、Ile-Val及びVal-Ileのア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れる。以下に述べる加水分解法の幾つかはこれらの問題に対処するために利用する。また、この加水分解法の幾つか(すなわち、方法4～11)はシステイン、メチオニン、アスパラギン、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(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。加水分解において、遊離アミノ酸はペプチド又はタンパク質中の不安定なアミ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の遅いペプチド結合(例えば、Ile-Val結合)についていえる。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。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。マイクロ波加水分解での至適条件はそれぞれの試料タンパク質又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理時間は僅か数分間であるが、1分間の変動でも適切な結果をもたらさない(例えば、不安定なアミノ酸の不完全な加水分解や破壊)。数種のプロテアーゼを用いた完全タンパク質消化も利用されているが、これは処理が複雑で、厳密な調節が必要である。そのため、一般にはタンパク質よりもペプチドに適用される。

201 注：未知タンパク質を初めて分析するときには、異なる加水分解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タンパク質又はペ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6 mol/L塩酸。

208 操作法

209 液相加水分解 試料タンパク質又はペプチドを加水分解管に入れ、乾燥する。(注：試料中の水分で加水分解用の塩酸が希釈されないように、試料を乾燥する。)凍結乾燥タンパク質500

212 μg 当たり加水分解液200 μL を加え、ドライアイス—アセトン
213 浴中で凍結させた後、減圧下で管を熔封する。酸化を防ぐため、
214 通常110℃で24時間、減圧下又は不活性ガス置換下で試料を加
215 水分解する。タンパク質が完全に加水分解されない懸念がある
216 場合は、長時間の加水分解(例えば、48、72時間)についても調
217 べる。

218 **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
219 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
220 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
221 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
222 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
223 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
224 部を不活性ガスで置換するか減圧(0.0267 kPa以下)にして、約
225 110℃で24時間加熱する。気体状の酸が乾燥試料を加水分解す
226 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
227 後、試料を減圧乾燥して残留する酸を除く。

228 方法2

229 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
230 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。

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

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

238 方法3

239 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
240 還元剤として用いることによって防げる。

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

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

250 方法4

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

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

255 **操作法** 試料タンパク質又はペプチドをギ酸20 μL に溶かし、
256 50℃で5分間加熱した後、酸化液100 μL を加え、10 ~ 30分間
257 放置する。この反応で、システインはシステイン酸に、メチオ
258 ニ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
259 心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
260 ンの修飾が起こる。過ギ酸酸化したタンパク質は方法1又は方
261 法2で加水分解する。

262 方法5

263 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
264 相加水分解中に行われる。

265 **加水分解液** 0.2%のフェノールを含む6 mol/L塩酸にアジ化

266 ナトリウムを最終濃度0.2 w/v%になるように加える。フェノ
267 ールはチロシンのハロゲン化を防止する。

268 **液相加水分解** 試料タンパク質又はペプチドを約110℃で24
269 時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/
270 シ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
271 ス테인酸に変換される。この方法は方法4よりもチロシンの
272 回収率が高いが、メチオニンは定量的に回収されない。メチオ
273 ニ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
274 ニンスルホンに変わる。

275 方法6

276 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
277 れる。

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

280 **気相加水分解** 試料タンパク質又はペプチドを約110℃で24
281 時間加水分解する。この加水分解中に、試料中のシステイン/
282 シ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
283 て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
284 を補正する方法として、タンパク質1 mol当たり1 ~ 8 molの
285 システインを含む標準タンパク質を酸化的加水分解して得られ
286 るシステイン酸の回収率を調べることが推奨される。タンパク
287 質又はペプチドの加水分解物からの回収率は、加水分解してい
288 ないシステイン酸標準品からの回収率より一般に約30%低い。
289 ヒスチジン、メチオニン、チロシン及びトリプトファンも修飾
290 されるので、本法では完全なアミノ酸組成分析は行えない。

291 方法7

292 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
293 エチル化反応で行われる。

294 **還元液** ピリジン83.3 μL 、4-ビニルピリジン16.7 μL 、トリ
295 プチルホスフィン16.7 μL 及び水83.3 μL を適当な容器にと
296 り、混和する。

297 **操作法** 試料タンパク質又はペプチド(1 ~ 100 μg)を加水
298 分解管にとり、この管をより大きなガラス管の中に入れる。大
299 きいガラス管の中に還元液を入れ、減圧(約0.0067 kPa)下で密封
300 し、約100℃で5分間放置する。次に、加水分解管を取り出し、
301 減圧デシケーター中で15分間乾燥し、残留する試薬を除く。
302 ピリジルエチル化したタンパク質又はペプチドは前記の方法で
303 酸加水分解する。このピリジルエチル化反応をタンパク質1
304 mol当たり1 ~ 8 molのシステインを含む標準タンパク質につ
305 いて同時に行い、ピリジルエチル化システインの回収率を補正
306 する。ピリジルエチル化反応を長時間行くと、タンパク質中の
307 末端 α -アミノ基及びリシンの ϵ -アミノ基が修飾される可能
308 性がある。

309 方法8

310 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
311 エチル化反応で行われる。

312 **原液** 次の3種類の原液を調製し、ろ過する。原液A : 4
313 mmol/Lエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含むpH 8.5の
314 1 mol/Lトリス緩衝液、原液B : 8 mol/L塩酸グアニジン溶液、
315 原液C : 10% 2-メルカプトエタノール溶液。

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

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

に室温で2時間放置する。次に、この液に4-ビニルピリジン
約2 μL を加え、更に2時間室温で暗所に放置してピリジルエチ
ル化反応を行う。逆相HPLCを用いてタンパク質又はペプチド
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、
真空遠心分離で乾燥させる。

方法 9

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
シメチル化反応で行われる。

原液 方法8に従って調製する。

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

緩衝液 方法8で調製した還元液を用いる。

操作法 試料を緩衝液50 μL に溶かし、原液C約2.5 μL を加
える。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
放置する。次に、総チオール理論量の1.5倍量のカルボキシ
メチル化溶液を加え、暗所に室温で更に30分間放置する。
(注：タンパク質のチオール含量が不明の場合には、タンパク
質20 nmol当たり100 mmol/Lヨードアセタミド溶液5 μL を加
える。)反応は過剰の2-メルカプトエタノールを加えて停止さ
せる。タンパク質又はペプチドの脱塩は逆相HPLCによる分離
で行う。酸加水分解する前に、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
酸加水分解の過程でS-カルボキシメチルシステインに変化す
る。

方法 10

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
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：
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
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。)

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)
の0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液(1→100)を調製する。

操作法 試料約20 μg を加水分解管に入れ、還元液5 μL を加
える。これに2-プロパノール10 μL を加え、真空遠心分離で
水分を除去した後、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
た加水分解前の試料の脱塩が不必要な点である。

方法 11

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
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
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
を合わせてGlxで表す。タンパク質又はペプチドはビス(1,1-
ト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
スパラギン酸及びグルタミン酸を含むタンパク質又はペプチド
中の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。

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

操作法 洗浄した加水分解管に試料約200 μg をとり、溶液A
又は溶液B 2 mL及び溶液C 2 mLを加え、減圧下で加水分解管

を密封する。これを暗所で60℃、4時間加熱する。次にこの試
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
量のn-ブチル酢酸で3回抽出した後、凍結乾燥する。このタ
ンパク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、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、
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
分解法を行う必要がある。)

アミノ酸分析の方法論とその基本原理

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
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
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
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
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。
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
用することができ、1分析当たり通常5 ~ 10 μg のタンパク質
試料を必要とする。その他の方法は一般に遊離アミノ酸を誘導
体化(例えば、フェニルイソチオシアネート、6-アミノキノイ
ル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメイト、o-フタ
ルアルデヒド、(ジメチルアミノ)アゾベンゼンスルホンクロ
リド、9-フルオレニルメチルクロロギ酸、7-フルオロ-4-
ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールなどによる誘導体化)
した後に逆相HPLCで分離するプレカラム法である。この
方法は感度が非常に高く、通常1分析当たり0.5 ~ 1.0 μg のタ
ンパク質試料でよいが、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。操作上の変動に対して、一般にポストカラム法の
ほうがプレカラム法に比べて影響を受けにくい。

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
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
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
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
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
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
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
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
算される。

方法 1 ニンヒドリンによるポストカラム検出法

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
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
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^+
を基本とした陽イオン交換系を利用し、 Na^+ を基本とした陽イ
オン交換系はタンパク質の加水分解で得られる単純なアミノ酸
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。
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
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
勾配変化もしばしば使用される。

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

色を呈する。イミノ酸以外のアミノ酸は紫色を呈し、波長570 nmに吸収の極大を示す。プロリンのようなイミノ酸は黄色を呈し、波長440 nmに吸収の極大を示す。カラムから溶出したアミノ酸とニンヒドリンの反応は440 nmと570 nmの両波長で記録し、得られたクロマトグラムはアミノ酸組成の決定に利用される。

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

方法2 OPAによるポストカラム蛍光検出法

o-フタルアルデヒド(OPA)はチオール化合物の存在下で一級アミンと反応し、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、この方法には多くの変法がある。

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リウムで酸化し、OPA及び*N*-アセチル-L-システインや2-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の影響をほとんど受けない。

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で誘導体化した後、反応物を蛍光検出器に通過させる。OPA-誘導体化アミノ酸の蛍光強度は励起波長348 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

検出限界はほとんどのアミノ酸誘導体で数10 pmolのレベルである。数pmolから数10 nmolの範囲で直線性が得られる。良好な組成値を求めるには、加水分解前の量として500 ng以上の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。

方法3 PITCプレカラム誘導体化法

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

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日間クロマトグラフ上での目立った変化は起こらない。

ODSカラムを用いた逆相HPLCでのPTC-アミノ酸の分離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せで行う。カラムから溶出したPTC-アミノ酸は波長254 nmで検出する。

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

も適している。

方法4 AQCプレカラム誘導体化法

カラムに導入する前にアミノ酸を6-アミノキノリン-*N*-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、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。

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

ODSカラムでのAQC-アミノ酸の分離はアセトニトリル濃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起波長250 nm、蛍光波長395 nmで選択的に検出できるので、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分後にはもはや誘導体化反応は起こらない。

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

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

方法5 OPAプレカラム誘導体化法

カラムに導入する前にアミノ酸を*o*-フタルアルデヒド(OPA)で誘導体化し、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。この方法では二級アミンのアミノ酸(例えば、プロリン)は検出しない。

OPAはチオール試薬の共存下で一級アミンと反応し、強い蛍光を持つイソインドール化合物を生成する。2-メルカプトエタノールや3-メルカプトプロピオン酸がチオール化合物として用いられる。OPAはそれ自体が蛍光を持たないので、妨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、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で行う。

OPAでプレカラム誘導体化したアミノ酸は逆相HPLCで分離する。OPA-アミノ酸誘導体は不安定であるので、HPLC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-アミノ酸誘導体の蛍光強度は励起波長348 nm、蛍光波長450 nmで測定する。

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

方法6 DABS-Clプレカラム誘導体化法

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ド(DABS-Cl)で誘導体化し、逆相HPLCで分離して可視光で検

536 出する方法である。

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

540 19種の天然にある全てのアミノ酸のDABS誘導体は、アセト
541 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
542 HPLCのODSカラムで分離することができる。カラムから分
543 離して溶出したDABS-アミノ酸は可視領域の波長436 nmで
544 検出する。

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

556 非タンパク質性アミノ酸であるノルロイシンは、 α -アミ
557 ノ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
558 ては使用できない。ニトロチロシンはいずれのアミノ酸ピーク
559 とも重ならないので、内標準物質に使用できる。

560 DABS-アミノ酸の検出限界は約1 pmolである。2 ~ 5
561 pmolの各DABS-アミノ酸が信頼性を持って定量的に測定で
562 き、1分析当たりDABS化したタンパク質加水分解物10 ~ 30
563 ngが必要である。

564 方法7 FMOC-Clプレカラム誘導体化法

565 9-フルオレニルメチルクロロギ酸(FMOC-Cl)によりアミノ
566 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
567 方法である。

568 FMOC-Clは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い
569 蛍光を持つ物質を生成する。アミノ酸とFMOC-Clの反応は水
570 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
571 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
572 ていく。FMOC-Clはそれ自体が蛍光を持っているが、過剰の
573 この試薬と蛍光性副生成物はFMOC-アミノ酸を消失させる
574 ことなく除くことができる。

575 FMOC-アミノ酸はODSカラムを用いた逆相HPLCで分離
576 される。この分離は、酢酸塩緩衝液/メタノール/アセトニト
577 リル混液(5:4:1)から酢酸塩緩衝液/アセトニトリル混液
578 (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
579 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
580 各誘導体は励起波長を260 nm、蛍光波長を313 nmに設定した
581 蛍光光度計で検出される。

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

584 方法8 NBD-Fプレカラム誘導体化法

585 7-フルオロ-4-ニトロベンゼン-2-オキシ-1,3-ジオ
586 ザール(NBD-F)によりアミノ酸を誘導体化し、これを逆相
587 HPLCで分離して蛍光で検出する方法である。

588 NBD-Fは一級アミンと二級アミンの両方と反応し、強い蛍
589 光を持つ物質を生成する。アミノ酸はNBD-Fと60℃で5時間加

590 熱することによって誘導体化される。NBD-アミノ酸誘導体
591 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
592 系を用いることによって逆相HPLCのODSカラムで分離され、
593 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
594 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
595 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
596 長を480 nm、蛍光波長を530 nmに設定した蛍光光度計で検出
597 される。

598 この方法の感度は、OPAと反応しないプロリンを除いて、
599 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
600 り、OPAと比べてNBD-Fのほうが都合がよいかもしれない。
601 各アミノ酸の検出限界は約10 fmolである。最終の標識反応溶
602 液中に約1.5 μ gのタンパク質加水分解物が含まれていれば、分
603 析することができる。

604 データの計算と解析

605 タンパク質又はペプチドの加水分解物中のアミノ酸含量を測
606 定するときには、酸加水分解の段階でトリプトファンとシステ
607 イ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
608 レ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
609 バ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
610 水分解中に酸化を受け、また、あるアミノ酸(例えば、グリシ
611 ンやセリン)は外部から混入しやすい。気相加水分解で反応容
612 器中を適切な真空度(0.0267 kPa以下)にするか、又は不活性ガ
613 ス(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
614 とができる。したがって、タンパク質又はペプチドの加水分解
615 物中のシステイン、トリプトファン、トレオニン、イソロイシ
616 ン、バリン、メチオニン、グリシン及びセリンの定量値は変動
617 しやすく、その解析にはより一層の検討と考察が必要である。

618 計算

619 **アミノ酸のモル%** アミノ酸のモル%とは、タンパク質中の
620 100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
621 は試験するタンパク質の分子量が明らかでないときのアミノ酸
622 分析データを評価するのに有用である。この情報はタンパク質
623 又は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
624 分析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
625 定する。試料中の各アミノ酸のモル%を次式により計算する。

$$626 \quad 100 \, r_U / r$$

627 r_U : 個々のアミノ酸のピーク面積から求めた量(nmol)

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

630 得られた各アミノ酸のモル%を既知タンパク質のそれと比較
631 することにより試料タンパク質を同定することができる。

632 **未知タンパク質試料** このデータ解析法は、アミノ酸分析デ
633 ータを用いて未知タンパク質試料のタンパク質濃度を推定する
634 のに利用できる。次式により回収された各アミノ酸の質量(μ g)
635 を計算する。

$$636 \quad m M_w / 1000$$

637 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

638 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
639 ノ酸の平均分子量

640 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

641 されたアミノ酸を適切に補正した後のタンパク質の総質量の推
 642 定値となる。未知タンパク質の分子量がSDS-PAGEや質量分
 643 析でわかれば、そのアミノ酸組成が予測できる。次式により各
 644 アミノ酸の残基数を計算する。

$$645 \quad m / (1000 M / M_{WT})$$

646 m : 回収されたアミノ酸の量(nmol)

647 M : タンパク質の総質量(μg)

648 M_{WT} : 未知タンパク質の分子量

649 **既知タンパク質試料** このデータ解析法は、分子量とアミノ
 650 酸組成が既知のタンパク質試料のアミノ酸組成及びタンパク質
 651 濃度をアミノ酸分析データを用いて調べるのに利用できる。分
 652 析しようとするタンパク質のアミノ酸組成が明らかなきには、
 653 あるアミノ酸の回収率は良好であるが、他のアミノ酸の回収率
 654 が完全又は部分的な破壊(例えば、トリプトファン、システイ
 655 ン、トレオニン、セリン、メチオニン)やペプチド結合の不完
 656 全開裂(すなわち、イソロイシンとバリンの開裂)又は遊離アミ
 657 ノ酸の外部からの混入(すなわち、グリシンやセリンの混入)の
 658 ために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
 659 できる。

660 回収率の最も良いアミノ酸はそのタンパク質を代表している
 661 ので、そのアミノ酸がタンパク質を定量するのに利用される。
 662 一般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
 663 ン、グルタミン酸/グルタミン、アラニン、ロイシン、フェニ
 664 ルアラニン、リシン、アルギニンがある。これら回収率の良い
 665 アミ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
 666 収率の良い各アミノ酸の量(nmol数)をそのアミノ酸の理論量で
 667 除し、回収率の良い各アミノ酸に基づいたタンパク質量を求め、
 668 これらの値を平均する。回収率の良い各アミノ酸によって求め
 669 たタンパク質量は平均値に対して均等に分布していなければな
 670 らない。平均値から大きくはずれた値は除外する。通常、平均
 671 値からの偏差が5%を超えるものは除外の対象と考えられる。
 672 残りの値から平均値を再計算して試料のタンパク質量を求める。
 673 各アミノ酸の含量を計算で求めた平均タンパク質含量で除して
 674 試料のアミノ酸組成を求める。

675 相対組成誤差(%)を次式により計算する。

$$676 \quad 100 m / m_s$$

677 m : アミノ酸の実測値(アミノ酸残基当たりのnmol)

678 m_s : 当該アミノ酸の理論量

679 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
 680 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
 681 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
 682 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。タン
 683 パク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タ
 684 ンパク質の同定と純度の保証に利用できる。

1 ペプチドマップ法〈G3-3-182〉

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 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
 4 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

5 1. はじめに

6 タンパク質は、大きく複雑な構造を有しており、不適切な会
 7 合、分解又は翻訳後修飾により一次構造の不均一性を示す分子
 8 もある。タンパク質は分子量が大きく複雑であるため、一つの
 9 分析手法を用いてタンパク質のまま化学的に同定することは非
 10 常に困難である。試料タンパク質を、十分な質量分解能で同定
 11 可能なより小さな断片に切断することにより、タンパク質の一
 12 次構造を決定することが可能である。この手順は、ペプチド
 13 マップ法として一般に知られているタンパク質同定技術の原理
 14 である。ペプチドマップ技術には、タンパク質中の特定のアミ
 15 ノ酸残基間のアミド結合を選択的に切断し、一連の予測された
 16 ペプチドを得るための酵素消化ステップが含まれる。ペプチド

17 混合物のクロマトグラフィー分析法による分離、検出及び同定
 18 により、タンパク質の一次構造に関する情報を明らかにし、タ
 19 ンパク質の同定が可能である。ペプチドマップ法は、相対比較
 20 の手法である。つまり試料タンパク質より得られた結果は、同
 21 様に処理した標準品／標準物質の結果と比較して、試料タンパ
 22 ク質を同定する。この比較による同定では、試料タンパク質の
 23 一次構造が同様に処理した標準品／標準物質(参照タンパク質)
 24 の一次構造と一致することを確認する。

25 本参考情報では詳細に記載していないが、ペプチドマップ法
 26 は一次構造の全体的な変化を検出することが可能であり、タン
 27 パク質の品質の決定のために広く応用されている。アミノ酸の
 28 誤取込みやジスルフィド結合のかけ違い、翻訳後修飾及び分解
 29 などに起因する試料タンパク質の純度は、定量的なペプチドマ
 30 ヱップ法を用いて決定することができる。スケールアップや製造
 31 工程変更時のペプチドマップ法による比較は、プロセスの恒常
 32 性に関する検討を裏付けることができる。さらに、ペプチド
 33 マップ法は、糖鎖付加や意図的修飾(例：PEG化)のような修飾
 34 の程度と特定のアミノ酸修飾部位を決定するのに用いることが
 35 できる。本参考情報は、タンパク質医薬品の化学的な同定にお
 36 けるペプチドマップ法の使用に焦点を当てており、特異性が分
 37 析法の主要な特性である。

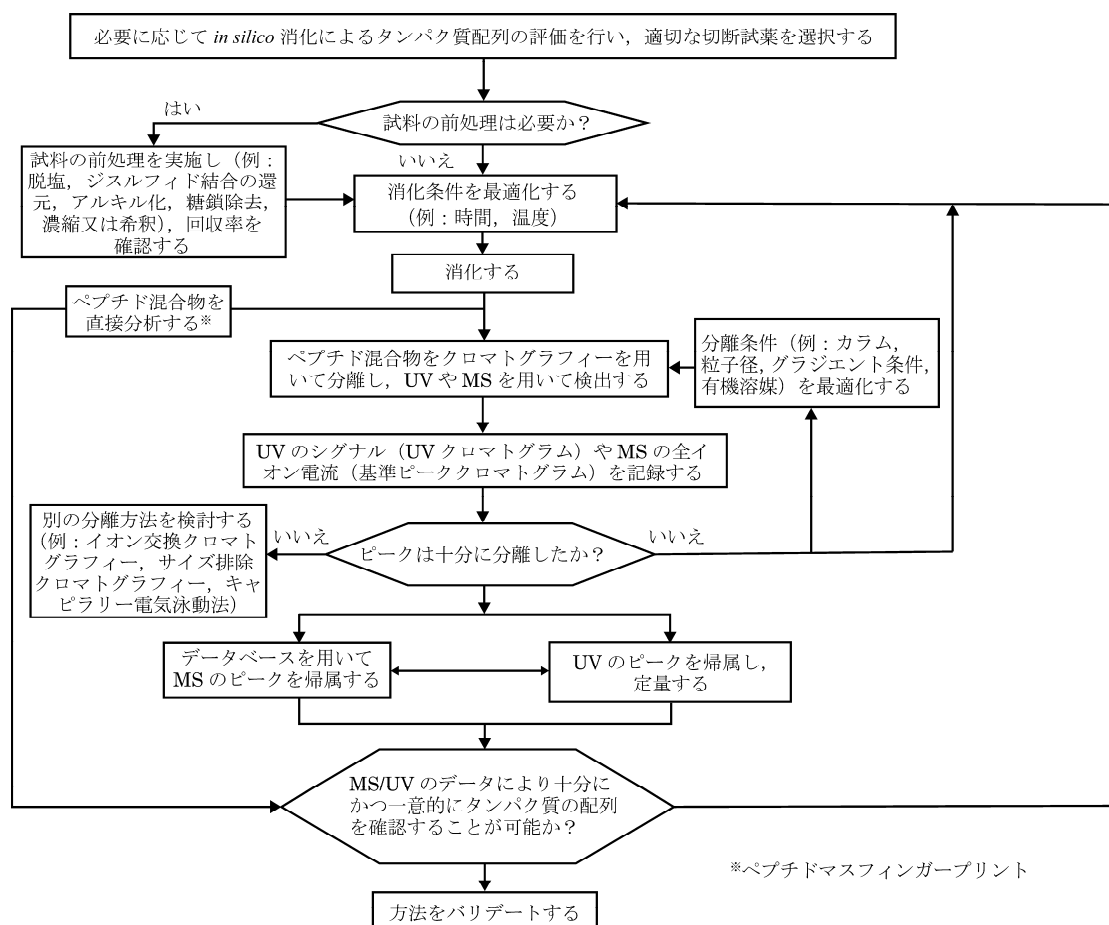


図1 ペプチドマップ法における分析手順と目標性能パラメーターの確定

2. ペプチドマップ法を用いた確認試験の開発における留意事項

確認試験の手順を開発する前に、同一施設で製造される他のタンパク質医薬品と試料タンパク質を区別するために要求される適用方法や特異性のレベルについて理解することが重要である。場合により、構造的に関連するタンパク質試料を区別するために複数の異なる手法が必要となる。それぞれのタンパク質は固有の特徴を有しているため、それをよく理解し、科学的にアプローチすることにより、十分な特異性を有するバリデートされた分析手順の開発が可能となる。分析に適した長さのペプチドを得るための前処理及び切断条件を選択するためには、試料タンパク質のアミノ酸配列を評価すべきである。目的によるが、開発段階ではタンパク質の変化に関する予備的知識がほとんどないことから、配列カバー率を十分に確保することが重要である。ペプチドマップ法の分析技術の開発において、次の事項を考慮すべきである。また、これらの要素を図1に示す。

3. 前処理

原薬、製剤又は標準品／標準物質を分析する際、分析の妨害となる添加剤やキャリアタンパク質を含む場合は分離・精製が必要になることがある。残存する妨害物質は、酵素的切断の効率やペプチドマップの見た目に影響を与える場合がある。残存する物質や試料精製過程が最終的なペプチドマップに及ぼす影響は、開発過程において評価する必要がある。

タンパク質の三次構造により、切断酵素が全ての切断部位に完全に作用するのを妨げられることにより、配列カバー率が不十分となることがある。タンパク質のカオトロピック試薬(例：塩化グアニジウム、尿素)及び界面活性剤(例：ドデシル硫酸ナトリウム)による処理は消化前にタンパク質の折りたたみをほぐすために使用される。変性試薬は酵素活性に影響を及ぼしうるため、追加の精製(例：透析ろ過)や希釈操作が消化前に必要になる場合がある。酵素が切断部位に完全に作用できるように、消化前にジスルフィド結合の還元及びアルキル化が必要なものもある。しかし、システイン-システイン結合の情報はその際に失われてしまう。ジスルフィド結合の還元に一般的に使用される試薬には、ジチオスレイトール及びトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンのようなトリアルキルホスフィン化合物がある。還元されたシステインをアルキル化する試薬には、ヨードアセトアミド、ヨード酢酸及び4-ビニルピリジンがある。アルキル化試薬の使用によりペプチドへの付加体が生じる可能性があり、影響を受けたペプチドはクロマトグラフィーの分離に影響を与え、分子量が変化する。

ペプチドマップ法は相対比較の手法であるため、試料タンパク質に対して行われるいかなる精製や前処理ステップも、標準品／標準物質に対しても同様に実施する必要がある。残存する物質、精製手順、又はタンパク質の前処理が分析法の特異性及び精度に及ぼす影響は、開発段階で精査し、分析法バリデーションにおいて実施される頑健性の検討に組み入れることを考慮すべきである。

4. 消化

切断技術の選択は、タンパク質により異なる。酵素的及び化学的手法において汎用される切断試薬とその特異性を表1に示す。必要な場合には、他の切断試薬を使用することや方法を組み合わせることもある。

タンパク質消化の効率及び再現性に影響を与える因子には、

表1 切断試薬の例

種類	試薬	特異性
酵素的 手法	トリプシン(EC 3.4.21.4)	アルギニン及びリシン残基のC末端側
	キモトリプシン(EC 3.4.21.1)	疎水性アミノ酸残基(例：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A (ペプシン) (EC 3.4.23.1)	特異性の低い消化
	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)	リシン残基のC末端側
	グルタミルエンドペプチダーゼ(Glu-CエンドプロテアーゼV8プロテアーゼ) (<i>S. aureus</i> V8株由来) (EC 3.4.21.19)	グルタミン酸及びアスパラギン酸残基のC末端側
	ペプチジル-Aspメタロエンドペプチダーゼ(Asp-Nエンドプロテアーゼ) (EC 3.4.24.33)	アスパラギン酸残基のN末端側
化学的 手法	クロストリパイン(Arg-Cエンドペプチダーゼ) (EC 3.4.22.8)	アルギニン残基のC末端側
	臭化シアン	メチオニン残基のC末端側
	2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸	システイン残基のN末端側
	O-ヨードソ安息香酸	トリプトファン及びチロシン残基のC末端側
	希酸	アスパラギン酸及びプロリン残基
	3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルチオ)-3H-インドール(BNPS-スカラー)	トリプトファン残基

pH、消化用緩衝液、温度、時間及びタンパク質に対する酵素／試薬の比率などが含まれる。

最適な消化混合液のpHは、一般に酵素又は試薬により決定される。選択されたpHでのアミノ酸の側鎖及びタンパク質の修飾を含むペプチドの化学的安定性を考慮しなければならない。例えば、臭化シアンを切断試薬として用いる場合は、強酸性条件(例：pH 2、ギ酸)が必要である。一方、トリプシンを切断試薬として用いる場合は、弱アルカリ性条件(pH 8)が適切である。

適切な温度は、切断試薬により異なる。例えば、ほとんどの酵素は25 ~ 37℃の範囲内に最適な活性を持つ。温度は、酵素の特異性をある程度決定することがある。このような場合、温度を調整することによりある種のタンパク質に対する消化条件を最適化することができる。理想的には、脱アミドのような試料に関連する化学的副反応やタンパク質凝集を最小化し、一方で、切断試薬の活性を維持しつつ試料タンパク質の消化に対する感受性を最大化するように消化温度を設定する。

消化の変動を避けるために、消化時間は意図した用途に十分であることを確認することが必要である。不完全な消化によるペプチド断片が最小限となるような十分な消化を確保するために、消化の経時変化に関する簡単な検討を実施すべきである。消化時間を分から日の単位で変化させ、単一反応溶液から一定量ずつとり適切に安定化し、分析を行うことで、タンパク質の完全な消化に必要な時間を決定する。

実用的な時間内(例：2 ~ 20時間)で望ましいレベルの消化が得られるように十分な切断試薬を用いるべきであるが、試薬がペプチドマップに影響を与えることを避けるため切断試薬の量

119 は最小限にする。酵素消化においては、タンパク質とプロテアーゼの質量比は20 : 1から200 : 1が一般的である。切断試薬が不安定な場合、複数回に分けて切断試薬を添加することにより切断効率が改善されるかもしれない。酵素は、固相支持体に結合させることで、相対的に多量のプロテアーゼを用いることができ、更に、酵素の自己消化物の混入及び酵素断片のペプチドマップへの影響を避けることができる。化学的な切断試薬は、通常、大過剰で用いられ、消化終了時に除去する必要がある。

127 消化中の試料タンパク質の最適な濃度は、経験的に決定される。タンパク質及び部分消化されたタンパク質の凝集が起こらないよう濃度は低くすべきであるが、続くクロマトグラフィー分離及び選択した検出法において、十分な検出感度で検出されなければならない。試料の希釈又は遠心ろ過のような技術による試料の濃縮が必要な場合もある。試料タンパク質に行われる希釈又は濃縮ステップは、タンパク質医薬品の標準品/標準物質にも同様に実施しなければならない。タンパク質の回収率はどんな濃縮ステップにおいても評価する必要があり、希釈又は濃縮の分析法の特異性及び精度に及ぼす影響は、開発段階で精査し、分析法バリデーションにおいて実施される頑健性の検討に組み入れることを考慮すべきである。

139 消化ステップにおいて、非特異的切断、脱アミド化、ジスルフィド結合の異性化、メチオン残基の酸化、リシン残基のカルバモイル化又はペプチドのN末端におけるグルタミンの脱アミド化により生じたピログルタミル基の形成のような副反応の結果、ペプチドマップが不明瞭になる可能性がある。自己消化は、タンパク質消化酵素が酵素自体を消化することにより生じた無関係なピークをもたらす。自己消化により生じたペプチドのピーク強度は、基質に対する酵素の比率及び使用した酵素の修飾と品質によって異なる。自己消化を避けるため、タンパク質消化酵素試液は、酵素活性を抑制するpHで調製するか、使用直前に調製する。自己消化を防ぐようにプロテアーゼを改変した修飾酵素が使用されることもある。酵素のリシン残基をメチル化又はアセチル化して自己消化部位の数を減少させた、市販のトリプシン試薬(しばしばプロテオミクスグレードと呼ばれる)も利用可能である。消化により生じたアーティファクトを同定するために、試料タンパク質以外の全ての試薬を用いたブランクの消化試料を用いて空試験を行う。

156 5. 分離

157 消化ステップにより得られたペプチド混合物のクロマトグラフィー分離は、その複雑さを解明し、データの適切な解釈が有意義で再現性のあるものとなるようにしなければならない。ペプチドマップの複雑さにより、最終的に、最適なクロマトグラフィー条件、カラム及び移動相の組み合わせが求められる。分析法の最適化実験は、最も質が高く再現性のあるクロマトグラムを得るために必要となる。試料タンパク質の分子量もまた、マップの複雑さと最適な分離に影響を及ぼす。

165 多くの技術(例：イオン交換高速液体クロマトグラフィー[HPLC]、疎水性相互作用HPLC、及びキャピラリー電気泳動)はこれまでペプチドマップ分析におけるペプチド分離に用いられてきたが、本参考情報ではペプチドマップ法の分離ステップにおいて最も一般的に用いられている方法である逆相HPLC(RP-HPLC)に重点を置く。

171 クロマトグラフィーにおけるカラムは、それぞれのタンパク質に応じて経験的に選択される。シリカ、ポリマー又はハイブ

173 リッド担体を基にした種々の孔径(8 ~ 100 nm)又は無細孔のカラムは、十分な分離を与えることが示されてきた。粒子径が2 µm未満のカラムが利用でき、一般的に3 ~ 5 µmの粒子径のカラムよりも分離効率がよい。一般に、オクチル又はオクタデシルシリル基を結合させた固定相がペプチドには最適である。30 nm又はそれより小さな細孔を持つオクタデシルシラン(C18)がペプチドマップの分離ステップで最もよく利用される結合相である。

181 ペプチドのRP-HPLC分離に最も一般的な移動相は、有機溶媒としてアセトニトリルを含む水である。しかし、メタノール、2-プロパノール、又は1-プロパノールなどの他の有機溶媒も用いることができる。移動相にプロパノールなどの溶媒を用いることは、疎水性の高いペプチドを多く含む試料の分離に有用である。しかし、親水性又は短いペプチドはカラムのボイド容量を示す時間に溶出する可能性があることに留意する。酸、塩基、緩衝塩及びイオンペア試薬のような移動相の添加剤は、一般に、ペプチドの良好なクロマトグラフィー分離のために必要である。最も一般的な移動相の添加剤はトリフルオロ酢酸(TFA)であり、一般的には0.05 ~ 0.2%の濃度で用いられる。添加剤としてリン酸の使用はあまり一般的ではないが、紫外(UV)検出器を用いる場合に有用である。揮発性の酸や塩は、質量分析計による検出との親和性を改善するために移動相に用いることができる。TFAはペプチドの分離の質に非常に良い影響を及ぼすが、質量分析計による検出の感度は、イオンサプレッション効果により悪影響を受ける。ギ酸、酢酸又はこれらをTFAと共に用いると、イオンサプレッションを抑制することにより質量分析計の感度を向上することができる。クロマトグラフィーカラムの温度調節は、良好な再現性を得るために必要である。逆相カラムにおいて分離は一般に温度の上昇と共に向上するため、カラム温度は、ペプチド分離の最適化やある種のペプチドの保持や溶出を改善するために用いられることがある。

205 6. 検出

206 RP-HPLCは、確認試験としてのペプチドマップ法で用いられる最も一般的な分離方法であり、最も一般的な検出方法は、214 nmでのUV光吸収である。タンパク質の消化により生じたペプチドは、より長波長(例：280 nm)の光を吸収する芳香族側鎖を持つアミノ酸を含まない場合があるので、タンパク質の配列カバー率を確保するには、移動相によるバックグラウンドを最小化するように注意し、214 nm(ペプチド結合が吸収する光の波長)での検出が不可欠である。また、その他の検出方法も適切である。

215 UV検出の限界は、ペプチドの構造に関する情報が得られないことである。質量分析は、ペプチドが同時に溶出した場合の選択性に加えて、ペプチドの同定に役立つ質量情報を提供する有用な検出方法である。ほとんどの分析目的において、RP-HPLCからの溶出液は、移動相が質量分析計に適している場合には、直接質量分析計に導入することができる。移動相に特有の留意事項は、選択したイオン化方法による。エレクトロスプレーイオン化法(ESI)は、タンパク質やペプチドを質量分析計に導入する最も一般的な方法であり、揮発性の水溶媒混合液を用いた際に最もよいイオン化効率が得られる。ESI-MSを用いたペプチドマップ法では、ポジティブイオンモードが用いられることが多い。pHを下げ、それによりペプチドのプロトン化

を促進する目的で、一般にギ酸や酢酸が移動相に添加される。緩衝液や塩は、シグナルを減少させることに加え、不揮発性の塩がイオン源に付着するため、使用は最小限にすべきである。前述のように、TFAは、マトリックス干渉の一種であるイオンサプレッションを引き起こし、特にESIを用いた場合にペプチドのシグナルを抑制する可能性があるため、避けるべきである。また、イオンサプレッションは糖ペプチドのイオン化効率を抑制し、感度を低下させる。したがって、UVとMSの両方において最適な結果を得るためには、条件を最適化することが重要である。

7. データ解析

ペプチドマップ法は相対比較の手法である。試料タンパク質が意図するタンパク質であるかを確認するために、試料タンパク質のペプチドマップを標準品／標準物質を同様な前処理、分離及び検出方法を用いて得られたペプチドマップと比較しなければならない。保持時間、ピークレスポンス(ピーク面積又はピーク高さ)、ピーク数及び全体的な溶出パターンの視覚的な比較は、手順の最初のステップである。重要なピークのピークレスポンス比及びピークの保持時間について、更に客観的解析を行うことが最良の方法である。もし試料タンパク質消化物及び標準品／標準物質の消化物の全ての重要なピークが同じ保持時間及びピークレスポンス比を示したなら、試料タンパク質の同一性が確認される。例えば、モノクローナル抗体試料は、共通のFcペプチドを含んでおり、ペプチドマップ試験の際には参照ピークとして用いられている。参照ペプチドを試料消化物に添加し、重要なピークのピークレスポンス比と保持時間をあらかじめ設定された判定基準と比較することが可能である。選択される比較方法は、得られるペプチドマップの複雑さと個々の確認試験の目的(例：同一施設で製造される別のタンパク質医薬品との区別や同じタンパク質医薬品の変異体との区別)において求められる特異性によって異なる。

高い特異性が求められる場合、質量分析を日常的な分析において用いることで、ペプチドの修飾、切断、切断ミス、不純物及び分離されずに一つのピークとして共溶出したピークに関する知見を得ることができる。

8. バリデーション実施前の留意事項

ペプチドマップ法の手順の開発の間に、システム適合性の基準及び分析法バリデーションの判定基準の選択につながる知識や経験が得られる。バリデーション実施前の最終レビューにより、手順がバリデーションの準備ができていることを確認し、基準を満たさないリスクを減らすことができる。一般的な手順として、ペプチドマップ法は、広範囲な試験デザイン、試験目的及び性能に関する要求を含んでいる。したがって、一般的な文書にて、特定のシステム適合性やバリデーション基準を規定することは不可能である。バリデーション開始前に次の要素について評価することが推奨される。

ペプチドマップ法の日常的な測定における質量分析の利用は本参考情報には記載していないが、ペプチドマップ法の開発段階におけるペプチドの構造同定に質量分析を適用することは最良の方法である。質量分析による検出は、性能に関する以下のパラメーターを評価するために利用される。

8.1. 配列カバー率

配列カバー率は、目的のタンパク質配列について、ペプチドマップ法を用いて同定されたアミノ酸配列の割合を指す。全て

の分析目的に対応する特定の数値は存在しないが、多くの場合95%程度の配列カバー率がペプチドマップ法において許容できる性能の目標である。

8.2. 特異的な結合切断

選択した酵素又は化学的消化手順により切断される特異的な結合は、同定し、記録する。

8.3. 主なピーク

特異的な結合の切断により回収された主なペプチドは、同定し、記録する。

8.4. 部分的切断

部分的又は不完全な切断を生じやすいペプチド結合及び関連するクロマトグラム上のピークやシグナルは同定する必要がある。

8.5. マイナー／非特異的切断

非特異的な結合の切断の程度は同定し、制限又は管理する必要がある。

8.6. プロテアーゼ由来のピーク

プロテアーゼが試料タンパク質の消化に用いられる場合は、バックグラウンドに認められるプロテアーゼ由来のピークを同定し、必要に応じて制限する必要がある。

8.7. 未消化の「コア」タンパク質

未消化又は部分的に消化されたタンパク質(しばしば「コア」と呼ばれる)は同定し、制限する必要がある。

8.8. 平均ペプチド長

選択したプロテアーゼ又は化学的切断試薬と試料タンパク質の組み合わせにより生成する一連のペプチドを記述する。小さなペプチドと大きなペプチドはトレードオフの関係にある。小さなペプチドは、ペプチドマップ法において高い構造選択性を示すが、多くのピークを示す複雑なマップとなる。一方で、長いペプチドは構造変異体を分離する能力は低くなるが単純なマップが得られる。全ての分析目的に適切な特定のペプチド長は存在しないが、一般的には平均ペプチド長は10～20残基が適切と考えられる。

8.9. 分解能

分解能は、プロテアーゼ又は化学的切断試薬により生成した一連のペプチドを分離するシステムの能力のことをいう。例えば、消化により30種類のペプチドを生じるが共溶出又は非回収により20個のピークしか検出されないかもしれない。不十分な分離を同定し、適切なクロマトグラフィー手順により解決する必要がある。必要に応じて、ペプチド標準品／標準物質の使用や、若しくはシステム性能の基準により管理する。

8.10. システム適合性の基準の選択

システム適合性の基準は、試料タンパク質の消化、分離及び検出の手順が、分析目的に応じて求められるレベルの構造同定が可能な能力を有することを確認できるように設定すべきである。確認試験として日常的な分析で評価されるシステム適合性の基準については、一般的に参照タンパク質消化物のクロマトグラムの評価が実施されることに加え、次のような性能特性が評価されることもある。

- (1)参照クロマトグラムとの定性的な類似性
- (2)消化の程度
- (3)部分的な切断
- (4)非特異的な切断
- (5)ピーク高さ／シグナルノイズ比

335 (6)ピーク形状

336 (7)ピークの保持時間

337 (8)特定のピークの分解能

338 試料の分離、精製又は濃縮を必要とする試験方法の手順に対
339 しては、試料の回収率の基準を設定すべきであり、システム適
340 合性の評価の一部として設定するべきである。消化により生じ
341 たアーティファクトが認められる場合には、妨害のないことを
342 実証するためにブランク消化試料を評価することが必要となる。

343 9. バリデーション

344 ペプチドマップ法の手順のバリデーションを実施する前に、
345 試験操作手順は最終化しシステム適合性の基準と一緒に文書化
346 すべきである。試験を行うたびに、結果をシステム適合性の基
347 準で評価し、過去の試験結果と一致する再現性のある結果が得
348 られているかを判断する。最終化する前は、判定基準がシステ
349 ム適合性の基準によってしばしば変化することがある。分析バ
350 リデーションにおけるプロトコルの要素は次のとおりである。

351 9.1. 特異性

352 分析性能の要件は、確認試験の目的により異なり、リスクア
353 セスメントを行うことにより同一施設で製造されるタンパク質
354 医薬品と試料タンパク質を区別するためにどの程度の特異性が
355 必要かを理解する必要がある。ペプチドマップ法は、試料の一
356 次構造が参照タンパク質と一致することを確認する相対比較の
357 手法である。特異性は適切な標準品／標準物質と構造の類似し
358 たタンパク質試料のペプチドマップと比較することにより確認
359 される。比較試料は、同一施設で製造される他のタンパク質医
360 薬品に関するリスクアセスメントに基づき選択し、バリデー
361 ションのプロトコルとして文書化するべきである。試験の本
362 質的なばらつきを最小化するために、試験時には標準品／標準
363 物質及び試料タンパク質に対して試験操作を実施する。特異性
364 のバリデーション試験として試料タンパク質消化物、標準品／
365 標準物質の消化物及び検体並びに標準品／標準物質の消化物の
366 1:1(v/v)混合液を分析することはペプチドマップ法の試験デ
367 ザインとして有用といえる。試料タンパク質のペプチドマップ
368 における試料タンパク質のピークと、標準品／標準物質の対応
369 するピークの保持時間が僅かに異なることにより、分析者がピ
370 ークは同一ではないと判断することがある。特異性のバリデー
371 ション試験において、混合物試料を試験しペプチドマップで共
372 溶出することにより二つのピークが同一であることを実証でき
373 れば、同一性を確認することができる。化学的に修飾された標
374 準品／標準物質は、pHや温度の条件や一次構造に変化を起こ
375 すことが知られる化学試薬への曝露により作成できる。これら
376 の変化として、アスパラギン及びグルタミン残基の脱アミド化、
377 メチオニン、ヒスチジン又はトリプトファン残基の酸化、並び
378 に酸触媒によるペプチド結合の切断などが挙げられる。化学的
379 に修飾された標準品／標準物質及び標準品／標準物質のペプチ
380 ドマップをあらかじめ決めておいた判定基準に基づいて比較す
381 ることにより、アミノ酸の側鎖の修飾がペプチドマップ法の特
382 異性に影響を及ぼすか否かを示すことができる。

383 9.2. 精度

384 ペプチドマップ法の手順の精度(併行精度、室内再現精度)の
385 測定を容易にするために、経験的に用いられているピークレス
386 ポンス(ピーク面積又はピーク高さ)及びピーク保持係数の数値
387 化の方法を手順に含むべきである。一つのアプローチとしては、
388 ピークレスポンス及びピーク保持時間を、同一のクロマトグラ

389 ム内の再現性の高い参照ピークとの相対値として比較すること
390 が挙げられる。分析手順のバリデーションで得られた精度の結
391 果は、報告の上、バリデーションの判定基準を満たすか確認を
392 行う。精度の結果が判定基準を満たさなかった場合、分析者は
393 手順中の消化や分離ステップの再評価を行う。

394 9.3. 頑健性

395 頑健性は分析手順の開発段階で評価する。繰り返して実施す
396 る必要はないが、バリデーション手順に組み込むこともある。
397 移動相の組成、プロテアーゼの品質又は化学試薬の純度、カラ
398 ムのばらつき及び劣化、消化温度並びに消化物の安定性は全体的な試験の性能と再現性に影響を及ぼしやすい。試験が日常的なロットリリースの目的に使用される場合は、それぞれの重要なパラメーターの許容範囲を評価し、基準値を定める。

402 タンパク質試料の精製、前処理、希釈又は濃縮手順の僅かな
403 変動が回収率や試験システム及びクロマトグラムに影響を及ぼ
404 すため、その影響を試験法開発の時点で同定し管理する必要が
405 ある。試料調製後に残存する物質の分析法の特異性及び精度に
406 及ぼす影響を考慮しなければならない。開発の際に特定された
407 重要パラメーターは、分析法バリデーションにおいて実施され
408 る頑健性の検討に含めるべきである。

409 多くのタンパク質の断片化方法では、タンパク質切断酵素が
410 用いられる。結果としてペプチドマップ法の操作における消化
411 手順は本質的に試験パラメーターの僅かな変動に影響を受けや
412 すい。これらのパラメーターとして、消化pH、緩衝液、緩衝
413 液濃度、イオン強度、消化温度、消化の反応速度、試料タンパ
414 ク質濃度、プロテアーゼの量、プロテアーゼの品質及び消化物
415 の安定性が挙げられる。実験計画法アプローチを用いて同定さ
416 れた重要パラメーターは、その分析におけるばらつきに及ぼす
417 影響を理解するために体系的に検討される。消化手順において、
418 僅かな変動がペプチドマップ手順の精度に影響を与えることが
419 示されたパラメーターは、これらの検討により確立されてバリ
420 デートされた操作範囲内で注意深く管理すべきである。

421 プロテアーゼの品質や化学試薬の純度を評価するため、標準
422 品／標準物質の試料を準備し、異なるロットの切断試薬で消化
423 する。それぞれの消化物に対するクロマトグラムは、ピーク面
424 積、ピーク形状及びピーク数の観点から比較する。その他の重
425 要な化学物質や、試料調製に用いられる還元剤及びS-カルボ
426 キシメチル化試薬などの前処理手順にも同様の手順を適用する
427 ことができる。

428 分離ステップに進む前に消化物を保管する時間や消化物を分
429 離前に保管する条件も評価する。単一の消化物を分注し異なる
430 保存条件で保管した後にクロマトグラフィー法で分離する。こ
431 れらのマップに有意な違いがないか評価する。

432 分離ステップにおいて、カラム間のばらつきは、単一のカラ
433 ムロット内でさえもペプチドマップ法の手順の性能に影響を与
434 えうる。カラムのロット差を評価するため、対象タンパク質の
435 標準品／標準物質を消化し、消化物を単一製造業者からの異な
436 るロットのカラムを用いて分析する。得られたペプチドマップ
437 は、全体的な溶出プロファイル、保持時間及び分離度の観点か
438 らあらかじめ決めておいた判定基準に従い評価する。

439 頑健性の観点からカラムの寿命を評価するため、標準品／標
440 準物質の単一の消化物を注入回数(例：カラム当たり10～
441 250注入)の異なるカラムを用い、ペプチドマップ法の手順に
442 従い分析する。得られたペプチドマップについて、ピークの広

443 がりや全体的な分離に有意な違いがないか比較する。カラムが
444 劣化するにつれて背圧が増加し、ペプチドマップに影響を与え
445 る可能性がある。システム適合性や試験の妥当性の基準は、カ
446 ラムの劣化やその他のペプチドマップ試験の結果に影響を与え
447 る事象の診断に用いられる。

448 10. まとめ

449 ペプチドマップの分析手順は、タンパク質の分離、変性、必
450 要に応じて化学的修飾(例：スルフヒドリル基のプロッキング)、
451 タンパク質消化、ペプチドの分離及び検出、並びにデータ解析
452 を含む複数のステップからなる。それぞれのステップを開発段
453 階で最適化することにより、ペプチドマップ法を用いた確認試
454 験として適切な分析手順を開発することができる。システム適
455 合性の基準は、適切な標準品／標準物質と組み合わせること
456 より手順中の全てのステップが適切に実施され、分析手順のバ
457 リデーションと一貫性のあるペプチドマップが得られるかを評
458 価できるように選択すべきである。ペプチドマップの分析手順
459 が適切に開発され、バリデーションされ、実施されていれば、
460 タンパク質医薬品の重要品質特性である試料タンパク質の確認
461 に用いることが可能である。

1 ペプチド及びタンパク質の質量分析 (G3-4-161)

質量分析(以下「MS」という)は、分子をイオン化させ、統一原子質量単位に対する比で表したイオンの相対質量(m)をイオンの電荷数(z)で割って得られる無次元量の m/z 値に応じてイオンを分離し、検出する方法である。統一原子質量単位は基底状態の ^{12}C の12分の1の質量であり、原子、分子及びイオンの質量を表す際に用いられる。測定結果は、イオンの m/z 値をx軸に、それに対する信号の相対強度をy軸に示したマススペクトルとして示される。イオンの m/z 値と z より、分子の質量を求めることができる。タンデム質量分析(以下「MS/MS」という)は、一段階目の分析部で選択したプリカーサーイオンを解離させ、生じたプロダクトイオンを二段階目の分析部で分離し、検出する手法である。観測したプロダクトイオンの m/z 値により、構造の確認や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あるが、定量にも利用される。MS並びにMS/MSは、ペプチド及びタンパク質分子の質量の測定並びにアミノ酸配列の確認及び翻訳後修飾の確認などに利用できることから、ペプチド及びタンパク質性医薬品の確認試験などに用いられる。

1. 装置

質量分析計は、イオン源、分析部、検出部及びデータ処理部からなる(図1)。イオン源は、導入された試料をイオン化する部位であり、ペプチド及びタンパク質のイオン化には主に、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization)及びエレクトロスプレーイオン化法(ESI: Electrospray ionization)が用いられる。分析部は、生成したイオンを m/z 値に応じて分離する部位であり、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、検出された信号は、データ処理部で処理され、マススペクトルとして出力される。MS/MS又は多段階MSは、複数の分析部を連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。イオンの解離には、通例、衝突誘起解離(CID: Collision-induced dissociation)、ポストソース分解(PSD: Post-source decay)及び電子捕獲解離(ECD: Electron capture dissociation)などが利用される。

2. 各種測定様式

2.1. MS

MSの測定法には次の方法がある。

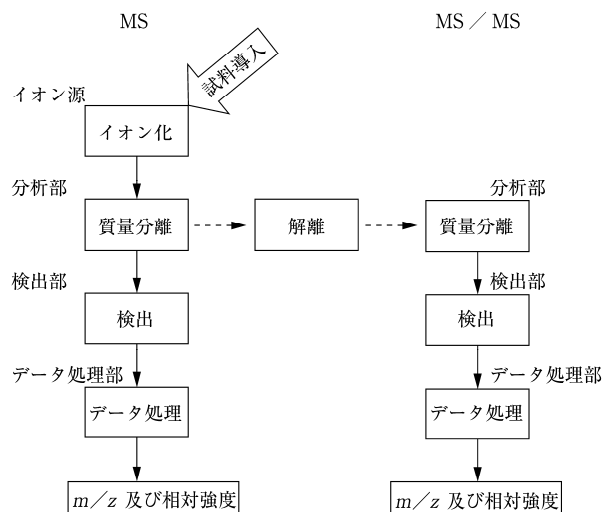


図1 MS及びMS/MSの概念図

(1) 全イオンモニタリング

選択した m/z 値の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 値のイオンのみを検出する方法であり、試料の高精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) プロダクトイオン分析

選択した m/z 値のプリカーサー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) プリカーサーイオンスキャンモード

解離により特定の m/z 値のプロダクトイオンを生ずるプリカーサー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)が起こるプリカーサー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 値のプリカーサーイオンを解離させて生じる特定の m/z 値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タンパク質を適切な溶媒に溶解し

82 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
83 溶液などを用いる。別に試料ペプチド及びタンパク質の構造特
84 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
85 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
86 液とする。通例、ペプチド及びタンパク質の測定には、 α -
87 シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸
88 又はシナピン酸などを用いる。試料溶液とマトリックス溶液を
89 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
90 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
91 試料をイオン化し、マスペクトルを得る。

92 (2) エレクトロスプレーイオン化法(ESI)

93 脱塩した試料ペプチド及びタンパク質を適切な溶媒に溶解し
94 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
95 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
96 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
97 導入する。キャピラリーに電圧をかけて試料をイオン化し、マ
98 スペクトルを得る。

99 3.2. MS/MS

100 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
101 を用いてMS/MSを行い、規定されたプロダクトイオンが検
102 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
103 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
104 る。医薬品各条で規定されたプリカーサーイオンを選択し、試
105 験条件に従い適切な解離条件を設定して解離させ、マスペク
106 トルを得る。分子内にジスルフィド結合を含むペプチドのMS
107 /MSを行う場合は、通例、試料を還元アルキル化する。還元
108 試薬として、通例、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタ
109 ノール及びトリス(2-カルボキシエチル)フォスフィンなど
110 が用いられる。また、アルキル化試薬として、通例、ヨード酢
111 酸、ヨードアセトアミド及び4-ビニルピリジンなどが用いら
112 れる。

113 4. 確認試験への応用例

114 4.1. 分子の質量の確認

115 MSにより試料ペプチド及びタンパク質分子の質量を測定す
116 る。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
117 ーク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
118 ピークが確認できない場合は、ピークの頂点より平均質量を
119 求める。試料タンパク質が多数の多価イオンとして観測される
120 場合には、デコンボリューション処理により平均質量を求める。
121 測定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
122 る。

123 4.2. アミノ酸配列などの確認

124 試料ペプチド分子の質量を確認した後、MS/MSにより医
125 薬品各条で規定したプリカーサーイオンを選択して解離させ、
126 医薬品各条で規定したプロダクトイオンが検出されることを確
127 認する。分子量が大きく有用なプロダクトイオンが観測できな
128 い場合、試料ペプチド及びタンパク質を酵素などにより断片化
129 し、生じたペプチド断片のMS/MSによりアミノ酸配列など
130 を確認できることがある。ペプチド及びタンパク質の断片化方
131 法は、参考情報「ペプチドマップ法 (G3-3-182)」におけるペ
132 プチド結合の選択的切断を参照する。

133 5. 用語解説

134 イオントラップ型(IT: Ion trap): 狭義には四重極イオント
135 ラップを指し、四重極型と同様の原理を利用して、高周波電圧

136 によりイオンを閉じこめ、イオンを m/z 値別にセルから追い出
137 すことによりイオンを分離する方法。特定の m/z 値のイオンを
138 トラップし、解離及びイオン放出を繰り返すことにより、多段
139 階MS(MS^n)を行うことができる。

140 エレクトロスプレーイオン化法(ESI: Electrospray
141 ionization): 大気圧下、試料溶液を高電圧をかけたキャピラ
142 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
143 方法。ペプチド及びタンパク質などの高分子化合物では多価イ
144 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
145 とができる。

146 四重極型(Q: Quadrupole): 直流と高周波を重ね合わせた電圧
147 を、双曲線又はそれに相当する断面を持つ平行な4本の電極柱
148 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の
149 m/z 値を変化させて、イオンを分離する方法。

150 衝突誘起解離(CID: Collision-induced dissociation): 加速
151 されたイオンと中性の衝突ガス(He, Ar, N_2 など)との衝突に
152 よ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
153 され、イオンが励起し、解離すること。衝突ガスと衝突させる
154 際のイオンの加速電圧により低エネルギーCID(約1000 V以下
155 の電圧で加速されたイオンの衝突)と高エネルギーCID(1000 V
156 以上の電圧で加速されたイオンの衝突)に分けられる。

157 電子捕獲解離(ECD: Electron capture dissociation): 多価の
158 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
159 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
160 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オ
161 ンの解離に利用される。

162 飛行時間型(TOF: Time-of-flight): イオン化した試料を高電
163 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
164 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
165 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
166 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
167 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
168 を補正することにより質量分解能が向上する。

169 フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型(FT-ICR: Fourier
170 transform ion cyclotron resonance): 一様な磁場中で、磁場
171 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
172 周期が m/z 値に反比例することを利用して、 m/z 値の異なるイ
173 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
174 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
175 より解析し、マスペクトルを得る。

176 ポストソース分解(PSD: Post-source decay): MALDIにおい
177 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
178 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
179 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
180 質量分析計を用いたMS/MSに利用される。

181 マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI: Matrix-
182 assisted laser desorption/ionization): 試料とマトリッ
183 クスを混合し、ナノ秒オーダーの短時間のレーザー光を照射す
184 ることにより試料イオンを生成する方法。タンパク質や糖質、オ
185 リゴヌクレオチド、脂質などの生体高分子をほとんど分解せず
186 にイオン化することができる。主に一価イオンが生成する。

1 単糖分析及びオリゴ糖分析／糖鎖プロファイル法〈G3-5-170〉

糖鎖試験法は、糖タンパク質医薬品等に結合している糖鎖の恒常性を確認する方法である。糖タンパク質に結合した糖鎖が有効性及び安全性に影響を及ぼす場合や、その可能性を否定できない場合は、糖鎖を管理すべき重要な品質特性と位置づけ、恒常性を確認するための方策を講じる必要がある。その一つが糖鎖試験法であり、1)単糖に分解して分析する方法(単糖分析)、2)遊離糖鎖として分析する方法(オリゴ糖分析／糖鎖プロファイル法)、3)糖ペプチドとして分析する方法(糖ペプチド分析)、4)糖タンパク質として分析する方法(グリコフォーム分析)がある。それぞれ単糖の組成、タンパク質全体に結合している糖鎖の種類とその分布、特定の部位に結合した糖鎖の種類とその分布、及び糖タンパク質の糖鎖修飾の全体的な特徴とその分布を確認することができる。糖鎖試験策定に当たっては、糖鎖の構造と生物活性、薬理作用、体内動態、免疫原性、安定性及び溶解性等の関係を考慮し、適切な方法を選択、又は組み合わせる用いる。糖鎖の恒常性は、糖鎖試験法だけでなく、製造工程段階で管理されることもある。糖鎖試験法は工程内管理試験として、また、工程開発過程における糖鎖の恒常性を確認する方法として利用可能である。以下に、単糖分析及びオリゴ糖分析／糖鎖プロファイル法について分析方法と一般的要件を示す。糖ペプチド分析はペプチドマップ法及び質量分析法が、また、グリコフォーム分析法は等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動及び質量分析法が参考になる。

1. 単糖分析

酸加水分解、酵素消化又はメタノリシスなどによりグリコシド結合を切断し、単糖を遊離する。遊離した単糖は、必要に応じて蒸発乾固、精製し、液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー及びキャピラリー電気泳動などにより分析を行い、内標準法又は絶対検量線法により定量する。測定結果は、通例、タンパク質1モル当たりの各単糖のモル数として示す。

1.1. 糖タンパク質の分離及び精製

添加物や塩は、加水分解、単糖の誘導体化及び単糖のクロマトグラフィーによる分離に影響を及ぼすことがあるので、単糖分析は、一般に、適切な方法で糖タンパク質をあらかじめ分離・精製してから行われる。精製が必要な場合には、その方法を各条に規定する。

1.2. 単糖の遊離

1.2.1. 酸加水分解

酸加水分解は、中性糖及びアミノ糖の遊離に用いられる最も一般的な方法である。通例、2 ～ 7 mol/Lトリフルオロ酢酸に溶解し、100℃で加熱するなどによりグリコシド結合を加水分解し遊離する。タンパク質に直接結合したアミノ糖は遊離しにくいいため、アミノ糖の正確な定量には、別途2 ～ 6 mol/L塩酸に溶解し、100℃で加熱するなどの条件で加水分解を行うことが望ましい。糖の種類及び結合様式により加水分解速度が異なることから、加水分解の経時変化をとり、単糖の生成と分解を確認することが推奨される。酸加水分解によりアミノ糖に結合したN-アセチル基が脱離するので、必要に応じて再N-アセ

チル化する。シアル酸は分解しやすいため、別途0.1 mol/L塩酸、0.1 mol/L硫酸又は2 mol/L酢酸中に溶解し、80℃で加熱するなどの条件にて酸加水分解を行い遊離する。

1.2.2. 酵素消化

シアル酸の遊離には、酵素消化も利用される。通常、*Arthrobacter ureafaciens*や*Clostridium perfringens*由来のシアリダーゼなど対象となる基質の範囲が広い酵素が使用される。試料に含まれるシアル酸の種類、結合様式及びO-アセチル化等を考慮して酵素消化の条件を最適化する。結合様式の異なるシアル酸を区別するために、特異性の高い酵素を用いる場合もある。

1.2.3. メタノリシス

十分に乾燥させた試料を塩酸を含むメタノール中で加熱することにより、単糖をメチル配糖体として遊離する。酸加水分解と比べ、遊離した単糖が分解されにくい。

1.3. 単糖の定量

1.3.1. 高pHイオン交換クロマトグラフィー／パルス式電気化学検出法

酸加水分解した試料から必要に応じて酸を除去する。単糖は誘導体化することなく高pHイオン交換クロマトグラフィー／パルス式電気化学検出により分離及び検出できる。単糖のpKaは12 ～ 14であり、強アルカリ条件(pH 12 ～ 13)下で水酸基が解離することを利用して、四級アミンを含むポリマー担体を充填したカラムなどを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離する。電気化学検出は、作用電極において物質が酸化還元されるときに電流を測定することにより電気化学的に活性な物質を検出する方法である。糖は強アルカリ条件下で陰イオンとなり、電気化学検出により検出することができる。糖の酸化物は電極の反応性を抑制するため、データ取込み後、電位を正及び負に変化させることにより電極表面の洗浄を行うパルス式電気化学検出が用いられる。アミノ酸も電気化学検出で検出されるため、糖含量の少ない糖タンパク質試料では妨害を受ける場合があることに留意する。本法は、中性糖、アミノ糖及びシアル酸などの単糖だけでなく、オリゴ糖の分析にも用いられる。

1.3.2. 誘導体化及び液体クロマトグラフィー

(1) 中性糖及びアミノ糖

酸加水分解により得た単糖は酸を除去し、必要ならばN-アセチル化した後、2-アミノ安息香酸、2-アミノピリジン又はエチル-4-アミノ安息香酸等を用いて還元的アミノ化、又は3-メチル-1-フェニル-5-ビラズロンにより誘導体化を行う。試薬由来の不純物のピークにより分析が妨害されることがあるので、使用する試薬の純度に留意する必要がある。誘導体化に用いた過剰の試薬が試験結果に影響を及ぼさないように、必要に応じて誘導体化単糖の精製を行う。誘導体化単糖は、逆相クロマトグラフィーやホウ酸錯体の形成を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーなどにより分離する。分離された単糖は蛍光光度計若しくは紫外吸光度計を用いて検出する。イオン交換クロマトグラフィーで単糖を分離した後、アルギニンなどで誘導体化して検出する方法もある。

(2) シアル酸

酸加水分解又はシアリダーゼで遊離したシアル酸を、 α -ケト酸と特異的に反応する1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼンや1,2-フェニレンジアミンにより誘導体化する。酸性条件下で誘導体化反応が進むので、酸加水分解した溶液を

そのまま誘導体化に用いることができる。誘導体化したシアル酸は、逆相液体クロマトグラフィーにより分離し、蛍光光度計で検出する。

1.3.3. ガスクロマトグラフィー

メタノリシスで遊離した単糖をN-アセチル化及びトリメチルシリル化して分析する方法、酸加水分解により遊離した糖を還元及び全アセチル化して分析する方法等がある。前者はシアル酸も分解せずに定量することができるが、メタノリシスの際に α -及び β -のアノマー構造などに由来する複数のメチル配糖体が生成するのでクロマトグラムが複雑となる。

糖鎖の全ての遊離水酸基をメチル化後、酸加水分解し、得られた部分O-メチル化単糖を還元及び全アセチル化しガスクロマトグラフィーで分離し定量することにより、各単糖の糖結合部位推定することができ、糖鎖の構造情報を得ることができる。

1.4. 適否の判定基準

検体が規格に適合するかの評価は、通例、タンパク質当たりの各単糖の含量などが規定した範囲内であることを確認することなどにより行われる。規格を適切に設定するには、糖鎖修飾の特徴と有効性及び安全性との関連性を考慮する必要がある。

1.5. 単糖標準物質

標準物質として測定対象の単糖が用いられることが多く、この場合、各単糖を等量ずつ又は試料中の含量と類似した割合で混合して用いる。

1.6. システム適合性

システム適合性試験用溶液は、単糖標準物質を用いて適切に調製する。単糖は類似した性質を持つため各単糖ピークを完全に分離することが難しいこともある。適切に判定基準を設定する。

2. オリゴ糖分析／糖鎖プロファイル法

糖タンパク質から酵素的遊離法又は化学的遊離法により糖鎖を遊離し、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、質量分析法又はこれらの組み合わせにより分析する。結果は糖鎖の種類と分布を表す糖鎖プロファイルとして取得される。

2.1. 糖タンパク質の分離及び精製

必要に応じて、添加物、塩及び界面活性剤などを取り除く。精製が必要な場合には、その方法を各条に規定する。

2.2. 糖鎖の遊離及び精製

糖タンパク質からのN-結合型糖鎖の遊離は、酵素消化又はヒドラジン分解により行う。O-結合型糖鎖の遊離は、アルカリによる β 脱離、ヒドラジン分解又はO-グリカナーゼ消化により行う。結合位置やその構造によらずタンパク質に結合した全ての糖鎖を再現良く回収できるように糖鎖の遊離条件を最適化する。表1に糖鎖の酵素的遊離に一般的に用いられる試薬及びその特異性について示す。遊離した糖鎖は、必要に応じて適切な方法により精製する。

150

表1 糖鎖遊離酵素の例

酵素	特異性
N-結合型糖鎖の遊離	
ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)-アスパラギンミダーゼ(EC 3.5.1.52)	ペプチド-N ⁴ -(N-アセチル- β -D-グルコサミニル)アスパラギン残基(グルコサミン残基は更に糖残基が付加されている)を加水分解し、(糖残基が付加された)N-アセチル- β -D-グルコサミニルアミンとアスパラギン酸残基を含むペプチドに加水分解する。
- ペプチドN-グリコシダーゼ F (PNGase F)	N-結合型糖鎖を遊離する。ただし、(α 1,3)-結合したコアフコースを含むN-結合型糖鎖は遊離しない。
- ペプチドN-グリコシダーゼ A (PNGase A)	N-結合型糖鎖を遊離する。(α 1,3)-結合したコアフコースを含むN-結合型糖鎖も遊離する。
マンノシル-糖タンパク質エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ(EC 3.2.1.96)	[Man(GlcNAc) ₂]Asn 構造を含む高マンノース型糖ペプチド／糖タンパク質のN,N'-ジアセチルキトビオースの間を加水分解する。N-アセチルグルコサミン残基がタンパク質に残る。残りの部分の糖鎖が遊離する。
- エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ F (endo F)	高マンノース型、ハイブリッド型及び複合型糖鎖を遊離する。
- エンド- β -N-アセチルグルコサミニダーゼ H (endo H)	高マンノース型及びハイブリッド型糖鎖を遊離する。
O-結合型糖鎖の遊離	
グリコペプチド α -N-アセチルガラクトサミニダーゼ(EC 3.2.1.97)*	セリン／トレオニン残基に α -結合したD-ガラクトース-(β 1,3)-N-アセチルガラクトサミンを遊離させる。

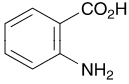
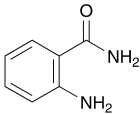
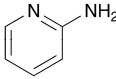
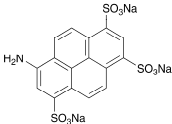
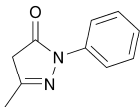
* 本酵素は特異性が限られているため使用は限られる。

151

206 2.3.1. 液体クロマトグラフィー〈2.01〉
207 2.3.1.1. 誘導体化及び液体クロマトグラフィー／蛍光又は紫
208 外吸収検出法
209 誘導体化糖鎖の液体クロマトグラフィーによるプロファイル
210 法は最も一般的である。2-アミノベンズアミド、2-アミノ

211 安息香酸、2-アミノピリジン等で誘導体化した糖鎖を、順相、
212 逆相、イオン交換、又はこれらの混合モードのクロマトグラフィー
213 により分離し、蛍光光度計などを用いて検出する方法、3-
214 メチルー1-フェニルー5-ピラゾロンで誘導体化した糖鎖を
215 逆相クロマトグラフィーで分離し、紫外吸光検出する方法等が

表2 誘導体化剤と適した分析法の例

試薬名	頭文字	分析法	蛍光又はUV検出の条件
2-アミノ安息香酸 	2-AA	LC, CE, MS	Ex : 360 nm, Em : 425 nm Ex : 325 nm, Em : 405 nm
2-アミノベンズアミド 	2-AB	LC, MS	Ex : 330 nm, Em : 420 nm
2-アミノピリジン 	2-AP	LC, MS	Ex : 310 nm, Em : 380 nm Ex : 320 nm, Em : 400 nm
8-アミノビレン-1,3,6-トリスルホン酸 三ナトリウム塩 	APTS	CE	Ex : 488 nm, Em : 520 nm
3-メチルー1-フェニルー5-ピラゾロン 	PMP	LC, MS	UV 245 nm

218 ある。親水性相互作用クロマトグラフィーにおいては、糖鎖は
219 親水性(糖鎖のサイズやシアル酸結合数など)に応じて分離され
220 る。逆相クロマトグラフィーでは、糖鎖は疎水性(糖鎖の種類、
221 分岐、シアル酸結合数など)に応じて分離される。イオン交換
222 クロマトグラフィーでは、電荷に応じて糖鎖が分離される。イ
223 オン交換と順相クロマトグラフィーの混合モードでは、糖鎖は
224 電荷の違いだけでなく構造の違いに応じて分離される。

225 2.3.1.2. 高pH陰イオン交換クロマトグラフィー／パルス式電
226 気化学検出法

227 遊離した糖鎖をそのまま、四級アミンを含むポリマー担体を
228 充填したカラムなどを用いて陰イオン交換クロマトグラフィー
229 により分離し、パルス式電気化学検出器を用いて糖鎖を検出す
230 る。本方法は、シアル酸結合数の異なる糖鎖及び異性体を分離
231 して検出することができる。誘導体化及び精製に伴うシアル酸
232 の脱離や糖鎖の損失のリスクがないこと、並びにシアロ糖鎖の
233 分離がよいことから、シアロ糖鎖の試験に用いられることが多
234 い。個々の糖鎖の検出器に対する感度が異なることから、ピー
235 ク面積比は糖鎖のモル比と対応しないことに留意する。

236 2.3.2. キャピラリー電気泳動

237 誘導体化糖鎖を、適切な緩衝液を用いてキャピラリーゾーン
238 電気泳動により分離し、レーザー誘起蛍光光度計などにより検
239 出する。糖鎖は、電荷、サイズ、形状等に応じて分離される。
240 一般に、電気浸透流を抑制するために、キャピラリーは内面を
241 中性のポリマー等を用いて共有結合又は物理的吸着により修飾

242 して用いられる。誘導体化剤の種類、並びに泳動液のpH及び
243 成分は、良好な分離が得られるように選択する。ピークの分離
244 能が高いこと及び一回の分析に必要な試料量が少ないことが特
245 徴である。

246 2.3.3. 質量分析

247 質量分析は、誘導体化糖鎖だけでなく非誘導体化糖鎖の分析
248 にも用いられる。得られた糖鎖の質量から単糖組成を推測する
249 ことが可能である。イオン化には一般的に、ソフトイオン化法
250 であるエレクトロスプレーイオン化法及びマトリックス支援レ
251 ーザー脱離イオン化法が用いられる。シアル酸を含む糖鎖では、
252 シアル酸の脱離が起こりやすいことに留意する。

253 2.4. ピークの帰属・同定

254 糖タンパク質に結合している糖鎖の同定は、試験方法の開発
255 及び糖鎖プロファイルの評価のために重要である。通常、質量
256 分析法を用いて決定した分子の質量、タンデム質量分析により
257 得られたプロダクトイオンのパターン、各種のエキシグリコシ
258 ダーゼ又はエンドグリコシダーゼ消化に対する感受性、構造が
259 明らかな標準糖鎖とのクロマトグラム又は電気泳動図のパター
260 ンの一致、メチル化分析並びに用いた細胞種により生合成され
261 る糖鎖のパターンなどの情報を基に帰属する。表3に糖鎖の構
262 造解析に利用されるエキソグリコシダーゼ及びエンドグリコシ
263 ダーゼの例を示す。試験においては、標準物質より得られた糖
264 鎖プロファイルとの比較によりピークを帰属する。

265 2.5. 適否の判定基準

266 適否の判定は、一般的に、検体に対する標準物質を用いて並
 267 行して得られた糖鎖プロファイルと比較し、ピーク位置や面積
 268 の比率等が同等であること、又は、各糖鎖の全糖鎖のピーク面
 269 積の合計に対する百分率(面積百分率法)や相対ピーク面積比が、
 270 設定された範囲内であることを確認する。規格を適切に設定す
 271 るには、糖鎖構造と有効性及び安全性の関連を考慮し、管理す

表3 糖鎖構造解析に利用されるエキソグリコシダーゼ及びエ
 ンドグリコシダーゼの例

試薬名	由来	基質特異性
エキソ- α -シアリダーゼ (EC 3.2.1.18)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	α 2-3,6,8,9
	<i>Vibrio cholerae</i>	α 2-3,6,8
	<i>Clostridium perfringens</i>	α 2-3,6,8
	Newcastle disease virus	α 2-3
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	α 2-3
β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)	Bovine testes	β 1-3,4
	<i>Streptomyces pneumoniae</i>	β 1-4
α -L-フコシダーゼ (EC 3.2.1.51)	Almond meal	α 1-3
	<i>Xanthomonas</i> sp.	α 1-3,4
	Bovine kidney	α 1-2,3,4,6
α -マンノシダーゼ (EC 3.5.1.24)	Jack Bean	α 1-2,3,6
α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22)	Green coffee beans	α 1-3,4,6
ケラタン硫酸-エンド- β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.103)	<i>Bacteroides fragilis</i>	β 1-3,4/poly LacNAc

272 べき糖鎖構造を明らかにすることが重要である。

273 2.6. 標準物質

274 標準物質は糖鎖分析法への使用の妥当性が検証されているこ
 275 とが重要である。

276 2.7. システム適合性

277 システム適合性は、試験の目的に応じて設定する。例えば、
 278 標準物質、又は、製品と同様な特性を持つ既知のよく特性解析
 279 された糖タンパク質を試料と同様に処理して得た糖鎖プロ
 280 ファイルに関して、特定のピークの存在、隣接するピークの分
 281 離度、検出されるべきピークの数、あらかじめ取得された参
 282 照プロファイルとの一致等を指標とした判定基準を設定する。
 283 若しくは、糖鎖標準物質、例えば、試験される製品からあらか
 284 じめ調製され、適格性が確認された標準糖鎖やシステム適合性
 285 糖鎖マーカー等を試料からの遊離糖鎖と同様に処理して得ら
 286 れた糖鎖プロファイルに関して、上記と同様の判定基準を設定
 287 する。

1 等電点電気泳動法 (G3-6-142)

本試験法は、三薬局方で調和合意に基づき規定した試験法である。
 なお、三薬局方で調和されていない部分は「◆ ◆」で囲むことにより示す。
 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

はじめに

等電点電気泳動法は等電点の違いを利用してタンパク質を分離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)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勾配を持ったゲルを用いる場合もある。添加したタンパク質がその等電点と同じpHのゲルの位置にまで泳動されると、タンパク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勾配を作ることが可能である。

理論

タンパク質は電場がかけられたゲル内の等電点の位置では実効荷電が0となり移動度がゼロとなるが、拡散作用による移動は認められる。タンパク質は通電により形成されたpH勾配の各々の等電点位置で移動が停止し、そこに濃縮される。この濃縮効果を“フォーカシング(focusing)”とよぶ。電圧をかけることに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ことにより、タンパク質の分離度を向上できる。薄いゲルや自動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 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(ΔpI)を測定することで算出される。

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

式中、 D はタンパク質固有の拡散係数、 dpH/dx はpH勾配、 E は電界強度(V/cm)、 $-d\mu/dpH$ はタンパク質のpH移動度曲線上におけるpIに等しいpHでの傾きである。 D 及び $-d\mu/dpH$ はタンパク質固有の値であり変えることはできないが、より狭い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電点ゲルによるタンパク質の分離は非常に良好な結果が得られる。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、pH値0.02以上異なる等電点を持つタンパク質を分離できるが、固定化pH勾配を用いたゲルでは、pH値約0.001以上異なる等電点を持つタンパク質を分離できる。

操作

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。

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ましい。

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に要する時間は色素タンパク質(例えばヘモグロビン)をゲル表面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。すなわち、異なる位置に添加した色素タンパク質のバンド位置が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る。プロトコルによってはフォーカシングの完了を泳動開始後の経過時間で定めることができる。

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タンパク質と泳動パターンを比較することにより、等電点電気泳動を目的タンパク質の確認試験に用いることができる。また、標準品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タンパク質のバンドに含まれるタンパク質の相対量を測定することも可能である。

装置

装置の構成は以下のとおりである。

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

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等電点電気泳動装置。

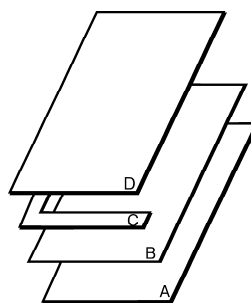
白金電極が付いたプラスチック製カバー。各電極はそれぞれ陽極液及び陰極液で浸された適当な幅、長さ及び厚さの紙芯でゲルと接続される。

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法：操作の詳細

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用いる。

平板ゲルの調製法

型枠 型枠(図参照)はガラス板(A)、ゲルの取扱いを容易にするためのポリエステルフィルム(B)、一つ以上のスパーサー(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っている。



7.5%ポリアクリルアミドゲル アクリルアミド29.1 g及び N,N' -メチレンビスアクリルアミド0.9 gを水100 mLに溶かす。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加え、水で10容とする。この液を注意深く混和した後、脱気する。

94 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
95 のせ、スぺーサーを置き、2枚目のガラス板をその上に置き、
96 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
97 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
98 ら、10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム溶液0.25容及び
99 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
100 の液を直ちに型枠のガラス板間の隙間に流し込む。

101 方法

102 型枠を外し、冷却した支持板を適当な液体2～3 mLでぬら
103 し、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
104 ル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
105 うに試料溶液及び標準溶液を調製する。約10 mm×5 mmの試
106 料添付用の紙片(複数)をゲル板上に置き、各紙片に試験する試
107 料の規定量を浸み込ませる。また、等電点既知のタンパク質溶
108 液の規定量をpHマーカーとしてゲルにのせる。プロトコール
109 によっ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
110 を使用する。ゲルの幅に届く長さに切った2枚のろ紙をそれぞ
111 れの電極液(陽極液は酸性、陰極液はアルカリ性)に浸す。陽極
112 液及び陰極液のそれぞれの組成は医薬品各条に規定される。こ
113 れらの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
114 置く。両電極が各紙芯に接触するようにカバーをかける。医薬
115 品各条に規定された電気泳動条件に従って泳動を開始する。標
116 準タンパク質混合物の泳動が終了した時点で電流を止め、ピン
117 セットで試料添加用紙片と両電極紙芯を取り除き、ゲル平板を
118 “ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動用固定液”に浸す。
119 室温で30分間穏やかに振とうした後、固定液を除き、“脱色
120 液”200 mLを加えて1時間、振とうする。脱色液を捨て、
121 “クーマシー染色試液”を加えて30分間放置する。次に“脱
122 色液”に浸して透明な背景にバンドが見えるようになるまでゲ
123 ルを脱色する。医薬品各条に記載されている染色パターンバン
124 ドの位置及び濃度を調べる。

125 本試験法の細部の変更 (検証の必要な項目)

126 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
127 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。
128 (1) 市販平板ゲル、染色及び脱色液のキットの使用
129 (2) 固定pH勾配ゲルの使用
130 (3) ディスクゲルの使用
131 (4) 種々のサイズの超薄層(0.2 mm)平板ゲルカセットの使用
132 (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
133 含むサンプル添加操作法の変更
134 (6) ゲルの寸法や装置に応じた電流、電圧等の変更や、バン
135 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
136 等、種々の泳動条件の利用
137 (7) プレフォーカシング段階の組入れ
138 (8) 自動装置の使用
139 (9) カンテンゲルの使用

140 等電点電気泳動操作法の検証

141 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
142 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。
143 (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
144 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
145 (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
146 動パターンとの比較
147 (3) 医薬品各条に記述された以外の評価基準

148 本法の規定の変更

149 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
150 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。

151 (1) 泳動ゲル中への尿素の添加(3 mol/Lの濃度がタンパク質
152 を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、
153 8 mol/Lまで用いることもできる)：等電点において沈殿を生じ
154 るタンパク質がある場合には、沈殿を起こさせないようにゲル
155 の組成に尿素を加える。尿素を使う必要がある場合には、タン
156 パク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
157 べきである。

158 (2) 他の染色法の利用

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

166 注意

167 試料はゲルのどの場所にもでも添加できるが、極端なpH環境
168 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
169 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
170 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、
171 両端に添加したタンパク質の泳動パターンは同一にはならない
172 ことも起こりうる。

173 フォーカシングを長時間行くとpH勾配が崩れて「pHドリフ
174 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
175 は完全に解明されているわけではないが、電氣的浸透圧と二酸
176 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
177 る。pHドリフトはゲルの陰極側からフォーカスしたタンパク
178 質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
179 ることによりこの問題を解決することができる。

180 泳動中はゲルを支えるゲル支持板を十分に冷却(約4℃)する
181 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
182 ことがあり、ゲルのフォーカシングにも影響する。

183 試薬・試液

184 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
185 ホサリチル酸二水和物35 g及びトリクロロ酢酸100 gに水を加
186 えて溶かし、1000 mLとする。

187 ◆クーマシー染色試液 クーマシーブリリアントブルー R
188 -250 125 mgを水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1) 100
189 mLに溶かし、ろ過する。

190 脱色液 水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)◆

キャピラリー電気泳動法〈G3-7-180〉

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。

三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

1. 基本原理

キャピラリー電気泳動法は、キャピラリー内の電解質液中に存在す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的な分析法である。

電場 E における移動速度は、試料の電気泳動移動度とキャピラリー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 μ_{ep} は試料の特性(電荷、分子の大きさ)と緩衝液の特性(電解液の種類とイオン強度、pH、粘性及び添加剤)に依存する。球形を想定した物質の電気泳動速度 v_{ep} は、次式により与えられる。

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

q : 粒子の有効電荷

η : 緩衝液の粘度

r : 溶質イオンのStokes半径

V : 電圧

L : キャピラリーの全長

緩衝液で満たされたキャピラリーに電圧を印加すると、電気浸透流と呼ばれる溶媒の流れがキャピラリー内に発生する。電気浸透流の速度はキャピラリー内壁の電荷密度及び緩衝液の特性に依存する電気浸透移動度 μ_{eo} により決まる。電気浸透速度 v_{eo} は次式により与えられる。

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

ε : 緩衝液の誘電率

ζ : キャピラリー内壁のゼータ電位

試料の移動速度(v)は次式により与えられる。

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

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、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、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、陰イオンの両者を一斉分析することが可能である。

キャピラリーの試料導入末端から検出部までの距離(有効長、 l)を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る。

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

通常、内面未処理のフューズドシリカキャピラリーは、pH

3以上で内壁に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。その結果、陽極側から陰極側へと向かう電気浸透流が発生する。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流を一定に保つ必要がある。分析の目的によっては、キャピラリー内壁を修飾したり、緩衝液の濃度、組成及びpHを変えることにより電気浸透流を抑制することが必要な場合がある。

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電気泳動移動度に応じて電解質内を移動する。ゾーンの拡散、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一の原因はキャピラリーに沿った方向への試料成分の分子拡散(軸方向拡散)である。理想的な場合のゾーンの分離効率、理論段数(N)として次式により表される。

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

D : 電解質中での試料の分子拡散係数

実際には、熱放散、キャピラリー内壁への試料成分の吸着、試料と緩衝液間の導電率の不均一性、試料プラグの長さ、検出セルのサイズ、泳動液槽の水位差なども、ゾーンの広がりの原因となりうる。

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変化させ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り達成される。

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

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度

μ_{ep} : 2種類の試料イオンの電気泳動移動度の平均

$$\mu_{ep} = \frac{1}{2} (\mu_{epa} + \mu_{epb})$$

2. 装置

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。

- (1) 電圧可変高電圧電源
- (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二つの泳動液槽
- (3) 泳動液槽に浸され、電源に接続した一対の電極(陽極と陰極)
- (4) 光学検出用ウィンドウを設けた分離用キャピラリー(通常フューズドシリカ製)。キャピラリーの両端は泳動液槽中に置かれる。このキャピラリーは各条で規定する溶液で満たされる。
- (5) 適切な試料導入システム
- (6) 所定の時間にキャピラリーの検出部を通過する目的物質の量を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蛍光光度法によるが、分離目的によっては導電率測定、電流測定又は質量分析による検出も有用である。紫外吸収や蛍光性を持たない化合物には間接的な検出法が用いられる。
- (7) 再現性のよい分離が得られるようにキャピラリー内の温度を一定に保つことのできる温度調節システムが勧められる。
- (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

ター

試料導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。導入方法として、落差、加圧又は吸引法、及び電気的な導入法がある。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素となる。

各条に規定されたキャピラリー、泳動液、キャピラリーの分析前処理法、試料溶液及び分析条件を用いる。分析中に気泡が発生して通電が遮断されたり、検出が妨害を受けないように、泳動液はろ過及び脱気を行う。移動時間について、高い再現性を得るためには、各分析法において厳密なキャピラリーの洗浄手順を設定しておくべきである。

3. キャピラリーゾーン電気泳動法

3.1. 原理

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まない緩衝液のみを満たしたキャピラリー内で試料を分離する。この方法では、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。各バンドの移動速度はキャピラリー内の溶質の電気泳動移動度と電気浸透流に依存する(1.基本原理参照)。キャピラリー内壁に吸着しやすい物質の分離能を高めるために内面修飾されたキャピラリーも使用できる。

本分離モードを用いて、低分子試料($M_r < 2000$)並びに高分子試料($2000 < M_r < 100000$)を分析できる。キャピラリーゾーン電気泳動法の高い分離効率により、質量電荷比が僅かしか異なる分子間の分離も可能となる。この分離法ではキラルセクターを分離用緩衝液に加えることによってキラル化合物の分離も可能となる。

3.2. 分離の最適化

複数のパラメーターが分離に関与する場合には、分離条件の最適化が複雑になる。分離条件の設定では、装置及び電解質溶液が主要なパラメーターである。

3.2.1. 装置に関するパラメーター

(1) 電圧 印加電圧及びカラム温度の決定には、ジュール熱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。しかし、電圧を上げると過剰な熱が発生し、キャピラリー内部の緩衝液の温度が上昇して、粘度の勾配が生じる。結果としてバンドが広がり、分離度を低下させる。

(2) 極性 電極の極性については通常電圧印加(試料導入側が陽極、廃液側が陰極)で、電気浸透流は陰極側へ流れる。極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みが検出部を通過する。

(3) 温度 温度の影響は、主に泳動液の粘度や導電率に表れ、移動速度に影響を与える。場合によってはキャピラリー温度の上昇がタンパク質の立体構造を変化させ、それらの移動時間や分離効率が変化することもある。

(4) キャピラリー キャピラリーの寸法(長さ及び内径)は分析時間、分離効率及び試料の導入量に影響を与える。全長の増加は電場を減少(定電圧時)させ、有効長さ及び全長の増加により移動時間が長くなる。緩衝液と電場が一定ならば、熱放散効率はキャピラリー内径により異なる。したがって、それによって起こされる試料バンドの拡散はキャピラリーの内径によっても変化する。また、使用する検出法にもよるが、内径が変わると

試料導入量が増えるため、検出限界にも影響を及ぼす。

キャピラリー内壁への試料成分の吸着が分離効率を低下させるため、分離法の設定で吸着を防ぐ方法を考慮する必要がある。特にタンパク質を試料とする場合、吸着を防ぐ幾つかの方法が工夫されている。その方法として緩衝液組成を工夫(pHの調節や陽イオン性添加剤を内壁へ吸着)するだけでタンパク質の吸着を防ぐ方法もある。その他、タンパク質と負電荷を帯びたシリカ表面との相互作用を防ぐために、キャピラリー内壁にポリマーを共有結合させて被覆する手法がある。この目的のために、親水性の中性ポリマーや陽イオン性又は陰イオン性ポリマーで化学修飾されたキャピラリーを入手することができる。

3.2.2 電解質溶液に関するパラメーター

(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緩衝液は、使用するpH範囲内で適当な緩衝能を持ち、また、電流発生を最少に抑えることができる移動度の低いものが良い。

緩衝液イオンの移動度を溶質の移動度に合わせることで、ピーク形状のゆがみを最少にすることができる。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ある。

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試料の移動速度は減少する。

(2) 緩衝液のpH 緩衝液のpHは、試料や添加剤の電荷及び電気浸透流に影響するので、試料の分離に影響を及ぼす。タンパク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、緩衝液のpHを高めると電気浸透流は速くなる。

(3) 有機溶媒 試料又は泳動液添加剤の溶解度を高めたり、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(メタノール、アセトニトリルなど)を添加する場合がある。一般に有機溶媒の緩衝液への添加は電気浸透流を低下させる。

(4) キラル分離のための添加物質 鏡像異性体を分離するためには、泳動液にキラルセクターを添加する。最も一般的に用いられるキラルセクターはシクロデキストリン類であるが、クラウンエーテル類、多糖類若しくはタンパク質が使用される場合もある。キラル認識はキラルセクターとそれぞれの鏡像異性体との相互作用が異なることによるため、その分離度は用いるキラルセクターの種類により著しく異なる。そのため、必要な分離を得るために、内腔の大きさの異なるシクロデキストリン類(α -, β -, γ -シクロデキストリン)、中性基(メチル、エチル、ヒドロキシアルキルなど)又は極性基(アミノメチル、カルボキシメチル、スルホブチルエーテルなど)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響を与えるそのほかの因子として、キラルセクターの濃度、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。

4. キャピラリーゲル電気泳動法

4.1. 原理

キャピラリーゲル電気泳動法は、分子ふるい効果を持つゲルを充填したキャピラリー内で分離が行われる。類似した質量電荷比を持つ分子のうち、分子サイズの小さい成分が大きい成分

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つ生体高分子(例えばタンパク質及びDNA断片)をそれらの分子量に従って分離できる。

4.2. ゲルの特徴

二種類のゲルが用いられる。固定型ゲルと流動型ゲルである。架橋されたポリアクリルアミドゲルのような固定型ゲルは、キャピラリー内でモノマーを重合させて調製する。通常ゲルはキャピラリー内壁と結合しているため、キャピラリーを破壊しない限り取り去ることはできない。ゲルを還元条件下でタンパク質の分析に使用するとき、泳動液は通常ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含み、分離前に試料を導入する前にSDSと2-メルカプトエタノール又はジチオスレイトールの混液とともに加熱して変性させる。非還元的条件の分析(例えば未変性の抗体)では、2-メルカプトエタノール及びジチオスレイトールを使用しない。架橋されたゲル中での分離において(「3.キャピラリーゾーン電気泳動法」で述べたように)、タンパク質の分離は泳動液の組成やゲル調製時のアクリルアミドの濃度や架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利用する必要がある。

流動型ゲルとして、直鎖ポリアクリルアミド、セルロース誘導体、デキストランなどの水溶性ポリマーも分子ふるいの効果を有する。これらの分離媒体は、架橋されたポリマーと比べて調製が容易である。バイアル中で調製し、電気浸透流が発生しないように内壁が修飾されたキャピラリーに圧力によって充填することができる。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(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。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低いので、試料の導入は圧力導入法及び電気的導入法のいずれでも行える。

5. キャピラリー等電点電気泳動法

5.1. 原理

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持つため電場の影響下で移動する。

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、収束及び移動である。

(1) 試料添加 二つの方法を利用できる。

(i) ワンステップ添加：試料を両性電解質と混和し、加圧又は吸引によりキャピラリーに導入する。

(ii) 連続的な添加：リーディング緩衝液、両性電解質、両性電解質と混和した試料、両性電解質、最後にターミナル緩衝液の順にキャピラリーに導入する。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。

(2) 収束 電圧を印加すると、両性電解質はそれぞれの電荷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(高いpH)へpH勾配が形成される。同時に分離する成分は、そ

れらの等電点(pI)に対応するpHのところに移動し、収束すると電流が著しく低下する。

(3) 移動 分離した成分のバンドを検出部まで移動させる。三種の方法を利用できる。

(i) 電気浸透流により収束中に成分移動が達成される。ただし、成分を収束させるために電気浸透流を小さくする必要がある。

(ii) 収束終了後に圧力を用いて移動させる。

(iii) 収束終了後に陰極又は陽極側の泳動液(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とキャピラリー中のpHが変化し、成分が移動する。pHが変化するにつれてタンパク質と両性電解質は塩類を加えた液槽の方向へ移動し、検出器を通過する。

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

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

5.2. 最適化

分離条件を決定する主要なパラメーターを以下に示す。

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

(2) キャピラリー 試料を検出部まで移動させる方法(上記参照)に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ない。内面修飾されたキャピラリーは電気浸透流を抑えるものが多い。

(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。陽極側にはリン酸が、陰極側には水酸化ナトリウムがしばしば使用される。

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。市販の両性電解質にはいろいろなpH範囲のものがあ、広いpH範囲が必要なときには、混和して使用する。広いpH範囲は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度を上げるために用いられる。標準タンパク質マーカーの等電点と移動時間の関係からpHを校正することができる。

必要ならば、グリセリン、界面活性剤、尿素、両性イオン緩衝剤などを緩衝液に添加することにより等電点でタンパク質が沈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はタンパク質を変性させてしまう。

6. ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)

6.1. 原理

ミセル動電クロマトグラフィー(MEKC)では、臨界ミセル濃度(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。MEKCは、キャピラリー電気泳動の効率、スピード及び装置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離に利用できる電気泳動法である。MEKCで最も広く用いら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

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る。

MEKCにおける分離のメカニズムは以下のとおりである。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、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、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気浸透流マーカーのピークとミセルのピークの間に存在する(これらの二つのピーク間はseparation windowと呼ばれる)。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者に依存する。

中性又は弱くイオン化した試料のMEKCにおける分離原理は本質的にはクロマトグラフィーであるので、試料の移動度と分離度は保持係数(k')、すなわちミセル中の溶質のモル数と移動相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る。中性の場合の k' は次式のとおりである。

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

t_R : 試料の移動時間

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電気浸透流マーカー、例えばメタノールの移動時間)

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

K : 試料の分配係数

V_S : ミセル相の容積

V_M : 移動相の容積

同様に、2種類の隣接して移動する試料間の分離度(R_S)は次式で得られる。

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

N : 一方の成分の理論段数

α : 選択性

k'_a, k'_b : 両成分の保持係数($k'_b > k'_a$)

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 値が得られる。

6.2. 最適化

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

6.2.1. 装置に関するパラメーター

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

し、分離度が低下する。

(2) 温度 キャピラリーの温度の変動は試料の緩衝液とミセルへの分配係数、臨界ミセル濃度及び泳動液の粘度に影響を及ぼす。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る。

(3) キャピラリー キャピラリーゾーン電気泳動法と同様に、キャピラリーの寸法(長さ及び内径)が分離時間及び分離効率に影響を与える。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(同一泳動液及び同一電場下で)熱放散に関与し、結果として試料ゾーンの拡散にかかわる。

6.2.2. 電解質溶液に関するパラメーター

(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MEKCにおける分離度は最大に達するので、移動相中の界面活性剤の濃度が変わると分離度は変化する。

(2) 緩衝液のpH pHはイオン化していない試料の分配係数を変えないが、コーティングしていないキャピラリー中の電気浸透流を変化させる。MEKCにおいて、pHが下がると電気浸透流が減少し、そのため分析時間が長くなり、中性試料の分離度が向上する。

(3) 有機溶媒類 疎水性化合物のMEKCにおける分離を改善するため、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とミセル形成が阻害されるので、MEKCの分配メカニズムが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合体が形成される場合もある。

(4) キラル分離用添加物質 MEKCで鏡像異性体を分離するた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、泳動液に添加するなどしてミセル分離系に加える。キラル識別できる部位を持つミセルにはN-ドデカノイル-L-アミノ酸塩、胆汁酸塩などがある。キラル分離は、キラル認識能のない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キラルセクターを添加することによっても達成される。

(5) その他の添加剤 泳動液に化学物質を添加して、選択性を変更させる方法が幾つかある。数種のシクロデキストリン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、選択性を高めることもできる。

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を調節し、MEKCにおける分離を改善できる。これらの添加剤にイオン性あるいは非イオン性他種の界面活性剤を添加して混合ミセルを形成したり、ミセルに溶解する金属陽イオンを加えて試料と配位錯体を形成させることもできる。

7. 定量分析

ピーク面積としては、対応するピークの移動時間で除して得られる補正ピーク面積を次の目的に用いる。

- (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正
- (2) 異なる移動時間で観察される試料成分間のレスポンスの補正

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クが内標準物質のピークと重ならないことを確認する。

7.1. 計算

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%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。

8. システム適合性

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ーターを使用する。これらのパラメーターには用いるキャピラリー電気泳動法の分離モードにより選択する。パラメーターには保持係数(k' 、ミセル動電クロマトグラフィーの場合のみ)、理論段数(N)、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よってこれらのパラメーターを算出することができる。

理論段数

理論段数(N)は次式により計算することができる。

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

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ンに沿った距離

w_h : ピークの半値幅

分離度

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)は次の式で表される。

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

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

t_{R1} , t_{R2} : 移動時間又は試料導入点から隣り合う二つのピー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に沿った各点までの距離

w_{h1} , w_{h2} : 各ピークの半値幅

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(H_v)と小さい方のピークの高さ(H_p)を測定し、ピークバレー比(p/v)を計算して分離度を算出してもよい。

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

シンメトリー係数

ピークの対称性を示すシンメトリー係数(A_s)は次式により計算することができる。

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

$w_{0.05}$: ピーク高さの1/20におけるピーク幅

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

ピーク面積の再現性(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ーターに加えるべきである。移動時間の再現性は、キャピラリーの洗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できる。

標準試料に対するシグナルノイズ比(SN比)を調べる(又は定量限界の測定)試験も有用である。

シグナルノイズ比(SN比)

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以上に相当する。SN比は次式を用いて計算する。

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

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に相当するピークの高さ、ピークトップから半値幅の20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を測定する。

h : ブランクの導入後に得られた電気泳動図で、規定の標準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後の範囲を観察したときの、バックグラウンドの幅。

1 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (G3-8-170)

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 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
5 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、生物薬品中のタンパ
7 ク質の特性解析、及び純度試験や定量試験に用いられる。

8 特に、生物薬品中のタンパク質の同定及び均一性の評価に適
9 した分析方法である。また、タンパク質のサブユニットの分子
10 量の推定並びに精製タンパク質のサブユニット組成の決定に日
11 常的に用いられる。

12 既製のゲル(プレキャストゲル)及び試薬類が市販されている
13 が、これらの市販品を用いた場合でも同等の結果が得られ、か
14 つ、後述するバリデーションを行い、その基準に適合する限り、
15 以下の方法に代えて利用して差し支えない。

16 1. ポリアクリルアミドゲルの特性

17 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
18 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
19 形成される繊維と孔の三次元網目構造により得られる。通常、
20 この重合反応は、過硫酸アンモニウム及び N,N,N',N' -テ
21 ラメチルエチレンジアミン(TEMED)によるフリーラジカル生
22 成系により触媒される。

23 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。
24 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。
25 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。
26 利用できるアクリルアミドゲル濃度には限界がある。アクリル
27 アミド濃度が高い場合、ゲルが壊れやすく、取扱いが難しい。
28 ゲルの孔径が減少するに従い、タンパク質のゲル中の移動速度
29 は減少する。アクリルアミドの濃度を調整して孔径を調節する
30 ことによって、本法の解像度を目的タンパク質に対して最適化
31 させることができる。このようにゲルの物理的な性質は、アク
32 リルアミドとビスアクリルアミドの組成によって定まる。

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

38 2. 変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動

39 以下に例示する方法は、質量14000 ~ 100000ダルトンの単
40 量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
41 術(例えば濃度勾配(グラジエント)ゲル、特殊な緩衝液系)に
42 よってこの質量範囲を広げることが可能である。例えば、電気
43 泳動用緩衝液の後端イオンとして以下の方法で使用されるグリ
44 シンの代わりにトリシンを用いるトリシンドデシル硫酸ナトリ
45 ウム(トリシンSDS)ゲルは、10000 ~ 15000ダルトン以下の非
46 常に小さなタンパク質及びペプチドを分離できる。

47 グリシンSDSを用いる変性条件下のポリアクリルアミドゲ
48 ル電気泳動法(SDS-PAGE)は、タンパク質性生物薬品の品質
49 評価に最も一般的に利用される電気泳動法であり、以下の方法

50 もこれを中心に記述する。一般に、タンパク質を電気泳動によ
51 り分析する際には、タンパク質をポリペプチドの各サブユニッ
52 トに解離させ、また凝集を最小にするような条件にしたポリア
53 クリルアミドゲル中で分析を行う。通常はタンパク質をゲルに
54 添加する前に強陰イオン界面活性剤であるSDSと熱により解
55 離させる。変性したポリペプチドはSDSと結合して負に荷電
56 し、タンパク質の種類とは無関係に一定の電荷-質量比を示す。
57 SDSの結合量は、ほとんどの場合ポリペプチドの分子量に比
58 例しており、そのアミノ酸配列に依存しないため、SDS-ポリ
59 ペプチド複合体はゲル中をポリペプチドの大きさに依存して
60 移動する。

61 生じたSDS-ポリペプチド複合体の電気泳動による移動度
62 は、全ての複合体分子について質量に対して同じ関数関係にあ
63 るとみなされる。SDS-複合体は低分子量複合体のほうが高
64 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。
65 したがって、SDS-PAGEでの相対移動度からタンパク質の分
66 子量を推定することができ、またゲル中の他のバンドに対する
67 強さで純度を測定できる。

68 N結合型糖鎖やO結合型糖鎖のようにポリペプチド骨格への
69 修飾が生じるものについては、SDSが糖鎖に対してポリペプ
70 チドと同様に結合しないため、タンパク質の見かけの分子量に
71 影響を与える。そのため、電荷-質量比は一定にならない。

72 糖鎖修飾や他の翻訳後修飾の程度により、タンパク質の見かけ
73 の分子量はポリペプチド鎖の真の質量を反映しない場合もある。

74 2.1. 還元条件

75 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-
76 S結合により保持されている。還元条件下でのSDS-PAGEの
77 目的は、S-S結合を還元してこの構造を破壊したタンパク質
78 を電気泳動することにある。2-メルカプトエタノール(2-
79 ME)やジチオスレイトール(DTT)で処理してタンパク質を完全
80 に変性、解離させるとポリペプチドの骨格がほどけた状態で
81 SDSとの複合化が起きる。このような条件下では、ポリペプ
82 チドのサブユニットの分子量は適当な分子量マーカーがあれば
83 線形回歸(又はより厳密には非線形回歸)により求めることがで
84 きる。

85 2.2. 非還元条件

86 試験目的によっては、タンパク質をサブユニットへ完全に解
87 離させたくない場合がある。2-MEやDTTのような還元剤に
88 よる処理をしなければ、S-S結合は完全に保持されたままと
89 なり、タンパク質はオリゴマーとして保持される。SDS-タン
90 パク質オリゴマー複合体はそれらのSDS-サブユニット複
91 合体よりも移動速度は遅い。その上、非還元タンパク質は
92 SDSによって完全には飽和されないため、SDSと一定の質量
93 比では結合しない。さらに、鎖内S-S結合は通常ストークス
94 径を低下させるようにタンパク質の形状を制約するため、見か
95 けの分子量(M_r)が低下する。このため、完全に還元変性させた
96 ポリペプチドの分析に比べ、非還元条件でのSDS-PAGEによ
97 る分子量の測定はより複雑である。なぜなら、分子量を正確に
98 比較するには標準物質と試料の双方が類似した形状である必要
99 があるからである。

100 3. 不連続緩衝液系ゲル電気泳動の特徴

101 タンパク質の混合物を分析するための最も一般的な電気泳動
102 法は、二種類の異なるゲルを連結させる方法、すなわち、分離
103 (下層)ゲルと濃縮(上層)ゲルからなる不連続な緩衝液系ゲルを

用いる方法である。この二種類のゲルは、孔径、pH及びイオン強度において異なっている。さらに、ゲル中と電解緩衝液で異なる移動イオンが用いられる。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。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、これによってタンパク質が濃縮ゲルに導入される。電極緩衝液からグリシンイオンがタンパク質に続いて濃縮ゲル中に入る。移動の速い塩素イオンを先端に、これに比して移動が遅いグリシンイオンを後端とする移動境界が速やかに形成される。この先端イオンと後端イオンの境界面に高電圧が局所的に生じ、SDS-タンパク質複合体は濃縮層を形成し、塩素イオン層及びグリシンイオン層の間を泳動する。添加した試料の層高に関係なく、全てのSDS-タンパク質複合体はごく狭い範囲に濃縮され、極めて限定された高密度タンパク質の層として分離ゲル中に入る。孔径の大きな濃縮ゲルは、ほとんどのタンパク質の移動は妨げず、主として対流防止物質として働いている。濃縮ゲルと分離ゲルの境界面では、分離ゲルの孔径の制限と緩衝液の不連続性により、タンパク質の移動度が急速に減少し、これがタンパク質の濃縮に寄与する。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によってタンパク質の移動速度は低下し続ける。グリシンイオンはタンパク質を追い越し、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールとグリシンにより形成された均一なpH域に移動する。分子ふるい効果によりSDS-タンパク質複合体はそれぞれ分子量に従って分離される。

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

本項では特定の器具を用いたゲルの調製について述べる。本法はプレキャストゲルには適用しない。プレキャストゲル又は市販の機材を用いる場合、製造業者の取扱い説明書に従わなければならない。

溶液として精製された市販試薬の使用が推奨される。これ以外の場合及び試薬の純度が十分ではない場合は、前処理を行う。例えば、ろ過が必要な純度が低い溶液では混床(陰イオン/陽イオン交換)樹脂を用いて、アクリル酸や他の荷電した分解物を除かねばならない。アクリルアミド/ビスアクリルアミド溶液や固体の過硫酸塩は、推奨条件で保管すれば、長期間安定である。

4.1. ゲル形成力セットの組立て

ガラス板2枚(サイズ:例えば10 cm×8 cm)、ポリテトラフルオロエチレン製サンプルコーム、スぺーサー2個及びシリコンゴム管(直径:例えば0.6 mm×35 cm)をマイルドな洗剤で洗い、水及び無水アルコールで十分にすすぎ、室温で乾燥させる。スぺーサー及びシリコンゴム管に非シリコン性グリースを塗布する。このスぺーサーをガラス板の両短端側に端から2 mm離し、更にゲルの底部に相当する長端側の端から2 mm離れた位置に取り付ける。次の片方のスぺーサーに沿ってガラス板にシリコンゴム管を取り付ける。注意しながらスぺーサーの下部でシリコンゴム管を曲げてガラス板の長端側に向ける。長端側のシリコンゴム管を指で押さえながらもう片方の短端側へ曲げて、取り付ける。2枚目のガラス板を正確に置き、手で押さえる。両短端側を2個ずつの留め金で固定する。注意しながらガラス板の長端側を4個の留め金で固定してゲル枠の底部を形成させる。シリコンゴム管がガラス板の端に沿って取り付けられ、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。これでゲル形成枠にゲルを注ぐことができる。

4.2. ゲルの調製

不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲルでは、両ゲ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pHが異なるので、分離ゲルを注ぎ、ゲルを形成させた後に濃縮ゲルを注ぐ。

4.2.1. 分離ゲルの調製

表1に示した量に従って、目的に応じた濃度の分離ゲルを調製するのに必要なアクリルアミドを含む溶液適量を三角フラスコ中で調製する。表1に示した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TEMEDを加える前に、混和した液を必要に応じてセルロースアセテート膜(孔径:0.45 µm)を用い吸引ろ過する。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TEMEDを加え、振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の2枚のガラス板の間に注ぐ。濃縮ゲルのための十分なスペース(サンプルコームの歯の長さプラス1 cm)を残しておく。この液の上にピペットを用いてイソブタノール飽和水を注意して積層させる。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

4.2.2. 濃縮ゲルの調製

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捨て、ゲル上部を水で数回洗浄し、イソブタノール及び非重合の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を流し去り、更に残る水をペーパータオルの端で取り除く。

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ドを含む溶液適量を三角フラスコ中で調製する。表2に示した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TEMEDを加える前に、混和した液を必要に応じてセルロースアセテート膜(孔径:0.45 µm)を用い吸引ろ過する。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減圧する。表2に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及びTEMEDを加え、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ゲルの上に直接注ぐ。直ちに気泡が入らぬように注意しながら清浄なサンプルコームを濃縮ゲル液中に差し込む。さらに濃縮ゲル液をサンプルコームのスペースが完全に満たされるよう加える。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

4.3. 試料の調製

医薬品各条で特に規定するもののほか、試料は次のように調製する。

試料溶液(非還元条件): 試料溶液又は標準溶液とSDS-PAGE試料緩衝液(高濃度)の等量混合液。

試料溶液(還元条件): 試料溶液又は標準溶液と還元剤として2-ME (又はDTT)を添加した還元条件用SDS-PAGE試料緩衝液(高濃度)の等量混合液。

各条においては、各タンパク質や染色方法に従って、タンパク質濃度を規定して良い。

試料処理: 沸騰水浴又は100℃に設定したブロックヒーターを用いて5分間加熱した後、冷却する(タンパク質の切断が熱処理の間に生じる可能性があるため、温度及び時間は各条で適宜設定しても良い)。

4.4. 電気泳動装置へのゲルの取付け及び泳動分離

ゲルの重合が完了した後(約30分)、サンプルコームを注意して取り除き、SDS-PAGE泳動緩衝液で溝をすすぎ、非重合アクリルアミドを除去する。必要ならば、先端を鈍化した皮下注

212 射針で濃縮ゲルの溝をまっすぐに直す。片方の短端側の留め金
213 をはずし、注意してシリコンゴム管を取り除き、再び留め金
214 を付ける。反対側についても同様に操作する。ゲル底部からシ
215 リコンゴム管を取り除く。このゲルを泳動装置に取り付け、
216 SDS-PAGE泳動緩衝液を上部及び下部の緩衝液槽に入れる。
217 ガラス板間のゲル底部の気泡を取り除く。この操作を行うには
218 曲がった注射針を付けた注射筒を用いると良い。緩衝液系の不
219 連続性が壊れるので、試料液などの液を添加する前に予備泳動
220 を行ってはならない。試料などの液を添加する前にSDS-PAGE
221 泳動緩衝液でゲルの溝を注意してすすぐ。適切な試料用
222 緩衝液を用いて試料液及び標準液を調製し、各条の規定に従っ
223 て処理する。各々の液の適量を濃縮ゲルの溝に添加する。各電
224 気泳動装置に適した条件で泳動を開始する。各電気泳動装置に
225 応じた表面積及び厚さの異なるゲルを市販品として入手するこ
226 ともできる。最適な分離を得るためには泳動時間及び電流/電
227 圧は泳動装置により変更する必要がある。分離ゲル中へ色素の
228 先端が移動していることを確認する。色素がゲルの下部に到達
229 したら、泳動を停止する。ゲル部を装置からはずし、注意しな
230 がらガラス板を取り除く。スパーサーを取り除き、濃縮ゲルを
231 除去した後、直ちに染色操作に入る。

232 4.5. SDS-PAGE-グラジエントゲル

233 グラジエントゲル(分離ゲル)は、先端から下端に向かって、
234 アクリルアミドの濃度を増加して調製されたものである。グラ
235 ジエントゲルの調製にはグラジエントを形成する装置が必要と
236 なる。市販されているプレキャストグラジエントゲルは各製品
237 の推奨条件下で利用できる。グラジエントゲルは固定濃度ゲル
238 と比べ、幾つかの長所がある。固定濃度ゲルで同様の移動度を
239 示すタンパク質であっても、グラジエントゲルで分離できるこ
240 とがある。電気泳動の間、タンパク質は孔径による障害が生じ
241 濃縮効果が起きるまで移動するため、シャープなバンドになる。
242 以下の表に示すように、グラジエントゲルは固定した濃度ゲル
243 よりも広い範囲の分子量のタンパク質も分離できる。

244 以下の表は、アクリルアミドの濃度範囲と分離に適したタン
245 パク質の分子量の範囲について示している。特定の使用目的の
246 ためには、他のグラジエント形状(例えば、凹型勾配)も調製で
247 きる。

アクリルアミド(%)	タンパク質範囲(kDa)
5 ~ 15	20 ~ 250
5 ~ 20	10 ~ 200
10 ~ 20	10 ~ 150
8 ~ 20	8 ~ 150

248 グラジエントゲルは分子量及びタンパク質の純度の測定にも
249 使用される。

250 4.6. ゲル中のタンパク質の検出

251 クーマシー染色と銀染色は最も一般的な染色方法であり、以
252 下により詳細に述べる。それ以外にも様々な市販の染色、検出
253 方法及び市販のキットが利用できる。例えば、蛍光染色は蛍光
254 イメージャーを用いて可視化され、通常広い範囲のタンパク質
255 濃度で直線的な反応を得ることができ、その範囲はタンパク質
256 に依存しており、通常数桁である。

257 クーマシー染色は、バンド当たり約1 ~ 10 µgのタンパク質
258 が検出できる。銀染色はゲル中の染色タンパク質の最も高感度
259 な方法であり、バンド当たり10 ~ 100 ngのタンパク質を検出

260 できる。これらの染色法では、概ねその程度の検出が可能であ
261 るが、一桁又は二桁感度を改善した事例も報告されている。

262 クーマシー染色は銀染色よりも直線性が高い。しかし、直線
263 性が得られる範囲はタンパク質と染色時間に依存する。主観に
264 よって染色操作を停止した場合、クーマシー及び銀染色の感度
265 の再現性が悪くなることがある。ダイナミックレンジが広い標
266 準タンパク質を使用することは、同一実験内の感度及び直線性
267 の評価に役立つため、非常に重要である。ゲル染色は全て手袋
268 を着用し、適切な容器を用い、例えばオービタルシェーカーを
269 用いて穏やかに振盪しながら室温で行う。

270 4.6.1. クーマシー染色

271 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
272 1時間染色する。染色試液を取り除く。

273 十分な量の脱色試液でゲルを脱色する。染色されたタンパク
274 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まで脱
275 色試液を数回交換する。ゲルの脱色が進めば進むほど、より少
276 ないタンパク質量を検出できるようになる。2 ~ 3 gの陰イオン
277 交換樹脂又は少量のスポンジ片を脱色試液に入れると脱色を
278 早めることができる。

279 この操作で用いられる酸-アルコール液はゲル中のタンパク
280 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操
281 作中に分子量の低いタンパク質は多少とも失われることがある。
282 クーマシー染色試液中に浸す前にゲルを水/メタノール/トリ
283 クロロ酢酸混液(5:4:1)に1時間浸すことにより耐久性の固定
284 が得られる。

285 4.6.2. 銀染色

286 ゲルを十分量の固定試液に1時間浸漬する。固定試液を除去
287 し、新しい固定試液を加え、少なくとも1時間又は一夜放置す
288 る。固定試液を捨て、十分量の水で1時間洗浄する。1 vol%の
289 グルタルアルデヒド溶液に15分間浸漬し、十分量の水で15分
290 間、2回洗浄する。暗所で新鮮な銀染色用硝酸銀試液に15分間
291 浸漬し、十分量の水で5分間、3回洗浄する。約1分間、十分に
292 染色されるまで現像試液に浸漬する。停止試液に15分間浸漬
293 し、現像を停止させ、水で洗浄する。

294 4.7. 結果の記録

295 ゲルをぬれたまま又は適切な乾燥操作により乾燥後、写真を
296 撮るかスキャンする。最近では、データ解析ソフトウェアを備
297 えたゲルスキャニングシステムが市販で入手でき、濡れたゲル
298 の写真を直ちに撮影し解析することができる。

299 用いた染色方法に応じて、ゲルの処理方法は若干異なる。ク
300 ーマシー染色の場合は、脱色後、少なくとも2時間100 g/Lのグ
301 リセリン溶液にゲルを浸漬する(一晚放置しても良い)。

302 銀染色の場合では、20 g/Lのグリセリン溶液中に5分間浸漬
303 する。

304 染色したSDSポリアクリルアミドゲルの乾燥は、恒久的に
305 ゲルを保存する一つの方法である。この方法はセルロースフィ
306 ルムの間で乾燥させる間にゲルに亀裂が生じる頻度が高い。

307 多孔性のセルロースフィルム2枚を水に浸し、5 ~ 10分間放
308 置する。一方のシートを乾燥用枠にのせる。注意してゲルを取
309 り上げ、そのフィルム上に置く。気泡を取り除き、ゲルの周囲
310 に2 ~ 3 mLの水を注ぎ、その上にもう1枚のフィルムをのせ、
311 気泡を取り除く。乾燥用枠を組み立て、オープン中又は室温で
312 乾燥するまで放置する。

4.8. 分子量の測定

タンパク質の分子量はそれぞれの移動度を分子量既知の幾つかのマーカータンパク質のそれと比較して算出する。一様に染色されるように混和された分子量既知の既染色又は未染色タンパク質の混合液がゲルのキャリブレーション用に市販されている。各種の分子量範囲のものが入手できる。分子量既知のマーカータンパク質の高濃度ストック溶液を適切な試料緩衝液で希釈し、測定しようとするタンパク質試料と同一のゲルに添加する。

泳動の完了後、直ちに泳動イオンの先端を確認するためトラッキング色素であるブロモフェノールブルーの位置に印を付ける。これにはゲルの端に切り込みを入れる、又は墨汁に浸した針でゲルを刺すという方法がある。染色後、各タンパク質のバンド(マーカータンパク質及び試料)について分離ゲルの上端からの移動距離を測定する。各タンパク質の移動距離をトラッキング色素の移動距離で割る。このようにして得られた移動距離はタンパク質の(色素の先端に対する)相対移動度又は R_f と呼ばれる。マーカータンパク質の相対分子量(M_r)の対数を R_f 値に対してプロットする。未知のタンパク質の分子量は直線回帰分析(より正確には非直線回帰分析)によって、又は未知試料で得られた相対移動度がほぼグラフの直線部分に位置する場合には R_f に対する M_r の対数曲線に内挿することによって推定することができる。

4.9. 実施した試験の適合性(バリデーション)

目的とする分離範囲が適切な分子量マーカーの分布によって示される(例えば、分子量マーカーの分布が、ゲル長の80%にわたる)場合以外は、試験は無効である。予測されるタンパク質で得られた分離は、分子量の対数値と R_f 値をプロットするとき、直線関係を示す必要がある。プロットがシグモイド形状となる場合は、カーブの直線領域に含まれるデータのみ分子量の計算に用いることができる。試験試料について、追加のバリデーション要件は、各条で規定する。

感度についてもバリデーションを行う必要がある。試験試料と並行して泳動する望ましい濃度限界に相当する標準タンパク質コントロールは、システム適合性試験に用いることができる。

4.10. 不純物の定量

SDS-PAGEは、不純物の限度試験として良く用いられる。デンスitomーター又は画像解析により主バンドに対する不純物の相対量を定量する場合、直線性に関するバリデーションが必要である。“ゲル中のタンパク質の検出”の項目の序文に記載したように、検出方法及びタンパク質に依存して、直線性のある範囲は変動するが、適切な範囲のタンパク質濃度を含む一つ以上のコントロール試料を用いることで、各泳動ごとに評価できる。

各条に不純物の存在許容限度が規定されている場合は、試験溶液を希釈して不純物の限度規格値に相当する標準溶液を調製する。例えば、限度規格値が5%なら、標準溶液は試験溶液を20倍に希釈したものになる。試料溶液から得た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。

バリデートされた条件下では、デンスitomーター又は画像解析により、主バンドに対して相対的な濃度を測定することにより不純物を定量できる。

5. 試薬・試液

(i) 30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29:1)試液: アクリルアミド290 g及びメチレンビスアクリルアミド10 gを水に溶かし、1000 mLとし、ろ過する。

(ii) SDS-PAGE泳動緩衝液: 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール151.4 g, グリシン721.0 g及びドデシル硫酸ナトリウム50.0 gを水に溶かして5000 mLとする。使用前に水を加えて10倍に希釈する。希釈溶液のpHを測定するときpHは8.1 ~ 8.8である。

(iii) SDS-PAGE試料緩衝液(高濃度): 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール1.89 g, ドデシル硫酸ナトリウム5.0 g及びブロモフェノールブルー50 mgを水に溶かす。グリセリン25.0 mLを加え、水を加えて100 mLとする。

塩酸を加えてpH 6.8に調整した後、水を加えて125 mLとする。

(iv) SDS-PAGE試料緩衝液(高濃度), 還元条件用: 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール3.78 g, ドデシル硫酸ナトリウム10.0 g及びブロモフェノールブルー100 mgを水に溶かす。グリセリン50.0 mLを加え、水を加えて200 mLとする。この液に2-ME 25.0 mLを加え、塩酸を加えてpH 6.8に調整した後、水を加えて250 mLとする。又は2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール3.78 g, ドデシル硫酸ナトリウム10.0 g及びブロモフェノールブルー100 mgを水に溶かす。グリセリン50.0 mLを加え、水を加えて200 mLとする。塩酸を加えてpH 6.8に調整した後、水を加えて250 mLとする。使用する直前にDTTを最終濃度が100 mMになるよう加える。

(v) クーマシー染色試液: クーマシーブリリアントブルーR-250 1.25 gを水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1) 1000 mLに溶かし、ろ過する。

(vi) 現像試液: クエン酸一水和物2 gを水に溶かし、100 mLとする。この液2.5 mLにホルムアルデヒド液0.27 mL及び水を加えて500 mLとする。

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

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

(ix) 脱色試液: 水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)

(x) 1.5 mol/Lトリス塩酸試液, pH 8.8: 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール90.8 mgを水400 mLに溶かし、塩酸を加えてpH 8.8に調整した後、水を加えて500 mLとする。

(xi) 停止試液: 水/酢酸(100)混液(9:1)

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							
		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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)試液

*2 1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8)：1.5 mol/L トリス塩酸塩試液，pH 8.8

*3 100 g/L SDS：100 g/L ドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100 g/L APS：100 g/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							
		1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
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
1.0 mol/L トリス溶液(pH 6.8) ^{*2}		0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
100 g/L SDS ^{*3}		0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
100 g/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)試液

*2 1.0 mol/L トリス溶液(pH 6.8)：1 mol/L トリス塩酸塩試液，pH 6.8

*3 100 g/L SDS : 100 g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100 g/L APS : 100 g/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 宿主細胞由来タンパク質試験法〈G3-9-172〉

宿主細胞由来タンパク質(HCP)は、医薬品製造に用いた宿主細胞に由来するタンパク質の総称である。本参考情報では、遺伝子組換え技術を用いて製造されたタンパク質医薬品(組換えタンパク質医薬品)に残留するHCPに関する試験について述べる。

組換えタンパク質医薬品に残留したHCPは、それ自身が抗原として免疫反応を引き起こす原因となる可能性があり、また、抗薬物抗体を誘導するアジュバントとなることが懸念される。したがって、組換えタンパク質医薬品の有効性と安全性を確保するために、製造工程の開発においては、HCPを安全性に影響のないレベルまで減少させる製法を確立することが必要である。また、工程内試験でHCPが恒常的に除去できていることの検証、あるいは、原薬の純度試験の設定により、HCP残留量を適切に管理しなければならない。

1. HCP試験法の選択

HCP試験法としては、通常、HCPを抗原とする抗体(抗HCP抗体)を用いたサンドイッチ免疫学的測定法が用いられ、検出系として酵素免疫測定法(ELISA)、電気化学発光免疫測定法(ECLIA)、時間分解蛍光免疫測定法(TRFIA)などが用いられる。本参考情報においては、サンドイッチ免疫学的測定法について扱うが、他の試験法を排除するものではない。

組換えタンパク質医薬品の製造で残留するHCPは、複数種類のタンパク質から構成される集団で、そのプロファイルは、宿主細胞の違いだけでなく、製造条件によっても異なると考えられている。HCP試験法は、使用目的や試験に用いる抗HCP抗体の調製方法に対する考え方の違いから、汎用試験法、製品特異的試験法、プラットフォーム試験法に分類される。汎用試験法は、同様の宿主細胞[例えば、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞に由来するCHO-K1細胞やCHO-DG44細胞]を用いて製造される医薬品に対し広く使用できることを目的とし、宿主細胞全体のタンパク質(細胞抽出液あるいは培養上清)を免疫原として作製された抗HCP抗体を用いて構築された試験法である。市販されているHCP測定用の試薬やキットは、通常、汎用試験法に該当し、使用する際には、その妥当性を確認する必要がある。製品特異的試験法は、特定の製品のHCPを管理することを目的として、当該製品の製造工程の特徴を考慮して開発されるものである。プラットフォーム試験法は、プラットフォーム化された製造方法で生産される組換えタンパク質医薬品(十分な経験のあるモノクローナル抗体など)に適用することを目的として開発されるものである。

汎用試験法は、宿主細胞全体のタンパク質を抗原とすることで、広範囲のHCPに対する抗体を網羅的に得ることを意図したものである。しかし、抗原として用いる個々のタンパク質の存在比率や免疫原性の違いにより、全てのHCPに対する抗体を得ることは困難であること、製造工程の違いによって残留するHCPのプロファイルが異なることがあるため、実際の製造工程で残存するHCPのカバー率が十分でない可能性に留意する必要がある。一方、製品特異的試験法では、残留する可能性の高いHCPを抗原とするため、汎用試験法よりも実際の製造

工程において残留するHCPを検出可能な抗HCP抗体が調製できることが期待される。ただし、製造工程の変更によって残留するHCPのプロファイルが変動する可能性に留意する必要がある。プラットフォーム試験法は、これらの試験法の中間的な考え方に位置するもので、プラットフォーム化された製造方法を用いて製造される様々な製品に適用可能であるという利点を有するが、抗HCP抗体の作製に用いる抗原の調製方法によって、汎用試験法あるいは製品特異的試験法と同様の課題を含む可能性がある。

製品によっては、目的物質に結合する特定のHCPが存在する可能性、あるいは、目的物質の発現に伴って産生量が著しく増加するHCPが生じる可能性等も考えられる。このようなHCPの残留が認められた場合は、当該HCPに対する他の試験法の設定の必要性を考慮する。

以上のような各HCP試験法の特徴を踏まえ、宿主細胞の性質、製造工程の特徴、HCPの免疫原性に関する知識、製品の開発段階等を考慮して、適切な試験法を選択する。

2. 試薬の調製と特性解析

2.1. HCP抗原/HCP標準物質

製品中のHCPを特異的に検出する抗体を産生させるための抗原として、目的物質を含まないHCPの調製が必要である。通常、ヌル細胞を用い、試験法の目的に応じたHCPが網羅的に含まれていることに留意して調製する。また、HCPは抗原として用いるだけでなく、定量用の標準物質としても用いるほか、抗HCP抗体のアフィニティークロマトグラフィーによる精製のリガンドとして用いる場合もある。

2.1.1. HCP抗原/HCP標準物質の調製

試験法の種類によって、HCP抗原/HCP標準物質の調製方法が大きく異なる。各試験法における抗HCP抗体作製用抗原あるいはHCP標準物質として用いるHCPの調製法と留意点について以下に示す。

汎用試験法に用いるHCPは、ヌル細胞を起源として、培養上清あるいは細胞を溶解又は破碎したものから、構成タンパク質種の保持に留意し、濃縮や透析等、最小限の操作に留めて調製する。実生産における培養工程と異なる条件で調製するため、製品に残留するHCPとは異なるプロファイルを示すことに注意が必要である。

製品特異的試験法に用いるHCPは、ヌル細胞を起源として、製品の製造工程を適用して調製する。通常、広範囲のHCPを確保するため、精製工程の適用は最小限に留める。ただし、測定すべきHCPに対する抗体が十分に得られない場合は、HCPの調製条件を検討する、あるいは、特定のHCPを排除したものを調製するなど、適切なHCP抗原の調製が必要になる場合がある。

プラットフォーム試験法に用いるHCPは、ヌル細胞を起源として、複数の製品で用いられているプラットフォーム化された製造方法を適用して調製する。通常、他の試験法と同様に、広範囲かつ十分量のHCPを確保するため、精製工程の適用は最小限に留める。また、製造条件の僅かな違いによるHCPスペクトルの差異をカバーするために、複数の条件で調製したHCPを混合したものを用いることも可能である。

製品特異的試験法及びプラットフォーム試験法用のHCPの調製に用いるヌル細胞としてモック細胞を用いることは、選択マーカーとして発現されるタンパク質が抗原中に含まれること、

実際の製造工程により類似した培養条件下で細胞が培養できることなどの利点を有している。一方、同一の細胞株であっても、各クローンの細胞増殖速度等の性質が必ずしも一致しないこと、また、目的物質の産生の有無などの違いによって、異なるHCPプロファイルを示す可能性に留意する必要がある。

2.1.2. HCP抗原／HCP標準物質の特性解析

調製したHCPについて、以下の事項について解析する。

1) タンパク質濃度

HCPの調製方法によっては、宿主細胞由来の核酸や培養液成分が含まれることに留意して、適切な測定法でタンパク質濃度を求める。具体的な測定方法と留意点については、参考情報「タンパク質定量法 (G3-12-172)」が参考になる。

2) HCPプロファイル

通常、一次元電気泳動法(SDS-PAGE)又は二次元電気泳動法を用い、調製したHCPに製造工程や原薬に残留すると予測されるHCP種が含まれることを確認する。質量分析法を用いたHCP種の同定も有用な手法である。

2.2. 抗HCP抗体

2.2.1. 抗HCP抗体の調製

HCPは、多種多様なタンパク質から構成されているため、試験に用いる抗HCP抗体として、それらを網羅的に検出できるポリクローナル抗体を取得する。免疫に用いる動物種は、ウサギ、ヤギ、ヒツジがよく用いられる。免疫の際は、アジュバントを用いて免疫応答を増強させることが有用である。HCPを構成する個々のタンパク質の免疫原性の程度は異なるため、抗原となるタンパク質の量に関わらず、抗体が誘導される時期や産生量は一定ではない。また、免疫に用いた動物の個体差によっても、誘導される抗体のプロファイルは同一とならない。通常、複数回の免疫が必要で、各段階の抗血清を用いたウェスタンブロット等で、誘導された抗体のHCPとの反応性を確認した後、全血清を回収する。複数の個体に由来する抗HCP抗体を混合することは、十分な抗体量を確保するためだけでなく、HCPプロファイルの偏りの解消に寄与することが期待できる。得られた抗血清から、プロテインA又はプロテインGクロマトグラフィーを用いて抗HCP抗体を精製する。いずれの場合も、カラムから抗体を溶出させるために酸性条件を用いているため、一部の抗体から凝集体が生成されることがある。抗体の凝集体は、測定を妨げる原因となることが懸念されるため、適切な方法で除去することが有用である。

抗HCP抗体は、HCPをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。この精製によって、HCPに特異的な抗体が濃縮されるため、非特異的な反応を排除することが期待できるが、低親和性の抗体が吸着されにくいことや極めて高親和性の抗体が溶出されにくいことで抗HCP抗体の多様性が低下する可能性に留意する必要がある。

2.2.2. 抗HCP抗体の適格性評価

抗HCP抗体は、製造工程や原薬に残留すると予測される広範囲の電荷及び分子量を持つHCPを網羅的に認識するものでなければならないが、各HCP種の免疫原性の違いにより、一部のHCPに対する抗体が誘導されにくい場合もあるため、得られた抗HCP抗体の適格性を確認しなければならない。通常、抗原カバー率で評価する。具合的な評価方法の一例を、以下に示す。HCPを二次元電気泳動法で分離後、ゲルの総タンパク質を染色する。同様に実施した二次元電気泳動について、抗

HCP抗体を用いたウェスタンブロットを行う。各染色で得たスポットパターンを比較し、総タンパク質染色のスポット数に対する、ウェスタンブロットで検出されたスポット数の割合を抗原カバー率とする。

2.3. 試薬類の保存

HCP標準物質や抗HCP抗体は、安定性に留意して保存する。これらの試薬の安定性は、標準物質の用量反応曲線のパラメーター等を継続的に観察することで確認できる。

3. HCP試験法のバリデーション

HCP試験法としてサンドイッチ免疫学的測定法を用いる場合、バリデーションの基本的な要件は、参考情報「分析法バリデーション (G1-1-130)」等が参考になる。ただし、HCP試験法は、単一の抗原を定量する一般的なサンドイッチ免疫学的測定法とは異なり、多様なHCP種の混合物を抗原として作製した抗体を用いることで、各HCP種を区別することなく同時に測定する手法であるため、HCP標準物質で直線性が確認された定量範囲であっても、精製が進んだ試料においては、試料の希釈率に応じた濃度変化(希釈直線性)を示さないことがある。この現象は、個々のHCPの精製工程での除去率の違いにより、測定試料中で一部のHCPの比率が高まるため、それらに対する抗体が不足することに起因すると考えられており、HCP濃度を実際よりも過少に評価してしまう可能性がある。

したがって、HCP試験法においては、真度、精度、特異性、検量線、定量範囲及び希釈直線性についてバリデーションを実施する。

(1) 真度及び精度

真度及び精度は、測定対象となる精製工程プールあるいは原薬に対するHCP標準物質の添加回収試験を実施し、HCP標準物質の回収率及び定量値の変動係数によって示す。

(2) 特異性

HCP試験法においては、大量の目的物質を含む試料中に残留する微量のHCPを測定する必要があるため、目的物質や試料溶液中の成分による干渉がないことを確認する。

(3) 検量線及び定量範囲

段階希釈したHCP標準物質を用いて検量線を作成し、回帰式を求め、決定係数等で妥当性を示す。回帰式から各濃度の標準物質の定量値を求め、許容できる真度及び精度が得られた濃度域を定量範囲とし、その最少濃度を定量下限とする。

(4) 希釈直線性

測定対象となる精製工程プールあるいは原薬等について、検量線の定量範囲内まで希釈した試料の定量値が直線性を示す試料の希釈倍数の範囲を確認する。

4. HCP試験法の設定

HCP試験法は、製造工程のHCP除去状況の確認あるいは原薬の純度試験として用いられる。HCP試験法の操作手順やデータ解析等の基本的な考え方については、参考情報「酵素免疫測定法 (G3-11-171)」が参考になる。

HCP試験の結果は、通常、全タンパク質あるいは目的物質に対する含有率で評価する。別途、試料の全タンパク質濃度あるいは目的物質濃度を測定し、全タンパク質量あるいは目的物質質量当たりのHCP含量率を求める。例えば、全タンパク質濃度が2 mg/mL、HCP濃度が20 ng/mLであった場合、HCP含有率は10 ng/mgと記載する。

212 5. その他

213 5.1. 製法変更時の留意点

214 組換えタンパク質医薬品の製造工程を変更した場合、残留す
215 るHCPのプロファイルに影響を及ぼす可能性があるため、製
216 法変更後においても適切にHCPが測定できていることを確認
217 する必要がある。HCPプロファイルが変化し、製法変更前の
218 HCP試験法を適用することが適切でないと考えられた場合は、
219 改めてHCP試験法を構築しなければならない。HCPプロファ
220 イルの変化は、二次元電気泳動法、あるいは、質量分析法等の
221 解析手法で確認することができる。

222 5.2. 試験用試薬等の変更時の留意点

223 重要試薬であるHCP抗原／HCP標準物質及び抗HCP抗体は、
224 製品のライフサイクルを考慮し、可能な限り十分量を確保して
225 おくことが望ましい。新たにHCP抗原／HCP標準物質や抗
226 HCP抗体を調製した場合は、二次元電気泳動法、ウェスタン
227 プロット法、質量分析法等の解析手法で、それらの特性につい
228 て、更新前後での同等性を確認する。また、必要な項目につい
229 て試験法のバリデーションを改めて実施し、更新前の試薬と試
230 験法との一貫性を確認した上で使用する。

231 汎用試験法を採用する場合、適格性が確認された市販キット
232 製品を用いることもできる。ただし、市販キット製品を用いた
233 試験の一貫性と品質を確保するためには、試薬のロット更新な
234 どの情報が提供されていることが必要で、適宜、重要試薬の特
235 性解析と試験法のバリデーションを実施する。

236 6. 用語

237 **モック細胞**：目的物質をコードする遺伝子を持たない発現ベク
238 ターを宿主細胞に導入して樹立された細胞。

239 **ヌル細胞**：目的物質を発現しない宿主細胞で、親細胞及びモッ
240 ク細胞を含む。

241 **抗原カバー率**：抗HCP抗体によるHCPを構成するタンパク質
242 の検出率である。例えば、HCPを二次元電気泳動法で分離し、
243 総タンパク質染色で得たスポット数と抗HCP抗体によるウエ
244 スタンブロット染色で得たスポット数から算出する。

1 バイオアッセイ (G3-18-190)

1. バイオ医薬品の品質確保における生物活性評価の役割

バイオ医薬品が意図した性質を有していることを確認するためには、構造・物理化学的性質の評価に加え、生物学的試験による生物活性の評価が必要である。これは、バイオ医薬品の有効成分の分子量が大きく、構造が複雑で、多様な分子種の混合物であり、理化学分析により高次構造を確定することが困難であるためである。生物活性を求めるには、生物学的な試験法を用いた生物活性試験(バイオアッセイ)を行う必要があり、評価対象となる医薬品の作用機序を考慮した試験法の設定が必要である。

バイオアッセイでは、通例、標準物質と試料について、用量と反応の関係に適切な解析モデルを当てはめ、得られた回帰式のパラメーターを比較することで相対的な活性(相対力価)を算出する。標準物質と試料に含まれる有効成分が同じであれば、同じ用量反応性を示す生物学的な反応が得られると考えられるため、相対力価の算出では、標準物質と試料の用量反応性が一致していることが前提となる。用量反応性の一致は、一般に、回帰直線あるいは回帰曲線の類似性(similarity)を統計的に評価することで、判断される。類似性(similarity)は、平行線モデルや非線形モデルの評価において、平行性(parallelism)と表現されることもある。

本参考情報では、バイオアッセイを適切に実施するために重要な、相対力価の算出方法などの解析方法、分析法バリデーションの実施、及び試験成立条件の設定に関する標準的な考え方、更にはバイオアッセイの開発とライフサイクルマネジメントにおける留意事項を示す。

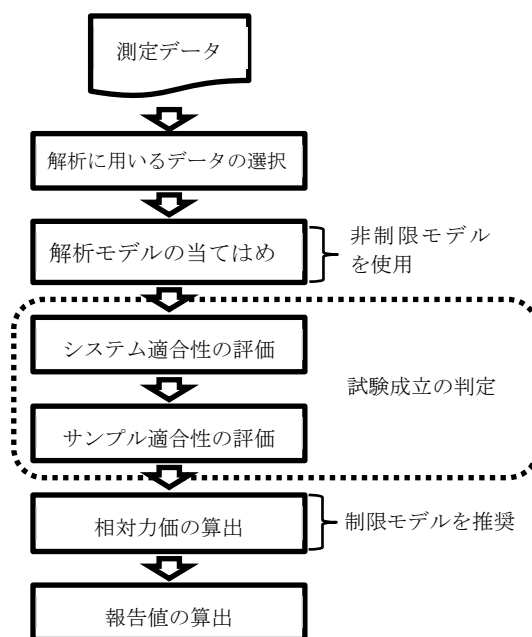
2. 相対力価の算出

医薬品の生物学的性質(biological properties)に関連する特性に基づく生物活性(biological activity)を定量的に表す尺度は、通例、「力価(potency)」であり、「単位(unit)」で表すことができる。単位は、原則として、あらかじめ値付けされた標準品に対する相対的な値として定める。ただし、酵素活性における単位時間当たりの基質分解能のように、絶対的な基準に基づいて単位を定義する場合もある。得られた値は、容量当たりの力価(単位/mL)や、タンパク質量当たりの力価(単位/mg)として表記することができる。タンパク質量当たりの力価は、比活性と呼ばれる。単位が設定されない医薬品の場合は、標準品あるいは標準物質に対する相対的な活性として、相対力価(%)を求めることができる。以下、標準品を用いる場合も含め、標準物質と表記する。

標準物質との比較により相対力価を求めるためのバイオアッセイでは、通例、標準物質と試料について、用量と反応の関係に適切な解析モデルを当てはめ、得られた回帰式のパラメーターを比較することで相対力価を算出する。用いられる主な解析モデルとして、1) 非線形モデル(Nonlinear model)、2) 平行線モデル(parallel-line model)、3) 勾配比モデル(Slope-ratio concentration-response model)が挙げられる。

図1に測定データの代表的な解析手順を示す。バイオアッセイのデータ解析においては、統計処理などにより解析に用いるデータを選択した後、標準物質と試料の回帰曲線に対して個別に解析モデルを当てはめ(非制限モデル)、モデルの適合性に関

する指標や類似性の評価から試験成立の判定を行う(詳細は4.試験成立の判定を参照)。成立した場合は標準物質と試料の回帰曲線のパラメーターを一致させた解析モデル(制限モデル)を当てはめ、得られた回帰式を用いて相対力価を算出する。ばらつきの影響を軽減するために、必要に応じて複数分析単位で得られた相対力価を統合し、報告値として算出する。なお、バイオアッセイの分析単位は、相対力価を算出するための適切な反復測定を含む試料及び標準物質の段階希釈系列から構成される試料の1セットと考える。1枚のマイクロプレート(プレート)で完結する場合もあれば、複数枚のプレートが必要な場合もある。



63

図1 非制限モデル(unconstrained model)及び制限モデル(constrained model)を用いた解析手順

相対力価の算出では、標準物質と試料の用量反応性が一致していることが前提となる(詳細は4.試験成立の判定を参照)。例えば、後述の4-パラメーターロジスティックモデルの場合、平行性が維持されている、すなわち標準物質と試料の用量曲線の上方、下方漸近線及び勾配パラメーターが一致していることを前提に、両者のEC₅₀値の比較により相対力価を算出することができる。標準物質と試料の回帰曲線の上方、下方漸近線及び勾配パラメーターを一致させる回帰式を用いるものを制限モデル(constrained model, reduced model, restricted model)という。一方で、標準物質と試料の回帰曲線の上方、下方漸近線及び勾配パラメーターを一致させないで個別に回帰式を用いる方法があり、非制限モデル(unconstrained model, full model)という。前述の通り、相対力価算出には、平行性の前提があるので、一般には、共通する漸近線を持つ曲線を用いて相対力価を算出する制限モデルを用いることが推奨される。標準物質と試料の用量反応曲線の形状に類似性が十分に担保されていれば、非制限モデルを使用することも可能と考えられるが、どちらの手法を用いるかは、事前に定めておく必要がある。データによっては制限モデルと非制限モデルの解析結果(EC₅₀の比)の乖離が大きい場合もあるが、このような試験結果は、試験成立条件を適切に定めることで不成立とすることができる。

87 2.1. 非線形モデル(Nonlinear model)

88 非線形の用量-反応モデルは一般的にS字型関数となり、濃
 89 度範囲が十分に広く、反応が上方、下方漸近線に制限される場
 90 合に用いられる。このうち最も汎用されているモデルは、4パ
 91 ラメーターロジスティックモデル(Four-parameter logistic
 92 model)である。

93 観測された反応を y 、濃度を z 、誤差項を e とすると、4パ
 94 ラメーターロジスティックモデルは次式で表される。

$$95 \quad y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{z}{C}\right)^B} + e$$

96 上方漸近線(Upper asymptote) : A

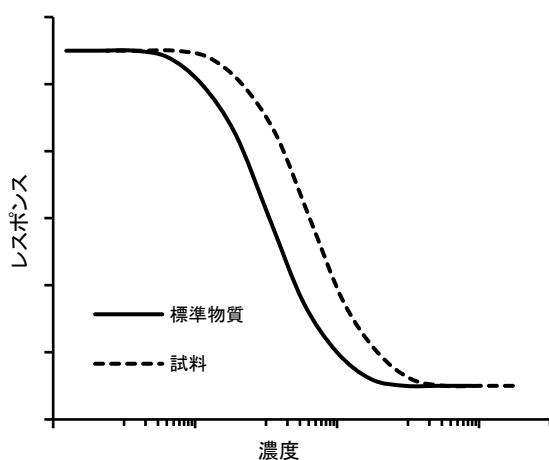
97 下方漸近線(Lower asymptote) : D

98 勾配パラメーター : B

99 50%有効濃度(EC_{50}) : C

100 B は EC_{50} における曲線の勾配を示す係数ではなく、 EC_{50} に
 101 おける曲線の勾配は以下の S で表される。ただし、 S は濃度
 102 に対する傾きであり、シグモイド曲線は濃度を対数変換している
 103 ために、見た目の傾きとは異なる値になることは留意が必要で
 104 ある。

$$105 \quad S = -\frac{1}{4} \times \frac{A - D}{C} \times B$$



106 図2 非線形曲線モデルにより得られた平行曲線の例
 107

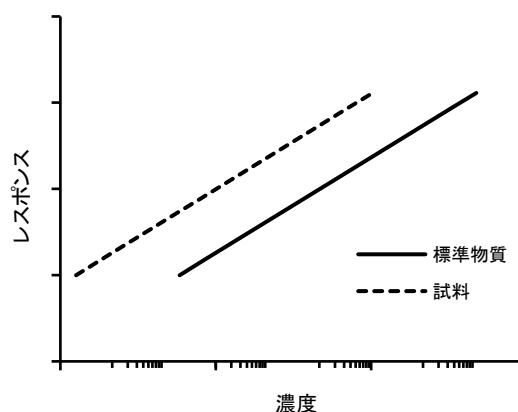
108 上下漸近線の一致を含め、二つのグラフの形状が一致してい
 109 る場合に相対力価の算出が可能であり、相対力価は係数 C で表
 110 される EC_{50} の比(標準物質/試料)となる。

111 2.2. 平行線モデル(Parallel-line model)

112 用量-反応の関係が濃度 z の対数 x と反応 y との間で直線関数
 113 であるとき、平行線モデルが使用できる。
 114 一般的な濃度-反応モデルが $x = \log(z)$ で線形に変換できる場
 115 合、 y 切片 α 、傾き β として、次式のように表すことができる。

$$116 \quad y = \alpha + \beta \log(z) + e = \alpha + \beta x + e$$

117



118

119 図3 平行線モデルの例

120 用量-反応直線が平行である場合には、水平方向の変化が
 121 測定対象の生物学的活性の差を示す。この水平方向での差が
 122 相対力価の対数 $\log(\rho)$ であり、試料及び標準物質の切片の差
 123 を傾き β で除したものととして算出される。したがって、相対
 124 力価は次式で表される(T は試料、 S は標準物質)。複数分析
 125 単位から得られた相対力価を統合して報告値が算出される場
 126 合がある。

$$127 \quad \rho = \text{antilog} \left(\frac{\alpha_T - \alpha_S}{\beta} \right)$$

128 2.3. 勾配比モデル (Slope-ratio concentration-response model)

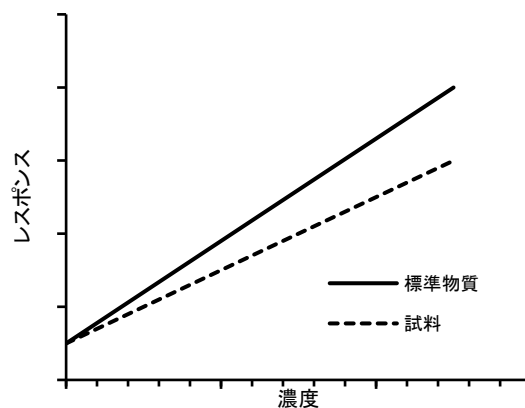
129
 130 用量-反応データの関係が直線回帰によく適合する場合には、
 131 勾配比モデルを使用できる。

132 類似性を仮定した勾配比モデルは次式で表すことができる。

$$133 \quad Y_S = \alpha + \beta z + e = \alpha + \beta_S z + e$$

$$134 \quad Y_T = \alpha + \beta(\rho z) + e = \alpha + \beta_S \rho z + e = \alpha + \beta_T z + e$$

135 勾配比モデルの特徴は、力価が異なる各線の切片は同じであ
 136 るが、傾きが異なるということである。共通の切片が原点であ
 137 る必要はない。



138

139 図4 勾配比モデルの例

140 勾配比モデルを用いる試験法では、最低限、標準物質及び試

141 料をそれぞれ1濃度以上のポイントで測定した値と、ブランク
142 試料の測定値を含む。濃度を対数変換しないため、一般的に、
143 対数目盛ではなく線形目盛において濃度を均等間隔でとる。モ
144 デルは、1個の共通の切片、試料の結果に基づく傾き及び標準
145 物質の結果に基づく傾きからなり、相対力価は以下のように傾
146 きの比から算出する。複数分析単位から得られた相対力価を統
147 合して報告値が算出される場合がある。

148 相対力価＝試料の傾き／標準物質の傾き＝ $\beta\rho/\beta=\rho$

149 3. 分析法バリデーション

150 バイオアッセイの分析法バリデーションを行う際に検討が必
151 要な分析能パラメーターは、一般的に、真度、直線性、特異性、
152 室内再現精度(併行精度を含む)及び範囲である。頑健性は分析
153 法バリデーションにおける要件ではなく分析法開発時に評価さ
154 れるが、細胞を用いたバイオアッセイにおける培養時間・温度、
155 用いる細胞数や細胞継代数、血清成分や検出試薬のロットなど
156 重要な要因は、特にこれらの要因が他の要因と関連する場合、
157 バリデーションの計画に含めることが重要である。

158 3.1. 真度

159 バイオアッセイにおける真度は、測定した相対力価(実測値
160 である力価測定値)と既知の相対力価(理論値である目標力価)の
161 間の一致の程度を指す。バイオアッセイの真度を評価するため
162 の最も一般的な方法は、標準物質又は力価が既知である試料を
163 希釈したサンプルを測定して得られた力価と、希釈倍数から理
164 論的に算出した目標力価から相対バイアスを算出することであ
165 る。各濃度における相対バイアスは、対数目標力価に対する対
166 数力価測定値の割合として以下の式で計算される。

167 相対バイアス＝ $100 \times (\text{力価測定値} / \text{目標力価} - 1) \%$

168 相対バイアスが、事前に定めた判定基準を満たしていること
169 を確認する。適切な場合、相対バイアスの信頼区間(例えば両
170 側90%)を判定基準と比較することが推奨される。各濃度の相
171 対バイアスに一定の傾向がない場合、各濃度における相対バイ
172 アスの推定値を事前に指定した判定基準と比較することができ
173 る。

174 3.2. 直線性

175 バイオアッセイの直線性は、ある一定の濃度範囲内で目標力
176 価と力価測定値が直線関係にあることを指す。直線性の程度は、
177 目標力価に対して力価測定値をプロットし、統計学的手法を用
178 いて評価することができる。例えば、最小二乗法による回帰直
179 線の計算から求められる回帰直線の傾きや相関係数(r)、残差
180 平方和を評価する。目標力価に対して残差をプロットした図を
181 解析することも直線性を評価する上で有用である。

182 3.3. 特異性

183 バイオアッセイの特異性は、存在が予想されるマトリックス
184 成分又は製品に関連する成分の存在下で、分析対象を明確に測
185 定する能力を示す。特異性はまた、有効成分とは異なる分子で
186 あるが関連性のある分子と区別する能力を示す場合もある。共
187 存が予想されるマトリックス成分だけでなく、劣化した試料に
188 含まれる目的物質由来不純物など、目的物質に関連する成分の
189 干渉がないことを示すことも、特異性の評価において必要な場
190 合がある。

191 3.4. 室内再現精度

192 室内再現精度は、同一の実験室内において、試験日、試験者、

193 器具等の条件を変えて測定する場合の精度を指す。室内再現精
194 度が、事前に定めた判定基準を満たしていることを確認する。
195 適切な場合、室内再現精度の信頼区間(例えば両側90%)を
196 判定基準と比較することが推奨される。室内再現精度はバイオ
197 アッセイの導入後に、経時的に変動する因子の影響を評価する
198 ために有用である。これらの影響は一般に不可避であり、バイ
199 オアッセイのバリデーション計画には、試験への影響を考慮し
200 て、試験者の変更、異なる器具や装置、異なる試薬ロットなど
201 の因子の評価を含めることが望ましい。アッセイ間とアッセイ
202 内で分散成分を分離することで、室内再現精度と併行精度を同
203 時に評価することが有用な場合がある。

204 3.5. 範囲

205 バイオアッセイの範囲は、その分析法が適切なレベルの真度、
206 室内再現精度及び直線性を有していることが既に示されている
207 相対力価の範囲と定義される。範囲は通常、力価に対する製品
208 規格の範囲を最小限含んでいることが求められる。安定性試験
209 のため、若しくは高力価又は低力価の試料をバイオアッセイの
210 範囲に希釈又は濃縮する必要性を最小限にするために、より広
211 い範囲にわたってバイオアッセイをバリデーションすることは
212 有用である。

213 4. 試験成立の判定

214 相対力価を算出するための試験では、標準物質と試料が同じ
215 用量反応性を示すことが重要であり、両者の用量反応曲線の形
216 状が類似していることをあらかじめ定めた試験成立条件を満た
217 すことにより確認する。相対力価は、事前に定めた試験方法の
218 濃度の範囲内で、標準物質と試料から得られた曲線が類似性を
219 示し、かつ解析に必要なモデルへの適合度を満たす場合のみ、
220 算出できる。

221 分析法開発時の検討と分析法バリデーションによる分析性能
222 の確認に加え、日々の試験において、試験が適切に実施されて
223 いることを確認するため、規格及び試験方法を設定する際には、
224 理化学試験におけるシステム適合性に相当するものとして、試
225 験成立条件を設定する必要がある。

226 試験成立条件には、1)システム適合性の評価及び2)サンプル
227 適合性(標準物質と試料の用量反応性の類似性)の評価が含まれ
228 る。試験成立条件として、目標とする分析性能を確保するため
229 の適切な指標を選択して、判定基準を設定することが重要であ
230 る。試験成立条件は、バイオアッセイの開発中から検討し、バ
231 リデーション前までに確立しておく必要がある。

232 4.1. システム適合性

233 試験法が目的とする試験を行うのに適切な状態を維持してい
234 ることを確認するために評価する。通常、標準物質やQC試料
235 (生物活性を含め、十分に特性解析された試料)で得られた用量
236 ー反応曲線について、被験物質の生物活性に基づく意図した反
237 応が得られたことを、いくつかのパラメーターがあらかじめ規
238 定した範囲内にあることにより確認する。例えば、4パラメー
239 ターロジスティックモデルにおいては、決定係数、上方漸近線
240 又は下方漸近線の値、上方漸近線と下方漸近線の差や比、観測
241 された反応の最大値と最小値の比、勾配パラメーター、 EC_{50}
242 などを指標とし、複数の指標について適否を判定することで、
243 一定の性能が維持されていることを確認できる。その他、QC
244 試料の相対力価を指標として設定することもできる(この場合、
245 標準物質とQC試料の用量反応曲線の類似性に関する評価も必
246 要となる)。平行線モデルでは観測された反応の最大値と最小

247 値の差や比、勾配比モデルでは切片及び高濃度標準物質の反応
248 等の指標が、あらかじめ規定した範囲内にあることにより確認
249 することができる。

250 4.2. サンプル適合性

251 標準物質と試料の用量反応性が類似していることを確認する
252 ために評価する。相対力価の測定は、標準物質と試料の用量反
253 応曲線の形状が一致していることが前提条件であるため、標準
254 物質と試料の用量反応曲線の類似性により、サンプル適合性評
255 価を評価する。類似性(similarity)の評価の対象となる項目に
256 は、4パラメーターロジスティックモデルの場合、EC₅₀以外の
257 パラメーター、すなわち、上方漸近線及び下方漸近線、勾配パ
258 ラメーターが含まれ、平行線モデルでは回帰直線の傾き、勾配
259 比モデルでは切片が含まれる。

260 類似性の評価の方法として、通例、標準物質と試料の用量反
261 応性に差がないという帰無仮説を検定する差異の検定
262 (Difference test)、あるいは、標準物質と試料の用量反応性が
263 同等と判断される許容範囲を定めて評価する同等性の検定
264 (Equivalence test)が用いられる。

265 4.2.1. 差異の検定 (Difference test)

266 差異の検定とは、分散分析を用いて「標準物質と試料の用量
267 反応性に差がない」という帰無仮説を評価するものである。差
268 異の検定は、個々の試験結果について判定が可能であり、許容
269 範囲を定めるための事前のデータ蓄積が必要ないという利点が
270 ある一方で、データのばらつきが大きいほど残差分散が大き
271 くなり、用量反応性に差がない、すなわち用量反応性が一致し
272 ていると判定されやすく、ばらつきが小さいほど、用量反応性が
273 一致していないと判定されやすいという欠点があることに注意
274 が必要である。

275 差異の検定の一つは、標準物質と試料の測定結果のばらつき
276 をいくつかの要素に分け、それぞれに設定した帰無仮説に対す
277 る判定結果をもとに、両曲線の一致を評価する方法である。代
278 表的な手法では、分散分析(Analysis of Variance)等により回
279 帰性(regression：回帰の成立を評価)、非平行性(non-
280 parallelism：非制限モデルと制限モデルの乖離を評価)、非線
281 形性(non-linearity又はlack of fit：非制限モデルからのデータ
282 の乖離を評価)に関して有意差検定により p 値を求め、試験の成
283 立を判定する。差異の検定のもう一つの方法(Extra sum of
284 square法)では、標準物質と試料の用量反応性をそれぞれ、モ
285 デルを当てはめて回帰した場合と、標準物質と試料の用量反応
286 曲線の形状が等しいとしてパラメーターの一部を共通として回
287 帰した場合の平均平方を比較し、モデル間でのあてはまりの違
288 いに有意差があるかを p 値により判定して、平行性を判断する。

289 4.2.2. 同等性の検定 (Equivalence test)

290 同等性の検定は、標準物質と試料の用量反応曲線について、
291 類似性の判定基準となる指標とその許容を定め、各試験で得ら
292 れた指標が、許容範囲に含まれる時、両者は同等、すなわち類
293 似していると判定する手法である。例えば、4パラメーターロ
294 ジスティックモデルでは、標準物質と試料の用量反応曲線につ
295 いて、EC₅₀以外のパラメーター、すなわち上方漸近線、下方
296 漸近線、及び勾配パラメーターを同等性の検定に用いることが
297 できる。試料と標準物質の上方漸近線の比又は差、試料と標準
298 物質の下方漸近線の比又は差、試料と標準物質の勾配パラメ
299 ーターの比等が判定に用いられる。分析法開発中に、どのパラ
300 ーターが重要であるか、また、同等性をどのように評価するか

301 を決定する必要がある。

302 5. バイオアッセイの開発とライフサイクルマネジメントにお 303 ける留意事項

304 バイオアッセイの開発の際には、適切な試験方法を選択し、
305 試験に用いる試薬や細胞株等の重要試薬について、適切なもの
306 を選択する。データ解析方法についても適切な方法を選択する。
307 試験性能に影響する操作パラメーターを洗い出し、試験性能と
308 種々の操作パラメーターの関連を理解した上で、目的とする分
309 析性能が得られる試験条件を設定することが推奨される。試験
310 性能が恒常的に維持されるよう、頑健性の評価を行っておく必
311 要がある。

312 5.1. 試験方法の選択

313 規格及び試験方法に用いられるバイオアッセイは、品質管理
314 戦略の一部を担うものとして設定される。一般には、有効成分
315 の作用機序を反映した系が用いられるが、複数の作用機序を持
316 つ製品では、その中から必要なものが選択される。細胞を用い
317 るバイオアッセイでは有効成分の作用機序を反映する細胞増殖
318 やサイトカインの分泌等が細胞応答の指標として用いられるほ
319 か、特定の細胞内シグナル伝達に応答するレポーター遺伝子を
320 導入した細胞を用いたレポーターアッセイが実施されることも
321 ある。何れの場合でも臨床上市期待する作用と選択したバイオ
322 アッセイにおいて測定される活性との関連について適切に説明で
323 きる必要がある。

324 5.2. 試験条件の設定

325 バイオアッセイの開発は、試験因子の条件や水準を変化させ
326 た一連の実験を通じて行われ、信頼性の高い頑健なバイオアッ
327 セイの試験条件を確立するため、試験因子の条件や水準を特定
328 する。それらの実験は、各因子を個別に検討して理想的な条件
329 を特定するか、多因子実験計画法を用いて行われる。細胞を用
330 いたバイオアッセイの試験結果に影響を及ぼす可能性のある主
331 な因子として、培養温度、培養時間、細胞密度、培地組成(血
332 清成分を含む)、細胞継代数及び継代スケジュールなどが挙げ
333 られる。プレートを用いるバイオアッセイでは、プレート上の
334 試料の配置が試験結果に影響を及ぼす場合があるため、注意が
335 必要である。全てのウェルで実験処理(洗浄、培養、基質の添
336 加など)が均一に施されていても、プレート上に実験処理とは
337 関係のない系統的な偏りが認められることがある。これらの偏
338 りが全ての行、列、プレートの端から中央にかけて発生する場
339 合、プレート効果と呼ばれる。試験法の開発中には、プレートの
340 レイアウト方法、ブロック化、無作為化、及び反復などの方
341 法により、プレート効果を最小限にするための対処が必要であ
342 る。プレート上の試料配置を含め、開発期間中に、当該試験法
343 において重要な因子を特定し、許容可能な性能(真度や精度な
344 ど)の範囲となるよう、因子の最適な値や範囲を決定すること
345 が望ましい。

346 5.3. 試験法開発中のデータ解析

347 開発中に蓄積されたバイオアッセイデータを使って、統計解
348 析方法や試験成立条件を決めることが有用である。具体的には、
349 データに当てはめる解析モデル(非線形モデル、平行線モデル
350 及び勾配比モデルなど)、必要な場合にはデータの変換や重み
351 付けの方法を決める必要がある。モデルの適切性については、
352 平行性の仮定を行わずにデータに解析モデルを当てはめ、試験
353 の濃度範囲全体における正規性及び等分散性からの逸脱につい
354 て、残差の分布を評価することも有用な場合がある。また、試

355 験法の開発中に、必要な場合は、外れ値の原因調査や処理に関
356 する方法を作成し、試験手順書と関連付けることが推奨される。

357 5.4. 標準物質の管理

358 バイオアッセイでは、試料の標準物質との相対的な活性を評
359 価する。報告値の信頼性を確保するためには、標準物質の信頼
360 性を確保する必要がある。標準物質は重要な試薬である。標準
361 物質は評価対象となる試料を代表するものである必要があり、
362 非臨床試験又は臨床試験で有効性・安全性が確認されたロット、
363 あるいは、特性解析を実施したロットから調製する。標準物質
364 は、使用される期間にわたり、力価を維持可能な条件下で保存
365 する必要がある。標準物質が原薬や製剤とは異なる条件下(保
366 存温度、保存容器、処方など)で保存されることもある。バイ
367 オ医薬品の標準物質においては、保存中の糖化や酸化など化学
368 変化に起因して活性が低下し、類似性の喪失や力価の経時的な
369 低下が生じる可能性があるため、標準物質の定期的な安定性評
370 価の実施が推奨される。また、ロット更新時に力価の不連続性
371 が生じる可能性があるため、標準物質のロット更新時の手順に
372 おいて、更新後のロットの値付けの方法が適切に定められ、実
373 施される必要がある。標準物質の力価の経時的な低下やロット
374 更新時の不連続性への対応策としては、上記の対策に加え、
375 後々の標準物質との同等性や力価試験結果の変動を調査するた
376 め、各標準物質ロットの一部を保存しておくことが有用である。
377 また、初期に確立した標準物質を一次標準物質とし、一次標準
378 物質を基準に検定された標準物質を常用標準物質として商用生
379 産の試験に用い、常用標準物質の更新時に一次標準物質を基に
380 生物活性を評価する、標準物質の2段階設定も有用である。

381 5.5. 重要試薬の設定と管理

382 試験性能に重要な影響を及ぼす試薬は、重要試薬として管理
383 する。例えば、中和活性を持つ抗体医薬品の細胞応答性試験に
384 おいて、中和される生理活性物質等が該当する。重要試薬につ
385 いては、あらかじめ品質特性や安定性を考慮して、品質確保の
386 ための評価項目と適否の判定基準、保存条件やロット更新の手
387 順などを設定しておく必要がある。ロット更新の際には、実際
388 にバイオアッセイに用いて、意図した結果が得られることを確
389 認する。

390 細胞を用いるバイオアッセイでは、細胞の特性が試験性能に
391 影響するため、細胞は重要試薬に含まれる。試験に適した特性
392 を持つ細胞であることを確認するために特性解析を行い、細胞
393 株を適切に管理することが、試験結果の信頼性確保に重要であ
394 る。細胞の十分かつ安定した供給を確保するため、セルバンク
395 を構築することが推奨される。セルバンクは、細胞の増殖特性、
396 バイオアッセイに用いる細胞の継代数や細胞数、試験の実施頻
397 度などを考慮して構築する。バイオアッセイに用いる細胞株の
398 機能的及び遺伝的特性に関する情報は、その細胞株の起源から
399 バンキングまでの履歴などを含めて、詳細に記録しておくこと
400 が望ましい。セルバンクから調製し、試験に用いる細胞につい
401 ては、あらかじめ定めた継代数の範囲で試験に用いる等、試験
402 性能を確保するための条件を定めておく。

403 6. 用語解説

404 バイオアッセイ(生物活性試験)(Biological assays,
405 Bioassays): 生物活性の測定に用いられる分析法。有効成分の
406 特性に応じて、酵素反応、標的分子との結合、細胞応答性、動
407 物個体での反応等を指標にした方法が用いられる。

408 相対力価(Relative potency): 標準物質と試料について、用量

409 と反応の関係に適切な解析モデルを当てはめ、得られた回帰式
410 のパラメーターを比較することで算出した相対的な活性。

411 試験成立条件(Suitability testing): 実施した試験が成立して
412 いることを判定するために、あらかじめ定めておく基準であり、
413 通例、標準物質の反応性に関して規定するシステム適合性、及
414 び、標準物質と試料の反応性の類似性の判定基準を規定するサ
415 ンプル適合性から構成される。理化学試験におけるシステム適
416 合性に相当するが、試験成立条件では、試料のデータを判定に
417 用いる点が特徴である。

418 類似性(Similarity): ここでは、標準物質と試料の用量反応直
419 線(曲線)の一致の程度のこと。相対力価の算出には、標準物質
420 と試料の用量反応直線(曲線)の形状が類似していることが前提
421 である。類似性(similarity)は、平行線モデルや非線形モデル
422 の評価において、平行性(parallelism)と表現されることもある。

423 差異の検定(Difference test): 差異がない、という帰無仮説を
424 設定して、試験成立の判定を行う方法。帰無仮説が棄却されな
425 い場合、すなわち差異があるとは言えない場合に、当該指標に
426 関して、試験成立の要件を満たすと判定できる。通例、回帰、
427 非平行性(モデル間の乖離)、及び、非直線性(回帰曲線上の点と
428 実測地の乖離)の有意性を検定する。4-パラメーターロジステ
429 イックモデル回帰を用いる場合は、Extra sum of square法が
430 用いられる場合もある。

431 Extra sum of square法: モデルの違い(制限モデルと非制限モ
432 デル)で生じる残差分散と、非制限モデルで回帰した場合の残
433 差分散を比較し、分散分析により平行性を検定する方法。4-パ
434 ラメーターロジスティックモデルを用いる場合に利用されるこ
435 とが多い。

436 同等性の検定(Equivalence test): 評価に用いる指標の差異が
437 一定の範囲内に収まっていることで試験成立とする方法。差異
438 が同等となる許容範囲に含まれる場合に、当該指標に関して、
439 試験成立の要件を満たすと判定できる。試験で得られるレスポ
440 ンスや回帰式の係数等に関して、判定の対象とする指標と、各
441 指標に関する許容範囲をあらかじめ設定しておく。指標の差異
442 そのものから判定する場合と、差異の信頼区間から判定する場
443 合がある。

444 QC試料: 代表的なロットから、適切な濃度に調製し、アッセ
445 イ系の評価に用いるもの。QC試料は、試験成立の判定に用い
446 る他、レスポンスの長期的な変動のモニターにも用いることが
447 できる。QC試料の利用は、標準物質のロット更新の前後で、
448 レスポンスに変化が生じていないことを確認する目的でも有用
449 である。Product control、あるいは、Assay Controlと呼ばれ
450 る場合もある。

451 参考資料

- 452 1) US Pharmacopeia (2023), <111> Design and analysis of
453 biological assays.
- 454 2) US Pharmacopeia (2023), <1032> Design and
455 development of biological assays.
- 456 3) US Pharmacopeia (2023), <1033> Biological assay
457 validation.
- 458 4) US Pharmacopeia (2023), <1034> Analysis of biological
459 assays.
- 460 5) European Pharmacopoeia 11.0 (2022), 5.3 Statistical
461 analysis of results of biological assays and tests.

1 表面プラズモン共鳴法 (G3-10-170)

表面プラズモン共鳴(Surface plasmon resonance : SPR)法は、センサーチップ上の質量の変化を、表面プラズモン共鳴により生じる反射光の消失角度の変化として検出する方法であり、物質間の結合特異性や結合親和性の解析、試料中の分析対象物質濃度の測定等に用いられる。

表面プラズモン共鳴を利用して物質間相互作用を測定する装置では、一般的に、プリズムを用いたKretschmann配置が採用されている(図1)。センサーチップの金属薄膜表面で全反射するように偏光を照射すると、反射光の一部に反射光強度が低下したSPRシグナルが観察される。SPRシグナルの生じる角度はセンサーチップ上の質量に依存して変化するため、センサーチップ上に固定した分子(リガンド)と添加した分子(アナライト)が結合又は解離することで、SPRシグナルの生じる角度が変化する(図1)。測定結果は、SPRシグナルの角度変化や、角度変化から換算されるレスポンスユニット(RU)を経時的に示したセンサーグラムとして取得される。取得された結合及び解離のセンサーグラムを理論曲線にフィッティングさせることで、リガンドとアナライトの結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、解離定数($K_D = k_d / k_a$)を求めることができる。また、既知濃度のアナライトとレスポンスを比較することで、試料中のアナライト濃度を求めることができる。

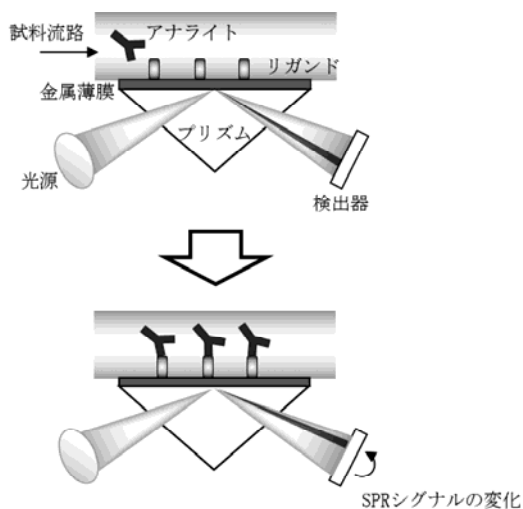


図1 SPR測定原理の概略図(Kretschmann配置)

1. 装置

一般的なSPR装置(連続フロー方式)は、光源、光学検出器、送液システム、センサーチップ挿入部、データ集積部からなる。センサーチップはカルボキシメチルデキストランを結合させたものが一般的である。固定化する分子の特性に応じて適切なものを選択する。センサーチップを装置にセットするとセンサーチップ表面に複数のフローセルが形成され、各フローセルにそれぞれリガンドを固定化することができる。

2. 測定

SPR法は、リガンドとアナライトの結合特異性の確認、結合親和性解析、又は、アナライトの濃度測定に使用される。通

例、流路に測定用緩衝液を流しながら、アナライトを注入し、SPRシグナルを経時的に観察することで、センサーチップ上に固定化したリガンドとの結合のセンサーグラムを取得する。センサーグラムの形状から結合親和性を解析するカインेटィクス解析では、アナライトの注入を終了した後、アナライトを含まない緩衝液を流して、解離のセンサーグラムも取得する。測定後、再生用緩衝液を流して、リガンドに結合しているアナライトを全て除去する(図2)。

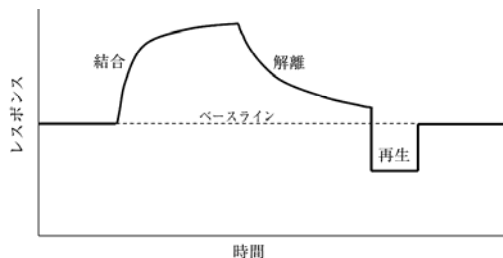


図2 SPRセンサーグラム 例示

2.1. 試料及び緩衝液

(1) アナライト溶液

分析目的や測定を行う分子間の親和性に応じて、測定用緩衝液を用いて試料を至適な濃度に希釈し、アナライト溶液とする。試料に不溶性の夾雑物が含まれる場合、遠心分離やタンパク質低吸着のフィルターなどで不溶物を除去する。

(2) 測定用緩衝液

測定対象に応じ緩衝液を選択する。緩衝液に塩や界面活性剤を添加することでリガンドやアナライトを安定化できることがある。必要に応じ、緩衝液は使用前にフィルターを過し、脱気する。測定時、アナライトを注入した際に対照フローセルへの非特異的な結合が見られた場合は緩衝液のpHやイオン強度等の変更により、至適化する。

(3) 再生用緩衝液

再生用緩衝液には酸性溶液、アルカリ性溶液、塩溶液、界面活性剤、非極性溶液、キレート剤などが使用される。用いることのできる緩衝液は装置の流路系の材質により異なるため、装置の有機溶媒耐性を確認する。センサーチップ表面のリガンドの性質を変化させることなく、結合した全てのアナライトを解離させる条件が理想的である。再生用緩衝液が適切であれば、再生後のベースラインがアナライト添加前のベースラインまで戻り、繰り返し測定で結合レスポンスが低下しない。再生条件が適切でない場合は、測定サイクルを重ねるごとにリガンドへの結合量が低下するため、測定の再現性に影響が生じる。リガンドとアナライトの解離が十分速い場合には緩衝液を流すことで、リガンドに結合したアナライトが解離するため、再生用緩衝液を流す必要はない。

2.2. 測定用センサーチップの準備

センサーチップへのリガンドの結合の方法には、リガンドを直接固定化する直接法と、リガンド内の特異的認識配列に結合するタンパク質やリガンドに対する抗体などを固定化し、リガンドを捕捉する捕捉法がある。リガンドの生物活性を維持した状態で固定化し、アナライトとの結合への影響を小さくすることが重要である。また、センサーチップに固定化するリガンドは純度が高いものを使用する。

リガンド固定化量は、次式を参考にして設定する。

82 リガンドの固定化量
 83
$$= \frac{\text{必要 } R_{\max}}{\text{リガンドの結合価数}} \times \frac{\text{リガンドの分子量}}{\text{アナライトの分子量}}$$

 84 測定に必要な $R_{\max}$ (リガンドにアナライトが最大限に結合した
 85 場合のレスポンス)は使用する装置の感度に応じて定められる。
 86 結合親和性解析を行う場合は、立体障害や凝集、マストランス
 87 ポートリミテーション(リガンドが過剰でアナライトの供給が
 88 追い付かず、アナライトの供給量が結合量変化の律速になって
 89 いる状態)を避けるために $R_{\max}$ は低く抑える。濃度測定を行う
 90 場合はマストランスポートリミテーションが生じることで、ア
 91 ナライト結合量の濃度依存性が上がり、検量線の直線性が上昇
 92 するため、 $R_{\max}$ は高くすることが望ましい。
 93 通例、センサーチップ上にリガンドを結合していない対照フ
 94 ローセルを用意し、非特異的なレスポンスの検出に使用する。
 95 未処理のフローセル、リガンドを固定化する際行った化学処理
 96 と同じ処理を行ったフローセル、又はアナライトと結合性を持
 97 たないリガンド様分子を固定化したフローセルが対照フローセ
 98 ルとなる。捕捉法でリガンドを捕捉した場合は、捕捉用分子を
 99 固定化したフローセルを対照とする。
 100 固定化したリガンドが安定な場合は、センサーチップを装置
 101 から外して保存することが可能である。保存には乾燥状態又は
 102 緩衝液に浸した状態で冷所に保存する方法等がとられる。
 103 **リガンドの固定化法**
 104 **(1) 直接法**
 105 リガンドのアミノ基、チオール基、カルボキシル基、アルデ
 106 ヒド基、ヒドロキシル基や、リガンドの疎水性などを利用して、
 107 直接リガンドを固定化する。通例、センサーチップにはカルボ
 108 キシル基のような固定化に利用できる基を持つ層があり、リガ
 109 ンドを共有結合により固定化する。直接固定化する場合にはリ
 110 ガンドの方向性が定まらないためにしばしば不均一な表面にな
 111 る。
 112 **(2) 捕捉法**
 113 リガンドとの結合能を持つ捕捉用分子をセンサーチップに固
 114 定化し、捕捉用分子との結合によりリガンドをセンサーチップ
 115 に捕捉する。捕捉用分子には、例えば、リガンドに対する抗体、
 116 リガンドに付与した特異的認識配列に対する抗体等が用いられ
 117 るほか、リガンドが抗体医薬品の場合は、プロテインAやプロ
 118 テインG、リガンドがビオチン化された分子である場合は、ス
 119 トレプトアビジン等が使用される。捕捉法では、リガンドの方
 120 向性が均一になりやすい。捕捉用分子とリガンドは測定時に解
 121 離しないことが重要である。サイクルごとにリガンドを捕捉し
 122 直す場合は、リガンドごとに再生条件を決定する必要があるた
 123 め、測定条件の決定が容易である。
 124 **2.3. 測定条件の設定**
 125 **(1) ベースラインの確認**
 126 測定開始前に、ベースラインが安定していることを確認する。
 127 ベースラインが安定していない場合は、①緩衝液、高イオン強
 128 度の溶液、又は、界面活性剤を含む溶液を複数回注入する、②
 129 緩衝液を高流速で流す、③アナライトの結合と再生操作を繰り
 130 返す、等の操作で安定させる。
 131 **(2) 流速**
 132 結合親和性解析ではマストランスポートリミテーションを抑
 133 制するために速く設定し、濃度測定ではマストランスポートリ

ミテーション条件とするために遅く設定する。
 135 **(3) 送液時間**
 136 結合や解離等の各領域の必要時間は、測定様式により異なる。
 137 特異的結合の確認では、結合領域の時間はレスポンスの変化が
 138 十分観察できる時間として設定する。カインेटクス解析を用
 139 いた結合親和性解析では、解離が遅い反応の場合、解離時間を
 140 十分にとる必要がある。平衡値解析によるアフィニティー解析
 141 では、結合が平衡に達するのに十分な時間を結合領域の時間と
 142 して設定する。濃度測定では、適切な検量線が得られる測定ポ
 143 イントが含まれていればよい。
 144 **(4) $R_{\max}$ の確認**
 145 測定された $R_{\max}$ が、リガンドとアナライトの分子量、リガ
 146 ンドの固定化量、リガンドの結合価数より算出された理論的
 147 $R_{\max}$ を超えている場合は、結合価数が間違っている、アナラ
 148 イトが凝集している、非特異的結合が起こっている等の理由が
 149 考えられるため、測定又は解析条件を変更する。
 150 **(5) 測定の再現性の確認**
 151 測定条件が至適でない場合、又は、測定サイクルを重ねるご
 152 とにリガンドが失活する場合等は、測定の再現性に影響が生じ
 153 ることがある。また、センサーチップを保存していた場合、保
 154 存により再現性に影響が生じることもある。測定条件を設定す
 155 る際には、再現性に特に留意する。必要に応じ、測定可能な回
 156 数や保存可能な期間をあらかじめ設定しておく。
 157 **2.4. 測定法**
 158 **2.4.1. 結合特異性の解析**
 159 アナライトを添加し、結合レスポンスからリガンドとの結合
 160 を確認する。固定化したリガンドに別のアナライトが結合しな
 161 いことを示す等、適切な対照実験により、結合が特異的である
 162 ことを確認する。
 163 **2.4.2. 結合親和性解析**
 164 **(1) カインेटクス解析**
 165 アナライトを注入し、結合を測定した後、アナライトを含ま
 166 ない溶液を流して、アナライトの解離を測定する。その後、再
 167 生操作でアナライトを全て解離し、次のアナライト溶液を測定
 168 する。再生操作を行わずに、異なる濃度のアナライトを連続し
 169 て注入することで結合親和性を解析する方法もある。通例、
 170 K_D 値の1/10から10倍の間で5濃度以上のアナライト濃度につ
 171 いて測定する。
 172 **(2) 平衡値解析**
 173 結合及び解離が速く、カインेटクス解析を行うことが難し
 174 い場合や、モデルへのフィッティングが難しい場合は、平衡値
 175 解析を行う。アナライトの結合が平衡に達するまでの時間、ア
 176 ナライトを注入し続け、平衡に達した状態でのレスポンスを記
 177 録する。結合したアナライトを再生操作により解離して、次の
 178 アナライト溶液を測定する。 K_D 値は $1/2R_{\max}$ を与えるアナラ
 179 イト濃度として算出されるため、最高濃度のアナライトで結合
 180 が飽和に近づくよう、アナライト濃度を設定する。
 181 **2.4.3. 濃度測定**
 182 マストランスポートリミテーション条件下で測定すると検量
 183 線の直線性が増し、広い範囲で測定精度を上げることができる
 184 ため、リガンドをなるべく多く固定化したフローセルにアナラ
 185 イトを注入し、結合を測定する。その後、再生操作でアナライ
 186 トを解離し、次のアナライト溶液を測定する。既知濃度のアナ
 187 ライトの測定結果から、検量線を作成し、アナライト濃度を計

算する。アナライト濃度と拡散速度が比例することを利用し、
検量線を用いずにアナライト濃度を計算する方法もある。

3. データ解析

解析を行う際にセンサーグラムの unnecessary 部分(捕捉用分子
によるリガンドの捕捉や再生部分など)を除き、リガンドを結
合したフローセルのレスポンスから対照フローセルのレスポ
ンスを差し引く。また、センサーグラムのベースラインを0に合
わせる。必要に応じ、測定用緩衝液のみを注入して得られたセ
ンサーグラムを、アナライトを注入したセンサーグラムより差
し引く。

3.1. 結合親和性解析

(1) カイネティクス解析

カイネティクス解析はリガンドとアナライトの結合様式から
導かれる反応速度式を用い、測定されたセンサーグラムから近
似式のパラメータ(k_a , k_d , K_D , R_{max} など)を算出する方法であ
る。リガンドとアナライトが1:1で結合する場合、
結合領域の反応速度式は

$$dR/dt = k_a \times C \times (R_{max} - R) - k_d \times R$$

解離領域の反応速度式は、

$$dR/dt = -k_d \times R$$

で表される(C : アナライト濃度, R : レスポンス)。

マストランスポートリミテーションや溶液効果を考慮した項
を含む反応速度式が用いられる場合もある。

また、結合親和性の指標となる解離定数 K_D は、次式により
求められる。

$$K_D = k_d / k_a$$

結合親和性解析のための反応モデルとしては、①リガンドと
アナライトが1:1で結合するモデル、②抗原に対する抗体の
結合のように、リガンドとアナライトが2:1で結合するモデ
ル、③2種のアナライトがリガンドに競合的に結合するモデル
④親和性の異なる二つの結合部位をもつリガンドに1種類のア
ナライトが結合するモデル、⑤1:1で複合体を形成した後、
コンフォメーション変化を起こすモデル等が用いられる。他の
生化学実験等の結果も考慮し、理論上、適切と考えられるモデ
ルを用いる。

カイネティクス解析を行った場合は、測定されたセンサーグ
ラムと理論曲線の残差プロットによる評価や、 χ^2 (平均平方残
差で測定データと計算された理論曲線の差を示す値であり、
フィッティングが良いと小さい値となる)等の統計的パラメー
タを指標にフィッティングが適切であるか評価する。

理論曲線とのフィッティングが不良の場合には、試薬の純度
が低い、固定化の方法や固定化の密度が適切でない、アナライ
トの濃度が適切でない、非特異的な結合がある、リガンドの活
性が落ちている、選択した反応モデルが適切でない、等の理由
が考えられるため、測定条件や反応モデルの見直しを行う。ま
た、結合・解離が速い反応で、データ解析時に、試料中の緩衝
液成分によるレスポンスとして算出される RI (refractive
index) 値が高くなり過ぎる場合は、RI 値を0になるように固定
し、フィッティングを行う。フィッティングが不良の場合に、
予想される k_a , k_d に近い値を初期値に設定することでフィッ
ティングが良好になることがある。

(2) 平衡値解析

平衡値解析では、例えば、アナライト濃度をX軸に、各アナ
ライト濃度において平衡に達したレスポンスをY軸にプロット
し、

$$\text{平衡反応式: アナライト濃度に対する平衡値} \\ = \text{アナライト濃度} \times R_{max} / (\text{アナライト濃度} + K_D)$$

より回帰を行い、 $1/2R_{max}$ のレスポンスを示す濃度(K_D)を求
める。本反応式により算出される K_D はリガンドとアナライト
が1:1で結合すると仮定した場合の数値である。実測のレス
ポンスが R_{max} に収束している場合は良好な解析ができるが、
 R_{max} よりも低い範囲である場合は解析値の信頼性が低いため、
測定濃度範囲を高濃度側に広げて再度、測定を行う。

3.2. 濃度測定

既知濃度のアナライトを注入して得られたセンサーグラムよ
り、注入開始時のレスポンスの傾き、又は、注入後一定時間経
過した時のレスポンスを求め、アナライト濃度に対してプロッ
トする。4-パラメーターロジスティック回帰あるいは直線回
帰など、適切な近似式を用いて検量線を作成する。試料をアナ
ライトとして測定したレスポンスの傾き又はレスポンスを求め、
検量線より試料濃度を算出する。

4. 各種試験への適用

4.1. 確認試験への応用例

2.4.1.に記した特異的結合の確認を利用し、試料がリガンド
に結合することを確認する。システムの性能として、標準物質
及び陰性対照(リガンドとの結合性が識別されるべき任意の物
質)試料を測定し、結合の特異性を確認する。

4.2. 結合親和性試験への応用例

2.4.2.に記した結合親和性解析を利用して、標準物質及び試
料について K_D を求める。結合親和性の規格値は、 K_D 又は K_D の
相対値(試料の K_D /標準物質の K_D)について設定することがで
きる。

システム適合性としてシステムの性能と再現性を設定する。
例えば、システムの性能は、リガンドの固定化量が設定した範
囲内であること、リガンドとの結合親和性が既知である複数の
親和性確認用試料の K_D が親和性順どおりに測定できること、
 χ^2 があらかじめ設定した数値以下であること等により確認する。
システムの再現性は、繰り返し測定時の K_D の相対標準偏差が
あらかじめ設定した数値以下であること等により確認する。

4.3. 結合量を指標とした比活性測定への応用例

標的分子との結合量を指標に比活性を算出する場合、2.4.3.
に記した濃度測定法を利用して測定を行う。標準物質により作
成した検量線をもとに、試料溶液のレスポンスから標準物質に
対する相対力価を算出し、タンパク質濃度で除して比活性を求
める。

システム適合性としてシステムの性能と再現性を設定する。
例えば、システムの性能は、リガンド固定化量が設定した範囲
内であること、検量線の相関係数又は決定係数が設定した数値
以上であること等により確認する。システムの再現性は、繰り
返し測定時のレスポンスの相対標準偏差が、あらかじめ設定し
た数値以下であること等により確認する。

1 酵素免疫測定法〈G3-11-171〉

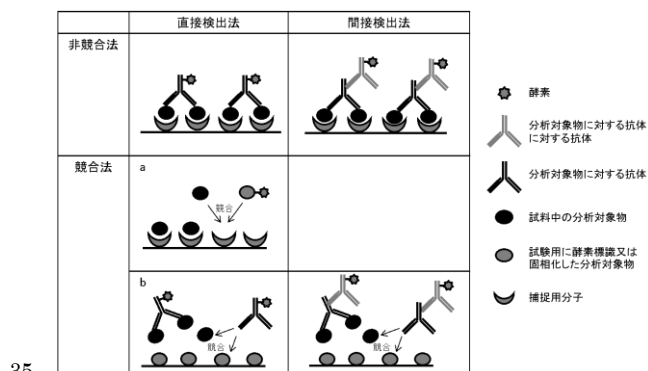
2 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay : 酵素免疫
3 測定法)は、抗原抗体反応により分析対象物を検出する免疫学
4 的測定法の一つで、検出用試薬として酵素標識体を利用する方
5 法である。通例、分析対象物に特異的に結合する捕捉用分子を
6 固相化した96ウェル等のプレートに、試料、酵素標識体等を
7 順次、添加、洗浄し、酵素標識体を固相に結合させる。さらに、
8 標識酵素の基質を加えて反応させた後、酵素反応により生じる
9 レスポンス(吸光度等)を測定し、試料中の分析対象物の濃度又
10 は結合活性を求める。分析対象物と特定の分子との結合の有無
11 を評価する定性的な試験として用いられることもある。

12 ELISAは生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起
13 源由来医薬品)の試験において、主に二つの観点から使用され
14 る。一つは、目的物質や製造工程由来不純物等の定量を目的と
15 するもので、通例、分析対象物に対して特異的に結合する抗体
16 を用いて、分析対象物の物質量を測定する。もう一つは、抗体
17 医薬品等の生物活性の評価を目的とするもので、目的物質と薬
18 理作用に関わる分子との結合性や、目的物質を含む試料を添加
19 した細胞から分泌される生理活性タンパク質の量を指標とした
20 細胞応答性の評価等に用いられる。

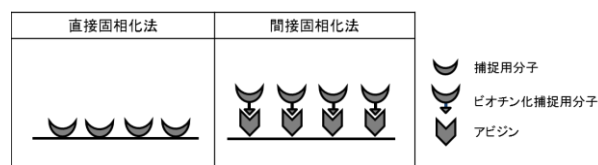
21 1. 各種測定様式

22 ELISAは、非競合法と競合法に大別され、検出方法により、
23 直接検出法及び間接検出法に分けられる(図1)。また、捕捉用
24 分子等の固相化法として、直接固相化法と間接固相化法がある
25 (図2)。

26 固相に結合した分析対象物は、分析対象物に対する抗体等によ
27 り検出される(図1)。直接検出法では、分析対象物に対する
28 抗体を酵素標識して用いる。間接検出法では、分析対象物に対
29 する抗体(一次抗体)に対する抗体(二次抗体)等、分析対象物に
30 間接的に結合する分子を用いる。直接検出法は、操作が簡便で
31 あるが、分析対象物ごとに酵素標識した抗体を準備する必要が
32 ある。間接検出法では、直接検出法と比較して操作が多くなる
33 が、二次抗体は、抗IgG抗体のように、分析対象物が異なってい
34 ても共通したものを用いることができる。



36 図1 ELISAの測定様式



37

38 図2 直接固相化法と間接固相化法の例

39 ELISAが物質量の定量に用いられる場合は、通例、捕捉用
40 分子として、分析対象物に対する抗体が用いられる。結合性を
41 指標とする生物活性の評価に用いられる場合は、捕捉用分子と
42 して、当該医薬品の薬理作用に関わる標的分子が用いられる。

43 1.1. 非競合法

44 非競合法は、捕捉用分子に対して、他の分子と競合すること
45 なく分析対象物を結合させる方法である(図1)。分析対象物の
46 分子量が比較的大きく、捕捉用分子との結合部位のほかに、検
47 出に用いる分子との結合部位を持つ場合に用いられる。

48 1.2. 競合法

49 競合法では、捕捉用分子を固相化し、捕捉用分子への結合に
50 関して、分析対象物とその酵素標識体を競合させる方法(図1a)、
51 又は、プレートに試薬として調製された分析対象物を固相化し、
52 酵素標識抗体への結合に関して、固相化した分析対象物と試料
53 中の分析対象物を競合させる方法がある(図1b)。競合法は、分
54 析対象物の分子量が比較的小さく、特異的に結合する分子を2
55 種類用意することが難しい場合等に用いられる。

56 2. 操作法

57 2.1. 操作手順

58 非競合法、競合法の一般的な操作手順を示す。定量的な試験
59 の場合には、いずれの方法においても、用量反応曲線又は検量
60 線を作成するために、段階的に希釈した標準物質溶液を用意す
61 る。

62 2.1.1. 非競合法

- 63 1) 捕捉用分子を含む溶液をプレートに添加して、インキュベ
64 ーションし、捕捉用分子を固相に結合させる。洗浄により
65 結合しなかった捕捉用分子を除去する。
- 66 2) ブロッキング試薬を添加し、捕捉用分子により占有されな
67 かった固相表面にブロッキング試薬を結合させる。洗浄によ
68 り結合しなかったブロッキング試薬を除去する。
- 69 3) プレートの各ウェルに標準物質又は試料を添加し、分析対
70 象物を固相に結合させる。洗浄により結合しなかった分析
71 対象物を除去する。
- 72 4) 直接検出法では、酵素標識抗体を添加し、分析対象物に結
73 合させる。間接検出法では、分析対象物に対する抗体を添
74 加、洗浄後、更に分析対象物に対する抗体に結合する酵素
75 標識抗体を添加し、固相に結合させる。洗浄により結合し
76 なかった酵素標識抗体を除去する。
- 77 5) 基質溶液を添加してインキュベーションし、必要に応じて
78 反応停止液を加えた後、酵素反応により変換された基質量
79 を、吸光度、発光強度又は蛍光強度により測定する。
- 80 6) 標準物質の用量反応曲線(検量線)を参照し、分析対象物の
81 結合活性又は濃度を求める。

82 2.1.2. 競合法

- 83 1) 競合法(a)：捕捉用分子を含む溶液をプレートに添加して、
84 インキュベーションし、捕捉用分子を固相に結合させる。
85 洗浄により、結合しなかった捕捉用分子を除去する。

競合法(b)：固相化用に調製した分析対象物をプレートに添加して、インキュベーションし、プレートに結合させる。洗浄により、結合しなかった分析対象物を除去する。

2) ブロッキング試薬を添加し、1)の操作により占有されなかった固相表面にブロッキング試薬を結合させる。洗浄により、結合しなかったブロッキング試薬を除去する。

3) 競合法(a)：プレートの各ウェルに標準物質と酵素標識した分析対象物、又は、試料と酵素標識した分析対象物を添加し、分析対象物及び酵素標識した分析対象物を固相に結合させる。洗浄し、結合しなかった分子を除去する。

競合法(b)：直接検出法では、標準物質と酵素標識抗体、又は、試料と酵素標識抗体を添加し、酵素標識抗体を固相に結合させる。洗浄し、結合しなかった分子を除去する。間接検出法では、標準物質と分析対象物に対する抗体、又は、試料と分析対象物に対する抗体を添加、洗浄後、分析対象物に対する抗体に結合する酵素標識抗体を添加する。洗浄し、結合しなかった酵素標識抗体を除去する。

4) 酵素の基質を添加してインキュベーションし、必要に応じて反応停止液を加えた後、酵素反応により変換された基質量を、吸光度、発光強度又は蛍光強度により測定する。

5) 標準物質の用量反応曲線(検量線)より分析対象物の結合活性又は濃度を求める。

2.2. データ解析

2.2.1. 定量

ELISAを物質量の定量に用いる場合は、適切な希釈倍数で調製した試料について測定を行い、標準物質の検量線より試料中の分析対象物の濃度を算出する。検量線は、通例、試料濃度の対数をx軸に、得られたレスポンスをy軸にプロットし、4パラメーターロジスティック回帰式等を用いて作成する。

4パラメーターロジスティック回帰式

$$y = D + \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B}$$

A：下方漸近線

B：EC50(IC50)における傾き

C：EC50(IC50)

D：上方漸近線

x：試料濃度

y：レスポンス

検量線が左右対称なシグモイド型曲線とならない場合には、5パラメーターロジスティック回帰式などを用いることで解析結果が改善される場合がある。非競合法では、分析対象物の濃度範囲を低濃度側に限定することにより、直線回帰により検量線を作成できることもある。

2.2.2. 生物活性

生物活性の測定では次の1)～3)の方法等が用いられる。

1) 適切な希釈倍数で調製した試料について、標準物質の用量反応曲線(検量線)をもとに、標準物質に対する相対的な濃度を算出し、標準物質に対する相対活性とする方法

2) 標準物質と試料それぞれについて用量反応曲線を取得し、最大レスポンスの50%に相当するレスポンスを与える用量(非競合法ではEC50、競合法ではIC50)の比から標準物質

に対する相対活性を算出する方法

3) 用量反応曲線のうち直線で近似できる領域を用いて、同じレスポンスを生じる用量比をもとに標準物質に対する相対活性を算出する方法

1)については2.2.1.と同様の方法で、標準物質に対する相対濃度を算出する。2)については、2.2.1.と同様の方法で、標準物質及び試料について、回帰式を導く。また、各濃度のレスポンスの回帰式算出への寄与を均等にするため、重み付けを行うことで、良好な回帰が得られる場合がある。重み付けの方法としては、 $1/y^2$ 、 $1/y$ 、 $1/x$ などを用いる方法があり、試験法確立の際に、真度及び精度の評価をもとに、より良好な結果が得られる回帰方法を選択しておく。3)については、EC50やIC50付近の濃度範囲で直線に近似できる領域を用いて解析する。

2.3. 試薬・試液

2.3.1. 捕捉試薬

分析対象物に対して特異的結合能を持つ分子(抗原、抗体等)が用いられる。プレートへの結合は物理的な吸着による場合が多いが、アミノ基結合性又はスルフヒドリル基結合性の官能基を持つプレートを用い、共有結合により捕捉用分子を結合させることもできる。プレートへの結合により立体構造変化が起こり、分析対象物との結合性が変化する可能性があることに留意する。

捕捉試薬は試験の性能に影響する重要な試薬であるため、必要な規格を設定して管理する。また、ロット更新方法を定めておく。

2.3.2. ブロッキング試薬

アルブミン、ゼラチン、カゼイン等のタンパク質溶液に、必要に応じてポリソルベート20等の界面活性剤を添加した緩衝液が用いられる。

2.3.3. 検出用試薬

検出用試薬に用いる酵素には、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ等がある。酵素の標識には、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル基を導入した酵素を被標識タンパク質のアミノ基に共有結合させる方法や、マレイミド基を導入した酵素を被標識タンパク質のスルフヒドリル基に共有結合させる方法等がある。抗体の酵素標識には、マレイミド基を導入した酵素を抗体のスルフヒドリル基に共有結合させる方法がよく用いられる。

検出用試薬は試験の性能に影響する重要な試薬であるため、必要な規格を設定して管理する。また、ロット更新方法を定めておく。間接検出法では、分析対象物に対する非標識抗体なども検出用試薬として使用するため、これらの試薬についても必要な規格を設定して管理する。

2.3.4. 基質

酵素に応じた基質を用いる。発色基質、化学発光基質、蛍光基質がある。高感度な測定系が必要な場合は、化学発光基質や蛍光基質が適している。

表1 基質例

酵素	発色基質	化学発光基質	蛍光基質
ペルオキシダーゼ	TMB	Luminol	
	OPD		
	ABTS		
アルカリホスファターゼ	pNPP		
β-ガラクトシダーゼ			MG
			NG

TMB：3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

184 OPD : *o*-Phenylenediamine
 185 ABTS : 2,2'-Azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate]
 186 pNPP : *p*-Nitrophenyl phosphate
 187 MG : 4-Methylumbelliferyl galactoside
 188 NG : Nitrophenyl galactoside

189 2.4. 留意事項

190 プレートの種類, 捕捉用分子の固相化量, 反応時間及び反応
 191 温度などが結果に影響を及ぼし得るため, 使用するものや方法
 192 を定めておく。また, プレート上の試料配置(試験を行ったウェ
 193 ルの位置)が試験結果に影響を与えないよう, 試験条件及び試
 194 料配置を設定する。

195 3. 規格及び試験方法への応用

196 3.1. 確認試験

197 ELISAは, 種々の生物薬品の各条において, 目的物質に特
 198 異的な抗体を用いて, 抗体との結合性を指標とする確認試験と
 199 して用いられるほか, 抗体医薬品において, 抗原との結合性を
 200 指標とする確認試験として用いられる。通例, 定性的な試験と
 201 して行うが, 抗体医薬品と抗原の結合性を指標とする確認試験
 202 の場合は, 適否の判定基準として, 標準物質を対照とした結合
 203 活性の許容範囲を設定することもできる。

204 3.2. 純度試験

205 宿主細胞由来タンパク質, 培地由来不純物, アフィニティー
 206 カラム担体から溶出したリガンドなど, 主に製造工程由来不純
 207 物を対象とする純度試験に用いられる。不純物の定量値を求め
 208 る試験の場合は, 検量線より試料中の不純物量を算出する。限
 209 度試験の場合は, 規格値に相当する量の不純物を含む対照試料
 210 と比較して, 試料のレスポンスが高くないことを確認する。

211 一般に, 試料中には, 不純物に比較して目的物質が多量に含
 212 まれるため, 目的物質による妨害が生じる場合がある。特に,
 213 アフィニティークラム担体のリガンドを分析対象物とする場合
 214 は, 目的物質がリガンドに結合するため, 目的物質による妨害
 215 に注意する。試料の前処理を行う場合は, 回収率を考慮する。

216 3.3. 生物活性試験

217 抗体医薬品等の目的物質とその標的分子との結合活性を測定
 218 する試験や, 目的物質を含む試料を添加した細胞から分泌され
 219 る生理活性タンパク質の量を指標とした細胞応答性試験等に用
 220 いられる。

221 2.2.2.の1)～3)で示した方法などにより, 相対活性を求める。

222 3.4. 定量法

223 目的物質の定量法として用いられる。標準物質を用いて検量
 224 線を作成し, 目的物質の濃度を算出する。

225 4. 試験成立条件

226 下記に一般的に使用される試験成立条件を示す。必要に応じ
 227 て, これらを組み合わせて用いる。

228 4.1. 確認試験

229 標準物質及び陰性対照物質の測定結果が, 医薬品各条に規定
 230 する基準値に適合することを確認する。

231 4.2. 純度試験

232 定量試験では, 検量線の信頼性を確認する。信頼性の確認に
 233 は, 回帰式から求められた検量線用標準試料の各濃度の真度や
 234 精度, 決定係数(R^2 値)などが利用できる。その他には, 試料の
 235 定量値の精度や, 標準物質から調製した既知濃度の対照試料
 236 (Quality Control試料: QC試料)の真度などを試験成立条件と
 237 することもできる。限度試験では, 規格値の濃度の分析対象物
 238 を含む試料のレスポンスが医薬品各条に定める基準値に適合す

239 ることを確認する。

240 4.3. 生物活性試験

241 2.2.2.の1)の方法を用いて生物活性を測定する場合には, 標
 242 準物質の用量反応曲線(検量線)の信頼性を確認する。用量反応
 243 曲線の信頼性の確認には, 回帰式から求められた検量線用標準
 244 物質の各濃度の真度や精度, R^2 値, 標準物質の用量反応曲線
 245 から得られる回帰式の各パラメーターの数値等が利用できる。
 246 その他には, 試料のレスポンスやレスポンスから算出された相
 247 対活性の精度や, QC試料の真度を試験成立条件とすることも
 248 できる。

249 2.2.2.の2)の方法で生物活性を測定する場合には, 標準物質
 250 及び試料の測定結果から得られる二つの回帰曲線の平行性を確
 251 認する。平行性の確認には, 標準物質と試料の用量反応曲線の,
 252 上方漸近線から下方漸近線を引いた値(2.2.1.の4-パラメーター
 253 回帰式の $D-A$)の比, 変曲点での傾き(2.2.1.の4-パラメーター
 254 回帰式の B)の比等が, あらかじめ設定した範囲内である
 255 ことを確認する同等性判定試験等がある。また, 標準物質及び
 256 試料の用量反応曲線の R^2 値やQC試料の真度なども試験成立条
 257 件として利用できる。

258 2.2.2.の3)の方法で生物活性を測定する場合には, 標準物質
 259 と試料それぞれの用量反応の直線性, 及び, 標準物質と試料の
 260 用量反応直線の平行性を確認する。

261 2.2.2.の2)及び3)では, 平行性を確認するための方法として,
 262 標準物質と試料の形状を同一として回帰を行った場合とそれぞ
 263 れを個別に回帰した場合の残差分散を比較し, 分散分析により
 264 二つの回帰曲線の平行性を判定する方法もあるが, 精度の低い
 265 データでは判定が甘くなることに留意する必要がある。

266 4.4. 定量法

267 標準物質の用量反応曲線から作成した検量線の信頼性を確認
 268 する。検量線の信頼性の確認には, 回帰式から求められた検量
 269 線用標準物質の各濃度の真度や精度, 回帰式の各パラメーター
 270 の数値, R^2 値等が利用できる。その他には, 試料の定量値の
 271 精度や, QC試料の真度を試験成立条件とすることもできる。

1 フローサイトメトリー 〈G3-16-182〉

フローサイトメトリーは、液中に分散させた細胞や粒子を流路系によって整列させ、個々の光学的特性を分析する測定手法である。散乱光を用いた細胞の大きさや内部構造の複雑性に関する形態パラメーターのほか、蛍光標識した抗体や蛍光色素などを用いて細胞を染色することにより、細胞表面や細胞内のタンパク質発現、核酸量等に関する情報を、単一細胞レベルで定量的に取得することが可能である。また、異なる蛍光プローブを組み合わせることで同時に複数のパラメーターに関する情報を取得することができる。生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の特性解析や規格及び試験方法においては、目的物質の標的細胞への結合活性の評価や、細胞応答の評価、生物活性試験に用いる培養細胞の適格性評価等に用いられる。

1. 装置と測定の原理

フローサイトメトリーに使用される装置(フローサイトメーター)は一般に、流路系、光源、光学検出系、電子処理系(電気パルス処理系)、データ処理系からなる(図1)。

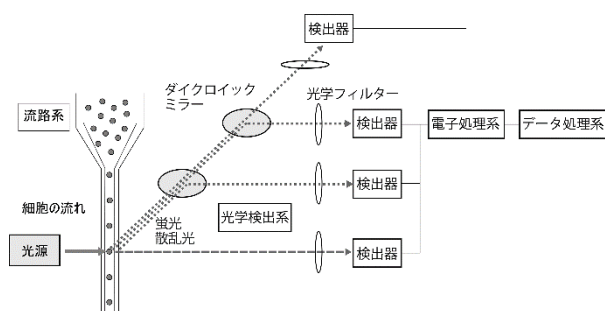


図1 フローサイトメーターの構成

多くのフローサイトメーターでは、細胞懸濁液は流路系によってフローセルまで運ばれ、シース液による流体力学的絞り込み(ハイドロダイナミックフォーカシング)によって細胞が一列に並んだ細い流束が形成され、細胞が1個ずつ観察ポイント(レーザー照射点)を通過する。光源としては、アルゴンレーザー(488 nm)、ヘリウム-ネオンレーザー(633 nm)のほか、種々の波長のダイオードレーザー等が複数組み合わせられて搭載されることが一般的であり、検出しようとする蛍光に適した光源が選択される。細胞がレーザー照射点を通過すると細胞の物理的構造によって様々な方向への散乱光が生じるほか、蛍光色素が励起されることで固有の蛍光が放出される。

レーザーの光軸の前方(通常は20°以内の角度)への散乱は前方散乱光(FSC: Forward Scatter)と呼ばれ、細胞が大きいほど強くなるため、FSCを測定することにより細胞の相対的な大きさを推定することができる。レーザーの光軸に対して90°方向への散乱を側方散乱光(SSC: Side Scatter)と呼ぶ。SSCの強度は細胞内の顆粒の量や種類、核や細胞膜の形態等の影響を受けるため、細胞構造の複雑性の指標となる(細胞の内部構造の複雑性が高いほどSSC強度は高くなる)。

蛍光信号は光源の種類に依存して、細胞内に含まれる蛍光物質や特定の解析を目的として使用した蛍光プローブ(蛍光色素、蛍光標識タンパク質、蛍光タンパク質等)から生じる。細胞から放出された蛍光は、光学系によって分離されて個別の

チャンネルで検出される。光学フィルターには、特定の波長以上を通過させるロングパスフィルター、特定の波長以下を通過させるショートパスフィルター、特定の狭い波長範囲のみを通過させるバンドパスフィルターがあり、入射光に対して一定の角度で設置したダイクロイックミラーと組み合わせることで、特定の波長をもつ蛍光が目的のチャンネルに振り分けられる。検出の特異性は光学系の設定に依存するため、検出しようとする蛍光に適した組み合わせとすることが必要である。

光学フィルターによって振り分けられた散乱光及び蛍光は光電子増倍管(PMT: Photomultiplier Tube)やフォトダイオードによって検出され、電圧パルスに変換される。PMTで検出される電圧パルスは検出器に電圧を加えることで増幅することができる。増幅の方法には線形(Linear)と対数(Log)の2種類があり、一般に細胞の散乱光(FSC, SSC)には線形増幅が、蛍光の測定には対数増幅が使用されることが多い。試料に含まれる微粒子(細胞片等の夾雑物)に由来する信号などの実験データとは無関係なデータの取得を防ぐため、通常はFSCに閾値を設定する。閾値を超えない信号は全ての検出器で無視される。電圧パルスはアナログ値であり、現在使用されるフローサイトメーターの多くでは、アナログ-デジタル変換によりコンピュータ上での処理が可能なデジタル値に変換される。

細胞の染色に2種類以上の蛍光色素を同時に使用する場合、各色の蛍光スペクトルの一部が重なることがあり、この場合、各蛍光検出器は意図した蛍光色素に由来する特異的な蛍光に加えて他の色素が発した蛍光を検出する。このような蛍光の漏れ込みの問題を解決するため、蛍光補正(コンペンセーション)を実施する。試験に使用するそれぞれの蛍光色素について単独で染色した試料などを用いることで、各蛍光色素の他の検出器への漏れ込みを計算し、干渉する信号を選択的に差し引いたデータを取得することができる。上記のプロセスを経て個々の細胞について得られた増幅・補正済みの各パラメーター(FSC, SSC, 蛍光)に関するデータが解析に使用される。

2. データ解析

2.1. データの表示

フローサイトメトリーで得られたデータは様々な方法で表示・解析することができる(図2)。一般的な表示方法の一つがヒストグラムであり、X軸に一つの測定パラメーターの信号強度を、Y軸に細胞数を表示する。ヒストグラムは特定のマーカー分子の発現量や発現割合の評価に有用である。また、X軸とY軸にそれぞれ異なるパラメーターの信号強度をプロットしたドットプロットは2種類の細胞表面マーカーを組み合わせた細胞集団の特定や、その割合の評価等に用いられる。

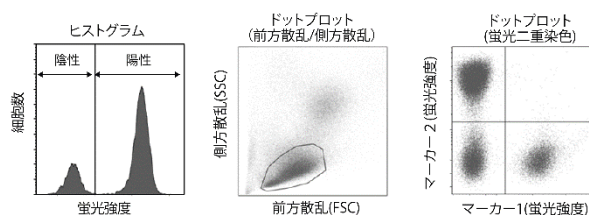


図2 データ表示の例

2.2. ゲーティング

取得したデータの中には解析に不要な死細胞や細胞片などの夾雑物、解析対象ではない細胞集団由来の信号が含まれる

91 ことがあり、目的とする細胞集団に限定した解析を行うために
92 ゲーティングを行う。通常、最初にFSCとSSCによる細胞の
93 形態学的特性に基づいたゲーティングを実施する。例えば、生
94 細胞よりもFSCが小さくSSCが大きい死細胞や細胞片は、
95 FSC/SSCプロットにおけるゲーティングにより解析対象から
96 除外することができる。また、血液サンプルの解析では、細胞
97 の大きさと複雑性の違いに基づき、FSC/SSCプロットを用い
98 てリンパ球と顆粒球を区別してゲーティングすることができる。
99 細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体を用いた測定では、特
100 定のマーカー分子(例えば、T細胞におけるCD3、B細胞におけ
101 るCD19など)を発現する細胞集団をゲーティングして解析する
102 ことができる。解析ソフトウェアを用いて、段階的な複数のゲ
103 ーティングを設定することが可能である。ゲーティングにより
104 絞り込まれた解析対象とする細胞集団について、試験に用いた
105 蛍光標識物質が結合する細胞の割合(例えば、蛍光標識抗体が
106 認識するマーカー分子が発現する細胞の割合)、結合量の指標
107 となる平均蛍光強度などを算出する。

108 3. 測定時の留意事項

109 3.1. 装置の校正

110 信頼性と再現性の高いデータ取得のため、定期的に装置の校
111 正を実施する。多くのフローサイトメーターでは、装置の製造
112 業者から機器校正用のソフトウェアと試薬(通常は蛍光ビーズ)
113 が提供されており、これを用いて装置の校正を実施し、機器の
114 性能のモニタリング状況(標準ビーズから得られる蛍光強度の
115 ばらつき、検出感度の設定など)を記録する。

116 3.2. コントロールサンプルの使用

117 バックグラウンドシグナルや非特異的なシグナルの特定と適
118 切な測定条件の設定のためにコントロールサンプルを使用する。
119 また、コントロールサンプルは日常的な試験の適格性評価(シ
120 ステム適合性の判定など)にも用いられる。

121 未染色コントロール：解析対象とする細胞集団のゲーティ
122 グ、細胞の自家蛍光によるバックグラウンドを踏まえた検出器
123 の調整と陰性領域の設定のため、未染色のサンプルを使用する。

124 アイソタイプコントロール：蛍光標識抗体を用いる場合、観
125 察された染色が目的抗原への特異的な結合によるものであるこ
126 とを確認するため、使用する抗体と同一のイムノグロブリンサ
127 ブクラスで、解析対象とする細胞には存在しない抗原に対する
128 抗体で染色したコントロールを用いる。アイソタイプコント
129 ロールに用いる抗体は試験に用いる抗体と同じ蛍光色素が同程度
130 の割合で標識されていることが求められる。アイソタイプコン
131 トロールは抗体や蛍光色素の細胞への非特異的結合や、単球や
132 マクロファージ等の免疫細胞上に存在するFc受容体への抗体
133 結合のようなバックグラウンドの評価に用いられる。

134 単一染色コントロール：複数種類の蛍光色素を用いた試験を
135 実施する際には、異なる蛍光色素間の漏れ込みを評価して蛍光
136 補正を行うため、試験に用いる各蛍光色素について、単独で染
137 色したコントロールを使用する。

138 FMO (Fluorescence Minus One)コントロール：FMOコン
139 トロールは、染色に用いる全ての蛍光色素から一つの蛍光色素だ
140 けを除いたコントロールである。欠けている蛍光色素のチャン
141 ネルへの他の蛍光色素の漏れ込みから、蛍光補正が正しく行わ
142 れていることを確認する。陰性／陽性画分を判定するゲーティ
143 ングの設定にも使用できる。

144 生物学的コントロール(アッセイコントロール)：上記の染色

145 に関するコントロールとは別に、実施する試験に対応する陽性
146 コントロール及び陰性コントロールとなる試料を調製する。例
147 えば、細胞応答に伴うマーカー分子の発現量の変化を測定する
148 試験では、未処理／未刺激のサンプルや確実に細胞応答が生じ
149 ることが既知の処理を施したサンプルをコントロールとして使
150 用する。これらのアッセイコントロールの測定データはシステ
151 ム適合性の判定に用いることができる。

152 3.3. 測定条件の設定

153 試料測定の際には、検出しようとする蛍光に適した光学系を
154 選択し、コントロールサンプルを用いて検出器の感度、ゲー
155 ティング、蛍光補正を設定する。通常、最初にFSC/SSCプロ
156 ットにおいて解析対象とする細胞集団が適切に表示されるよう
157 FSCとSSCの検出感度を調整し、解析対象の細胞集団をゲー
158 ティングする。次に検出しようとする蛍光パラメーターについ
159 てヒストグラムやドットプロットを展開し、未染色コントロ
160 ルや陽性・陰性コントロールにおいて検出される蛍光が測定範
161 囲内に含まれるように検出器の感度を調整する。検出される蛍
162 光強度の値はレーザーの出力等によって変動する相対的な値で
163 あり、コントロールサンプルの蛍光強度があらかじめ定めた一
164 定の範囲内になるように検出器の感度を設定することは、再現
165 性を担保する上で有用である。複数の蛍光色素を用いた多重染
166 色サンプルを分析する場合は、単一染色コントロールやFMO
167 コントロールを用いてそれぞれの蛍光の他の検出器への漏れ込
168 みを評価し、解析結果に影響しないように蛍光補正を設定する。
169 陽性画分の割合(マーカー分子の発現割合等)を算出する場合に
170 は、コントロールサンプルの蛍光強度を指標として、陽性・陰
171 性画分を区別できるようにゲーティングを設定する。アッセイ
172 コントロール等を用いたシステム適合性を設定し、日常的な試
173 験における測定条件が適切であることを確認する。

174 3.4. 細胞と試薬の管理

175 使用する細胞や染色に用いる蛍光標識抗体などは試験の性能
176 や結果に影響を及ぼす重要試薬であるため、適格性を評価す
177 るための項目と判定基準を定め、適切な方法で管理する。細胞は
178 培養経過により形質の変化が生じる可能性があるため、セルバ
179 ンクシステムを構築し、培養方法や継代回数の上限、試験時の
180 細胞の状態に関する規定(細胞生存率など)を定めて使用する。
181 特定の受容体等を標的とする試験に用いる場合には、標的受容
182 体の発現量を規格として定めて管理する。試験実施時には、
183 アッセイコントロールを用いて、使用した細胞が期待される細
184 胞応答を示すことを試験ごとに確認することも重要である。染
185 色に用いる蛍光標識抗体や細胞の刺激に用いるサイトカイン等
186 は用途への適合性を確認した上で使用する。タンパク質試薬は
187 市販品であってもロットごとに比活性が異なることがあるため、
188 ロット更新時には新旧ロットの比較を行い、必要に応じて添加
189 濃度を調整して試験に使用する。

190 4. 生物薬品の試験における使用例

191 4.1. 目的物質の標的細胞への結合活性の評価

192 目的物質が細胞表面に存在する標的タンパク質と結合して薬
193 理作用を発揮する場合(細胞膜タンパク質を標的とする抗体、
194 ホルモン・サイトカイン類など)、フローサイトメトリーによ
195 り標的分子を発現する細胞に対する目的物質の結合活性を評価
196 することができる。細胞を用いた結合試験は、より生理的な条
197 件下で細胞膜上に存在する標的タンパク質に対する結合活性を
198 評価できるという利点を有しており、組換えタンパク質の精製

199 が困難な複数回膜貫通タンパク質に対する結合試験にも有用で
200 ある。一方で、試験に用いた細胞に存在する本来の標的以外の
201 分子への非特異的結合が生じる可能性もあり、検出される結合
202 の特異性について留意する必要がある。

203 測定方法としては、他の原理の結合試験と同様に非競合法あ
204 るいは競合法が使用される。非競合法では、目的物質に対する
205 蛍光標識抗体(例えば、抗体医薬品に対する蛍光標識抗ヒト
206 IgG抗体)を用いて、標的細胞への目的物質の結合を検出する。
207 競合法では、蛍光標識した標準物質等と試料を混合して標的細
208 胞に添加し、蛍光標識体の標的細胞への結合に対する試料の阻
209 害活性を測定する。適切な希釈倍数で調製した試料の希釈系列
210 について試験を行って得られたシグナル(平均蛍光強度)から用
211 量反応曲線を作成し、最大反応の50%に相当するシグナルを
212 与える用量(非競合法では EC_{50} 、競合法では IC_{50})を算出する。
213 標準物質に対する相対活性を求める場合には、標準物質と試料
214 についてそれぞれ用量反応曲線を作成し、 EC_{50} あるいは IC_{50} の
215 比を算出する。

216 4.2. 細胞応答の評価

217 細胞刺激に伴う細胞応答として細胞表面マーカー分子の発現
218 量の増加や減少が認められる場合、フローサイトメトリーに
219 よって定量的に発現変動を解析することができる。受容体を介
220 した細胞応答を誘導するホルモン・サイトカイン類のほか、細
221 胞応答を促す液性因子やその受容体を標的とする中和抗体の生
222 物活性評価にも使用される。試料を添加して一定時間培養する
223 等の処理を施した細胞をマーカー分子に対する蛍光標識抗体を
224 用いて染色し、マーカー分子の発現する細胞の割合や、発現量
225 を測定する。

226 4.3. 生物活性試験に用いる培養細胞の適格性評価

227 フローサイトメトリーは、生物活性試験に用いる細胞におけ
228 る受容体などの標的タンパク質の発現確認のための有用な手法
229 の一つである。培養細胞はクローン化された株化細胞であって
230 も不均一な遺伝子発現パターンを示すことがあり、培養期間の
231 経過により形質が変化する可能性がある。また、標的タンパク
232 質を発現させるために遺伝子導入により作製した細胞株では、
233 導入遺伝子の欠落やサイレンシングによる標的タンパク質の発
234 現の消失や低下が生じる可能性について考慮する必要がある。
235 標的タンパク質に対する蛍光標識抗体を用いた染色により、標
236 的タンパク質の発現割合や発現量を測定し、あらかじめ定めた
237 基準に適合することを確認する。

1 タンパク質定量法〈G3-12-172〉

以下の方法は薬局方医薬品に含まれるタンパク質の定量法の例を示したものである。HPLCなどの他の方法であっても、全てのタンパク質が回収されることを示すことができれば利用して差し支えない。以下に記載したタンパク質定量法の多くは市販のキットを用いて測定することが可能である。

注：水を用いる際は精製水を用いること。

8 方法1 (紫外吸収法)

溶液中のタンパク質は、芳香族アミノ酸、主としてチロシン及びトリプトファンにより、波長280 nmの紫外線を吸収する。この性質を利用したのが本法である。波長280 nmにおける吸光度を用いたタンパク質定量は主にタンパク質のチロシンとトリプトファン含量に依存する。タンパク質の溶解に用いる緩衝液が水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、正確な結果が得られない可能性がある。更に、低濃度ではタンパク質はキュベットに吸着し、溶液中のタンパク質含量の低下を引き起こす可能性がある。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ある。

注：試料溶液、標準溶液、緩衝液は試験中、同じ温度に置くこと。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料タンパク質の標準品又は標準物質を、試料溶液と同じ緩衝液に、試料溶液と同じ濃度で溶かした液を調製する。

試料溶液 試料タンパク質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、1 mL当たり0.2～2 mgのタンパク質を含む液を調製する。

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、波長280 nmにおける吸光度を測定する。正確な結果を得るには、試験するタンパク質の濃度が直線性の得られる範囲にある必要がある。

光散乱 タンパク質の紫外吸収測定の精度は試料による光散乱の影響で低下する可能性がある。溶液中のタンパク質が測定光の波長(250～300 nm)に匹敵するサイズである場合、光散乱により試料の吸光度は明らかな増加を示す。光散乱による波長280 nmの吸光度を算出するには、試料溶液につき、波長320 nm、325 nm、330 nm、335 nm、340 nm、345 nm及び350 nmにおける吸光度を測定し、直線回帰法を用いて、測定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、各点に最も近似した標準曲線を求め、外挿により波長280 nmにおける光散乱による吸光度を求める。波長280 nmにおける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のタンパク質の吸光度が得られる。特に溶液が明らかに濁っている場合は、0.2 μmのメンブランフィルターを通すか、若しくは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ある。

計算法 次式により試料溶液中のタンパク質濃度 C_U を求める。

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

C_S ：標準溶液のタンパク質濃度

A_U ：試料溶液の補正した吸光度

A_S ：標準溶液の補正した吸光度

55 方法2 (Lowry法)

本法は一般にローリー(Lowry)法と呼ばれる方法で、Folin-Ciocalteuのフェノール試液(フォリン試液)に含まれるリンモリブデン酸・タングステン酸混合物の発色基がタンパク質により還元されて、波長750 nmに吸収極大が得られることを利用した方法である。フォリン試液は主としてタンパク質のチロシン残基と反応するため、タンパク質の種類が異なると呈色度に差異を生じる場合がある。本法は妨害物質の影響を受けやすいため、試料からタンパク質を沈殿させる操作を入れることもできる。試料中のタンパク質から妨害物質を分離する必要がある場合には、試料溶液の調製に先立ち、後述する「妨害物質」の項に示す方法により操作する。妨害物質の影響は、試料タンパク質を正確に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下の方法に代えて用いることができる。

標準溶液 医薬品各条に規定するもののほか、試料タンパク質の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する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL当たり5～100 μgのタンパク質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以上の濃度の標準溶液を調製する。

試料溶液 試料タンパク質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。適切な緩衝液はpH 10～10.5の範囲である。

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。

79 試薬・試液

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

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

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

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

操作法 標準溶液、試料溶液及び対照液、各1 mLにアルカリ性銅試液1 mLを加えて混和し、室温で10分間放置する。各液に希フォリン試液0.5 mLを加えて直ちに振り混ぜた後、室温で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、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験を行い、波長750 nmにおける吸光度を測定する。

計算法 吸光度とタンパク質濃度に直線関係が成立する濃度範囲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タンパク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、試料溶液中のタンパク質の濃度を求める。

103 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
104 酸・トリクロロ酢酸を試料に加えてタンパク質を沈殿させるこ
105 とにより妨害物質を除去する。この方法はタンパク質を希釈溶
106 液から濃縮するためにも利用することができる。

107 **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
108 ウム150 mgを水に溶かし、100 mLとする。

109 **トリクロロ酢酸試液** トリクロロ酢酸72 gを水に溶かし、
110 100 mLとする。

111 **操作法** 試料タンパク質溶液1 mLにデオキシコール酸ナトリ
112 ウム試液0.1 mLを加え、攪拌機を用いて混和する。室温で10
113 分間放置した後、トリクロロ酢酸試液0.1 mLを加え、同様に
114 混和する。次に3000×gで30分間遠心分離し、上澄液を捨て、
115 更に残った水分をピペットで取り除く。タンパク質の沈殿をア
116 ルカリ性銅試液1 mLに溶解し、試料溶液の項に準じて操作す
117 る。[注：呈色は室温で放置する間、20～30分で最高となり、
118 その後徐々に低下する。妨害物質のほとんどは呈色度を低下さ
119 せるが、界面活性剤の中には呈色を僅かに強めるものがある。
120 塩濃度が高いと沈殿を生じる場合がある。タンパク質の種類が
121 異なると呈色強度が変わることもあるので、標準タンパク質と
122 試料タンパク質は同じでなければならない。]

123 方法3 (Bradford法)

124 本法は一般にブラッドフォード(Bradford)法とよばれる方法
125 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
126 長が、タンパク質と結合することにより470 nmから595 nmに
127 シ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
128 トブルーG-250は主にタンパク質のアルギニン残基及びリシ
129 ン残基に結合するため、タンパク質の種類が異なると反応性が
130 変わることもある。

131 **標準溶液** 医薬品各条に規定するもののほか、試料タンパク質
132 の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
133 解する。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL当たり
134 100 µg～1 mgのタンパク質を含む、標準曲線上等間隔の5種
135 類以上の濃度の標準溶液を調製する。

136 **試料溶液** 試料タンパク質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、
137 標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

138 **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。

139 **クーマシー試液** クーマシーブリリアントブルーG-250^{※2}
140 100 mgをエタノール(95) 50 mLに溶かす。[注：色素の含有量
141 は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
142 ことがある。]この液にリン酸100 mLを加え、水を加えて1000
143 mLとする。この液をろ紙(ワットマンNo.1又は相当品)を用い
144 てろ過し、室温で遮光容器に保存する。[注：試液の保存中に
145 徐々に沈殿が生じる。用時ろ過する。]

146 **操作法** 標準溶液、試料溶液及び対照液、各100 µLにクーマ
147 シー試液5 mLを加え、転倒混和する。再現性に影響を与える
148 の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
149 液につき、対照液を対照とし、紫外可視吸光度測定法により試
150 験を行い、波長595 nmにおける吸光度を測定する。[注：石英
151 製のセルは色素を吸着するため用いてはならない。タンパク質
152 の種類が異なると呈色強度が異なることもあるので、標準タン
153 パク質と試料タンパク質は同じでなければならない。]妨害物質
154 は比較的少ないが、界面活性剤やアンフォライト類を試料に共
155 存させることは避けるべきである。塩基性の高い試料は酸性の
156 試液を妨害することがある。

157 **計算法** 吸光度とタンパク質濃度に直線関係が成立する濃度範
158 囲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
159 タンパク質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準
160 曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料
161 溶液中のタンパク質濃度を求める。

162 方法4 (ビシンコニン酸法)

163 本法は一般にビシンコニン酸(BCA)法とよばれる方法で、タ
164 ンパク質が銅II(Cu²⁺)イオンを銅I(Cu⁺)イオンに還元するこ
165 とを利用した方法である。BCA試液は銅I(Cu⁺)イオンの検出
166 に用いられる。本法に対する妨害物質はほとんど存在しない。
167 妨害物質が共存するときは、試料タンパク質を正確に測定でき
168 る濃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。
169

170 **標準溶液** 医薬品各条に規定するもののほか、試料タンパク質
171 の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
172 かす。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL当たり10
173 ～1200 µgのタンパク質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以
174 上の濃度の標準溶液を調製する。

175 **試料溶液** 試料タンパク質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、
176 標準溶液の濃度範囲内の液を調製する。

177 **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。

178 試薬・試液

179 **BCA試液** ビシンコニン酸10 g、炭酸ナトリウム一水和物20
180 g、酒石酸ナトリウム二水和物1.6 g、水酸化ナトリウム4 g及
181 び炭酸水素ナトリウム9.5 gを水に溶かし、必要なら水酸化ナ
182 トリウム又は炭酸水素ナトリウムを加えてpH 11.25に調整し
183 た後、水を加えて1000 mLとする。

184 **硫酸銅試液** 硫酸銅(II)五水和物2 gを水に溶かし、50 mLと
185 する。

186 **銅・BCA試液** 硫酸銅試液1 mLとBCA試液50 mLを混和す
187 る。

188 **操作法** 標準溶液、試料溶液及び対照液、各0.1 mLに銅・
189 BCA試液2 mLを加え、混和する。これらの液を37℃で30分間
190 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
191 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
192 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
193 行い、石英製のセルを用いて波長562 nmにおける吸光度を測
194 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
195 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
196 物質」の項を準用して処理する。タンパク質の種類が異なると
197 呈色強度が異なることもあるので、標準タンパク質と試料タン
198 パク質は同じでなければならない。

199 **計算法** 吸光度とタンパク質濃度に直線関係が成立する濃度範
200 囲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
201 タンパク質濃度に対してプロットし、各点に最も近似した標準
202 曲線を求める。得られた標準曲線と試料溶液の吸光度から試料
203 溶液中のタンパク質濃度を求める。

204 方法5 (Biuret法)

205 本法は一般にビウレット(Biuret)法とよばれる方法で、アル
206 カリ性溶液中でタンパク質と銅II(Cu²⁺)イオンが反応し、波長
207 545 nmの吸光度が生じることを利用した方法である。

208 **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
209 分析によりタンパク質含量を測定したヒトアルブミン(窒素一
210 タンパク質換算係数は6.25を用いる)、若しくは試料タンパク

211 質の標準品又は標準物質を、塩化ナトリウム溶液(9→1000)に
212 溶かす。この液の一部を塩化ナトリウム溶液(9→1000)で希釈
213 し、1 mL当たり0.5 ~ 10 mgのタンパク質を含む、標準曲線
214 上等間隔の3種類以上の濃度の標準溶液を調製する。[注：試料
215 とヒトアルブミンでプロリン含量が大きく異なるとき、反応性
216 が低い場合がある。その場合は別の標準タンパク質を用いるこ
217 と。]

218 **試料溶液** 試料タンパク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3.46 gを水10 mLに溶か
222 し、必要ならば加温して溶かした後、放置冷却する(A液)。ク
223 エン酸三ナトリウム二水和物34.6 g及び無水炭酸ナトリウム
224 20.0 gを水80 mLに溶かし、必要ならば加温して溶かした後、
225 放置冷却する(B液)。A液及びB液を混和し、水を加えて200
226 mLとする。ビウレット試液は室温で6箇月間安定であるが、
227 濁りや沈殿を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℃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545 nm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タンパク
235 質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、標準溶液のタンパク質
237 濃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
238 の線の相関係数を計算する。[注：標準品の濃度範囲内ではタ
239 ンパク質濃度と吸光度はほぼ直線関係が成立する。]相関係数が
240 0.99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
241 液の吸光度から、必要な補正を行い、試料中のタンパク質の濃
242 度を求める。

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 からタンパク質を沈殿させることができる。試料の溶液1容量
245 に50%トリクロロ酢酸0.1容量を加え、上清を捨てた後、沈殿
246 物を0.5 mol/L水酸化ナトリウム試液少量に溶かし、これを試
247 料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僅かな相違
249 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緒に
250 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で
251 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液
252 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、試料中のタンパク質の濃
255 度が500 µg/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、タンパク質の第一級アミン(例えばN末端アミ
258 ノ酸やリシン残基のε-アミノ基など)と反応するo-フタルア
259 ルデヒド(OPA)によるタンパク質の誘導体化を利用した方法で
260 ある。試験に先立ち、タンパク質を加水分解することにより試
261 験感度を増加させることができる。加水分解により、タンパク
262 質を構成するアミノ酸のα-アミノ基がOPA試薬と反応でき
263 るようになる。本法は極微量のタンパク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、試料タンパク質
271 の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
272 かす。この液の一部を同じ緩衝液で希釈して、1 mL当たり10
273 ~ 200 µgのタンパク質を含む、標準曲線上等間隔の5種類以上
274 の濃度の標準溶液を調製する。

275 **試料溶液** 試料タンパク質の適当量を適切な緩衝液に溶かし、
276 標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61.83 gを水に溶かし、水酸化カリウ
280 ムを加えてpH 10.4に調整した後、水を加えて1000 mLとする。

281 **OPA試液原液** o-フタルアルデヒド120 mgをメタノール1.5
282 mLに溶かし、ホウ酸緩衝液100 mLを加えて混和する。これ
283 にポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル0.6 mL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5 mL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pH 8.0 ~ 10.5に調整する。
289 試料溶液及び各標準溶液10 µLをOPA試液100 µLと混和し、
290 室温で15分間放置した後、0.5 mol/L水酸化ナトリウム試液3
291 mLを加えて混和する。これらの液につき、蛍光光度法により
292 試験を行い、励起波長340 nm、蛍光波長440 ~ 455 nmにお
293 ける蛍光強度を測定する。[注：励起のための照射は蛍光強度
294 を低下させるため、各測定は1回限りとする。]

295 **計算法** タンパク質濃度と蛍光強度は直線関係が成立する。直
296 線回帰法を用いて、標準溶液の蛍光強度をタンパク質濃度に対
297 してプロットし、各点に最も近似した標準曲線を求める。得ら
298 れた標準曲線と試料溶液の蛍光強度から、試料中のタンパク質
299 濃度を求める。

300 方法7 (窒素測定法)

301 本法はタンパク質定量の手段として窒素定量を利用した方法
302 である。試料タンパク質に他の窒素含有物質が共存すると本法
303 を妨害することになる。窒素定量を行うと試料は破壊されるが、
304 溶液中以外のタンパク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、試料タンパク質の窒
306 素含量を測定する。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℃近い温度で酸素中の試料
309 を燃焼する)を利用し、試料タンパク質に含まれる窒素から一
310 酸化窒素(NO)及び他の窒素酸化物(NO_x)を産生させる。装置に
311 よ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
312 量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、比較的純粋で試料タンパク質と同一組成のタ
317 ンパク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タンパク質の既知の窒素含量で

319 割ることにより，タンパク質の含量を算出する．タンパク質の
320 既知の窒素含量はタンパク質の化学組成から求めるか，若しく
321 は適切な標準品又は標準物質の窒素含量と比較することにより
322 求めることができる．

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 フローイメージング法によるバイオテクノロジー応用医薬品(バイオ医薬品)原薬／製剤中の不溶性微粒子の評価法〈G3-17-182〉

バイオテクノロジー応用医薬品(以下「バイオ医薬品」という。)には、外来性の物質、製造工程に由来する物質及び処方成分や一次容器からの溶出物に加えて、タンパク質それ自身が凝集してできたタンパク質凝集体などの不溶性微粒子が含まれる可能性がある。注射剤に含まれる微粒子を評価・管理することは、最終製品の品質を確保する上で重要であるが、タンパク質凝集体については、タンパク質製剤の免疫原性に影響する可能性が懸念されており、より厳密な評価・管理が求められる。フローイメージング法は、試料溶液をフローセルに導入し、連続的に画像を撮影し、得られたデジタル画像を数値情報に変換して解析することにより、溶液に含まれる微粒子の計数、粒子径分布の測定、形状及び光学的特性の評価を行う手法である。光遮蔽粒子計数法では屈折率の高いポリスチレン標準粒子を用いて得られた粒径応答曲線により粒子径が算出されるため、水との屈折率の差が小さいタンパク質凝集体は検出されないか小さく検出される恐れがある。一方でフローイメージング法は光遮蔽粒子計数法と比較して、溶媒と粒子との屈折率差の影響を受けづらいことが示されている。また、形状及び光学的特性を評価することにより、タンパク質凝集体、シリコーン油、気泡及びその他の不溶性微粒子を区別できる場合もある。フローイメージング法による粒子数の定量的評価や含まれる粒子の特性解析は、タンパク質医薬品の不溶性微粒子の評価方法として有用と考えられる。本参考情報では主に、タンパク質医薬品注射剤などバイオ医薬品に含まれる不溶性微粒子の評価法について記載する。

1. 測定の原理

装置は、一般に、試料導入部、画像を取得する領域であるフローセル、各部位をつなぐ流路、ポンプ(チューブポンプやシリンジポンプ)、光源を含む光学系、撮像装置であるカメラ及び取得した画像を解析する画像解析装置などからなる。フローセルに流れてきた試料溶液に光源より光が照射され、撮像装置により画像が取得される。測定可能な粒子径はフローセルの厚さと対物レンズの倍率、カメラの性能などにより規定され、多くの場合、測定範囲は約2～100 µm程度である。粒子画像データは画像解析装置によって処理され、例えば画像の背景部分と粒子部分の濃淡に基づいて画像中の粒子の境界が認識され、粒子個々の形状及び光学的特性の評価が行われる。微粒子の計数値を測定体積で除することで粒子濃度が求められる。

2. 測定

2.1. 装置

測定は、一般に次の手順で行われる。対物レンズの倍率は測定する粒子の大きさに応じたものを使用し、通常、4～20倍の対物レンズが使用される。測定前に、フローセルを洗浄し、フローセル内にとどまっている粒子がないことを確認する。なお、セルの洗浄には微粒子を含まない水その他、必要に応じて洗剤や薄めた水酸化ナトリウム溶液、エタノールなどを使用できる。その後、装置の使用手順に定められた方法にて焦点を適切に合わせる。装置ごとに必要な測定条件(流量、測定容量、画像取得頻度、背景から粒子を区別するための閾値など)を設定

する。フローセルに導入された溶液のうち実際に画像解析された割合を画像取得効率という。画像取得効率を設定できる装置の場合、画像取得効率は、測定容量、流量、画像取得頻度から算出され[画像取得効率=画像取得頻度(frames/s)×画像一枚当たりの測定容量(mL/frame)／流量(mL/s)×100 (%)]、同じ粒子が複数回計数されないように、また、実際に測定される容量が十分となるよう、適切に設定する。測定領域を設定できる場合、計数の正確性は、計数標準粒子を測定することにより確認できる。さらに、測定の原理上、粒子の一部が測定領域に収まらず、一部が欠けた粒子画像が得られることが想定される。部分的に撮像された粒子の取扱いについては事前に設定しておく。

2.2. 操作法

試験は外部から微粒子が混入しない条件下、できれば層流等により清浄度の保たれたキャビネット中で行う。試料は、含まれる粒子が均一になるように、例えば容器をゆっくりと回転させるなど、穏やかに十分に振り混ぜる。容器を開封する際には、必要に応じて容器開口部の外表面を微粒子試験用水で洗浄し、内部が汚染されないよう注意して栓を開ける。溶液中に存在する微粒子を測定するにあたり、操作中に気泡や新たな凝集を引き起こさないように注意が必要である。必要に応じて、気泡を除くために、容器を大気圧下にしばらく放置する、又は減圧して放置する。超音波処理はタンパク質を凝集、変性させるおそれがあることから、適切ではない。装置に導入する試料の液量は、測定容量と風袋容量を考慮して決定する。測定容量は、試料の特性、画像取得効率及び求める分析法の精度等を考慮して十分な容量とする。試料の粘度が高い、粒子数が多いなど、必要な場合は、希釈直線性を確認し、試料を希釈することも可能である。測定回数は装置の性能及び試料の特性を考慮し適切に設定する。

閾値は、分析結果に大きな影響を及ぼすので、閾値を個別に設定できる装置を使用する場合は、事前に粒子境界が適切に認識されていることを確認する。その際、実試料若しくは実試料を劣化させた試料、又はタンパク質凝集体を模して作製された標準粒子などを使って、粒子の形状が正しく評価されていること、ノイズを粒子として認識していないことも確認することが望ましい。なお、異なる閾値で取得したデータを比較する際は、閾値の差が測定結果に与える影響を十分に考慮する必要がある。

3. 画像解析

検出した粒子の粒子径は、円相当径(粒子の投影面積と等しい面積をもつ円の直径)にて示されることが多い。円相当径のほかに、球相当径やフェレー径などが使用できるため、粒子径の比較には注意する必要がある。

本参考情報はフローイメージング法による微粒子の計数を主な対象としているが、粒子の画像から由来を推定することや、画像の特徴に応じて粒子を分類できる場合もある。画像解析の結果得られる、粒子の特性を表すパラメーターの主なものには、粒子径の他、面積、粒子周囲長、アスペクト比、円形度などの形状に関するパラメーターの他、明暗度や粒子内での明暗度の標準偏差といった光学的なパラメーターがある。これらのパラメーターを使って、例えば、試料に含まれる粒子を、容器に由来するシリコーン油滴など由来ごとに分類することも可能である。シリコーン油滴との区別には、アスペクト比、真円度、周囲長、長さ、明暗度の平均値や標準偏差などが用いられる。各パラメーターを組み合わせ、最適な閾値を設定し、段階的にふ

るい分ける。蓄積した十分な画像データを使って分類モデルを構築し、同じ装置で取得した画像データに適用することで、検出された粒子を由来ごとに分類することも可能と考えられる。ただし、これらのパラメーターは撮像装置や解析ソフトに組み込まれた定義式、画像解析装置のシステム及び測定条件に依存し、解像度や画素数、焦点の合わせ方によって測定値が異なる可能性のあること、由来の特定には顕微ラマン分光法など分子構造や組成情報の得られる適切な他の技術による分析が必要なることに留意する。

4. 分析法バリデーション

分析法バリデーションでは一般に、真度、精度、特異性(選択性)などで表現される分析能パラメーターが、事前に定めた基準を満たしていることを実証することにより、分析法の妥当性が示される。評価すべき分析能パラメーターは、分析法が用いられる試験法の目的によって異なる。医薬品中の不溶性微粒子を計数する試験法の場合は、実試料を反映した真度既知の分析対象がなく、真度既知の分析法を使った評価が難しいこと、また製剤や原薬など実試料に含まれ得る微粒子は粒子径分布が広く均質ではないため、通常の定量試験と同様に分析法バリデーションを行うことは難しい。したがって、例えば、平均粒子径が値付けされたポリスチレン標準粒子や、粒子径と粒子濃度が値付けされたポリスチレン計数標準粒子を使って以下のバリデーション手順例に示す分析能パラメーターを評価することで妥当性が示される。用いる標準粒子及び計数標準粒子の粒子濃度や粒子径は、実試料に含まれる粒子濃度や粒子径分布、規格値などを考慮して適切に設定する。粒子径の異なる複数の標準粒子を使うことも、分析法の性能を評価するのに有効である。なお、適切な機関により認証され、粒子径分布若しくは粒子数が保証されている標準粒子を用いる。この他、屈折率が低いシリカ粒子やポリメチルメタクリレート粒子は、タンパク質凝集体のモデル粒子として適切な場合もあると考えられ、処方成分が試験対象試料と同様の溶液に添加した試料は、粒子と溶液の屈折率の差が小さいことで計測される粒子径が変動するか確認するのに有用と考えられる。

フローイメージング法により微粒子数を計数する場合のバリデーション手順例

真度：5、10及び25 μm ポリスチレン計数標準粒子を測定し、認証された粒子径及び粒子濃度の範囲内であることを確認する。精度：併行精度及び室内再現精度を評価する。併行精度は、微粒子を含まない水又は処方成分が試験対象試料と同様の溶液に、3水準の粒子濃度となるよう5、10及び25 μm の標準粒子を添加した試料について各々3回測定を繰り返すことにより求める。室内再現精度については、同様に調製した試料について、少なくとも試験日と試験者を変更した条件で測定を行って算出する。

直線性：微粒子を含まない水又は処方成分が試験対象試料と同様の溶液に5、10及び25 μm の標準粒子を添加し、例えば5水準の粒子濃度について直線性を評価する。

特異性：モデルを使って粒子を分類するなどが必要な場合、実試料を劣化させた試料及び目的とする分析対象物を実試料に添加し、適切に分類できていることを確認する。

5. 装置性能の管理

5.1. 校正

フローイメージング法で算出される粒子径や粒子数は、標準粒子の測定値から算出される相対的な値ではなく、測定の原理に基づいた絶対的な値であるが、計数標準粒子を使って装置が正しく稼働していることを確認し、必要に応じて装置側の設定を調節する必要がある。光学系の確認は必須であり、焦点が正しく合っていること、光源の明るさが適切であることなどを確認する。また、ポンプの性能も測定結果に影響し得るため、流量の調節と流量確認を実施する。なお、装置校正には、適切な機関により認証され、絶対的な方法により粒子径分布及び粒子数が保証されているポリスチレン計数標準粒子及びポリスチレン標準粒子を用いる。

5.2. システム適合性

測定実施前に装置の稼働状態が適切であること、適切に洗浄されていることを確認するため、以下のようなシステム適合性を設定することが推奨される。

適切な標準粒子の測定値(粒子径及び粒子数)があらかじめ定めた範囲内にあることを確認する。フィルターを通した水(用時調製)で、粒子数が規定した値以下であることを確認する。粒子径の範囲は、目的に応じて適切な範囲とする。粒子数が適切な範囲内でなかった場合は、使用する水の調製及び装置の洗浄を繰り返し、再測定する。

1 日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件 (G3-13-190)

1. 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た。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、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。

1.1. 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

日本薬局方生物薬品には、哺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タンパク質医薬品(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的方策には、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。

1.2. 各条及び参考情報におけるウイルス安全性確保策

1.1.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。

1.3. 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タンパク質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「「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー一応用医薬品等のウイルス安全性評価に関するガイドライン」の一部改正について」(令和7年1月9日付医薬薬審発0109第3号厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知)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の一部改正について」(令和6年3月29日付医薬発第0329第16号厚生労働省医薬局長通知)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全ての生物薬品、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タンパク質医薬品などのウイルス安全性確保に必要な一般的留意事項及び各論を盛り込んでいる(表1)。

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

1. はじめに
1.1. 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
1.2. 各条及び参考情報におけるウイルス安全性確保策
1.3. 本参考情報において盛り込んだ事項と内容
2. 一般的事項
2.1. 目的
2.2. 背景
2.3. ウイルス安全性確保策における未知のリスク問題
2.4. 適用範囲
2.5. 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)
2.6. ウイルス安全性確保の基本
2.7. ウイルス試験の限界
2.8. ウイルスクリアランス試験の役割
3. 原材料・医薬品製造基材
3.1. 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
3.2. 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
4. 製造及びウイルス試験にかかわる留意事項
4.1. 精製工程前のウイルス試験

-
- 4.2. 中間原料等の受入れ試験としてのウイルス検査
 - 4.3. 最終製品におけるウイルス試験
 - 5. ウイルスクリアランスに関する工程評価
 - 5.1. 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
 - 5.2. ウイルスの選択
 - 5.3. ウイルスクリアランス試験の設計
 - 5.4. ウイルスクリアランス試験結果の解釈
 - 5.4.1. ウイルスクリアランス指数の評価
 - 5.4.2. ウイルスクリアランス指数の計算法
 - 5.4.3. 結果の解釈及び評価上留意すべき事項
 - 6. 統計
 - 6.1. ウイルス力価測定における統計学とその留意点
 - 6.2. ウイルスクリアランス試験の再現性、信頼限界
 - 7. ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合
 - 8. ウイルスクリアランス試験にかかわる測定法
 - 8.1. ウイルス感染価の測定法
 - 8.2. 核酸増幅法(NAT)による検査
 - 9. 記録と保存
 - 10. その他
 - 11. おわりに
-

2. 一般的事項

2.1. 目的

哺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は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品のウイルスに対する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、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その解析・評価、④生物起源の製造関連物質(試薬、抗体カラムなど)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ウイルススクリアランス試験計画の立案、⑦ウイルススクリアランス試験の実施と評価、などに関する方策や留意事項について記述し、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的に示すことを目標とする。

2.2. 背景

ヒト又は動物を直接起源とする生物薬品や、ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品(組換え医薬品、細胞培養医薬品などのバイオ医薬品)において留意すべき安全性上の極め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入した結果生じる可能性もある。

日局生物薬品や細胞株由来タンパク質バイオ医薬品は、従来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きな関心事であり課題でもある。

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

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、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である。

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ると考えられる。

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欠くものになってしまう。バランスのとれた適切な科学的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、医薬品という社会的資産は、その時点での科学の結晶が社会が医療のために活用するという特徴を持つ共通の資産であり、活用にあたってのキーポイントは科学的、社会的評価に基づくリスク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、これらの要素を勘案しながら検討する必要がある。

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。

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、汚染の可能性を想定するウイルスは、種類、形態、粒子サイズ、物理的・化

177 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
178 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
179 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
180 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
181 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
182 考慮することになる。

183 2.3. ウイルス安全性確保策における未知のリスク問題

184 リスクの問題には既知のリスクと未知のリスクがある。

185 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
186 から不可避的に存在するいわば既知のリスクに対しては、試験
187 方法や評価基準を明確にしやすいし、リスクをいわば定量化す
188 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
189 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
190 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
191 と考えられる。

192 一方、ウイルス安全性確保上、不可避的に課題となる未知の
193 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、
194 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
195 英知を結集して対処しなければならない課題である。

196 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
197 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
198 性確保を図るか”という視点がある。

199 “未知であるから危険である”というのは、それ自体既に一
200 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
201 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
202 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
203 る。

204 例えば、「医薬品生産のある工程にウイルス、ウイルス様粒
205 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
206 ず、したがって危険性も否定できない」というケースでは、
207 “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
208 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、
209 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、
210 未知の何かがあるかもしれない‘おそれ’がある」として“未
211 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
212 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
213 るとはいえない。ウイルス安全性問題に関しては、慎重の上にも
214 慎重であるべきことはいうまでもないが、少なくとも‘おそれ’
215 の内容について明確に説明できるのでなければ、‘おそれ’
216 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
217 る使命との間で齟齬をきたす可能性がある。

218 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
219 もしれない‘おそれ’がある」として、「危険である」とする
220 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
221 図るか”という課題に取り組むことであろう。その際、現段階で
222 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
223 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。
224 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
225 ことが可能になるからである。

226 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
227 “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
228 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
229 いかけになる。このようなアプローチをすると、「問題」と
230 「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

231 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、
232 そうしてみても科学的に関係付けの「対策」が「何が未知
233 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
234 少ないであろう。

235 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
236 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
237 することを評価する」という場面における“何が未知であるか”
238 は、「どのような既存ウイルスが迷入してくるかが未知」とい
239 う問題設定であるべきである。「どのようなウイルスが世に存
240 在しているかが未知」ということではない。前者の問題設定で
241 は、DNAウイルス又はRNAウイルス、エンベロープを有する
242 ウイルス又は有しないウイルス、粒子サイズ、物理的・化学的
243 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上で
244 の問題設定となる。迷入してくるウイルスは未知でも、そのウ
245 イルスは種類、形状、諸性質などにおいて既存の学問、知識の
246 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え、
247 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入し
248 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と
249 であれば、核酸の種類、エンベロープの有無、粒子サイズ、物性
250 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せ
251 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、既存
252 の全てのウイルスのクリアランス状況をシミュレートしたこと
253 になり、“安全性確保を図る”ための方策になる。

254 「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
255 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、
256 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
257 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
258 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
259 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
260 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
261 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
262 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
263 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
264 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
265 を図る”ための方策にはならない。同様に、現在のスクリー
266 ニ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
267 しれないと問題設定してみても、対応のしようはなく、どのよう
268 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
269 性確保を図る”ための方策とはならない。

270 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
271 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
272 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
273 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
274 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、
275 いかに科学的に合理性のあるアプローチで人的、経済的、時間
276 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
277 ると思われる。

278 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
279 を全ての前提にしていることを改めて確認する必要がある。例
280 えば、前述の「医薬品生産のある工程にウイルス、ウイルス様
281 粒子又はレトロウイルス様粒子が検出されないが、未知の何か
282 があるかもしれない‘おそれ’がある」という問題設定では、
283 「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
284 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

285 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
286 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
287 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
288 は当然である。

289 2.4. 適用範囲

290 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
291 びヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品を適用対象
292 とする。一方、血液製剤に関しては、生物学的製剤基準に収載
293 され、また「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関
294 するガイドライン」が適用されるので、日局参考情報の適用対
295 象外とする。さらに生物起源由来物質でもアミノ酸、糖類、グ
296 リセリンなどのような比較的低分子の化合物や、感染性や病原
297 性を示す高分子化合物でもゼラチンのようなものは、その製法
298 や精製法からウイルスの迷入の可能性が考えられないケースが
299 多く、また、タンパク質には適用できないような強力なウイル
300 ス不活化／除去操作を適用することも可能なので、これらにつ
301 いては、適用対象外とするのが合理的である。ただし、本情報
302 に盛り込まれた事項のうち合理的に適用できる部分があれば、
303 参考によればよい。なお、日局には収載されていない生物薬品
304 であっても、本文書の適用対象となる日局生物薬品と同様なも
305 のについては、本参考情報を参考にしてウイルスに対する総合
306 的な安全確保対策をとることが推奨される。

307 2.5. 日局生物薬品がウイルスに汚染される可能性(ウイルス 308 の汚染源)

309 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
310 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
311 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
312 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
313 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
314 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
315 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
316 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
317 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
318 なければならない。また、ヒト又は動物起源細胞株由来のタン
319 パク質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
320 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
321 必要であることは医薬薬審発0109第3号通知に述べられている
322 とおりである。

323 なお、ここで「医薬品製造基材」とは、原薬の品質・安全性
324 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
325 造のための出発素材と定義する。「医薬品製造基材」は、ヒト
326 又は動物の組織、体液等そのものである場合もあり、尿等にあ
327 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
328 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
329 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
330 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
331 造基材」段階で試験、評価、又は品質管理の程度を徹底化すれ
332 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
333 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
334 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
335 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
336 理化することもできる。

337 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
338 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

339 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
340 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
341 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
342 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、
343 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
344 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。
345 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
346 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
347 ウイルス(HAV)やC型肝炎ウイルス(HCV)が混入したケースが
348 知られている。また、1980年代の血漿分画製剤によるヒト免
349 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
350 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
351 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
352 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
353 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、
354 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、
355 HIV、HAV、B型肝炎ウイルス(HBV)、HCV、ヒトT細胞白血
356 病ウイルス(HTLV-I/II)、ヒトパルボウイルスB19、サイ
357 トメガロウイルス(CMV)などがある。ヒト又は動物由来の組
358 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、
359 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
360 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
361 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
362 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
363 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
364 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
365 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
366 に対する注意も必要である。さらに、製造施設環境から汚染さ
367 れ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
368 中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
369 ので、これらにも留意した対策が必要である。

370 ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品の場合、細
371 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
372 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
373 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
374 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
375 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
376 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
377 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
378 ような生物起源由来の試薬の汚染、2)目的タンパク質をコード
379 す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)
380 精製等に使用するモノクローナル抗体アフィニティカラムの
381 ような試薬の汚染、4)製剤化に使用する添加剤の汚染、5)細胞
382 及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
383 イ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
384 ラ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
385 見に役立つとされている。

386 2.6. ウイルス安全性確保の基本

387 ヒト又は動物由来の組織、体液、細胞株等を原材料・医薬品
388 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
389 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。
390 (1) ウイルス汚染の可能性(汚染源)について熟知すること
391 (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
392 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

393 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
394 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
395 と

396 (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
397 トへの有害性が高いかを検討・確認すること

398 (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
399 な生物起源製造関連物質(試薬、抗体カラムなど)を選択すること
400 と

401 (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
402 品のウイルス否定試験を実施すること

403 (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
404 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
405 ること。各種の方法の組合せにより高いウイルスクリア
406 ランスの達成に留意すること

407 (7) 周到なウイルスクリアランス試験計画を立てること

408 (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
409 すること

410 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
411 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
412 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
413 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
414 べきである。

415 2.7. ウイルス試験の限界

416 ウイ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
417 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
418 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
419 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
420 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
421 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
422 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
423 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
424 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。
425 さらに、3)用いたウイルス試験法がヒト又は動物由来の組織、
426 体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
427 しも適切ではなく、それらを検出できない場合もあり得る。

428 ウイ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、
429 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
430 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
431 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
432 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
433 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
434 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
435 必要がある。

436 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、
437 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
438 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
439 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
440 ると考えるべきである。

441 2.8. ウイルスクリアランス試験の役割

442 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
443 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
444 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
445 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
446 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

447 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
448 活化ができるかである。ウイルスクリアランス試験を実施する
449 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
450 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
451 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
452 粒子のサイズ、形状、エンベロープの有無、核酸の種類(DNA
453 型、RNA型)、耐熱性や化学的処理に対する抵抗性などの特性
454 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
455 (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
456 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
457 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
458 要である。

459 このように、ウイルスクリアランス試験の役割は、製造工程
460 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
461 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
462 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
463 学的根拠を得ることに寄与するものである。

464 ウイルスクリアランス試験の実施に際しては、個々の製品ご
465 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
466 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
467 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
468 チ法を採用する必要がある。

469 3. 原材料・医薬品製造基材

470 3.1. 原材料・医薬品製造基材の起源たる動物種と採取部位に 471 依存した問題と対策

472 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
473 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
474 は主にヒト、ウシ、ブタ、ウマなどより得ている。いずれも健
475 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
476 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
477 止条件(SPF : specific pathogen-free)に適合したコロニー由来
478 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
479 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
480 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
481 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
482 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
483 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。
484 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
485 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
486 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、
487 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
488 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。
489 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
490 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、
491 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)
492 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
493 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
494 にTSEsの汚染の報告がない国(地域)由来の原材料などやTSEs
495 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
496 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
497 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
498 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。

499 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
500 製造基材としては以下のものがある。

(1) ヒト由来生物薬品

ヒト由来生物薬品の原材料を得るソースとしては、血漿、胎盤、尿などが用いられている。これらの原材料については、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定する検査を行う必要がある。

(2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

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

(3) ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品

ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品の場合、ヒ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バンク(マスター・セル・バンク、ワーキング・セル・バンク)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、起源たる動物のウイルス面に関しての情報やマスター・セル・バンクの基で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実践できることはいうまでもない。

3.2. 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

(1) ヒト由来生物薬品

ヒト由来生物薬品にあっては、健康なヒトから得た体液などを用いることが必須である。さらに、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たりすることが可能でかつ必要なケースでは、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血清学的検査を行い、少なくともHBV、HCV及びHIVの存在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、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。

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ることが合理的ではない原材料にあっては、プールした原材料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された抗原検査やNATなどを用いて少なくともHBV、HCV及びHIVの存在を否定しておくべきである。

(2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

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かにされている必要がある。さらには、飼育されている群が適切に管理された飼育条件にあって全く異常な個体が発生していな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、否定できる情報や科学的根拠を示すか、血清学的又はNATなどを用いて否定しておくべきである。各々の動物に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、

これら全てについて、各動物個体、原材料となる組織、体液など、又はプールした原材料(医薬品製造のための直接の基材)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、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ることが重要である。

(3) ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品

医薬品製造基材であるマスター・セル・バンク(MCB)において、医薬品製造0109第3号通知に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(CAL)についても、適切な外来性ウイルス試験(例えば*in vitro*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胞基材としての各ワーキング・セル・バンク(WCB)については、それ自体を対象に又は各WCBを培養したCALの段階で、外来性ウイルスに関する試験を実施すること。適切な非内在性ウイルスの試験がWCBのもとであるMCBで実施され、かつ、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施されている場合、同様の試験は当該WCBでは不要である。

4. 製造及びウイルス試験にかかわる留意事項

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全性が高い生物薬品を製造するには、2.5.で述べたようなウイ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、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る。

さらに、近年のめざましい技術進歩をふまえ、有用なウイルス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／除去工程としては、①加熱(例えば、55～60℃、30分の加熱で肝炎ウ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るとされている。血液や尿由来の製品では液状60℃、10～24時間処理、乾燥加熱処理の例もある)、②有機溶媒・界面活性剤処理(S/D処理)、③膜ろ過(15～50 nm)処理、④酸性処理、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、硫酸アンモニウム分画処理)、⑧抽出処理、などがある。

4.1. 精製工程前のウイルス試験

(1) ヒト由来生物薬品

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、

609 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
610 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
611 れらのケースでは、既に3.2.(1)で述べたように、特異性や感度、
612 精度が十分に評価された試験法を用いて少なくともHBV、
613 HCV及びHIVの存在を否定しておく必要がある。精製工程前
614 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
615 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
616 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
617 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
618 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
619 われる。

620 (2) ヒト以外の動物を用いて製造される生物薬品

621 4.1.(1)と同様に、精製工程前のウイルス試験の試験試料とし
622 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
623 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
624 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
625 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
626 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
627 ついて、既に3.2.(2)で述べたように存在を否定できる情報を示
628 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
629 るいはNATなどを用いてその存在を否定しておく必要がある。
630 精製工程前の未精製バルクが医薬品製造基材より下流にある場
631 合の考え方は、(1)の場合と同様である。

632 (3) ヒト又は動物起源細胞株由来のタンパク質医薬品

633 この場合は、一般に、医薬品製造基材は細胞バンクであり、
634 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
635 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
636 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
637 からなる場合もある。MCBやWCBレベルでのウイルス試験に
638 に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
639 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。
640 また、CALでの試験も通常一回行われるのみなので、バ
641 リデーションとしての意味合いは大きい、恒常的なウイルス
642 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
643 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
644 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
645 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
646 することはできない。

647 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
648 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
649 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
650 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
651 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。
652 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
653 り高感度に行える場合には、この限りではない(例：未加工／
654 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、
655 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
656 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
657 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
658 適切な場合もある。

659 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
660 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
661 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
662 求として求められる。さらに、それ以降の各製造バッチについ

663 て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
664 る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
665 イルス試験の範囲、程度及び頻度を決定するにあたっては、以
666 下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
667 産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
668 試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
669 法、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
670 る。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
671 ているのは、一種又は数種の細胞株を用いる*in vitro*スクリー
672 ニング試験である。なお適宜、NAT試験その他の適切な試験
673 法を用いるとよい。

674 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
675 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
676 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
677 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
678 るべきである。

679 4.2. 中間原料などの受入れ試験としてのウイルス検査

680 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
681 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
682 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
683 場合、原材料など製造者により既に本参考情報に沿った試験が
684 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
685 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
686 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
687 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
688 ておく必要がある。

689 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
690 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
691 製造基材とみなし、必要な全てのウイルス否定試験を行う必要
692 がある。

693 4.3. 最終製品におけるウイルス試験

694 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
695 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
696 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、
697 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
698 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
699 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
700 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
701 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
702 ルス試験、ウイルスクリアランス試験を的確に実施することな
703 ど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で
704 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
705 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
706 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
707 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、
708 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
709 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
710 ル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
711 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
712 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
713 NATによる検査などを行うことが推奨される場合もあるかも
714 知れない。

715 5. ウイルスクリアランスに関する工程評価

716 5.1. ウイルスクリアランスの工程評価の意義、目的、一般的
717 留意事項

718 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
719 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
720 に重要である。このウイルススクリアランスに関する評価を行う
721 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
722 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
723 ことの一定限の保証となる。ウイルススクリアランス試験は、綿
724 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
725 評価される必要がある。

726 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
727 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
728 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
729 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、
730 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
731 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
732 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
733 る。その際、必ずしも製造工程の全ての工程について評価する
734 必要はなく、十分なクリアランスが示される幾つかの工程につ
735 いて試験し、評価することにより、しかし、評価対象以外のス
736 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影響
737 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、ウ
738 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、
739 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。

740 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
741 染性の不活化により減少する。ウイルススクリアランスに関して
742 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
743 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
744 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
745 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
746 線が描けるように計画するべきである。

747 5.2. ウイルスの選択

748 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
749 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
750 から、DNAウイルス及びRNAウイルス、エンベロープの有無
751 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
752 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
753 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
754 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
755 度のモデルウイルスを組み合わせることが必要になる。

756 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
757 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
758 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
759 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
760 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
761 イルスを選択する。また、高力価の材料が調製できるウイルスが
762 望ましい(ただし、これがいつも可能であるとはいえない)。さ
763 らに、使用するそれぞれのウイルスの検出法に関しては、試験
764 対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
765 度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
766 果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
767 る必要がある。なお、ウイルスの選択にあたっては、クリアラ
768 ン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

769 ある。

770 その他ウイルスの選択に際しての留意事項は、医薬薬審発
771 0109第3号通知を適宜参考にするといふ。また、バイオ医薬品
772 のウイルススクリアランス試験に用いられるウイルスを表3に示
773 した。これは医薬薬審発0109第3号通知を参照したものである。
774 ただし、医薬薬審発0109第3号通知はヒト又は動物細胞株由来
775 の製品のウイルス安全性を対象としているので、生物薬品の起
776 源・原料によっては、より適切なモデルウイルスを選択する必
777 要があると思われる。

778 5.3. ウイルスクリアランス試験の設計

779 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
780 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
781 や不活化能力を定量的に評価するものである。

782 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
783 とが望ましい留意点を以下に示す。

784 (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
785 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
786 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
787 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
788 能性が生じる。

789 (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
790 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
791 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
792 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
793 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
794 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
795 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。
796 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
797 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
798 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
799 度のウイルス試料(例えばウイルス粒子数が1 L当たり1 ~
800 1000)を取り扱う場合、ウイルス試料のサンプリングの仕方
801 によって生じる統計学上の問題を考慮に入れるべきである。

802 (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
803 の製造工程の規模を縮小した試験系で実施する。GMP上、製
804 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
805 で、ウイルススクリアランス試験は、製造設備とは別のウイルス
806 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
807 アランス試験は、ウイルス学的研究を行う設備のある隔離された別
808 の施設で、ウイルスの専門家と精製工程のスケールダウンを設
809 計し、準備に関与した製造技術者が協同行う必要がある。そ
810 の際のウイルススクリアランス試験はGLPの基本理念に基づき
811 実施しなければならない。

812 (4) この製造規模の縮小版で行うウイルススクリアランス試験
813 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
814 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
815 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、
816 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)、
817 緩衝液、カラム充填剤の種類、pH、温度、タンパク質濃度、
818 塩濃度、目的物質濃度に関して、全て実生産スケールの製造に
819 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の
820 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程
821 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造
822 工程を反映させることができない場合には、それが結果へどの

823 ような影響を及ぼすかを考察しておくべきである。

824 (5) 製造工程のうち、ウイルス不活化／除去に関して原理が
825 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
826 望ましい。

827 (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
828 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
829 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
830 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
831 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
832 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
833 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
834 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
835 ス除去が分離・分画操作による場合、可能な範囲で、ウイルス
836 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
837 ことが望ましい。

838 (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
839 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
840 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
841 化は単純な一次反応でなく、通常、速い“第一相”と遅い“第
842 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
843 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
844 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
845 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
846 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
847 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
848 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
849 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
850 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
851 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
852 (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
853 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
854 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
855 ウイルス量の実測値に基づいて定めるべきであるが、實際上こ
856 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
857 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
858 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
859 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
860 を適切な試験系により示す必要がある。

861 (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
862 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
863 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
864 クリアランス試験を実施する必要がある。

865 (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
866 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。
867 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
868 製品中のタンパク質の挙動を変えたりすることがないように、工
869 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。

870 (10) 被験試料中のウイルスは、可能な限り超遠心分離、透析、
871 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、
872 阻害物質や毒性物質の除去のための操作、又は全ての試料を同
873 時に定量するために一定期間保存することなど、定量前に何ら
874 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、
875 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
876 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、

877 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
878 ある。

879 (11) 緩衝液又は製品(に含まれる目的タンパク質やその他の
880 成分)が指示細胞に望ましくない影響を及ぼす可能性がある。
881 したがって、これらのウイルス力価測定法に対する毒性作用又
882 は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
883 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
884 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、
885 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。
886 製品(目的タンパク質など)が抗ウイルス活性を持っている場合、
887 クリアランス試験を疑似工程(mock run)、すなわち目的タンパ
888 ク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
889 施する必要がある。しかし、製造工程によっては、目的タンパ
890 ク質などを除くことや抗ウイルス活性を持たない類似タンパク
891 質で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。

892 (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
893 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
894 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
895 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
896 あることに留意する必要がある。

897 (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
898 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
899 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
900 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
901 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
902 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
903 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
904 留意する必要がある。

905 (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
906 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。
907 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
908 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
909 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
910 以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、
911 S/D (有機溶媒／界面活性剤)処理は、一般に脂質膜を有する
912 ウ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
913 に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
914 工程(55 ～ 60℃, 30分)にも抵抗性を示すものもある。このよ
915 う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
916 更に強くするか、作用原理・機構が異なる工程の導入を考慮す
917 る必要がある。S/D (有機溶媒／界面活性剤)処理や加熱処理
918 と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
919 れ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
920 である。一方、目的タンパク質を特異的に吸着させるアフィニ
921 ティークロマトグラフィー工程は、目的タンパク質以外のウイ
922 ルスなどを徹底して洗い流すことも可能なため、ウイルス除去
923 に一般に有効である。イオン交換クロマトグラフィーやエタノ
924 ール分画処理工程などにおいては、製品中の目的タンパク質と
925 各種ウイルス類との分離・分画状況は様々な様相を呈するが、
926 これらの工程が他の処理工程で十分に不活化・除去できないウ
927 イルスのクリアランスに有効であるケースも少なくない。

928 (15) ウイルスクリアランスは、例えば、不活化工程が2段階
929 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
930 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

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。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、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る。

(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てる必要がある。

(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。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回使用した後にウイルススクリアランスに関する性能を示す指標を測定することにより評価できる。

(18) その他、生物薬品のウイルススクリアランス試験の設計に関しては医薬薬審発0109第3号通知を適宜参考にすること。

5.4. ウイルスクリアランス試験結果の解釈

5.4.1. ウイルスクリアランス指数の評価

ウイルススクリアランス指数は、製造工程においてクリアラン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。製造工程全体における総ウイルススクリアランス指数は、これら各製造段階でのウイルススクリアランス指数のうち適切に評価できるものを加算することにより得られる。

得られた各ウイルススクリアランス指数及び総ウイルススクリアランス指数が受入れ可能かどうかについて、原材料及び製造過程に混入(迷入)する可能性が現実的に考えられる全てのウ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。

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く、ウイルススクリアランスに関して、必要な程度を上回る能力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ある。比較をする上で、原材料・医薬品製造基材など中のウイルス量を測定することが重要である。この測定値は、感染性の測定又はその他の方法、例えば電子顕微鏡(TEM)により、得られるべきである。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。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、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

基材などは、原則として医薬品生産には使用できない。

通常は、生物薬品の製造基材には、何らかの試験・検査によ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りうるが、一般的には、5.2.で述べたように、広範囲なウイル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になる。このような場合には、ウイルススクリアランスに関する一般的な数値目標は特に設定できない。工程のウイルススクリ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感度、その他文献の事例などを勘案しながら考察することになる。

5.4.2. ウイルスクリアランス指数の計算法

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

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

ここで、 R =対数で表される減少度であり、 V_1 =工程処理前の試料の容量、 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(力価)である。

ウイルススクリアランス指数を算出する場合には可能な限り、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イルス負荷量を算出することになる。

5.4.3. 結果の解釈及び評価上留意すべき事項

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、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、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／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、様々な要因を組み合わせて考察する必要がある。さらに補足的事項を以下に示した。

これら様々な要因が結果に影響することをふまえて、適正な解釈、評価に導くようにする必要がある。

(1) 試験に使用したウイルスの挙動

ウイルススクリアランス試験の結果を解釈するにあたって、ク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、自然界に存在するウイルスと培養ウイルスとでは純度や凝集の程度が異な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、結果を解釈する必要がある場合も考えられる。

(2) 試験の設計

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

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考えられる。

(3) ウイルス減少度データの取捨選択

総ウイルスクリアランス指数は、対数で表された各製造段階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、同一又は近似した方法を繰り返して達成されたウイルスクリアランス指数は、合理的な理由がない限り加算するべきではない。

(4) 不活化の時間依存性

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(抵抗性画分)が凝集形態をとった場合、各種化学処理や熱処理に対しても抵抗性を示す可能性がある。

(5) 対数で表されるウイルス減少度の評価

ウイルス力価の減少度を対数で表してウイルスクリアランス指数とするため、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。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ことになる。

(6) 製造工程の変動因子

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造工程の変動因子の僅かな変動に対しウイルスの除去及び不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しれない。

(7) 抗ウイルス抗体の存在

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、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。

(8) 不活化／除去工程の新規導入

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／除去工程を追加導入すべきである。

(9) ウイルスクリアランス試験の限界

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、上述のようなウイルスクリアランス試験のデザイン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

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く可能性もあることに留意する必要がある。

6. 統計

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性が検証されたものである必要がある。

6.1. ウイルス力価測定における統計学とその留意点

ウイルスの力価測定は他の生物活性の測定と同様、ばらつきが大きい。ウイルスクリアランス試験を信頼性のあるものとするため、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必要がある。統計学的评价の目的は実施したウイルスクリア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裏付けることである。

1. ウイルス力価測定法には半定量法(quantal method)と定量法(quantitative method)があるが、半定量法、定量法共に、統計学的评价の対象となる。

2. 試験の変動は、希釈誤差、統計的な要因、及び測定法に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果のばらつき(試験内変動)より大きい。

3. 試験内変動の95%信頼限界を求めるとき、通常、平均値 $\pm 0.5 \log$ のレベルに収まるようにすべきである。試験内変動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、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当な理由が必要である。

6.2. ウイルスクリアランス試験の再現性、信頼限界

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量の低減に再現性があることを立証する必要がある。

一方、クリアランス試験におけるクリアランス指数の95%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、ウイルスクリアランス指数の95%信頼限界は

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

である。

7. ウイルスクリアランスの再評価が必要な場合

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とウイルスクリアランスの程度が変わる可能性がある。

8. ウイルスクリアランス試験にかかわる測定法

8.1. ウイルス感染価の測定法

ウイルス感染価の測定法には、半定量法と定量法がある。半定量法は動物を用いた感染性試験や、CCID法(Cultured cell infectious dose : 培養細胞感染性価)で、動物や培養細胞の感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

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。定量法としてはブランク法などがある。ブランク法では1ブランクが1感染単位に相当する。測定法は、十分な感度と再現性を持つべきであり、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。

8.2. 核酸増幅法(NAT)による検査

核酸増幅法(NAT)による検査は、各々のウイルスに対する血清学的検査が陰性であるときでも個別の検体やブールされた原材料・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検出できる方法である。培養系で測定できないHBVやHCV遺伝子などの検出にも応用できる。また、HBV、HCV及びHIV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、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ルスの全てのサブタイプを検出できないこともある。したがって、NATの採用にあたっては、可能な限りの様々なサブタ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がある。

NATは、ウイルスクリアランス工程評価においてウイルス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能性がある。また、NATを導入する場合には、検出感度の妥当性、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の解釈において十分な注意を払わなければならない。

9. 記録と保存

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

1201

については全て文書化し、保存しなければならない。

10. その他

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品審発0109第3号通知が適切に適用できる場合にはこれを参考にすること。

11. おわりに

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、考え方でなされる必要がある。

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。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。さらに、考えうるあらゆるケースを考慮しながら、全ての生物薬品に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、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物薬品の側から見れば、改めて、本参考情報に全て沿って、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、その起源、由来、種類、製造方法、特性、臨床上の用法、過去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合理的に対処していく必要があると考えられる。

1200

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)	◎	◎	◎	◎	
ウェ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)					◎
ニバウイルス(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)		◎			
ブタ繁殖呼吸器病症候群ウイルス(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)		◎			
ブタバルボウイルス(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)	◎				

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	エンベロープ	サイズ(nm)	形状	耐性
水疱性口内炎ウイルス(VSV)	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)	レスピロウイルス属(Respirovirus)又はオルトルブラウイルス属(Orthorubulavirus)	多種	RNA	有	100～200+	多様/球形	低
マウス白血病ウイルス(MLV)	レトロウイルス科(Retro)	ガンマレトロウイルス属(Gammaretrovirus)	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
ウシウイルス性下痢ウイルス(BVDV)	ペスチウイルス科(Pesti) ^注	ペスチウイルス属(Pestivirus)	ウシ	RNA	有	50～70	多様/球形	低
仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies Virus)	ヘルペスウイルス科(Herpes)	バリセロウイルス属(Varicellovirus)	ブタ	DNA	有	120～200	球形	中
オートグラフ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス(Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus)	バキュロウイルス科(Baculo)	アルファバキュロウイルス属(Alphabaculovirus)	昆虫	DNA	有	250～300	多面体	中
ベジウイルス2117(Vesivirus 2117)	カリシウイルス科(Calici)	ベジウイルス属(Vesivirus)	不明	RNA	無	27～40	正20面体	中
脳心筋炎ウイルス(EMCV)	ピコルナウイルス科(Picorn)	カルジオウイルス属(Cardiovirus)	マウス	RNA	無	25～30	正20面体	中
ウシエンテロウイルス(BEV)	ピコルナウイルス科(Picorn)	エンテロウイルス属(Enterovirus)	ウシ	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)	ポリオーマウイルス科(Polyoma)	ベータポリオーマウイルス属(Betapolyomavirus)	サル	DNA	無	40～50	正20面体	高
パルボウイルス(イヌ、マウス、ブタ)(Parvovirus : canine, mouse, porcine)	パルボウイルス科(Parvo)	プロトパルボウイルス属(Protoparvovirus)	イヌ マウス ブタ	DNA	無	18～24	正20面体	高

注：国際ウイルス分類委員会の分類では、フラビウイルス科(Flavi) ペスチウイルス属である。

1203

1204

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〈G3-14-170〉

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. 核酸増幅法(Nucleic acid amplification test : NAT)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、適切なバリデーションを実施することにより、C法をA法やB法の代替法として用いることができる。

A法、B法により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又は除去する。

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、バッチ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、ブドウ糖分解マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531, NBRC 14401又は同等の種又は株)とアルギニン分解マイコプラズマ(*Mycoplasma orale* ATCC 23714, NBRC 14477又は同等の種又は株)を陽性対照として加えた培地での試験をその都度実施し、これらの既知のマイコプラズマが検出できることを確認しておく必要がある。陽性対照試験に使用するマイコプラズマ株は、公的又は適切と認められた機関より入手後、適切に管理された継代数の低いもので、100 CFU (コロニー形成単位)以下又は100 CCU (色調変化単位)以下で培地に接種する。

3. 培養及び観察

1) カンテン平板培地1枚当たり検体(細胞懸濁液) 0.2 mL以上を、プレートに均等に広がるように接種する。カンテン平板培地は1検体当たり2枚以上とする。検体を接種した後、カンテン平板培地表面を乾燥し、5～10%の炭酸ガスを含む窒素

ガス中で、適切な湿度のもと、35～37℃で14日間以上培養する。

2) 液体培地1本当たり検体(細胞懸濁液) 10 mL以上を、100 mLの液体培地を入れた容器に接種する。液体培地は1検体当たり1本以上とし、35～37℃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。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、2,3日ごとに観察し、液体培地の色調変化を観察した日、及び色調変化が無い場合においても、3日目、7日目及び14日目の計3回にわたり、それぞれ各液体培地より0.2 mLずつを採取し、カンテン平板培地各2枚以上に接種する。カンテン平板培地での培養は5～10%の炭酸ガスを含む窒素ガス中で、35～37℃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日目に倍率100倍以上の顕微鏡でマイコプラズマの集落の有無を調べる。

B. 指標細胞を用いたDNA染色法

試験操作法の妥当性についてあらかじめ検討するため、培養Vero細胞に100 CFU以下又は100 CCU以下の*Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC 14858又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC 23714, NBRC 14477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等以上の検出感度があることを示すデータがある場合は、Vero細胞以外の指標細胞やマイコプラズマ菌株を本試験に使用することもできる。マイコプラズマ菌株は、公的又は適当と認められた機関より入手後適切に管理された継代数の低いものにつき、接種単位をあらかじめ設定した上で使用しなければならない。細胞は適当と認められた細胞保存機関からマイコプラズマが検出されていないことを確認したデータと共に入手しなければならない。入手した細胞は、マイコプラズマの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) 1 mL以上を接種する。

試験には、陰性(非接種)対照及び2種類のマイコプラズマ陽性対照を置く。陽性対照には、例えば*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981, NBRC 14858又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC 23714, NBRC 14477又は同等の種又は株) 100 CFU以下又は100 CCU以下を使用する。

細胞は5%炭酸ガスを含む空气中、35～38℃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、ビスベンズイミド(bisbenzimidazole)又は同等の染色剤によりDNA蛍光染色し、蛍光顕微鏡(倍率400～600倍又はそれ以上)でマイコプラズマの存在を鏡検する。陰性対照及び陽性対照と検体を比較しマイコプラズマ汚染の有無を判定する。

方法

1) 細胞培養用ディッシュ(直径35 mm)に滅菌したカバーグ

105 ラスを無菌的に置く。
106 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)を含むイーグル最少必須培地中にVero細胞
108 が1 mL当たり 1×10^4 細胞となるように細胞懸濁液を調製する。
109 3) Vero細胞懸濁液2 mLを各培養ディッシュに接種する。
110 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
111 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%
112 炭酸ガスを含む空气中、35～38℃で一日培養する。
113 4) 培地を新鮮な培地2 mLと交換した後、試験検体(細胞培
114 養上清) 0.5 mLを培養ディッシュ2枚以上に添加する。陰性対
115 照と陽性対照[*M. hyorhinis* (ATCC 29052, ATCC 17981,
116 NBRC 14858又は同等の種又は株)及び*M. orale* (ATCC 23714,
117 NBRC 14477又は同等の種又は株)等の2種類のマイコプラズ
118 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、35～38℃で3～6
120 日間培養する。
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) 2 mLをそれぞれに加え、5分間放置
123 する。
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、全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イミド蛍光染色液2 mLを加
128 え、ディッシュに蓋をして室温で30分間静置する。
129 10) 各ディッシュより染色液を吸引除去し、ディッシュを
130 蒸留水2 mLで3回洗浄する。カバーグラスを取り出し乾燥する。
131 11) カバーグラスに封入液を滴加して封入する。余分な封
132 入液をカバーグラスの端より吸い取る。
133 12) 倍率400～600倍又はそれ以上の蛍光顕微鏡で観察す
134 る。
135 13) 検体と陰性対照及び陽性対照の顕微鏡像を比較する。
136 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
137 1000個のうち5個(0.5%)以上あれば陽性と判定する。

138 C. 核酸増幅法(NAT)

139 核酸増幅法(Nucleic acid amplification test : NAT)は、目的
140 とする細胞やウイルス等の遺伝子や遺伝子発現により転写され
141 たmRNA等をその塩基配列に特異的なプライマーを用いて酵
142 素的に増幅し、増幅産物を種々の方法により検出する手法であ
143 る。NATをマイコプラズマ検出に用いることにより、検体(細
144 胞懸濁液又は細胞培養上清)から抽出した核酸をマイコプラズ
145 マに特異的なプライマーやプローブを用いて増幅し、マイコブ
146 ラズマに由来する核酸の存在の有無を高感度に検出することが
147 期待される。NATは目的とする塩基配列の存在を示すもので
148 あり、必ずしも生きたマイコプラズマの存在を意味するもので
149 はない。

150 NATとしては様々な手法が利用可能であり、本参考情報は
151 特定のNATの手法を規定するものではない。使用するNATは、
152 十分な感度と特異性が担保され、核酸抽出手技や反応液組成の
153 僅かな差異により異なる結果が得られることのない頑健性のあ
154 る手法を用いること。本項に示すバリデーション法により特異
155 性と感度を評価し、その妥当性が立証されるのであれば、どの
156 ようなNATの手法を用いることも可能である。市販のキット
157 を用いる場合、キットの製造業者によりバリデーションが実施
158 され、そのデータが入手可能な場合もあるが、使用する機器や

159 目的とする細胞によっては製造業者により実施されたバリデー
160 ション結果とは異なる結果が得られる可能性がある。必ず自施
161 設で製造業者のバリデーションどおりの結果が得られることを
162 確認する必要がある。特に検査対象となる細胞が異なる場合に
163 は、検出感度、再現性について確認しておく必要がある。また、
164 核酸の抽出法や検出法等で製造業者の指定する機器と異なる機
165 器を用いる場合には、採用する手法や当該機器の妥当性を検証
166 する必要がある。

167 さらに、試薬の組成やプライマー・プローブ等に関する情報
168 が製造業者から開示されない場合には、キットの内容が変更され
169 た際にも変更内容に関する情報が得られるような対策が求め
170 られる。キットの内容が変更された場合には、必要に応じ目的
171 とするマイコプラズマの検出感度や精度に差異がないことを確
172 認しておく必要がある。一方で、キットが製造中止になる場合
173 もあり、適切な代替法に変更できるような対応も考えておくこ
174 と。

175 細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖する場
176 合が多いため、細胞培養上清ではなく細胞懸濁液を検体とする
177 ことが基本的に求められる。細胞培養上清を検体として用いる
178 場合は、細胞を汚染するマイコプラズマを十分に検出できてい
179 ることの妥当性を示す必要がある。

180 NATは、以下に示すバリデーションを適切に実施すること
181 により、バリデーション法で例示した全てのマイコプラズマに
182 対して十分な感度を持って検出できる場合には、A法やB法の
183 代替法として用いることができる。

184 なお、Vero細胞を用いて検体中に存在する可能性があるマイ
185 コプラズマの増殖を図った後にNATを行い、感染性マイコ
186 プラズマ由来のDNAの検出精度を高める方法もある。この場
187 合にもバリデーション法で例示した全てのマイコプラズマが高
188 感度に検出できることが示されなければならない。

189 C-1 核酸増幅法によるマイコプラズマ否定試験の実施

190 試験は陽性対照(ランコントロール) [例えば100 CFU以下又
191 は100 CCU以下の*M. hyorhinis* (ATCC 17981, NBRC 14858
192 又は同等の種又は株)] と陰性対照を置き実施する。陽性対照
193 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
194 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
195 き、接種単位をあらかじめ設定したうえで使用しなければならない。
196 細胞懸濁液を検体とする場合にはマイコプラズマ汚染のないこ
197 とが確認された細胞を陰性対照とし、細胞由来の核酸の存在下
198 での核酸増幅法への影響についてもあらかじめ試験を実施し陽
199 性シグナルが出ないことを確認しておくこと。検体からマイコ
200 プラズマの遺伝子が増幅されないときは、この試験に適合とす
201 る。

202 C-2 試験における注意事項

203 NATは微量の核酸を増幅して検出するため、試験に用いた
204 増幅産物により、施設や機器、試薬等が汚染され偽陽性の結果
205 が得られることがある。このため、試薬の保管・調製、核酸の
206 抽出、核酸の増幅、増幅産物の検出はそれぞれ可能な限り独立
207 した施設ないし設備を用いて、細心の注意を払って実施する必
208 要がある。増幅した核酸のキャリーオーバーによる偽陽性を防
209 止する方法として、Uracil-N-glycosylase (UNG)を用いる
210 方法等が利用できる。また、核酸の抽出効率が低い場合や、
211 NATの阻害物質が検体に含まれるための偽陰性でないことを

212 確認するために、被験細胞のハウスキーピング遺伝子を内部対
213 照として同時に測定することが望ましい。

214 一方、核酸の抽出から増幅まで自動化された機器を用いるこ
215 とにより交差汚染を防ぐための対策がとられている場合には、
216 必ずしも独立した施設で実施することは不要であるが、増幅産
217 物の廃棄等に際しては汚染の起こらないような対策をとる必要
218 がある。

219 C-3 マイコプラズマ検出のためのNATのバリデーション法

220 NATによる目的核酸の検出法としては、定性的試験と定量
221 的試験がある。細胞基材へのマイコプラズマ汚染の検出には、
222 定性的試験として限度試験が考慮される。ここにマイコプラズ
223 マ汚染を検出するための定性的NATの評価方法を示す。この
224 評価方法は、適切なカットオフ値を設定した定量的NATにも
225 適用できる。

226 NATによる分析の検証に最も重要な項目は特異性と検出感
227 度である。また、分析法の頑健性も評価する必要がある。なお、
228 NATによる分析の評価には、核酸の抽出から増幅産物の検出
229 までの全工程が含まれる。

230 市販キットをNATによる試験の一部又は全部に用いる場合
231 は、キットの製造業者により添付され文書化されたフルバリデ
232 ーションデータがあれば、使用者のバリデーションの代替とし
233 て用いることが可能であり、使用者が再度フルバリデーション
234 を行う必要はない。しかし使用者は、キットの性能(特異性、
235 検出感度等)について、使用目的に十分かなっていること、使
236 用者の試験系でも目的とした性能が得られることを確認する試
237 験を必ず実施し、データを提示すべきである。

238 NATは以下の目的で用いることができる。

239 ・工程内管理の目的として

240 ・A法又はB法の代替法として

241 本項は、第一にNATそのもののバリデーション手順、第二
242 にNATとA法又はB法との比較試験のバリデーションの二つの
243 目的について書かれている。

244 なお、NATの特異性や検出感度のバリデーションにはCFU
245 又はそれに相当するコピー数等が明らかにされたマイコプラズ
246 マ参照品が様々な段階で必要とされる。また通常の試験では、
247 マイコプラズマ参照品、あるいは参照品を用いて適切に値付け
248 された検体が陽性対照として用いられる。試験では、陽性対照
249 としてマイコプラズマの菌体の他に核酸(プラスミド等)が用い
250 られることもあるが、抽出効率を含めたバリデーションの検討
251 では菌体を用いる必要がある。

252 1) 評価項目

253 特異性、検出感度、頑健性の三つのパラメーターについて評
254 価する必要がある。

255 2) 特異性

256 NATにおける特異性とは、存在が予想される検体中に含ま
257 れる標的核酸を確実に検出する能力である。NATの特異性は
258 プライマーやプローブの選択、及び試験条件の厳密さ(増幅及
259 び検出段階)に依存する。

260 マイコプラズマ(マイコプラズマ属、ウレアプラズマ属、ス
261 ピロプラズマ属、アコレプラズマ属等のモリキューテス綱の細
262 菌)に特異的で、かつ広範囲のマイコプラズマによく保存され
263 ている塩基配列に対するプライマーやプローブを用いることが
264 重要である。NATが幅広いマイコプラズマパネルを検出する
265 能力は、プライマーとプローブのデータベースとの比較による

266 理論的分析のみにより示すのではなく、3)に示された参照マイ
267 コプラズマを用いた実証評価により示されなければならない。

268 3) 検出感度

269 検出感度とは、試料中に含まれる検出可能な標的核酸の最低
270 量であり、必ずしも定量する必要はない。検出感度を確立する
271 には、NATの陽性カットオフ値を決定する必要がある。陽性
272 カットオフ値は、試験において95%の確率で検出可能な試料
273 の一定容量に含まれる標的配列の目的核酸量である。この陽性
274 カットオフ値は試験を行う試料に含まれる目的マイコプラズマ
275 遺伝子配列と酵素の活性などの要因に影響され、結果として各
276 試験により異なる95%カットオフ値が得られることになる。
277 陽性カットオフ値を決定するには、特性解析され菌濃度(CFU
278 又はコピー数等)が明らかにされたマイコプラズマ参照品又は
279 国際標準品の希釈系列について、試験ごとの変動を調べるため
280 に日を変えて試験を実施する。

281 検出感度のバリデーションには、以下の種について検討する
282 こと。選択されたこれらのマイコプラズマ種は、バイオテクノ
283 ロジー応用医薬品／生物起源由来医薬品の製造に使用される哺
284 乳動物由来培養細胞への汚染の出現頻度や系統発生、更には培
285 養等で用いられる動物由来原料を考慮して選択されたものであ
286 る。なお、このリストはバリデーションのためのものであり、
287 通常の試験でこれら全てを陽性対照として用いることを求めて
288 いるわけではない。

289 ・ *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206, NBRC 14400又は
290 同等の株)

291 ・ *Mycoplasma arginini* (ATCC 23838又は同等の株)

292 ・ *Mycoplasma fermentans* (ATCC 19989, NBRC 14854又は
293 同等の株)

294 ・ *Mycoplasma hyorhinis* (ATCC 17981, NBRC 14858又は
295 同等の株)

296 ・ *Mycoplasma orale* (ATCC 23714, NBRC 14477又は同等
297 の株)

298 ・ *Mycoplasma pneumoniae* (ATCC 15531, NBRC 14401又は
299 同等の株)

300 ・ *Mycoplasma salivarium* (ATCC 23064, NBRC 14478又は
301 同等の株)

302 昆虫細胞や植物由来細胞を製造に用いる場合は、上記のマイ
303 コプラズマに加えて、昆虫や植物に由来するマイコプラズマ
304 (*Spiroplasma citri*など)、鳥類に由来する細胞や試薬を製造に
305 用いる場合は鳥類に由来するマイコプラズマ(*Mycoplasma*
306 *synoviae*など)の検出が可能であることを評価する必要がある。

307 検出感度は、菌濃度(CFU等)を測定した原液から、適切な希
308 釈系列(10倍希釈列ないしは $10^{0.5}$ 倍希釈列)の検体を作製し、各
309 希釈に対してNATでの試験を実施する。検出限界となった希
310 釈倍数をもとに検体中の標的配列に対応する最小の菌濃度
311 (CFU等)を陽性カットオフ値として算出する。例えば、増幅産
312 物を電気泳動で分離し、蛍光染色等で陽性バンドを検出する場
313 合には、マイコプラズマを含まない細胞から得られた検体は陽
314 性バンドが検出されないことを確認すること。また、定量的
315 PCR法を用いて検出する場合には適切な増幅サイクル数を
316 カットオフ値として設定すること。また、設定したカットオフ
317 値の妥当性を証明すること。NATの検出には検体からの核酸
318 の抽出効率も影響するため、細胞懸濁液に含まれるマイコプラ
319 ズマの検出感度を評価する。

上記マイコプラズマ参照品の各菌種について、最低三つの異なる10倍希釈列を作成し、統計解析を可能とするため各希釈列について合計24となるように十分な繰り返し数を試験する必要がある。例えば、三つの希釈列を異なる日に各希釈段階で8回繰り返す、四つの希釈列を異なる日に各希釈段階で6回繰り返す、あるいは六つの希釈列を異なる日に4回繰り返して実施してもよい。希釈列の数を扱いやすい量にするために、陽性カットオフ値(陽性シグナルが得られる最高希釈倍率)を求めるための予備試験を行うべきである。希釈の範囲は予備的に求められたカットオフ値の周辺で選ぶことができる。試験により95%の確率で検出されるマイコプラズマの濃度(CFU等)を適切な統計学的解析により算出する。これらの結果は分析法の変動を評価するために用いることもできる。

4) 頑健性

頑健性とは、パラメーターの小さな意図的変動で変化しない能力の指標であり、通常の使用での分析法の信頼性を示すものである。頑健性の評価は開発段階で検討すべきである。パラメーターを意図的に変動させることにより分析法の信頼性を示す必要がある。NATでは、パラメーターの小さな変動により結果に大きく影響する可能性がある。試薬濃度(MgCl₂, プライマー, デオキシリボヌクレオチド等)を小さく変動させた試験が開発段階で実施されていれば、方法の頑健性が示される。抽出キットや抽出法の変更、サーマルサイクラーの種類の違いも評価される。

5) NATをA法及びB法の代替法として用いる場合

NATはA法(培養法)、B法(指標細胞を用いたDNA染色法)の代替法として用いることができる。この場合、同等性試験を実施する必要がある。試験では主としてNATとA法又はB法との検出感度の比較を行うが、特異性(検出可能なマイコプラズマパネル、偽陽性の結果)についても考慮すべきである。

検出感度の判定基準は以下のとおりである。

- ・A法(培養法)の代替法とする場合、NATは3)に示すマイコプラズマ7種全てについて10 CFU/mLを検出可能なことを示す必要がある。

- ・B法(指標細胞を用いたDNA染色法)の代替法とする場合、NATは3)に示すマイコプラズマ7種全てについて100 CFU/mLを検出可能なことを示す必要がある。

どちらの場合も、判定基準に達することを示すにはCFUで適切に値付けされたマイコプラズマ参照品を用いる必要がある。以下の二つの方法のうち一つをこの同等性試験として用いることができる。

- ・CFUで値付けされたマイコプラズマ株を用いてNATをA法又はB法と並行して実施し、両者の検出限界を同時に評価する。

- ・NATによる試験結果をA法又はB法の評価で得られたデータと比較する。この場合、両者の評価に用いる参照品のCFUの値付け及び安定性について注意深く説明すること。

あるいは、試料に含まれるマイコプラズマ核酸のコピー数で同等の検出感度を示すことでもよい。この場合、1 CFUに相当するマイコプラズマのコピー数等を明らかにしておく必要がある。

6) 対照群

- ・内部対照：バリデーションにおいて内部対照を用いることにより、検体由来の阻害物質等による影響を受けず核酸増幅が

適切に行われていることが確認できる。また日常の試験では、抽出操作に問題がなく、またNAT反応を阻害する物質がないことを示すために必要となる。内部対照はプライマー結合部位その他の適切な配列を用いる。検体から核酸を抽出する前に添加し、核酸の抽出、逆転写、増幅、検出の全体の対照となることが望ましい。検体となる細胞の遺伝子を内部対照として用いることもできる。

- ・外部対照：外部陽性対照は、試験条件のバリデーションに用いられるマイコプラズマ種のうち、一種類以上の適切なマイコプラズマ種について標的配列の一定のコピー数あるいは一定のCFUを含むものである。陽性対照の一つは期待される感度が達成できることを示す陽性カットオフ値近傍にセットする。陰性対照は、標的配列を含まないもので、必ずしも検体と同じマトリクスである必要はない。

7) 結果の解釈

用いたプライマーやプローブ等によってはマイコプラズマ以外の核酸を増幅し、偽陽性の結果を導くことがある。バリデーションでは必要に応じて、陽性の結果の確認のための方法を確立しておくこと。

C-4 Vero細胞中でマイコプラズマを増殖させる方法

1) 試験検体、陽性対照及び陰性対照について、それぞれ2枚以上のディッシュを使用する。

2) 細胞培養用ディッシュ(直径35 mm)に、10%ウシ胎児血清(NATによりあらかじめマイコプラズマDNAが検出されないことを確認しておく)を含むイーグル最少必須培地を用いて調製したVero細胞懸濁液(1×10^4 細胞/mL)を2 mLずつ加え、5%炭酸ガスを含む空气中、35 ~ 38°Cで1日培養する。

3) 古い培地を新鮮な培地と交換し、試験検体(細胞培養上清) 0.5 mLをVero細胞の培養ディッシュ2枚以上に接種する。陽性対照[例えば100 CFU以下又は100 CCU以下の *M. hyorhinis* (ATCC 17981, NBRC 14858又は同等の種又は株)]と陰性対照についても同じ操作を行う。

4) 試験検体、陽性対照及び陰性対照を接種したVero細胞の培養ディッシュをそれぞれ5%炭酸ガスを含む空气中、35 ~ 38°Cで3 ~ 6日間培養する。

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〈G3-15-141〉

4 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ままでもない。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ところから、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、ウインドウ期(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ビー、ウシにおけるBSE、シカの

105 Chronic Wasting Disease (CWD), ヒトにおける新型CJDな
106 どのTSEs発生地域(国)やリスクの高い地域(国)の動物, 長期(6
107 箇月以上)滞在者由来の医薬品原料や関連物質の使用を避ける
108 こと, ②スクレイピー, BSE, CJDなどを発症している個体
109 由来の物質の使用を避けること, ③リスクの高い器官, 臓器,
110 細胞などに由来する物質の使用を避けること, ④TSEsの発生
111 状況, プリオンに関する疫学的調査結果, 研究成果若しくは原
112 料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
113 を収集して的確に対応することなどである。

114 3. 医薬品原料となるヒトや動物由来の細胞について

115 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と
116 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
117 物が健康なものであることが望ましいことはいまでもない。
118 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
119 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
120 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,
121 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
122 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
123 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
124 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
125 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
126 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
127 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
128 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
129 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
130 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
131 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
132 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
133 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
134 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
135 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
136 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
137 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
138 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
139 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
140 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
141 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
142 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
143 スを勘案し, 判断することになる」。例えば, 最もよく用いら
144 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,
145 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
146 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,
147 CHO細胞などは医薬品生産に汎用されている。また, 担ガン
148 患者からの株化細胞(例: NAMALWA細胞, BALL-1細胞な
149 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
150 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
151 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
152 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
153 高いといえる。

154 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・ 155 用量の遵守が安全性確保に果たす役割

156 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
157 て安全性を保証するにはおのずと限界がある。また, 「動物の健
158 康」とは一義的に定められるものではなく, 様々な要件によつ

159 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を
160 引き起こすことがないようにすることである。この目的を達成
161 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の
162 用法・用量の遵守が果たす役割は大きい。

163 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
164 は内在性のレトロウイルス様粒子の存在が知られているが, 二
165 重三重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
166 活化・除去処理工程が取り入れられていることによる。極端な
167 例としては, 製造の手段として, 意図的にウイルスや微生物な
168 どを使用する場合もある。これについても, 製造工程や精製工
169 程に当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
170 り入れられており, 医薬品として使用することにおいて, ヒト
171 への感染の危険性は十分に否定され, 安全性が担保されるとい
172 う対応策がとられている。更に, 当該動物において, 仮にヒト
173 に対す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
174 ある場合や, 原料にウイルスなどが存在している場合があった
175 としても, 製造段階や精製段階などで適切な不活化・除去処理
176 工程が取り入れられ, その有効性が検証され, またGMPなど
177 による適切な工程管理がなされることにより, 十分に安全性が
178 確保されるならば, 当該原料の使用が可能な場合もある。

179 5. まとめ

180 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
181 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
182 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
183 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
184 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
185 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
186 もの」である。

187 なお, 本課題への対応は, その時点での科学的水準をふま
188 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
189 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
190 理的根拠に基づくものとする必要がある。

1 G4. 微生物関連

2 日本薬局方収載微生物株の学名表記について 3 〈G4-14-190〉

4 日本薬局方収載の微生物株の学名表記は、微生物データベ
5 ースや微生物保存機関等において分類学的に用いられる学名表
6 記と異なっている場合がある。これは、日局が学術書ではなく
7 法令であるために生じる。加えて、微生物の分類法の発展によ
8 り、微生物の分類及び学名がしばしば変更されていることによ
9 る。微生物関連試験に使用する微生物株の学名表記が日局にお
10 ける表記と不一致である場合は、必要に応じて微生物株の入手
11 先などに対し、両者が同一の微生物株であることを確認すると
12 よい。

1 非無菌医薬品の微生物学的品質特性〈G4-1-170〉

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。

なお、三薬局方で調和されていない部分は「◆」で囲むことにより示す。

三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

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、製造、貯蔵及び流通に際し、最新のガイドラインに従ってGMPを実施することにより、最終製品のバイオバーデンを確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)の限度の目安を基準値として示したものである。◆非無菌医薬品の微生物試験は、微生物限度試験法〈4.05〉の「Ⅰ.生菌数試験」及び「Ⅱ.特定微生物試験」に準拠して行う。◆非無菌医薬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たっては、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、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ならない。◆

◆1. 定義

- (i) 非無菌医薬品：日本薬局方の医薬品各条に収載されてい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。
- (ii) 医薬品原料：原薬、添加剤を含む医薬品製造に用いる全ての物質。ただし、医薬品製造用水及びガス類は除く。
- (iii) バイオバーデン：非無菌医薬品中に生存する微生物(細菌及び真菌)の数と種類。
- (iv) 処置基準値：直ちに調査を行い、必要に応じて是正措置をとらなければならないバイオバーデンに対して設定した基準値。
- (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、調査は行う必要があるバイオバーデンに対して設定した基準値。
- (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。

2. 試験の適用除外

生菌を有効成分とする非無菌医薬品には、通例、生菌数試験を適用しない。

3. 試料の採取方法及び試験の実施頻度

3.1. 試料の採取方法

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均一でない。偏りのある試料採取方法では、正確なバイオバーデン値を推測できない場合もある。したがって、回顧的又は同時的バリデーションで得られたバイオバーデンデータの解析に基づいて、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

たものを被験試料とする。

また、清浄度管理環境下での試料採取が困難な場合には、採取環境や採取器材に注意を払い、採取した試料のバイオバーデ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ては、採取試料中のバイオバーデンが変化しないことが確認されている場合、本試験を試料採取直後に行う必要はない。

3.2. 試験の実施頻度

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のものがある。

- (i) 非無菌医薬品の剤形(用法)
- (ii) 製造方法
- (iii) 製造頻度
- (iv) 医薬品原料の特性(天然物より製したもの、化学合成で製したもの等)
- (v) ロットサイズ
- (vi) バイオバーデン値のばらつき(ロット間、季節変動など)
- (vii) バイオバーデンに影響を及ぼす変更事項(製造工程の変更、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)
- (viii) そのほか

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、試験頻度を少なくすることができる。

4. 微生物管理計画書

非無菌医薬品に微生物限度試験法〈4.05〉を適用する場合には、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しなければならない。

- (i) 試験対象医薬品名(品目名)
- (ii) 試料採取頻度及び試験実施頻度
- (iii) 試料の採取方法(採取者、採取量、採取環境などを含む)
- (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む)
- (v) 試料の処理方法(微生物の回収方法)
- (vi) 生菌数の測定方法(供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法などを含む)
- (vii) 特定微生物の検出方法(供試量、培地の種類、培地の性能試験、培養方法などを含む)
- (viii) 生菌数の算出方法及び検出菌の性状検査
- (ix) 微生物許容基準値(警報基準値、処置基準値)の設定
- (x) 微生物許容基準値を超えた場合の対処方法
- (xi) 試験実施者、試験責任者など
- (xii) そのほかの必要な事項◆

5. 非無菌医薬品の微生物許容基準値

総好気性微生物数(Total Aerobic Microbial Count : TAMC)及び総真菌数(Total Combined Yeasts / Moulds Count : TYMC)に対する微生物許容基準値を設定する◆ことにより、医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

106 微生物学的品質の維持，改善に役立てることができる．◆
 107 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
 108 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
 109 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
 110 より一般に低いバイオーバーデン状態にあるが，植物や動物由来
 111 の医薬品原料は，一般に合成原料よりかなり高いバイオーバーデ
 112 ン状態にある．
 113 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
 114 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
 115 管理にも，細心の注意が必要である．◆
 116 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，
 117 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
 118 無菌医薬品の適用法，水との親和性などにに基づき規定されてい
 119 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
 120 いては，一般に低い微生物許容基準値が設定されている．◆
 121 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
 122 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
 123 検出されてはならない特定微生物を全て網羅しているわけでは

124 ない．ある特定の製剤では原材料の特性や製造工程によっては，
 125 ほかの微生物に対する否定試験も必要である．
 126 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
 127 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
 128 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
 129 ることができる．
 130 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
 131 要性は次のような見地によって評価される．
 132 (i) 製品の用途：危険要素は投与経路(眼球，鼻，呼吸器官)
 133 によって異なる
 134 (ii) 製品の性状：当該製品は微生物の発育を支持するのか，
 135 それとも十分な抗菌的活性を有するのか

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

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	大腸菌を認めない(1 g又は1 mL)
経口(水性製剤)	10^2	10^1	大腸菌を認めない(1 g又は1 mL)
直腸	10^3	10^2	—
口腔粘膜 歯肉 皮膚 鼻 耳	10^2	10^1	黄色ブドウ球菌を認めない(1 g又は1 mL) 緑膿菌を認めない(1 g又は1 mL)
腔	10^2	10^1	緑膿菌を認めない(1 g又は1 mL) 黄色ブドウ球菌を認めない(1 g又は1 mL) カンジダ・アルビカンスを認めない(1 g又は1 mL)
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	黄色ブドウ球菌を認めない(1パッチ) 緑膿菌を認めない(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	黄色ブドウ球菌を認めない(1 g又は1 mL) 緑膿菌を認めない(1 g又は1 mL) 胆汁酸抵抗性グラム陰性菌を認めない(1 g又は1 mL)

◆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

	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
カテゴリー1	許容基準： 10^7 最大許容値：50,000,000	許容基準： 10^5 最大許容値：500,000	大腸菌の許容基準： 10^3 (1 g又は1 mL) サルモネラを認めない(10 g又は10 mL)
カテゴリー2	許容基準： 10^5 最大許容値：500,000	許容基準： 10^4 最大許容値：50,000	胆汁酸抵抗性グラム陰性菌の許容基準： 10^4 (1 g又は1 mL) 大腸菌を認めない(1 g又は1 mL) サルモネラを認めない(10 g又は10 mL)

137

◆

138 (iii) 使用方法

139 (iv) 使用者：新生児，幼児，衰弱した人に対するリスクも異
140 なる

141 (v) 免疫反応抑制剤：皮質ステロイドの使用

142 (vi) 疾患，外傷，臓器損傷の有無

143 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
144 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
145 よってなされる。146 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
147 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
148 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
149 判定する。なお，微生物許容基準値は，個々の試験成績，又は
150 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。151 10^1 CFU：最大許容値＝20152 10^2 CFU：最大許容値＝200153 10^3 CFU：最大許容値＝2000，以下同様。

154 ◆6. 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物許容基準値

155 生薬及び生薬を配合した製剤の微生物限度の目安を基準値と
156 して表3に示す。カテゴリー1は，熱湯で処理して用いる生薬及
157 びその製剤，カテゴリー2は，そのほかの生薬及びその製剤で
158 ある。本指針では，生薬及び生薬を配合した製剤に対する特定
159 微生物として，胆汁酸抵抗性グラム陰性菌，大腸菌及びサルモ
160 ネラを掲げているが，生薬原料の由来や生薬を配合した製剤の
161 製法によっては，これら以外の微生物(例えば*Bacillus cereus*,
162 *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*
163 *aureus*, *Aspergillus*属や大腸菌群の一部の菌種)についても注
164 意を払わなければならない場合がある。原料生薬に対する微生
165 物限度はその原料が供される工程，要望される品質規格の原料
166 であることを考慮に入れたリスク評価に基づき設定する。◆

1 微生物試験に用いる培地及び微生物株の管理 2 〈G4-2-180〉

3 本参考情報は、微生物試験に用いる培地及び微生物株の試
4 験室での管理における留意事項を示すものである。

5 なお、機器については、適切に保守・管理及び校正された
6 ものを使用する。

7 1. 培地の調製及び品質管理

8 1.1. 培地の調製

9 培地を調製するときには、実施する微生物試験に適した培地
10 及び培地成分を選択する。粉末培地には成分組成及び調製指示
11 書が添付されている。培地ごとに、調製の要件(例えば、加熱、
12 添加物、pH調整など)が異なる場合があるため、適正な品質の
13 培地を調製するためには、それらの指示書に従うことが重要で
14 ある。調製年月日、秤取した粉末培地又は培地成分の名称・ロッ
15 ト番号・質量、使用した水の容量、滅菌条件、滅菌後のpH、
16 使用した機器などを記録しておく、問題発生時の原因調査な
17 どに役立つ。

18 粉末培地又は培地成分の秤取は適切に行う。また、調製時の
19 異物の混入を防ぐために、清浄な容器及び器具を使用する。培
20 地の調製に用いる水は、試験を行うのに適した水を使用するが、
21 精製水が最もよく用いられる。

22 粉末培地は、滅菌する前に水に溶解させるか、又はよく振り
23 混ぜて十分に分散させる。滅菌前に小分けする場合には、完全
24 に水に溶解させる。培地を溶解するために加熱が必要な場合に
25 は、培地を熱し過ぎないように注意する。メイラード反応など
26 による培地の褐色化は、過熱の目安の一つとなる。培地の調製
27 には、加熱、攪拌及び混合に適切な装置及び器具を使用する。
28 加熱できない成分を添加する場合には、滅菌後に適切な温度ま
29 で冷却した培地に無菌的に添加し、十分に混合する。

30 洗浄が十分でない器具などを使用して培地を調製すると、微
31 生物の発育を阻害する物質が培地に混入するおそれがある。阻
32 害物質は、器具などの洗浄後の残留洗剤、その器具などを洗う
33 前に使用した物質あるいは未使用の器具であっても製造時の残
34 留物などに由来する。洗浄工程では、確実に残留物及び異物を除
35 去し、最後に精製水などを用いて洗剤などを完全に洗い落とす。

36 培地の滅菌は、供給業者から提供されたパラメーター(温度、
37 圧力、保持時間など)又はユーザーによって検証されたパラメ
38 ーターの範囲内で実施する。熱に対して不安定な培地成分が含
39 まれる場合を除き、高圧蒸気滅菌が望ましい。培地組成によっ
40 ては、ろ過による滅菌が適切な場合もある。

41 高圧蒸気滅菌器を使用する場合には、積載物の載荷形態(ロー
42 ディングパターン: 容器の形状、大きさ、数及び配置並びに
43 被滅菌物の種類及び液量など)に応じて、全ての被滅菌物の品
44 温(培地温度)が指定された温度及び保持時間を満たす滅菌サイ
45 クル(被滅菌物の品温が指定温度に上昇するまでの工程及び滅
46 菌終了から被滅菌物を適切に取り出せる温度に下降するまでの
47 工程を含む)で行う。温度の上昇が緩やかとなる滅菌サイクル
48 は培地の過熱を招く場合もある。一般的に被滅菌物の液量が多
49 くなると滅菌サイクルはより長くなるが、総量が同じであって
50 も小分け容器の大きさ及び数にも影響されるので、適切な条件

51 を選択する。滅菌サイクルの完了後は速やかに培地を取り出し、
52 必要に応じて培地を冷却する。滅菌サイクルの影響を、培地の
53 無菌性(微生物汚染がないこと)の確認と共に培地性能試験(微生
54 物限度試験法〈4.05〉、無菌試験法〈4.06〉など参照)によって検
55 証する。

56 不適切な調製を行うことにより、発育促進特性や選択特性が
57 低下したり、色調、透明度、ゲル強度、pHなどの性状が許容
58 範囲から逸脱する場合があるので留意する。

59 培地のpHは、滅菌バッチ(一度に滅菌する単位。以下「バッ
60 チ」という。)ごとに試験サンプルを無菌的に抜き取り、常温又
61 は別に規定された温度まで冷却した後に確認する。規定された
62 温度で測定できない場合には、規定された温度に補正したpH
63 とする。カンテン培地表面に対しては先端が平らなpH電極が、
64 液体に対しては浸漬型のpH電極が推奨される。培地のpHは、
65 指定された範囲内とする。ただし、培地性能試験や適合性試験
66 (微生物限度試験法〈4.05〉、無菌試験法〈4.06〉など参照)によ
67 り、更に広い範囲が許容されることが確認された場合を除く。

68 調製した培地(カンテン平板培地や試験管などに分注した培
69 地)は、名称、バッチ番号、調製日などで識別する。また、下
70 記の事項に留意する。

- 71 (i) 容器の破損
- 72 (ii) 容器間の分注量の不均一
- 73 (iii) 培地成分などの付着による容器の汚れ
- 74 (iv) 褐色化又は変色
- 75 (v) 気泡
- 76 (vi) 酸化還元電位指示薬の状態(該当する場合)
- 77 (vii) 溶血(該当する場合)
- 78 (viii) 結晶などの形成
- 79 (ix) 亀裂や窪みを生じるような乾燥
- 80 (x) 微生物による汚染

81 1.2. 培地の保存

82 培地及び培地成分を保存する場合には、品質低下を防ぐため
83 に、入手するまでの輸送条件も含め、下記の事項に留意する。

- 84 (i) 乾燥、蒸発、吸湿
- 85 (ii) 温度
- 86 (iii) 微生物汚染
- 87 (iv) 異物の混入
- 88 (v) 破損

89 また、培地又は培地成分には、名称、バッチ又はロット番号、
90 保存条件、使用期限などを表示し、識別する。

91 調製後の培地の保存条件及び使用期限については、設定した
92 条件で保存した場合に、使用期限の最後まで当該培地の性能が
93 許容基準を満たしていることを、培地性能試験やその他の必要
94 な品質試験により検証し、安定性を確認して設定する。

95 長期間保存する場合には、水分の蒸発を防ぐことができるよ
96 うな包装材、包装形態、容器及び栓を選択する。また、必要に
97 応じて遮光する。カンテン培地は、凍結によりカンテンのゲル
98 構造が破壊されるため、凍結を避けて保存する。

99 なお、保存後に再融解したカンテン培地については、性能試
100 験を実施し、適合性を確認した上であれば、確認された使用期
101 限内で使用することは差し支えない。また、カンテン培地の再
102 融解は、過熱による品質低下や汚染の可能性を避けるため、1
103 回までとするのが望ましい。再融解は、加熱した水浴中又は流
104 通蒸気中で行うことを推奨する。培地の融解に電子レンジや加

105 熱プレートを使用することは、培地全体に均一に熱がかからず
106 過熱による培地の劣化や容器の破損などが発生する可能性がある
107 ため、留意する。

108 滅菌直後のカンテン培地又は再融解した培地は、45 ～ 50℃
109 又は別に規定された温度で保持するが、品質低下や汚染のリス
110 クを考慮して、長時間の保持は避ける。また、水浴で保持する
111 場合は、ペトリ皿への分注時の水槽水由来の汚染に注意する。

112 使用した培地や期限切れの培地を廃棄する際は、必要に応じ
113 て滅菌し、汚染防止に配慮する。

114 1.3. 品質管理試験

115 調製された全ての培地について、バッチ又はロットごとに下
116 記の品質管理試験を行う。調製された培地には、市販培地及
117 びキット化された培地(スワブ、ストリップなどとセットになっ
118 たもの)も含まれる。

119 (i) 培地性能(発育促進特性、必要に応じて選択特性や鑑別特
120 性)

121 (ii) pH(市販培地は必要に応じて)

122 冷蔵状態で購入又は保存した培地は、常温又は別に規定
123 された温度に戻して確認する。

124 (iii) 無菌性(微生物汚染がないこと)

125 無菌医薬品製造区域のグレードA及びBの環境モニタリ
126 ング用培地は、多重包装品を使用するか若しくは外装を消
127 毒又は除染し、定められた手順で搬入する。包装後の滅菌
128 処理がされていない培地は、制御された環境への外来汚染
129 及び偽陽性結果を防ぐために、使用する前に全ての培地
130 (全数)を培養することにより、微生物汚染がないことを確
131 認する。

132 なお、市販培地には試験成績書が添付されており、そこに
133 は培地性能試験に使用した標準微生物株と共に、保存条件及び
134 使用期限が記載されている。受入時に供給業者から試験のデー
135 タを入手し、書面又は現地調査などによりそのデータが信頼で
136 きるものであり、培地性能試験結果及び使用期限の妥当性に
137 ついて確認できれば、バッチ又はロットごとではなく、定期的
138 に品質管理試験を行うことでもよい。

139 培地と同様に品質管理試験が必要なものとして、グラム染色
140 試薬やオキシダーゼ試薬などの微生物同定試験用試薬がある。

141 これらは、受入時又は使用時に、適切な標準微生物株を選定し
142 て品質管理試験を行う。

143 2. 微生物株の維持管理

144 微生物試験の精度と結果の再現性を保つ上で、保存微生物株
145 を適切に取り扱うことは非常に重要である。試験室での微生物
146 株の保存及び取扱いは、汚染に注意し、当該微生物の増殖特性
147 の変化を最小とするような方法で行う。公定法で使用する微生
148 物株は、微生物保存機関又は適切な供給業者から、凍結品、凍
149 結乾燥品、斜面培養品又は調製済みの形態で入手できる。入手
150 した微生物株は、品質管理試験に使用する前又は使用時に、選
151 択性のない平板培地に塗抹し、出現コロニーが単一であること
152 などで他の菌の混入がないことを確認する。また、必要に応じ
153 て、分与された菌種の確認を行う。

154 保存用微生物株は、微生物保存機関などから指定された方法
155 で復元する。微生物株の保存の管理には、シードロット培養管理
156 手法(シードロットシステム)の適用が推奨される。シードロッ
157 トシステムとは、継代による性状変化を避けるために保存微生
158 物株の継代回数を管理するシステムである。一継代は、新鮮培

159 地への移植培養として定義する。どのような形態の移植培養で
160 も、継代とみなす。管理に当たっては、少なくとも下記の事項
161 に留意する。

162 (i) 微生物保存機関などから入手した微生物株を復元(継代回
163 数1回目)して得られた培養物を、1世代目として数える。

164 (ii) 継代回数を管理する。

165 (iii) 培地性能試験や適合性試験に用いる微生物株については、
166 継代回数5回を超えて使用しない。

167 微生物株の保存には、凍結保存法、乾燥保存法、継代培養保
168 存法などがあるが、凍結保存する場合の一例を示す。微生物保
169 存機関などから入手した標準微生物株を適切な培地で復元培養
170 し、生育させる。この培養菌(1世代目)の一部を凍結障害を防
171 ぐ保護剤を含む溶液に懸濁してバイアルなどに移し、菌種に応
172 じて適切な温度で凍結保存する。多くの微生物株は-70℃以
173 下に維持することにより長期間の保存が可能となる。2世代目
174 以降を大量に作製しておけば、標準微生物株の入手及び調製の
175 頻度を下げることができる。

176 一度開封した容器は、保存微生物株の生育能力の低下と汚染
177 のリスクを避けるため、再凍結せずに廃棄する。

178 3. 参考資料

179 1) WHO: WHO Good Practices for Pharmaceutical Micro-
180 biology Laboratories (WHO Technical Report Series,
181 No.961, Annex 2, 2011).

182 2) US Pharmacopeia 43 (2020), <1117> Microbiological
183 Best Laboratory Practices.

1 微生物試験における微生物の取扱いのバイオリスク管理〈G4-11-181〉

本参考情報は、一般試験法の微生物学的試験法(4.02抗生物質の微生物学的力価試験法、4.05微生物限度試験法、4.06無菌試験法)、生薬試験法(5.02生薬及び生薬を主たる原料とする製剤の微生物限度試験法)、参考情報のG3.生物薬品関連(日局生物薬品のウイルス安全性確保の基本要件〈G3-13-141〉)、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〈G3-14-170〉)、G4.微生物関連(保存効力試験法〈G4-3-170〉、微生物迅速試験法〈G4-6-170〉、遺伝子解析による微生物の迅速同定法〈G4-7-160〉、蛍光染色による細菌数の迅速測定法〈G4-8-152〉、消毒法及び除染法〈G4-9-170〉)などの実施に際して考慮すべき微生物の安全な取扱いにおける基本要件を示すものである。

微生物を取り扱う作業に当たり、試験実施により生じるバイオリスクを的確に管理することが求められる。微生物を取り扱う際のリスクは、微生物の特性と取扱い作業内容により異なるため、そのリスクマネジメントにおいては、個々の作業ごとにリスクアセスメントを行ってリスクを特定、分析及び評価し、微生物取扱い者を防護すると共に、実験室バイオセーフティ上及びバイオセキュリティ上のリスクを低減することが必要である。その実践に際しては、組織内にバイオリスク管理に関する責任者及び担当者を置き、運営のための規則と計画の策定に当たる。リスクを低減するために安全管理、個人用防護具、安全機器及び物理的封じ込め施設・設備の4要素を組み合わせ、実験室バイオセーフティ対策を行う。構築したリスクマネジメント方法は、継続的なリスクレビューにより更新する¹⁾。

微生物の取扱いにおけるバイオリスク管理に必要な基本的な考え方を以下に示す。

1. 用語の定義

本参考情報で用いる用語の定義は、次のとおりである。

1.1. **実験室(Laboratory)**：検査、試験、研究のための実験などを行う目的で微生物を取り扱う施設・設備。

1.2. **バイオハザード(Biohazard)**：生物及び生物由来物質による災害。

1.3. **微生物リスクレベル分類**：微生物取扱い者及び関連者に対する微生物のリスクを分類したもの。

1.4. **実験室バイオセーフティ(Laboratory Biosafety)**：バイオハザードのリスクに応じたリスク低減対策をバイオセーフティと呼ぶ。病原体又は毒素の意図しない曝露や拡散及び偶発的漏洩を予防するのが目的である。中でも、実験室バイオセーフティは、安全管理、個人用防護具、安全機器及び物理的封じ込め施設・設備の4要素を組み合わせで行う。

1.5. **実験室バイオセーフティレベル(Biosafety Level, BSL)**：実験室バイオセーフティを実践する4要素の組合せによりBSL1からBSL4に分けられ、個々のBSLに応じたリスク低減対応策を構築する。

1.6. **バイオセキュリティ(Biosecurity)**：防護・監視を必要とする重要な生物材料(Valuable Biological Materials)への不正アクセス、紛失、盗難、濫用、悪用、流用又は意図的な放出を防止するための実験施設内における防御や制御を示す。

1.7. **バイオリスク(Biorisk)**：実験室バイオセーフティ及びバイオセキュリティ上の両方を併合し、危害をもたらす有害な事象(偶発的感染、不正アクセス、紛失、盗難、濫用、悪用、流用又は意図的な放出など)が起こる可能性や機会の全てを含む。

1.8. **バイオリスクマネジメント(Biorisk Management)**：リスクアセスメント(Assessment)、リスク低減(Mitigation)、実施(Performance)の3要素で構成されている。

1.9. **微生物取扱い者**：実験室において直接微生物を取り扱う者及び実験室施設の維持管理のために実験室へ入室する者。

1.10. **関連者**：微生物取扱い者と直接あるいは間接的に接触する実験室使用者、微生物取扱い者の同僚あるいは同居人など感染の可能性がある者。

1.11. **標準微生物学実験手技(Good Microbiological Technique, GMT)**：微生物を安全に取り扱う標準的技術。技術取得のための教育プログラム、標準作業手順書、規則などの整備を含む。

1.12. **個人用防護具(Personal Protective Equipment, PPE)**：微生物取扱い者をバイオハザードから防護するために個人で装着する用具一式。例えば、マスク、呼吸器保護具、ゴーグル、手袋、防護服、靴カバーなど。

1.13. **安全機器(Safety Equipment)**：微生物取扱い者を生物学的危険物質曝露から防護する装置、機器、器材一式。例えば、電動ピペット、密閉容器、生物学用安全キャビネット(Biological Safety Cabinet)など。生物学用安全キャビネットは、機器内で発生したエアロゾルの機器外への漏出を防ぐことを目的とした装置のことで、開口部に気流によるエアバリアを形成して機器内外を隔絶する開放型と閉鎖されたグローブボックス型の装置がある。

1.14. **物理的封じ込め施設・設備(Physical Containment)**：微生物リスクレベル分類に応じて微生物の取扱いを安全上管理する施設・設備。物理的封じ込めレベルによりP1からP4までの4段階に分類される。

1.15. **管理区域**：バイオリスク管理が必要な区域。微生物取扱い実験室の他、バイオハザードのリスクがあると考えられる廃棄物処理施設・設備、排水処理施設・設備、空調機械室などを含む。

2. 微生物取扱いにおけるリスクアセスメント

個々の試験の実施計画において微生物取扱い作業に伴う以下のリスクについて評価する。

2.1. 実験室バイオセーフティ上問題になるリスク

2.1.1. 微生物の特性によるリスク

(i) 微生物のリスクレベル分類によるリスク
微生物は、分類上の種や株ごとにヒトに危害を及ぼす程度が異なることから、微生物に感染した場合の微生物取扱い者の症状や関連者への影響を考慮し、リスクが低いものから順に微生物リスクレベル1から4までに分類する(表1)。個々の微生物リスクレベルの分類は、国や地域、対象(ヒトや家畜)、有効な治療法や予防法の有無、感染の成立に必要な最少感染量、感染経路、使用する量、作業内容などによって異なる。なお、国内に存在しない微生物は高いリスクレベルに分類する場合が多い。

103 表1 微生物リスクレベル分類

微生物リスク レベル	基準
1	微生物取扱い者及び関連者に対するリスクが無いか、低いリスク。ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがないもの(健康人に病気を発生させることのないもの)。
2	微生物取扱い者に対する中程度のリスク、関連者に対する低いリスク。ヒトあるいは動物に感染すると疾病を起こし得るが、微生物取扱い者や関連者に対し、重大な健康被害を起こす可能性が低いもの。有効な治療法、予防法があり、関連者への伝播のリスクが低いもの、すでに多くの者が免疫をもっており感染を容易に予防できるもの。
3	微生物取扱い者に対する高いリスク、関連者に対する低いリスク。ヒトあるいは動物に感染すると重篤な疾病を起こすが、通常、感染者から関連者への伝播の可能性が低いもの。有効な治療法、予防法があるもの。
4	微生物取扱い者及び関連者に対する高いリスク。ヒトあるいは動物に感染すると重篤な疾病を起こし、感染者から関連者への伝播が直接又は間接に起こり得るもの。通常、有効な治療法、予防法がないもの。

104 (ii) 微生物の感染経路や曝露経路によるリスク

105 微生物取扱い者に曝露が想定される微生物の感染経路を検討
106 する。自然感染では口腔、鼻腔、眼の粘膜が感染経路になりや
107 すく、粘膜への接触、経口感染、飛沫感染、空気感染、媒介昆
108 虫の有無などを検討する。実験室内感染においては、針刺し感
109 染、皮膚の傷からの感染、器具などの汚染物への接触による感
110 染に留意する。

111 (iii) 宿主の感受性によるリスク

112 使用する微生物に対する微生物取扱い者の感受性が異なるリ
113 スクについて検討する。ワクチンが存在する微生物の場合、適
114 切なワクチン接種により微生物取扱い者に抵抗性を付与し、当
115 該感染症の発症などのリスクを減らすことができる。

116 (iv) 関連法規に定める微生物によるリスク

117 法律²⁻⁵⁾により定められている微生物種、株及び毒素は、そ
118 れらの使用、所持、保管、移動などに当たり、関連する法律を
119 遵守する。一般的事項については、それらを詳述した法令、通
120 知、事務連絡などを参照する。

121 2.1.2. 取扱い作業によるリスク

122 (i) 取り扱う微生物の形状や量によるリスク

123 ピペット操作などは飛沫やエアロゾルを発生する場合が多く、
124 微生物を含むエアロゾルは気流によって広範囲に拡散するリス
125 クが大きい。取り扱う微生物種、株及び毒素の量が多くなるに
126 従い、それらに付随するリスクが高くなることを考慮する。

127 (ii) 微生物取扱い者の技量によるリスク

128 取り扱う微生物に関する十分な知識を有しない者又は適切な
129 微生物の取扱い方法について十分な教育・訓練を受けていない
130 者の作業は、リスクが高くなることを考慮する。

131 (iii) 取り扱う器具の形状によるリスク

132 ガラス器具を作業に用いることは、破損によって微生物を含
133 む内容物の汚染リスクが高くなるだけではなく、破損物で生ず
134 る傷などを介して感染するリスクが高くなることを考慮し、ガ
135 ラス器具を用いる際には、リスクを考慮して用途を検討する。

136 (iv) 作業内容に伴うリスク

137 液体又は粉体を含む容器の開封、ピペット又はピペッターを

138 用いた液体の取扱い、ボルテックスミキサーによる液体の攪拌、
139 遠心分離後の上清を他の容器に移し替える操作などは、エアロ
140 ズルを発生させるリスクが高くなることを考慮する。

141 (v) 作業工程ごとのリスク

142 作業工程が複数ある場合、各工程の作業内容によりリスクが
143 異なることを考慮する。

144 (vi) 微生物の受入・分与のリスク

145 微生物、株及び毒素の受入・分与に伴い、新たなリスクが生
146 じることを考慮する。

147 (vii) 微生物移動時のリスク

148 微生物を含む試料を移動する際には、管理区域内移動と管理
149 区域外への移動の場合でリスク(外部への影響)が異なることを
150 考慮する。

151 (viii) 感染性廃棄物のリスク

152 作業中に微生物で汚染した全ての器具や試料は、消毒、除染
153 又は滅菌して微生物を不活化させるまでは感染のリスクがある
154 感染性廃棄物として取り扱う。

155 (ix) 緊急時のリスク

156 微生物取扱い者の微生物曝露、施設・設備の汚染、微生物の
157 管理区域外漏洩などが発生した時の緊急時対応を考慮する。

158 2.2. バイオセキュリティ上問題になるリスク

159 微生物を取り扱う施設への入室管理や微生物の保管管理方法
160 が適切にとられていない状況は、微生物への不正アクセス、紛
161 失、盗難、濫用、悪用、流用、意図的な放出などがバイオセキ
162 ュリティ上のリスクになる。

163 3. 微生物取扱いにおけるリスク低減対策

164 評価により明らかになった各リスクに対しては、微生物取扱
165 い者や関連者にリスクを及ぼさないように、必要な対策を講じ
166 てリスクを低減する。実施に当たっては、以下の内容を含む。

167 3.1. バイオリスクマネジメント体制の構築

168 微生物を保有し、取り扱う機関は、微生物取扱い者の人数に
169 係わらず、バイオリスクマネジメントに関する管理組織の構築
170 が求められる⁶⁻⁸⁾。

171 ・管理組織における役割、権限、責任を明確にする。

172 ・バイオリスクマネジメントに関する責任者を置く。

173 ・バイオリスクマネジメントの担当者を置く。

174 ・バイオリスクマネジメント運営のための規則並びに計画を策
175 定する。

176 実施する内容には、以下のものがある。

177 ・実験室バイオセーフティ上問題になるリスクを低減する。

178 ・バイオセキュリティ上問題になるリスクを低減する。

179 ・バイオリスク教育・訓練を実施する。

180 ・管理区域の施設・設備の維持管理計画を策定して実施する。

181 ・関連法規を遵守する。

182 3.2. 実験室バイオセーフティ上問題になるリスクの低減

183 微生物取扱いにおけるリスク低減対策には、主なものとして
184 安全管理、個人用防護具、安全機器・器材、物理的封じ込め施
185 設・設備の4要素がある。バイオリスクに応じて4要素を組み
186 合わせた実験室バイオセーフティ対策(表2)を行い、リスクを
187 低減する⁹⁾。

188 (i) 安全管理(Safety Management)

189 安全管理には、関連する全ての事項を含み、以下のものが必
190 要である。

191 ・微生物の安全な取扱いに必要な諸項目に関する規則を策定す

る。

- ・標準微生物学実験手技(GMT)に基づく標準作業手順書を整備する。
- ・標準微生物学実験手技(GMT)を取得するため、継続的な教育・訓練を行う。
- ・微生物取扱者の健康管理に関し、使用する微生物に対するワクチンなどの効果的な予防法がある場合には、微生物取扱者のワクチン接種歴を活用する仕組みを導入する。
- ・緊急時対策を整備する。
- ・バイオリスク教育・訓練を実施する。

(ii) 個人用防護具

作業時には、適切な個人用防護具(PPE)を用い、微生物曝露のリスクを低減する。個人用防護具(PPE)は、取り扱う微生物の特徴と感染経路及び作業内容によって適切なものを選択する。

(iii) 安全機器

電動ピペットなどを用い、微生物取扱者が直接微生物に接触することが無いようにする。器具・器材は破損しにくい材質の漏出しにくい容器を使用する。注射針などの鋭利な器具を廃棄する際は、鋭利な器具が貫通しない容器(注射針回収容器など)に廃棄する。

表2 実験室バイオセーフティレベル(BSL)分類と対策

BSL 分類	安全管理	個人用防護具	安全機器	施設・設備 (物理的封じ込めレベル)
BSL1	標準微生物学実験手技及び管理体制(管理組織、取扱い手順書、教育・訓練)	個人用防護具	安全機器	P1(基本実験室)
BSL2	BSL1の要求に加えて、微生物リスクレベル2に対応した標準微生物学実験手技	BSL1の要求に加えて、微生物リスクレベル2に対応した個人用防護具	BSL1の要求に加えて、微生物リスクレベル2に対応した安全機器	P2(微生物リスクレベル2に対応した基本実験室)
BSL3	BSL2の要求に加えて、微生物リスクレベル3に対応した専用標準微生物学実験手技	BSL2の要求に加えて、微生物リスクレベル3に対応した専用個人用防護具	BSL2の要求に加えて、微生物リスクレベル3に対応した専用安全機器	P3(物理的封じ込め実験室)
BSL4	BSL3の要求に加えて、微生物リスクレベル4に対応した専用標準微生物学実験手技	BSL3の要求に加えて、微生物リスクレベル4に対応した専用個人用防護具	BSL3の要求に加えて、微生物リスクレベル4に対応した専用安全機器	P4(高度物理的封じ込め実験室)

各微生物リスクレベルに応じた総合的なリスクマネジメント方法をBSL1からBSL4に分類し、BSLの数値が上がるにつれて、新たに発生、懸念されるリスクに応じて対応策を順次追加、強化する。特にBSL3及びBSL4では、専用の標準微生物学実験手技、個人用防護具及び安全機器を用いる必要がある。

微生物を開放系で取り扱う作業は、生物学用安全キャビネットなどで行い、発生するエアロゾルに含まれる微生物の曝露や作業場所への拡散のリスクを低減する。エアロゾル感染のリスクが高い試料は、エアロゾルを封じ込める対策を施した遠

心機を使用する。生物学用安全キャビネットなどの中で使用した安全機器などは、生物学用安全キャビネットなどの中で消毒後に持ち出す。

微生物(芽胞や胞子を含む)は、封じ込め性能が担保されていないクリーンベンチで取扱わない。

(iv) 物理的封じ込め施設・設備

微生物の特性及び作業内容をもとにリスクアセスメントでリスクレベルを設定し、必要な物理的封じ込め施設・設備を使用する。施設・設備には、封じ込めレベルごとに定められた要件があり^{10, 11)}、物理的封じ込めレベル3(P3)以上の施設・設備では、作業中に発生する微生物を含むエアロゾルによる微生物取扱者への曝露の防止と周辺への漏洩を防止する有効な対策が必要である。

(v) 微生物受入・分与時のリスク低減

受入及び分与に際しては、関連する法律²⁻⁵⁾を遵守する。機関内に新たに微生物を受け入れる際には、その機関において微生物リスクをアセスメントして実験室バイオセーフティレベル(BSL)を設定すると共に、緊急時や曝露時の対応策など必要事項を事前に決めておく。分与に際しては、事前に分与先の実験室バイオセーフティを確認する。一般的事項については、それらを詳述した法令、通知、事務連絡などを参照する。

(vi) 微生物移動時のリスク低減

微生物試料を移動する際は、管理区域内での移動においても適切な漏洩防止策をとる。管理区域外に移動する際には、試料が漏れない三重梱包を施すことが基本となる¹²⁾。施設外に移動する際には、法律²⁻⁵⁾を遵守する。

(vii) 感染性廃棄物のリスク低減

感染性廃棄物は、対象となる微生物に適切な薬剤又は高圧蒸気滅菌法などにより確実に不活化する。不活化処理は、管理区域内で完結する。

(viii) 緊急時のリスク低減

微生物の曝露、漏洩などの緊急事態が発生した場合に備えて、適切な対処方法を文書化する。対処方法には、連絡方法、連絡網の整備、具体的な対処方法、必要な器材・器具の備蓄、それらに対する教育・訓練を含む。それらを実施する組織体制を確立しておく。

3.3. バイオセキュリティ上問題になるリスクの低減

バイオセキュリティ上問題になるリスクの低減には、以下の内容を含む¹³⁾。

(i) 微生物取扱者のアクセスコントロール

- ・ID管理
- ・微生物取扱者の登録管理
- ・施錠
- ・入退室管理

(ii) 微生物のコントロール

- ・微生物の保管出納管理

3.4. バイオリスク教育及び訓練

微生物取扱者の技量の向上のため、微生物の取扱いに関するリスクの理解とその対策に関する教育訓練を行う。微生物の特性、作業によるリスク、標準微生物学実験手技(GMT)の取得と訓練、緊急時対応などが重要である。教育・訓練は、繰り返し行う。

3.5. 関連法規の遵守

法律²⁻⁵⁾で指定される特定微生物などの取扱いについては、

275 微生物や毒素の所持, 出納管理, 移動などについて, 関連する
276 法律を遵守する. 一般的事項については, それらを詳述した法
277 令, 通知, 事務連絡などを参照する.

278 4. バイオリスクマネジメントのレビューと更新

279 バイオリスクマネジメントが有効に機能していることを評価
280 するため, リスクアセスメント(Assessment), リスク低減
281 (Mitigation), 実施(Performance)が適切に行われていること
282 を定期的にレビューし, マネジメント計画を更新する. 適切に
283 管理する手法として例えば計画Plan・実行Do・評価Check・改善
284 Act (PDCAサイクル)などがある.

285 5. 参考資料

- 286 1) 日本薬局方, 参考情報「品質リスクマネジメントの基本的
287 考え方 (G0-2-170)」.
- 288 2) 平成10年法律第114号「感染症の予防及び感染症の患者に
289 対する医療に関する法律」(平成11年4月1日施行).
- 290 3) 昭和26年法律第166号「家畜伝染病予防法」(昭和26年6月
291 1日施行).
- 292 4) 昭和25年法律第151号「植物防疫法」(昭和25年5月4日施
293 行).
- 294 5) 平成15年法律第97号「遺伝子組換え生物等の使用等の規
295 制による生物の多様性の確保に関する法律(カルタヘナ法)」
296 (平成16年2月19日施行).
- 297 6) CEN (European Committee for Standardization), CWA
298 (CEN Workshop Agreement) 15793 「Laboratory biorisk
299 management」, 2011年9月.
- 300 7) ISO/DIS 35001: 2019, Biorisk management for
301 laboratories and other related organisations.
- 302 8) CEN (European Committee for Standardization), CWA
303 (CEN Workshop Agreement) 16393 「Laboratory biorisk
304 management-Guidelines for the implementation of CWA
305 15793: 2008」, 2012年1月.
- 306 9) WHO, Laboratory biosafety manual Third Edition, 2004.
307 ISBN 92-4-154650-6.
- 308 10) 昭和36年2月1日厚生省令第2号「薬局等構造設備規則」
309 第八条「特定生物由来医薬品の製造者等の製造所の構造設
310 備」.
- 311 11) 平成16年12月24日厚生労働省令第179号「医薬品及び医
312 薬部外品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令」第二
313 章第四節「生物由来医薬品の製造管理及び品質管理」.
- 314 12) WHO, Guidance on regulations for the Transport of
315 Infectious Substances 2013-2014.
- 316 13) WHO, Biorisk management: Laboratory biosecurity
317 guidance, 2006

1 微生物学的試験法の適合性試験等における留意事項<G4-12-190>

本参考情報は、微生物限度試験法〈4.05〉、無菌試験法〈4.06〉、生薬及び生薬を主たる原料とする製剤の微生物限度試験法〈5.02〉及び参考情報「保存効力試験法〈G4-3-170〉」の適合性試験等における留意事項を示すものである。

1. 試験の実施

微生物学的試験法の適合性試験は、被験製品について微生物試験を初めて実施する際に、選択した試験法の微生物検出能力を確認するため、微生物試験の実施前又は同時に行うことが望ましい。試験結果に影響を及ぼすような試験法の変更や、製品の処方変更があった場合には、再度確認する。

2. 試験菌の選定及び調製

微生物には様々な性質を持つものが含まれ、その性質は抗菌活性に対する反応や回収に必要な中和法に影響を及ぼす。試験の目的に応じて、細菌、酵母及びかびの中から、代表する試験菌を選定する。

試験菌の発育状態や調製方法は、試験菌の細胞の生理活性に影響を及ぼす。試験菌は標準化された安定な懸濁液を使用するか、又は規定された液体培地若しくはカンテン培地を用いて調製された新鮮培養菌を使用することで、均質で変動の少ない調製又は再現性のある調製が可能となる。参考情報「保存効力試験法〈G4-3-170〉」においては、試験菌の生理活性が結果に影響を及ぼす可能性が高いため、新鮮培養菌を使用することが望ましい。

3. 試料調製

試料調製作業が被験製品に存在する微生物に影響を与える可能性がある場合には、その影響を確認する。試料液を供試するまで放置する場合には、菌数などに変化がないことを確認する。

4. 抗菌活性を有する試料に対する一般的な追加手順

被験製品に抗菌活性が認められ、その抗菌活性を除去するために試験法を変更する場合には、変更後の試験法で適合性試験を繰り返して結果の再現性を確認する。

4.1. 希釈

被験製品を希釈することで抗菌活性を中和する。有効な希釈倍率は、被験製品によって異なる。中和に必要な希釈倍率が高い場合には、他の方法によって中和する。

なお、希釈することにより、製品試験において規定された微生物許容基準値(参考情報「非無菌医薬品の微生物学的品質特性〈G4-1-170〉」参照)での判定が困難となる場合には、適宜平板の使用枚数や培地の本数を増やすとよい。

4.2. 中和剤の使用

中和剤の使用については、微生物限度試験法〈4.05〉「I.非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験」の3.4.3.を参照する。阻害物質に対する一般的な中和剤は、微生物限度試験法〈4.05〉表4.05-I-2を参照する。

被験製品が抗生物質の場合には、一般的な中和剤による影響を受けにくく、酵素処理(ペニシリナーゼ、 β -ラクタマーゼなど)による影響を受けやすい。酵素処理を行う場合は、最小発育阻止濃度(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)などの情報を参考とし、適切な濃度で使用するとよい。

4.3. 膜ろ過

一般的にメンブランフィルターを用いて行う。メンブランフィルターには様々な材質があるため、被験製品の性質や成分を考慮し、適切な材質を選択する。例えば、抗菌活性のない試料にはセルロース混合エステルなど、水溶性、油性又は低濃度のアルコール性溶液にはセルロースナイトレートなど、高濃度のアルコール性溶液にはセルロースアセテートなどの材質のフィルターが用いられる。また、フィルターへの抗菌物質の吸着を低減させるために、ポリビニリデンフロライド(PVDF)などの低吸着性フィルターが用いられることもある。

被験製品中の抗菌物質を除去するために、フィルターを適切な溶液で洗浄することができる。適合性が確認できれば、フィルター上に残留若しくは吸着した抗菌物質の中和又は試料の懸濁化などを目的として、例えばポリソルベート80(濃度：1 g/L)のような界面活性剤を洗浄液に添加しても差し支えない。

5. 試験菌の接種

微生物限度試験法〈4.05〉及び生薬及び生薬を主たる原料とする製剤の微生物限度試験法〈5.02〉の生菌数試験において、試料液を調製する場合には、抗菌活性の影響を確認するため、最初に調製した試料液(最も低い希釈率)に試験菌を接種する。調製した試料液を更に希釈して供試する場合も、最初に調製した試料液に試験菌を接種する。中和剤を加えた希釈液を使用する場合にも、最初に調製した試料液に試験菌を接種する。希釈、中和剤の使用、膜ろ過などの様々な手段を講じても抗菌活性を除去又は中和できない場合には、調製可能な範囲で最大限に希釈した試料液や膜ろ過後のフィルターの最終洗浄液に試験菌を加えてもよい。なお、被験製品をそのまま膜ろ過に供する場合には、膜ろ過後のフィルターの最終洗浄液に試験菌を接種する。

6. 培地の追加

原則として、微生物試験で規定された培地の種類を変更することはできないが、被験製品の性質や成分又は汚染微生物の種類によっては、規定外の培地を用いる方が適切な場合もある。やむを得ない事情により、規定された培地に追加する場合は、以下の事項に留意する。

6.1. 生菌数試験用又は無菌試験用などの非選択培地の場合

微生物限度試験法〈4.05〉や無菌試験法〈4.06〉などを参考として培地性能試験を実施し、微生物検出能力を確認する。

なお、微生物には発育するために特定の成分を必要とするものや、逆に、特定の成分の存在下では発育できないものがある。非選択培地であっても、培地成分の違いによって、検出される微生物の数や種類及び発育した集落の外観が異なる可能性があることに留意する。

6.2. 特定微生物試験用の選択培地の場合

微生物限度試験法〈4.05〉などを参考として培地性能試験を実施し、微生物検出能力を確認する。培地成分の違いにより、鑑別反応が異なることに留意する。

7. 培養時間

培地性能試験及び適合性試験の培養時間は、それぞれ規定されている時間とする。

ただし、試験菌の増殖確認及び菌数測定が可能であることが確認された適切な時間を採用する。

なお、適合性が確認された試験法で実施する製品試験において、規定されている培養時間の中で最短の培養時間を採用する場合には、その妥当性を確認する。

106 8. 製品試験における集落数の計測

107 カンテン平板法での集落数の計測は、適切な希釈倍数で行う。

108 製品試験では一般的に、細菌及び酵母では1平板当たり250

109 CFU未満、かびでは50 CFU未満の集落数を目安として計測す

110 る。計測後、培地ごとに算術平均をとり、希釈倍率を乗じて生

111 菌数を算出する。

1 保存効力試験法〈G4-3-170〉

保存効力試験法は、多回投与容器中に充填された製剤自体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法である^{1,2)}。製剤に試験の対象となる菌種を強制的に接種、混合し、経時的に試験菌の消長を追跡することにより、保存効力を評価する。

汚染微生物の増殖には、製品中の水分活性が重要な役割を果たしている。多回使用される医薬品では、使用される間に微生物の二次汚染による変質・変敗を起こす可能性があり、微生物汚染した医薬品を使用した場合は、薬効の低下のみならず汚染微生物により感染症を引き起こす危険性も高くなる。これらのことから多回使用される医薬品には、日本薬局方製剤総則において保存剤の配合が認められている。

医薬品GMPに対応するために、又は単に生菌数(細菌数及び真菌数)を抑制する目的のためだけに、保存剤を使用してはならない。保存剤は量によっては毒性を示すことから、ヒトへの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、製剤自体の抗菌作用又は製剤に添加された保存剤の効果は、製剤の有効期間にわたって検証しなければならない。なお、抗菌性保存剤含量の試験は、通常、出荷時に行う必要があるが、場合によっては、出荷判定試験の代わりに製造工程管理試験として行うことも可能である。

1. 製剤とそのカテゴリー

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(表1)。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で、水分活性0.6以上の製品と定義する。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に含まれる。

表1 製剤のカテゴリー

カテゴリー	製剤の種類
Ⅰ A	・注射剤 ・水性溶剤に溶解又は分散させた無菌の製剤(点眼剤、点耳剤、点鼻剤等)
Ⅰ B	・水性溶剤に溶解又は分散、若しくは水溶性の基剤に混和させた非無菌の局所投与製剤(点耳剤、点鼻剤、吸入剤、その他粘膜に使用される製剤等を含む)
Ⅰ C	・水性溶剤に溶解又は分散、若しくは水溶性の基剤に混和させた制酸剤以外の経口投与する製剤及び口腔内に適用する製剤
Ⅰ D	・水性溶剤又は水溶性の基剤で調製した制酸剤
Ⅱ	・非水溶性の基剤又は溶剤を用いて作られた製剤で、カテゴリーⅠに記載している全ての剤形を含む。

2. 試験菌株、培地性能及び生菌数測定法の適合性

2.1. 試験菌の調製

試験菌は、最初のマスターシードロットからの継代数5回を超えないように、シードロット培養管理手法(シードロットシステム)を用いて管理する。細菌及び真菌の各試験菌について、

表2に示す菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を使用し、表2に示す条件でそれぞれ個別に培養する。

表2 試験菌株と培養条件

試験菌	株名	培地	培養温度	試験菌の培養期間
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739 NBRC 3972	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30 ~ 35℃	18 ~ 24 時間
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027 NBRC 13275	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30 ~ 35℃	18 ~ 24 時間
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 NBRC 13276	ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地 ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地	30 ~ 35℃	18 ~ 24 時間
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 NBRC 1594	サブロー・ブドウ糖液体培地 サブロー・ブドウ糖カンテン培地	20 ~ 25℃	44 ~ 52 時間
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404 NBRC 9455	サブロー・ブドウ糖カンテン培地	20 ~ 25℃	6 ~ 10 日間

これらの指定菌株に加えて、製剤の性質により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することが望ましい。例えば、シロップ剤等の高糖濃度製剤には *Zygosaccharomyces rouxii* (NCYC 381; IP 2021.92 ; NBRC1960)を用いて試験することが望ましい。試験菌の培養は、カンテン培養又は液体培養のいずれかを採用する。

カンテン培養：上記5種の菌株をそれぞれカンテン平板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・ダイジェストカンテン培地を、真菌の場合はサブロー・ブドウ糖カンテン培地を使用する。細菌の場合は30 ~ 35℃で18 ~ 24時間、*Candida albicans*は20 ~ 25℃で44 ~ 52時間、*Aspergillus brasiliensis*は20 ~ 25℃で6 ~ 10日間又は十分な孢子が形成されるまで培養する。細菌及び*C. albicans*は培養菌体を無菌的に採取し、生理食塩液に浮遊させ、約10⁸ CFU/mLの生菌を含む浮遊液を調製する。*A. brasiliensis*の場合には、ポリソルベート80を0.05%の割合で添加した生理食塩液に浮遊させ、約10⁸ CFU/mLの孢子を含む浮遊液を調製する。必要に応じて孢子浮遊液を、滅菌ガーゼやガラスウールなどでろ過して菌糸を除く。全ての調製菌は必要に応じて遠心分離して培地成分を取り除くこと。これらの浮遊液を接種菌液として使用する。

液体培養：上記4種(*A. brasiliensis*は除く)の菌株をそれぞれソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地又はサブロー・ブドウ糖液体培地で培養後、遠心分離して培地を除く。菌体は生理食塩液で洗浄して、同じ溶液で約10⁸ CFU/mLの生菌を含む接種菌液を調製する。

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菌に適した方法を採用する。カンテン培養法と液体培養法のいずれにおいても、得られた接種菌液を2時間以内に被検製剤に接種できない場合には、2～8℃に保存し、24時間以内に使用する。*A. brasiliensis*の胞子は、通常、7日間までは2～8℃に保存できる。接種菌液中の生菌数を使用直前に計測し、得られた菌数値より接種直後における製剤1 mL又は1 g当たりの理論接種菌数を算出する。

2.2. 培地性能

保存効力試験用の培地は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地、サブロー・ブドウ糖カンテン培地の中から適当なものをを用いる。他の培地等でも類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似の増殖性を持つものは使用して差し支えない。使用する培地は、表2に指定する菌株、若しくはこれらと同等と考えられる菌株を用いて培地性能試験を実施する。培養日数は、ソイビーン・カゼイン・ダイジェストカンテン培地の場合は3日以内、サブロー・ブドウ糖カンテン培地の場合は5日以内とする。

カンテン培地では、得られる集落数は標準化された菌数の計測値の50%以上でなければならない。新鮮培養菌を用いて試験する場合は、有効性が確認された培地バッチ以前に得られた発育と同等の発育が認められなければならない。

2.3. 生菌数測定法の適合性

試験製剤1 mL又は1 g以上をとり、9倍量の生理食塩液又は他の適切な中和液で希釈し(10^{-1} 希釈)、攪拌後、更に連続10倍希釈を行う(10^{-2} , 10^{-3} 希釈)。試験菌ごとに各試験製剤希釈液の適量を試験管にとり、適切な数の試験菌を接種し、一平板当たり細菌及び*C. albicans*は250 CFU以下(理想的には25～250 CFU)、*A. brasiliensis*の場合は、80 CFU以下(理想的には8～80 CFU)になるように、適切な量を少なくとも2枚(又は計測のバラツキを最小とするためにそれ以上)のペトリ皿に分注する。本手法の陽性対照として、同じ試験菌を同量、生理食塩液に接種し、同じようにペトリ皿に分注する。試験製剤の希釈液は、陽性対照菌数に比較し、50%以上の菌回収率を示すものとする。発育が阻害される場合は、試料液の調製に用いる緩衝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えないことを確認する必要がある。保存剤や製剤そのものの存在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、微生物限度試験法(4.05)に記載されているメンブランフィルター法により生菌数を測定する。生菌数測定法の適合性は、試験材料や試験方法に変更があった場合、又は製剤に試験結果に影響を及ぼすような変更があった場合には再度確認すること。適合性の確認において、接種菌数に対する回収菌数が50%以上の場合には、0日目の混合試料中の生菌数は、接種菌数から換算した理論値としてもよい。カテゴリⅡ製剤は、3.2項を参考に適切な方法で生菌数を測定する。

3. 試験手順

3.1. カテゴリⅠ製剤

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入し、均一に混合する。なお、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る。製剤の容器の中に菌液を無菌的に混合しにくいとき、又は製剤1容器当たりの量が少ない場合に

は、滅菌した別の容器に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を対照として保存し、生菌数を測定する。混合する接種菌液の量は製剤の0.5～1.0%とする。通常、製剤1 mL又は1 g当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFUの生菌数になるように接種、混合する。カテゴリⅠD製品(制酸剤)の場合は、製品1 mL当たり $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ CFUの生菌数となるように接種する。これらの容器を遮光下で20～25℃に保存し、0、7(カテゴリⅠAのみ)、14及び28日目に混合試料中の生菌数を測定する。上記の期間中、混合試料に顕著な変化(例えば、色調の変化、異臭の発生、かびの発生等)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評価検討する。生菌数の経時的な変化は、接種菌数(CFU/mL又はg)からの対数減少値で表される。生菌数測定は、原則として微生物限度試験法(4.05)に記載されているカンテン平板法(カンテン平板混釈法、カンテン平板表面塗抹法)、又はメンブランフィルター法による。本試験法との同等性が示されている場合は、カテゴリⅠ及びⅡ製剤に自動化を含む別の微生物学的方法を用いてもよい³⁾。

3.2. カテゴリⅡ製剤

カテゴリⅠで示された手順と同様に行うが、試験菌を製剤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には、特別の手法と配慮が要求される。

半固形の軟膏基剤製品では、試料を45～50℃に加熱して油状とし、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とを確認する必要がある。生菌数測定のために混合試料を緩衝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添加することが望ましいこともある。特に、半固形の軟膏剤や油性製剤などに接種された微生物を緩衝液や液体培地中に均一に分散させるには、ソルビタンモノオレイン酸エステル、ポリソルベート80、レシチンなどを使用するとよい。これらは汎用されている保存剤の多くを不活化、又は中和させる作用がある。

4. 判定

保存効力の判定は、表3に従う。表3に記されている試験結果が得られた場合、本試験に適合と判定する。なお、無菌製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を要する。また、非無菌製剤中の汚染菌数が、参考情報「非無菌医薬品の微生物学的品質特性(G4-1-170)」に定める菌数を超える場合にも、試験操作上又は製造管理上の注意を要する。“菌数から増加しないこと”とは、先の測定値からの増加が $0.5 \log_{10}$ 以下であることをいう。

表3 製剤区分別判定基準

カテゴリー	微生物	判定基準
I A	細菌	7日後：接種菌数に比べ1.0 log以上の減少
		14日後：接種菌数に比べ3.0 log以上の減少
		28日後：14日後の菌数から増加しないこと
	真菌	7日後，14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
I B	細菌	14日後：接種菌数に比べ2.0 log以上の減少
	真菌	28日後：14日後の菌数から増加しないこと
I C	細菌	14日後：接種菌数に比べ1.0 log以上の減少
	真菌	28日後：14日後の菌数から増加しないこと
I D	細菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
II	細菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと
	真菌	14日後，28日後：接種菌数から増加しないこと

181 6. 参考資料

182 1) European Pharmacopoeia 8.0 (2014), 5.1.3. Efficacy of
183 Antimicrobial Preservation.184 2) US Pharmacopeia 38 (2015), <51> Antimicrobial
185 Effectiveness Testing.

186 3) 日本薬局方，参考情報「微生物迅速試験法〈G4-6-170〉」

165 5. 培地等

166 保存効力試験用の培地を以下に掲げる。他の培地等でも類似
167 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似
168 の選択性や増殖性を持つものは使用して差し支えない。

169 (i) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0 g
ダイズ製ペプトン	3.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖一水和物	2.5 g
水	1000 mL

170 滅菌後のpHが25℃で7.1 ～ 7.5になるようにpHを調整する。

171 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

172 (ii) 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	15.0 g
ダイズ製ペプトン	5.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

173 滅菌後のpHが25℃で7.1 ～ 7.5になるようにpHを調整する。

174 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

175 (iii) サブロー・ブドウ糖カンテン培地

ブドウ糖	40.0 g
ペプトン(肉製及びカゼイン製1：1)	10.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

176 滅菌後のpHが25℃で5.4 ～ 5.8になるようにpHを調整する。

177 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

178 (iv) サブロー・ブドウ糖液体培地

ブドウ糖	20.0 g
ペプトン(肉製及びカゼイン製1：1)	10.0 g
水	1000 mL

179 滅菌後のpHが25℃で5.4 ～ 5.8になるようにpHを調整する。

180 確認されたサイクルで高圧蒸気滅菌する。

1 エンドトキシン試験法と測定試薬に遺伝子組換えタンパク質を用いる代替法〈G4-4-180〉

エンドトキシンは、グラム陰性細菌の細胞壁外膜に存在するリポ多糖(Lipopolysaccharide)であり、様々な生物活性を示す。エンドトキシンは血中に入ると極微量で発熱を惹起し、大量ではエンドトキシンショックから死に至らしめるような強い毒性を発揮する。また、環境中に広く存在しているグラム陰性菌に由来すること、耐熱性を示し容易に失活しないことから、エンドトキシンは医薬品の製造工程などにおいて混入する可能性があり、更に混入の可能性がある発熱性物質の中で特に強力な作用を示すことから、医薬品などの安全性確保のために管理すべき物質として位置づけられている。エンドトキシン試験法〈4.01〉は、カプトガニの血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、エンドトキシンを高感度に検出できる *in vitro* 試験法であり、注射剤などに適用される。一方、カプトガニの保護、試薬の安定供給、試薬ロット間差の低減及び試験の安定性の向上を目的に、ライセート試薬に代わるものとして遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬が開発された。

本参考情報では、エンドトキシン試験法〈4.01〉におけるライセート試薬及び測定方法に加え、遺伝子組換えタンパク質を利用したエンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際の測定及び測定上の留意点を示す。

1. エンドトキシン試験法の測定原理

エンドトキシン試験法〈4.01〉は、カプトガニ(*Limulus polyphemus*又は*Tachypleus tridentatus*)の血球抽出成分より調製されたライセート試薬を用いて、エンドトキシンを検出又は定量する方法である。これは、カプトガニの血球抽出成分がエンドトキシンにより凝固する反応を利用した試験法であり、その凝固反応はエンドトキシンにより引き起こされる複数のセリンプロテアーゼによる連鎖反応に基づいている(図1)。エンドトキシンがカプトガニの血球抽出成分に含まれるC因子を活性化して活性型セリンプロテアーゼに変換し、それが次のB因子、更に凝固酵素前駆体を連続的に活性化して、最後に凝固性タンパク質であるコアグュローゲンがコアグュリンに加水分解されると、不溶性のゲルが形成されて凝固する。また、カプトガニの血球抽出成分は、エンドトキシンだけでなく主に(1→3)-β-D-グルカンにも反応し、G因子から始まる連鎖反応により凝固する。

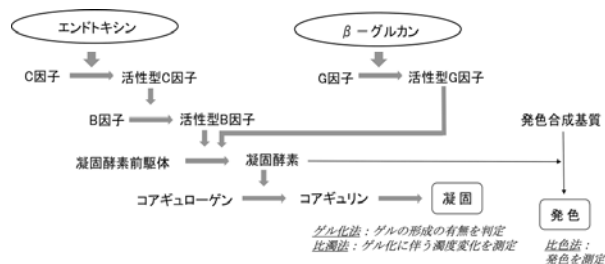
2. エンドトキシン試験法における測定方法

エンドトキシン試験法〈4.01〉には、ライセート試液のゲル形成を指標とするゲル化法及び光学的变化を指標とする光学的定量法がある(図1)。

ゲル化法は、ゲルの形成の有無を目視で確認する方法であり、判定には特別な機器を必要としない。ゲル化法には限度試験法及び定量試験法があり、前者は被検試料が各条に規定されたエンドトキシン規格を超えるエンドトキシンを含むか否かを、ライセート試薬の表示感度を指標として判定する方法で、後者は被検試料中のエンドトキシン量を、ゲル化反応を示した最大の試料希釈倍数(エンドポイント)を求めることにより定量する方

法である。

光学的定量法には、比濁法及び比色法がある(図1)。いずれもライセート試液と試料溶液を混和し、一定時間後又は経時的に反応液を分光光度計で測定する。比濁法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度変化を吸光度又は透過率を用いて測定する方法で、比色法は、エンドトキシンとライセート試液との反応により、発色合成基質から遊離される発色基の量を吸光度又は透過率を用いて測定する方法である。



59

図1 エンドトキシン試験法〈4.01〉における測定原理及び測定方法

3. エンドトキシン試験法に用いる試薬

エンドトキシン試験法〈4.01〉に用いるライセート試薬は、各測定法に対応した複数の試薬がある。エンドトキシン及びβ-グルカンに対する反応性から試薬を分類すると、C因子から始まる反応系及びG因子から始まる反応系の両方を含む試薬と、G因子を除去、又はG因子系の反応を抑制し、C因子から始まる反応系によりエンドトキシンのみを検出する試薬に分類され、被検試料や試験の目的に応じて選択する。

ゲル化法に用いるライセート試薬には、凝固(ゲルの形成)を呈する最小のエンドトキシン濃度が表示感度(エンドトキシン単位(EU)/mL)として試薬メーカーにより設定されている。その表示感度を指標として被検試料の適否が判定される。正確な試験結果を得るために、エンドトキシン試験法〈4.01〉の4.1.予備試験 4.1.1. ライセート試薬の表示感度確認試験により、表示感度が適切であることを確認する。幾何平均エンドポイント濃度が規定の範囲内でない場合は、試験条件を整備して再試験を行う。再試験においても幾何平均エンドポイント濃度が規定の範囲内でない場合は、そのライセート試薬は使用できない。

光学的定量法に用いるライセート試薬は、比濁法、比色法のいずれにおいても、定量可能な濃度範囲内で3濃度以上の標準溶液により検量線を作成するが、エンドトキシン試験法〈4.01〉の5.3.予備試験 5.3.1. 検量線の信頼性確認試験により、試験者の試験操作及び試験条件が適切であることを確認する。光学的定量法に用いるライセート試薬には、表示感度は表示されていないが、検量線に用いた最小の標準溶液濃度が表示感度に相当する。

医薬品の多くは、エンドトキシン試験において、程度には差はあるが何らかの反応干渉作用を示す。一般に、試料溶液に存在する反応干渉因子の影響は希釈により回避できることが多いが、その場合、エンドトキシン試験用水などで最大有効希釈倍数を超えない範囲で希釈して測定する。最大有効希釈倍数は、許容される試料溶液の最大の有効希釈倍数であり、エンドトキシン試験法〈4.01〉の3. 最大有効希釈倍数の求め方に示されている通り、ゲル化法に用いるライセート試薬については表示感度、光学的定量法に用いるライセート試薬については検量線の

97 最小濃度が λ であり、 λ が小さいほど最大有効希釈倍数が大き
98 くなる。光学的定量法に用いるライセート試薬の λ は、ゲル化
99 法に用いるライセート試薬の λ より小さい試薬が多い。被検試
100 料に含まれる反応干渉因子が明確な場合は、それを取り除く処
101 理を行う。取り除くことができない、あるいは反応干渉因子が
102 明確でなく、反応干渉作用が回避できない場合は、他のライセ
103 ート試薬を用いるか、測定法を変更することを検討する。

104 4. 遺伝子組換えタンパク質を利用したエンドトキシン測定試 105 薬を用いて代替法とする際の測定及び測定上の留意点

106 遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、
107 カプトガニの血球抽出成分に含まれる因子の遺伝子情報を利用
108 して作製したタンパク質を用いたものである。カプトガニ(例
109 えば*Carcinoscorpius rotundicauda*, *T. tridentatus*)の血球抽
110 出成分に含まれるC因子の遺伝子情報を用いて作製した遺伝子
111 組換えタンパク質を用いる試薬、カプトガニ(例えば*T.*
112 *tridentatus*)の血球抽出成分に含まれるC因子、B因子及び凝
113 固酵素前駆体それぞれの遺伝子情報を利用して作製した遺伝子
114 組換えタンパク質を用いる試薬などがある。前者のC因子(遺
115 伝子組換え)を用いた試薬には、エンドトキシンがC因子(遺伝
116 子組換え)を活性化し、活性型C因子(遺伝子組換え)が蛍光合成
117 基質に作用することにより生じる蛍光量を測定するものがある。
118 後者の三種類の遺伝子組換えタンパク質で構成される試薬には、
119 比色法の測定法と同様に、エンドトキシンがC因子(遺伝子組
120 換え)を活性化し、それがB因子(遺伝子組換え)、更に凝固酵素
121 前駆体(遺伝子組換え)の連続的な活性化により、発色合成基質
122 から遊離される発色基の量を測定するものがある。いずれの試
123 薬も、試液と試料溶液を混和し、一定時間後又は経時的に反応
124 液を光学的に測定する方法で、蛍光強度又は吸光度を測定する。

125 遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定試薬は、
126 エンドトキシン試験法〈4.01〉で規定されている「カプトガニ
127 の血球抽出成分より調製されたライセート試薬」には該当しな
128 い。エンドトキシン測定試薬を用いて代替法とする際は、ライ
129 セート試薬を用いたエンドトキシン試験法〈4.01〉と比較して、
130 同等以上の真度、精度、感度、特異性などが得られることを確
131 認する。遺伝子組換えタンパク質を用いたエンドトキシン測定
132 試薬のうち、感度、特異性などがライセート試薬を用いた方法
133 と同等以上であることが報告されているものがある。医薬品な
134 どのエンドトキシン試験法〈4.01〉を遺伝子組換えタンパク質
135 試薬を用いて行う際は、エンドトキシン試験法〈4.01〉の光学
136 的定量法と同様に、5.3. 予備試験 5.3.1. 検量線の信頼性確認
137 試験も実施する必要がある。その場合、検量線の最小濃度が λ
138 (EU/mL)に相当する。また、反応干渉作用について留意する
139 必要があり、5.3.2. 反応干渉因子試験も実施する。蛍光量を測
140 定するなど、エンドトキシン試験法〈4.01〉では用いられてい
141 ない測定法を利用する場合、蛍光の発生を阻害するといった、
142 ライセート試薬での測定では影響のなかった物質が干渉作用を
143 示す可能性についても留意する必要がある。また、エンドトキ
144 シン試験法〈4.01〉で規定されているカプトガニ(*L.*
145 *polyphemus*又は*T. tridentatus*)と異なるカプトガニのタンバ
146 ク質の遺伝子情報を用いて作製した試薬については、そのタン
147 パク質(遺伝子組換え)の違いがエンドトキシンに対する反応性
148 に影響を及ぼす可能性について留意すべきである。

1 エンドトキシン規格値の設定〈G4-5-131〉

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。

$$4 \text{ エンドトキシン規格値} = \frac{K}{M}$$

5 ただし、 K は、発熱を誘起するといわれる体重1 kg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1 kg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1 kg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60 kgを用いる。
19 3) 体重1 kg当たりの小児投与量が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 単球活性化試験法〈G4-13-190〉

2 1. はじめに

3 発熱性物質試験法〈4.04〉は、発熱性物質の存在をウサギを
4 用いて試験する方法であるが、動物福祉の観点から単球活性化
5 試験(Monocyte Activation Test : MAT)が開発された。単球活
6 性化試験はグラム陰性菌由来のエンドトキシンのほか、非エン
7 ドトキシン汚染因子として、グラム陽性菌、グラム陰性菌、ウ
8 イルス及び真菌に由来する病原体関連分子パターン
9 (Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMPs)並びに医
10 薬品の製造過程に起因する生物学的及び化学的汚染因子を検出
11 する。

12 本参考情報では、単球活性化試験を用いて発熱性物質を検出
13 する際の留意点について述べる。

14 2. 単球活性化試験の概要

15 単球活性化試験は、ヒトの単球や単球系細胞を活性化して腫
16 瘍壊死因子 α (TNF- α)やインターロイキン- 1β 、インター
17 ロイキン-6などの炎症性サイトカインなど内因性物質の産生
18 を誘導する物質を検出又は定量する方法である。これらの物質
19 が発熱機序に関与しているため、単球活性化試験は間接的に試
20 料中の発熱性物質を検出することになる。

21 非エンドトキシン汚染因子は多様で、通常は試料溶液の汚染
22 因子の同定は困難であるため、以下のいずれかの方法で試験す
23 る。

24 方法1：半定量試験

25 方法2：参照ロット比較試験

26 試料溶液中の発熱性物質のレベルは、エンドトキシン標準品
27 に対する反応(方法1)又は試料溶液の参照ロット(方法2)と比較
28 し、それぞれ等価エンドトキシン量(EE)又は参照ロットに対
29 する相対値で表す。

30 発熱・炎症応答を惹起する非エンドトキシン汚染因子を含む
31 医薬品は、エンドトキシンの用量反応曲線と比較して急勾配の
32 用量反応曲線を示すことがある。そのため、非エンドトキシン
33 汚染因子を含む又は含んでいる可能性のある医薬品は、最小希
34 釈倍率を含む複数の希釈倍率で試験を行う必要がある。

35 3. 基本手法

36 ヒトの単球又は単球系細胞を含む材料(例えば末梢血単核細
37 胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells : PBMC)、単球系細
38 胞株、又は同等性が示された細胞株)を試料溶液と共に培養す
39 る。選択した測定指標が適切に評価可能な期間を培養時間とす
40 る。試料溶液について選択した測定指標の試験結果を、エンド
41 トキシン標準品又は試料溶液の参照ロットに関する測定指標の
42 試験結果と比較する。

43 4. 器具

44 全てのガラス製品及びその他の耐熱性器具を、検証された方
45 法を用いて乾熱処理を行い、発熱性物質を除去又は不活化する。
46 マルチウェルプレートやマイクロビペット用チップなどのプラ
47 スチック製器具を使用する場合は、検出可能な発熱性物質によ
48 る汚染がなく試験に干渉しないことが確認されたものを使用す
49 る。

50 5. 使用する細胞

51 本試験には、全血、PBMC又は単球系細胞株が使用可能で
52 あり、様々な細胞源の取扱いと細胞の適格性を以下に示す。

53 5.1. 全血

54 5.3., 5.4., 5.5.及び該当する場合は6.3.に記載する条件を満
55 たす単一の提供者に由来する全血又は複数の提供者に由来する
56 全血を使用する。

57 5.2. 末梢血単核細胞(PBMC)

58 PBMCは、5.3., 5.4., 5.5.及び該当する場合は6.3.に記載す
59 る条件を満たす単一の提供者又は複数の提供者に由来する全血
60 から分離する。

61 5.3. 血液提供者の条件

62 血液提供者は健康、安全性、倫理的懸念に関連する条件を満
63 たす者でなければならない。

64 5.4. 複数の提供者に由来する細胞の条件

65 複数の提供者に由来する全血又はPBMCを使用する場合は
66 6.3.に記載するように非エンドトキシン汚染因子を検出すること
67 を確認する。

68 使用する全血は最低4人のドナーからの献血で構成され、各
69 ドナーからほぼ同量の血液又はほぼ同数の細胞が試験に使用さ
70 れる。

71 5.5. 冷凍保存細胞の条件

72 単球活性化試験での使用を意図した細胞(ヒト全血、PBMC
73 などの血液分画物や単球系細胞株)を冷凍保存することも可能
74 である。複数の提供者に由来する冷凍保存細胞は、冷凍前に調
75 製するか、若しくは冷凍保存していた単一血液を解凍直後に混
76 和するなどによって調製する。エンドトキシンに対する用量反
77 応曲線を6.1.に従って確認する。また、非エンドトキシン汚染
78 因子検出を目的とする場合には、6.3.に従って検証する。

79 5.6. 単球系細胞株

80 単球系細胞株は、以下の要件が確認されればエンドトキシン
81 及び非エンドトキシン汚染因子の検出に適している。

82 単球活性化試験に十分供給できるだけのヒト単球系細胞株を
83 培養する。供給手段を最適化するためにクローン化された細胞
84 株を使用する場合もある。

85 細胞は無菌条件下で管理し、定期的にマイコプラズマなどの
86 汚染の有無を確認する。さらに細胞の特性(倍加時間、形態、
87 機能など)を定期的に確認する。細胞株の機能的安定性は継代
88 数に応じて細胞の特性のモニタリングを行うことで評価する。
89 機能的安定性の基準を確立する必要がある。これには増殖性や
90 試験で得られる最大シグナル、背景ノイズ、受容体シグナル伝
91 達が含まれる場合がある。受容体シグナル伝達は、パターン認
92 識受容体(例えばToll様受容体)に対する特定のリガンド(特定の
93 受容体と特異的に結合して生物学的応答を引き起こす物質)で
94 試験することができる。

95 エンドトキシンに対する用量反応曲線を6.1.に従って確認す
96 る。また、非エンドトキシン汚染因子検出を目的とする場合に
97 は、6.3.に従って検証する。

98 なお、測定指標に炎症性サイトカインの発現に関わる転写因
99 子などを用いる場合は、非エンドトキシン汚染因子検出の妥当
100 性を示す必要がある。

101 6. 測定上の留意点

102 試験の妥当性を検証するため予備試験を実施する。この予備
103 試験において、6.1.に記載するエンドトキシン標準曲線の条件
104 が満たされており、試料溶液が試験に干渉せず、試験でエンド
105 トキシン及び非エンドトキシン汚染因子が検出され、溶液が検
106 出システムに干渉しないことを確認する。

試験結果に影響するおそれのある試験条件の変更がある場合はその都度予備試験が必要となる。

6.1. エンドトキシン標準曲線の保証

エンドトキシン標準溶液を用いて、標準曲線を作成するために少なくとも四つのエンドトキシン濃度を調製する。エンドトキシン標準溶液の各濃度を少なくとも $n=4$ で試験する。

ブランク(エンドトキシン標準溶液の添加がない条件)の測定値は可能な限り低くすることが望ましい。

標準曲線については統計的に適切な手法によって有効性を保証する。

6.2. 干渉因子の検証

予備試験において、試料溶液が試験に干渉しないことを確認する。適切な希釈溶媒を用いて試料溶液を適宜希釈するが、全ての希釈が最大有効希釈倍数(汚染因子の限界濃度を決定できる試料の最大許容希釈度)を超えないようにする。最大有効希釈倍数の計算はエンドトキシン標準品に基づいており、以下の式を用いて求める。

$$\text{最大有効希釈倍数} = CLC \times C / LOD$$

CLC : 汚染因子の限界濃度

C : 試料溶液の濃度

LOD : 検出限界

試料溶液及びエンドトキシン標準品を適切な濃度で添加した試料溶液を使用し、エンドトキシン標準曲線を用いて各溶液中のエンドトキシン濃度に相当する発熱性物質濃度を算出する。エンドトキシン添加試料溶液で検出された発熱性物質濃度から、エンドトキシン無添加試料溶液で検出された発熱性物質の平均濃度を減じて、エンドトキシン添加試料溶液中のエンドトキシン濃度を算出した後、添加したエンドトキシンの平均回収率を算出する。平均回収率が50 ~ 200%の場合、試料には干渉因子がないものとみなされる。

6.3. 非エンドトキシン汚染因子に関する検証

予備試験では選択した試験系がエンドトキシンの他に非エンドトキシン汚染因子を検出することを確認する。確認の際は、非エンドトキシン汚染因子によって汚染されており、発熱性物質試験法(4.04)にて陽性と判定された、あるいはヒトにおいて有害反応を生じさせたことが明らかになっている過去の参照ロットを用いて行うことが可能である。そのような参照ロットが入手不可能な場合、予備試験では、二つ以上のパターン認識受容体(例えばToll様受容体)に対する特定のリガンドを用いて試験系を検証する。添加した非エンドトキシン汚染因子の回収率が50 ~ 200%の場合、試料には干渉因子がないものとみなされる。ただし、回収率が200%を超えた場合であっても、試験条件の変更によって非エンドトキシンと試料の間の相乗効果の可能性を排除できない場合には、200%を超えることが許容される。検証に使用する非エンドトキシン発熱性物質の選択は、試料溶液に含まれている可能性の高い汚染因子を反映するものとする。試験系は少なくともToll様受容体4のリガンドであるエンドトキシンと他の二つのToll様受容体のリガンドが検出されることを確認する必要がある。

6.4. 検出システムにおける干渉

試料溶液の最適な希釈倍数を確認後、選択した測定指標の検出システム(酵素免疫測定法など)の干渉について検証する。

7. 試験法

以下に示す二つの方法がある。予備試験後に実施する。

方法1: 半定量試験

方法2: 参照ロット比較試験

方法1では、試験される試料溶液とエンドトキシン標準溶液の標準曲線との比較が行われる。予備試験と同様に、試験ごとにエンドトキシン標準曲線を作成し、反応干渉因子の影響を確認する。方法2では、試料溶液が最大有効希釈倍数を超えない範囲では反応干渉因子の影響を回避できない場合や、非エンドトキシン汚染因子が含まれていると考えられる場合に、試験される試料溶液と検証済み参照ロット(臨床試験などを通じて安全性及び有効性が検証済の製剤)との比較が行われる。いずれの方法も試験ごとにエンドトキシン標準品を用いた陽性対照と適切な陰性対照を置き、具体的な手順及び判定については妥当性が検証された単球活性化試験の方法に従う。

8. 参考資料

- 1) European Pharmacopoeia Supplement 11.5 (2024), 2.6.30 Monocyte-activation test.
- 2) European Pharmacopoeia Supplement 11.5 (2024), 2.6.40 Monocyte-activation test for vaccines containing inherently pyrogenic components.

1 微生物迅速試験法 (G4-6-190)

従来の培養法を用いた微生物試験は、結果判定に数日間以上を要し、微生物用培養培地の選択種によっては10日間以上を要する場合もある。そこで近年の科学技術の進歩により、細菌の生理活性、菌体成分等を高精度に測定できる方法が数多く開発され、新たな細菌検出法、計数・計量法が登場している。また1980年代以降の環境微生物学分野における研究の進展により、環境中の細菌の多くは従来の培地ではコロニー形成能が低く、培養法のみではそのような細菌を検出、計数・計量、同定しがたいことが明らかとなってきた。細菌数・細菌量の測定に当たっては、得られる結果が利用する手法により異なり、最新の手法を用いても、真値を得ることは難しい点に留意すべきである。また、各手法のバリデーションのための標準菌株は存在するが、生理活性も含めて標準化することは容易ではない。新手法は従来法と比較し、必ずしも全ての点において優れて

いるわけではないが、迅速性及び精度においては優位であることが多く、真菌やウイルス等にも応用可能であることより、その積極的な活用は関連分野における微生物管理レベルの向上に大きく役立ち、微生物汚染に伴うリスクの低減等に貢献する。

培養を基本とする従来法ではコロニーや微生物増殖に伴う濁度の変化などを指標とするのに対し、新手法では測定対象及び測定原理が従来法とは大きく異なる。また、環境中に生息する微生物の解析に当たっては、特定の微生物に着目する方法と共に、微生物群集を網羅的に理解することの重要性が認識されつつある。本参考情報では微生物迅速試験法の原理及びバリデーションと応用分野を紹介し、また利用に当たっての考慮すべき点を述べる。

1. 測定対象及び測定原理

微生物迅速試験法には様々な測定原理と、用途に特化した測定装置が開発されている。各種測定原理、測定対象、特徴、測定装置の例、想定される用途例を表1に示す。ここに掲載するものは事例であり、具体的な用途や装置は個別の事例によって異なるため、この表によって制限や推奨をするものではない。

表1 測定対象及び測定原理

名称	測定対象	原理・特徴	測定装置の例	想定される用途例
1) 直接測定法				
固相サイトメトリー	菌体	フィルターなどの担体に捕捉した微生物が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の微生物を選択的に検出するため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡などを含む、種々の光学検出・測定装置を用いる。	蛍光顕微鏡 レーザースキャニングサイトメーター等	無菌試験 微生物限度試験 原材料受入試験 環境モニタリング 製薬用水の品質管理等
フローサイトメトリー	菌体	流路系を通過する微生物が発するシグナルを直接的に検出する。染色剤を選択することにより、生理活性等にかかわるシグナルを得ることもできるほか、自家蛍光を利用することもある。また特定の微生物を選択的に検出するため、遺伝子プローブや抗体、また蛍光標識したファージなどを用いることがある。検出・測定装置として、種々の光学検出・測定装置を用いる。	フローサイトメーター バイオパーティクルカウンタ等	環境モニタリング 製薬用水の品質管理等
2) 間接測定法				
免疫学的方法	抗原	微生物がもつ抗原に特異的な抗体を反応させ、発色や蛍光を目視やマイクロプレートリーダーなどで測定する。簡便なものには免疫クロマトグラフィーがある。	免疫クロマトグラフィー マイクロプレートリーダー	菌体由来抗原による菌種同定
核酸増幅法 (NAT)	核酸	微生物がもつ核酸を、対象とする微生物に特異的なプライマーを用いて増幅し、検出する。定量的PCR法を用いることにより、定量も可能である。	電気泳動装置 定量的PCR装置	環境モニタリング 製薬用水の品質管理
生物発光法・蛍光法	ATP等	菌体内のATP等を酵素反応による発光現象・蛍光現象をもとに測定する。	発光測定器 蛍光測定器	無菌試験 微生物限度試験 原材料の品質管理 製薬用水の品質管理 環境モニタリング等
マイクロコロニー法	増殖能 (マイクロコロニー)	コロニー形成初期のマイクロコロニーを検出・計数する。平板培養法と同じ培養条件(培地組成、温度等)を使用できる。	蛍光顕微鏡等	無菌試験 微生物限度試験 原材料の品質管理 製薬用水の品質管理 環境モニタリング等
インピーダンス法	増殖能 (電気特性)	微生物が増殖の際に培地成分を利用し産生する代謝産物の増加により生じる電気特性の変化を利用する。	電気計測器	保存効力試験等 消毒剤(評価法)
ガス測定法	増殖能 (ガス産生等)	微生物の増殖に伴う二酸化炭素の産生や酸素の消費等のガス量の変化を利用する。	ガス測定器 培地の呈色反応	無菌試験 原材料の品質管理 容器完全性試験等
脂肪酸分析法	菌体脂肪酸	微生物の種類によって菌体脂肪酸組成が異なることを利用する。	ガスクロマトグラフィー	菌体由来脂肪酸による菌種同定
赤外吸収スペクトル測定法	菌体成分	菌体に赤外線を照射し、その赤外吸収スペクトルパターンを利用する。	フーリエ変換赤外分光光度計	菌株識別
質量分析法	菌体成分	菌体成分を質量分析計により測定し、データベースと照合して解析する。	質量分析計	菌種同定
フィンガープリント法	DNA	試料から抽出したDNAを制限酵素で切断し、DNA断片の泳動パターンを利用する。データベースと照合することにより同定が可能である。またT-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms)法では群集構造解析が可能である。	電気泳動装置	菌種同定

ハイスルーブ ット・シーク エンシング	核酸	試料中に存在する多種多様な微生物から抽出した核酸の配列を決定し、その情報をもとに群集構造を解析する。	シークエンサー等	細菌叢解析 真菌叢解析
比濁法	増殖能	特定の波長において、微生物の増殖による培地の濁度の変化を利用する。	分光光度計	保存効力試験等 消毒剤(評価法)

35 注) PCR: ポリメラーゼ連鎖反応 T-RFLP: 末端標識制限断片長多型分析

36 2. バリデーション

37 機器の適格性評価に当たっては、それぞれの測定法で測定対
38 象とする標準試料を用いて実施する。すなわち、直接測定法に
39 においては標準菌株、間接測定法においては検出対象となる成分
40 等とする。

41 試験方法のバリデーションに当たっては、測定対象が微生物
42 数・微生物量測定の指標となる科学的根拠を明らかにし、日局
43 で定められている試験法と比較して優位な点と共に、利用に当
44 たって考慮すべき点についても明らかとすることが望ましい。

45 また、標準菌株を用いたバリデーションの結果は、日局で定め
46 られている試験法がある場合は日局で定められている試験法と
47 比較し同等以上(非劣性)であるべきだが、測定原理が異なるこ
48 とより必ずしも相関関係を求める必要はない。環境中に生息す
49 る微生物の検出を目的とする場合、より合理的な結果を得るた
50 めには、試験に用いる標準菌株の生理活性を可能な限り環境中
51 での状態に近似させること。また、試験法によっては、製造環
52 境で検出された微生物を用いることが望まれる。

53 微生物迅速試験法のバリデーションには、試験法開発を目的
54 とした検証と使用用途を想定した検証がある。微生物迅速試験
55 法を提供する機器の製造業者は通常、前者の検証を行い、使用
56 条件を想定した後者の検証は、使用者の責任のもとで検証する。
57 使用者は、微生物迅速試験法を提供する機器の製造業者の試験
58 法開発時におけるバリデーションの検証方法及び結果の妥当性
59 を確認することで、バリデーションの一部としてその結果を採
60 用することができる。

61 微生物迅速試験法のバリデーションにおける検証内容は、定
62 性試験及び定量試験で異なる。定性試験とは、試験検体に混入
63 した微生物の有無を判定する試験であり、例として無菌試験が
64 挙げられる。定量試験とは、試験検体に混入した微生物数・微
65 生物量を評価する試験であり、例として微生物限度試験の生菌
66 数試験が挙げられる。各試験に要求されるバリデーションパラ
67 メーターを表2に示す。バリデーションパラメーターは、参考
68 情報「分析法バリデーション (G1-1-130)」で要求される分析
69 法バリデーションの分析能パラメーターに加えて、頑健性、適
70 合性及び非劣性がある。

71 表2 各試験と検証が必要なバリデーションパラメーター

バリデーションパラメーター	定性試験	定量試験
分析法バリデーション における分析能パラメ ーター		
真度	—	+
精度	—	+
特異性	+	+
検出限界	+	—*
定量限界	—	+
直線性	—	+
範囲	—	+
頑健性	+	+
適合性	+	+
非劣性	+	+

72 — 通例評価する必要がある。

73 + 通例評価する必要がある。

74 * 必要な場合がある。

75 分析法バリデーションにおける分析能パラメーター及び頑健
76 性については、参考情報「分析法バリデーション (G1-1-130)」
77 に加えて、必要に応じて、医薬品規制調和国際会議ICHで合意
78 されたガイドラインのうち「分析法バリデーションに関するデ
79 キスト(実施項目) (平成7年7月20日薬審第755号)」及び「分析
80 法バリデーションに関するテキスト(実施方法) (平成9年10月28
81 日薬審第338号)」を参照することができる。

82 適合性については、原材料又は製品試験に微生物迅速試験法
83 を適用する場合に対象となり、原材料又は製品が微生物の検出
84 に影響しないことを確認する。日局で定められている試験法
85 (例えば、4.05 微生物限度試験法や4.06 無菌試験法等)を代替す
86 る場合は、それら試験法の記載内容を参照することができる。

87 非劣性については、日局で定められている試験法を微生物迅
88 速試験法で代替する場合に実施する。一つの原材料又は製品に
89 において、微生物迅速試験法が日局で定められている試験法と非
90 劣性であることが示された場合は、新しい原材料又は製品ごと
91 に非劣性の評価を繰り返す必要はない。

92 バリデーションパラメーターの定義と評価方法の例を次に示
93 す。

94 2.1. 真度

95 2.1.1. 定義

96 微生物迅速試験法によって得られた測定値の偏りの程度のコ
97 とで、真の値と測定値の総平均との差で表される。日局で定め
98 られている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、微生
99 物迅速試験法の試験結果と、日局で定められている試験法によ
100 って得られた試験結果との差である。

101 2.1.2. 評価方法

102 真度は、実際の試験で対象となる測定範囲を含んだ微生物濃
103 度で検証する必要がある。例えば、測定範囲の上限で微生物の
104 懸濁液を調製し、測定範囲の下限まで段階希釈することによ
105 って評価される。

106 また、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代
107 替する場合には、適切な統計分析を使用して、日局で定められ
108 ている試験法より微生物迅速試験法が非劣性であることを示す
109 必要がある。なお、直線性と合わせて、真度を確認することも
110 可能である。

111 2.2. 精度

112 2.2.1. 定義

113 均質な微生物懸濁液から採取した複数の検体を繰り返し測定
114 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であ
115 り、測定値の分散、標準偏差又は相対標準偏差として表される。
116 精度は、併行精度と室内再現精度の2種類に分類される。

117 (i) 併行精度とは、試験室、試験者、装置、器具及び試薬のロ
118 ットなどの分析条件を変えずに、同一の微生物懸濁液から採
119 取した複数の検体を短期間に繰り返し評価するときの精度で
120 ある。

121 (ii) 室内再現精度とは、同一の試験室内で試験者、装置及び試
122 薬のロットなどの一部又は全ての分析条件を変えて、均質な

微生物懸濁液から採取した複数の検体を繰り返し評価するときの精度である。

2.2.2. 評価方法

併行精度を検討するために十分な微生物懸濁液を準備し、試験濃度範囲の中央にある少なくとも一つの微生物懸濁液を評価する。室内再現精度は、同一の試験室内で考えられる可能な変動要因について検討する。各検討で得られた結果の分散、標準偏差又は相対標準偏差を算出する。なお、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、日局で定められている試験法より非劣性であることを示さなければならない。

2.3. 特異性

2.3.1. 定義

対象となる微生物のみを検出する能力のことである。対象となる微生物とは、製品へ混入するリスクの高い微生物、製造環境で検出された微生物、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合はその有効性を測定するために適した微生物及び生理学的な属性で代表的な微生物等である。

2.3.2. 評価方法

接種する微生物数・微生物量は、検出限界又は定量限界を上回るが、試験法の有効性を評価することが可能なレベルとする。培養を必要とする微生物迅速試験法においては、少数の微生物(100 CFU以下)を添加し、添加した微生物を検出できることを検証する。

培養を必要としない微生物迅速試験法においては、適切な陰性及び陽性対照を用いて、システム内に混入する可能性のある外来物質(例えば、細胞外ATP、DNA、阻害因子、又は促進因子)が、対象となる微生物の検出に影響しないことを検証する。

2.4. 検出限界

2.4.1. 定義

規定された実験条件下で、検出可能な試験検体中の微生物の最少数・最少量のことである。検出限界では、必ずしも定量できるとは限らない。

2.4.2. 評価方法

検出限界については、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合には、「2.10.2 (3) 判定の非劣性」を参照し、日局で定められた試験法と代替法で評価する。

2.5. 定量限界

2.5.1. 定義

許容できる精度及び真度で定量的に評価可能な試験検体中の微生物の最少数・最少量である。

2.5.2. 評価方法

定量限界は、定量限界付近を含む複数の検体を用いて評価する。直線性及び真度の結果も使用できる。この場合、線形範囲の最低濃度が試験法の定量限界とみなすことができる。日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合は、日局で定められている試験法の定量限界よりも劣ってはいけない。

2.6. 直線性

2.6.1. 定義

実際の試験で対象となる測定範囲内で、試験検体中に存在する微生物の濃度に比例した結果を得られることである。

2.6.2. 評価方法

微生物迅速試験法の使用目的に対応するように、妥当な範囲(例えば、 $10^0 \sim 10^6$ CFU/mL)の試料を用意し、試験手順に従

って各試料を繰り返し測定し、結果を得る。各濃度で得られた結果の回帰式及び相関関数から直線性を評価する。

2.7. 範囲

2.7.1. 定義

適切な精度、真度及び直線性を与える、下限及び上限の微生物数又は微生物量に挟まれた領域のことである。

2.7.2. 評価方法

適切な範囲の上限値、下限値及び範囲の中央付近の値の試験試料について精度、真度及び直線性を検討する。

2.8. 頑健性

2.8.1. 定義

試験条件を小さい範囲で意図的に変化させるときに、測定結果が影響を受けない能力の指標である。

通例、頑健性は、試験法開発者が試験法の開発段階で検討すべきである。ただし、試験法使用者が重要なパラメーターを変更する場合は、頑健性への影響を評価する必要がある。

2.8.2. 評価方法

試験条件(例えば、試薬量、培養時間、周囲温度等)を意図的に変動させることにより試験結果への影響を評価する。

2.9. 適合性

2.9.1. 定義

原材料又は製品が微生物の検出に影響しないことの確認である。

2.9.2. 評価方法

微生物迅速試験法を用いて試験される原材料又は製品について、原材料又は製品存在下及び非存在下で微生物を接種し、それらの結果を比較することによって原材料又は製品による偽陽性又は偽陰性が発生しないことを確認する。

2.10. 非劣性

2.10.1. 定義

非劣性は、日局で定められている試験法を微生物迅速試験法で代替する場合に対象となり、日局で定められている試験法に比べて代替法が劣っていないことを統計的に判定することである(非劣性検定)。

2.10.2. 評価方法

実使用における試験条件を考慮し、ワーストケースを想定して行う。また、原材料又は製品試験に適用する場合は、原材料又は製品を用いて実施する。

非劣性には三つの異なる判定法がある。

(1)性能の非劣性

代替法と日局で定められている試験法の分析能パラメーターを比較し、比較結果に基づいて非劣性を判定する。

(2)結果の非劣性

代替法と日局で定められている試験法で得られた数値結果を比較し、比較結果に基づいて非劣性を判定する。

(3)判定の非劣性

代替法と日局で定められている試験法で陰性(適合)/陽性(不適合)を判定し、陽性率(不適合率)の比較結果に基づいて非劣性の判定を行う。

どの判定法で行うかは、測定原理及び測定対象により異なるため、装置の特性を把握し適切な判定法で行う必要がある。

(1)性能の非劣性

性能の非劣性は、代替法の単位が日局で定められている試験法と同一単位であるときに使用できる。分析法バリデーション

231 の各パラメーターに対して、代替法が非劣性であることを示す。
 232 比較できない場合は、代替法自体の判定基準に対して適合する
 233 ことを示す。利用者は代替法と日局で定められている試験法を
 234 比較検討し、特定のパラメーターにおいて非劣性を示せない代
 235 替法を利用する必要がある場合には、代替法が対象物の品質の
 236 評価法として適切であることの妥当性を示さなければならない。
 237 (2)結果の非劣性

238 結果の非劣性は、代替法の単位が日局で定められている試験
 239 法とは異なるが、得られた結果に定量性があり日局で定められ
 240 ている試験法との間に相関があると推定される場合に使用でき
 241 る。精度において、代替法が数値的に非劣性であることを示す。
 242 次に、適切な製品又は試験試料の規格範囲内で、検量線を用い
 243 て二つの方法間の相関を示す。

244 微生物の代謝物や生理活性を指標とした測定原理の場合は、
 245 微生物の生理状態により測定値がCFUで評価する方法より著
 246 しく高い推定値となることがあるなど、測定原理の違いから相
 247 関が得られないことがある。その場合は、(3)判定の非劣性評
 248 価を行う。

249 (3) 判定の非劣性

250 判定の非劣性は、代替法及び日局で定められている試験法が
 251 同等の試料に対して、それぞれの基準で陰性(適合)/陽性(不適
 252 合)を判定する場合に使用できる。代替法の陽性率(不適合率)が
 253 日局で定められている試験法の陽性率より非劣性であることを
 254 示す。この陽性率に対する非劣性検定は、独立サンプルと対応
 255 のあるサンプルとで計算方法が異なるので適切な検定法を用い
 256 る。

257 判定の非劣性のもう一つの方法としては、最確数法を代替法
 258 と日局で定められている試験法で複数回実施し、各々の測定値
 259 を対数変換後、平均値の非劣性検定をする。

260 3. 応用分野と考慮すべき点

261 微生物迅速試験法は幅広い分野での応用が期待されるが、測
 262 定対象及び測定系が従来法とは異なるため、これまでに蓄積し
 263 たデータとの相関を得られないことがある。従来法と同等以上
 264 の能力を有することを確認することが原則であるが、微生物迅
 265 速試験法により新たな管理方法が考案され、従来法がない場合
 266 には、その妥当性を検証して微生物迅速試験法を用いることが
 267 できる。

268 微生物迅速試験法を当局に新たに製造販売承認申請(あるいは
 269 は製造販売承認事項一部変更承認申請)し、承認された場合に
 270 は、局方試験の代わりに微生物迅速試験法の結果に基づき出荷
 271 可否決定を行うことができる。

272 微生物迅速試験法は短時間のうちに結果を得ることができる
 273 ので、製品の検査を早期に完了できる点、製造設備や製造用水、
 274 原材料等の早期の汚染検知や製造室等の清浄度の早期確認が可
 275 能な点など様々な利点が想定され、製品試験、環境モニタリン
 276 グ、バイオバーデン試験、原材料管理などをリアルタイムに実
 277 施でき、工程管理の新たな方法として活用が期待される。警報
 278 基準値(アラートレベル)、処置基準値(アクションレベル)など
 279 は得られたデータを元に傾向分析を通じて設定することができ
 280 る。

281 応用分野の例を以下に示す。

- 282 ・微生物限度試験(生菌数試験)
- 283 ・保存効力試験
- 284 ・消毒剤(評価法)

285 ・原材料の品質管理

286 ・製薬用水の品質管理

287 ・環境モニタリング

288 ・無菌試験

289 ・容器完全性試験

290 ・作業員の教育及び適格性評価など(更衣や無菌操作など)

291 4. 用語の定義又は説明

292 本参考情報で用いる用語の定義は、次のとおりである。

293 ・培養法：微生物が必要とする栄養分で作られた微生物用培地
 294 で、適切な環境下(温度、湿度、浸透圧、pH等)で培養し、
 295 増殖に伴う濁度の変化を目視にて確認することやコロニー数
 296 を計数する手法。

297 ・微生物：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称であり、本参
 298 考情報では細菌及び真菌を指す。

299 ・標準菌株：本参考情報では、公的な機関より管理・分譲され
 300 る菌株。日局に記載された試験菌株を含む。

301 ・従来法：日本薬局方収載微生物試験法(無菌試験法、微生物
 302 限度試験法、保存効力試験法、遺伝子解析による微生物の迅
 303 速同定法など)。

304 ・微生物迅速試験法：微生物の代謝活性や生理活性又は菌体成
 305 分等(ATPや抗原、核酸など)でその存在を確認する手法で、
 306 その検出対象によって様々な手法があり、培養を基本とする
 307 従来法と比較して測定結果が早い手法。

308 ・微生物数：細胞数として定量される微生物の数。

309 ・微生物量：微生物の代謝物として定量される物理量。

310 ・偽陽性：本参考情報では、微生物が存在しない陰性検体を誤
 311 って陽性と判定すること。

312 ・偽陰性：本参考情報では、微生物が存在する陽性検体を誤っ
 313 って陰性と判定すること。

314 ・直接測定法：微生物が発する自家蛍光などのシグナルを直接
 315 的に検出する試験法。

316 ・間接測定法：特定の菌体成分、酵素反応や微生物代謝物など
 317 を間接的に検出する試験法。

1 遺伝子解析による微生物の迅速同定法 (G4-7-190)

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検出される微生物(細菌及び真菌)を遺伝子解析によって種又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造する上で重要である。微生物の同定には、微生物固有の形態や生理・生化学性状、菌体成分の解析等を組み合わせて、分類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れてきた。表現形質による微生物同定用システムも数多く市販されているが、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るおそれがある。微生物の進化の歴史はリボソームRNA(rRNA)に記録されており、近年の微生物分類学ではこの記録をもとに、系統発生的に区分する手法が採用されている。本法は、細菌については、16S rRNAの高度可変領域の全部又は一部、真菌については18S rRNAと26S/28S rRNA間のスペーサー領域(ITS1-5.8S rRNA-ITS2)又は26S/28S rRNAのD1/D2領域の遺伝子配列を解析し、データベースと照合するこ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、本法は他の同定法に取って代わるものではなく、厳密な同定のためには他の手法も併せて考慮する必要がある。また、本法に示した方法は、用いる装置や材料、実施者の経験などによって変更可能である。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可能である。

1. 装置

(i) DNA自動解析装置

DNAの塩基配列を読み取る(シーケンスする)装置で、キャピラリー法など、種々の機種がある。

(ii) DNA増幅装置

被検菌の標的DNAの増幅(PCR)に用いる。また、PCR産物をシーケンシング試薬で標識するためにも用いる。

2. 操作法

以下、操作法の一例を示す。

2.1. 鋳型DNAの調製

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である。被検菌が集落の場合は、1.5 mLマイクロチューブに被検菌処理液を0.3 mL入れ、これに滅菌ループなどで集落の一部(かびの場合は、ごく少量)をとり懸濁させる。被検菌が液体培養物の場合は、1.5 mLマイクロチューブに培養物を適量(0.5 mL程度)とり、遠心分離(10000 ~ 15000×g, 2 ~ 3分)後、上清を除去し、残留物に被検菌処理液を0.3 mL入れて懸濁させる。ヒーターを用いて懸濁液を100℃で10分間加熱する。細菌、酵母類は一般に、加熱処理物でもPCRは進行するが、かびの中には集落を用いるとPCRを阻害するものもある。その場合には、液体培養物からDNA抽出を行った方がよい。また、市販のゲノムDNA抽出キットを用いてもよい。

2.2. PCR

加熱処理した菌液の上清又はDNA抽出物を2 µL程度用い、細菌の場合は10F(又は27F)/1492R(又は1525R)プライマーセット、真菌の場合はITS1F(又はITS5F)/NL4Rプライマーセットを添加して、用いるPCR酵素に最適な条件でPCRを行う。細菌の場合は約1200 bp、真菌の場合は菌種により、約1000 ~ 1400 bpのDNA断片が増幅生成する。PCRを行う際には、陰性対照(菌液の代わりに被検菌処理液)を置く。なお、PCRの代わりに他の核酸増幅法を用いてもよい。

また、合理性があれば他のプライマーセットも使用可能である。

2.3. PCR産物の精製

未反応物(dNTPやプライマーなど)を除去するため、市販のキット等を使用してPCR産物を精製する。なお、目的の塩基長と異なるPCR産物(非特異的増幅産物)の生成が疑われる場合は、アガロースゲル電気泳動等、適切な方法により、目的の塩基長のPCR産物を精製する。

2.4. 精製DNAの定量

必要に応じて、精製DNA量を適切な方法により測定する。分光光度計で測定する場合には、1 OD_{260nm} = 50 µg/mLで換算する。

2.5. 塩基配列の解析

用いるDNA解析装置に適したシーケンス試薬を使用し、適切なプライマーを用いて試料の塩基配列を読み取る。得られた確度の高い(Quality valueが20以上)塩基配列をBLAST^{®1)}検索によりデータベース(rRNA/ITS databases もしくは Standard databases)と照合する。なお、陰性対象では試料と同じ塩基配列が読み取れないことを確認する。また、非特異的増幅産物の混入が疑われる場合は、2.2で用いたプライマー以外のプライマーを用いてシーケンスすると正しく読める場合が多い。

3. 判定

一般に、得られた塩基配列とデータベース²⁻⁴⁾とが97%以上合致した場合、以下のように判定できる。なお、一致度が97%を下回る場合、又は複数の属が上位の一致率で検索された場合は他の同定法を考える。

(i) 細菌の場合は、16S rRNAの5'側500塩基程度、又は必要に応じて全長の塩基配列を適切なプライマーを用いて読み取り、得られた塩基配列をBLAST[®]を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

(ii) 真菌の場合は、rRNA遺伝子のスペーサー領域(ITS1-5.8S rRNA-ITS2)やD1/D2領域を適切なプライマー(スペーサー領域はITS5FやITS4R, D1/D2領域はNL1FやNL4Rなど、図1)で読み取った塩基配列をBLAST[®]を用いて検索し、上位にランクされた菌種を被検菌と同一種又は近縁種と判定する。

(iii) データベース検索の結果、ヒトの健康に影響を与える懸念のある微生物が上位に検索された際は、再試験や、PCR産物の全長を解析する、あるいは、本同定法とは原理の異なるマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析法や微生物迅速試験法 (G4-6-190) に示す方法等の他の同定法を試みるなどの対応が必要である。

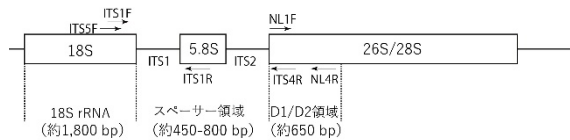


図1 真菌のスペーサー領域 (ITS1-5.8S rRNA-ITS2), D1/D2 領域およびプライマーの位置

- 141 and T.J. White, eds., Academic Press, New York, 1990, pp.
142 315-322.
143 9) K. O'Donell, In: "The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic
144 and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics", D.R.
145 Reynolds, and J.W. Taylor, eds., CAB International,
146 Wallingford, 1993, pp. 225-233.

4. 試薬・試液

- (i) エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液, 0.5 mol/L : エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物 18.6 g を水に溶かし, 100 mL とする。
(ii) トリス緩衝液, 1 mol/L, pH 8.0 : 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 24.2 g を水に溶かし, 0.2 mol/L 塩酸試液を加えて pH 8.0 に調整した後, 水を加えて 200 mL とする。
(iii) TE 緩衝液 : pH 8.0 の 1 mol/L トリス緩衝液 1.0 mL に 0.5 mol/L エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム試液 0.2 mL を加えた後, 水を加えて 100 mL とする。
(iv) 被検菌処理液 : 適切な濃度の界面活性剤を含む溶液 (例えばポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテルを 1 vol% 含む TE 緩衝液) を小分けし, 凍結保存する。
(v) PCR 及びシーケンス用プライマー (例) :

微生物	プライマー	塩基配列
細菌	10F ⁽⁵⁾	5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'
	27F ⁽⁶⁾	5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'
	519R ⁽⁶⁾	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'
	800R ⁽⁵⁾	5'-TACCAGGTATCTAATCC-3'
	800F ⁽⁵⁾	5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'
	1492R ⁽⁷⁾	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'
	1525R ⁽⁶⁾	5'-AAGGAGGTGATCCARCC-3'
真菌	ITS1F ⁽⁵⁾	5'-GTAACAAGGTYTCCGT-3'
	ITS5F ⁽⁸⁾	5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3'
	ITS4R ⁽⁸⁾	5'-TCCTCCGCTTATTCGATATGC-3'
	NL1F ⁽⁹⁾	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'
	NL4R ⁽⁹⁾	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'

R: A 又は G, Y: C 又は T

- (vi) ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル : 本品は微黄色の粘性の液体である。

5. 参考資料

- 1) BLAST[®], Basic Local Alignment Search Tool, National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (Accessed Nov 21, 2023)
2) M. Kim, et al., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 346-351 (2014).
3) S.W. Peterson and C.P. Kurtzman, System. Appl. Microbiol. 14, 124-129 (1991).
4) H.A. Raja, et al., J. Nat. Prod. 80, 756-770 (2017).
5) T. Sasaki, et al., PDA J. Pharm. Sci. Technol. 51, 242-247 (1997).
6) D.J. Lane, Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt, and M. Goodfellow, eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
7) S. Turner, et al., J. Euk. Microbiol. 46, 327-338 (1999).
8) T.J. White, et al., "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky,

1 蛍光染色による細菌数の迅速測定法 (G4-8-152)

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

1. CFDA-DAPI二重染色法

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

1.1. 装置

1.1.1. 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

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

1.2. 器具

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

1.3. 操作法

以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

1.3.1. 試料の調製

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

1.3.2. ろ過

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

1.3.3. 染色

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

1.3.4. プレパラートの作製

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

1.3.5. 計数

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

102 菌数(cells/mL)

103
$$= \{ (1 \text{ 視野当たりの細菌数の平均値}) \times (\text{ろ過面積}) \} /$$

104
$$\{ (\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積}) \}$$

105 1.4. 試薬・試液

106 (i) 無菌水：水を孔径0.2 μmのメンブランフィルターでろ過
107 した後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。注射用水を用いて
108 も良い。

109 (ii) CFDA溶液、10 mg/mL：CFDA 50 mgをジメチルスル
110 ホキシドに溶かし、5 mLとする。遮光下、-20℃で保存する。

111 (iii) CFDA染色用緩衝液：塩化ナトリウム5 gに0.1 mol/Lエ
112 チレンジアミン四酢酸二水素ナトリウム試液0.5 mL及び薄
113 めたリン酸水素ナトリウム試液(1→3)を加えて溶かし、100
114 mLとする。この液にリン酸二水素ナトリウム二水和物溶液
115 (1→64)を加えてpH 8.5に調整する。孔径0.2 μmのメンブラン
116 フィルターでろ過する。

117 (iv) DAPI溶液、10 μg/mL：DAPI 10 mgを無菌水100 mLに
118 溶かす。無菌水で10倍希釈して、孔径0.2 μmのメンブランフ
119 イルターでろ過する。遮光下、4℃で保存する。

120 (v) 蛍光顕微鏡用イメージジョンオイル

121 2. マイクロコロニー法

122 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
123 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
124 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
125 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
126 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
127 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、
128 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。
129 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
130 ができる。

131 2.1. 装置

132 2.1.1. 蛍光顕微鏡又はこれに準ずる蛍光観察装置

133 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
134 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
135 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
136 ある。

137 2.2. 器具

138 (i) ろ過装置(ファンネル、吸引フラスコ、吸引ポンプ)

139 (ii) ポリカーボネート製メンブランフィルター(孔径0.2 μm
140 以下)：粒子を表面で捕集できるフィルターであればポリカー
141 ボネート製でなくとも良い。

142 (iii) スライドガラス

143 (iv) カバーガラス

144 (v) ろ紙(No.2)

145 (vi) 計数用接眼マイクロメーター(10×10のマス目を区切っ
146 たもの)

147 2.3. 操作法

148 以下に、蛍光顕微鏡による測定法の一例を示す。

149 2.3.1. 試料の調製

150 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
151 うに試料を調製する。

152 2.3.2. ろ過

153 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
154 ルター(孔径0.2 μm)をセットする。適当量の試料をろ過し、試

155 料中の細菌をフィルター上に捕集する。

156 2.3.3. 培養

157 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
158 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
159 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
160 注意する。なお、サンプルにより適切な培養条件(培地、培養
161 温度、培養時間など)は異なるので注意する。

162 2.3.4. 固定

163 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
164 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
165 30分以上静置し、マイクロコロニーを固定する。

166 2.3.5. 染色

167 ろ紙に染色液(1 μg/mL DAPIなど、2% polyoxyethylene
168 sorbitan monolaurate)適量をしみ込ませ、ろ過面を上にして
169 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
170 ロコロニーを染色する。無菌水をしみ込ませたろ紙の上でろ過
171 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
172 ーを十分に風乾させる。

173 2.3.6. プレパラートの作製

174 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滴滴
175 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。
176 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
177 ーガラスを被せてフィルターを封入する。

178 2.3.7. 計数

179 蛍光顕微鏡下で400倍又は200倍の倍率で観察・計数する。
180 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
181 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、
182 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
183 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
184 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。
185 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、
186 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
187 上ある場合は、検出限界以下とする。

188 マイクロコロニー数(cells/mL)

189
$$= \{ (1 \text{ 視野当たりのマイクロコロニー数の平均値}) \times (\text{ろ過面}$$

190
$$\text{積}) \} / \{ (\text{ろ過量}) \times (\text{検鏡面積}) \}$$

191 2.4. 試薬・試液

192 (i) 無菌水：水を孔径0.2 μmのメンブランフィルターでろ過
193 した後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌する。注射用水を用いて
194 も良い。

195 (ii) 染色液：DAPI 10 mgを無菌水100 mLに溶かす。無菌水
196 で10倍希釈して、孔径0.2 μmのメンブランフィルターでろ過
197 する。遮光下、4℃で保存する。使用時にpolyoxyethylene
198 sorbitan monolaurateを終濃度2%となるように溶解する。

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

201 (iv) 蛍光顕微鏡用イメージジョンオイル

1 消毒法及び除染法 (G4-9-170)

本参考情報は、医薬品の製造所において清浄度の管理が必要な清浄区域又は無菌操作区域における構造設備、及び同区域での製造管理及び製造作業に従事する職員(作業者)の衛生管理のうち、化学薬剤を用いて生存する微生物の数をあらかじめ設定したレベルまで減少させる処置法を示す。

なお、医薬品各条に規定された微生物関連試験法を実施する場合、医薬品の製造における製品等及び資材の微生物による汚染を防止するために必要な措置を講ずる場合、及び薬局において微生物管理が必要な場合等についても本参考情報を参考に適切な対応を図ること。

1. 用語の定義

本参考情報で用いる用語の定義は、次のとおりである。

- ・微生物：細菌、真菌、原虫、ウイルス等の総称であり、本参考情報では細菌及び真菌を指す。
- ・消毒：一般的には、病原菌など有害な微生物を除去、死滅、無害化することであり、本参考情報では対象物又は対象物の表面等の局所的な部位に生存する微生物を減少させることを指す。
- ・除染：空間や作業室を含む構造設備内に生存する微生物をあらかじめ指定された菌数レベルにまで減少させることを指す。
- ・対数減少量：処理前の微生物数と一定処理後の微生物数との対数値の差。
- ・消毒剤のローテーション：使用中の消毒剤に抵抗性を示す微生物が検出された場合に、有効性の異なる消毒剤を用い、その微生物が検出されなくなるまで使用する、又は一定期間ごとに作用機作の異なる消毒剤を交互に使用する消毒プログラムを指す。本法が有効かどうかについては、あらかじめ検証する必要がある。

2. 消毒法

本法には、化学薬剤を用いた清拭、噴霧、浸漬等の方法があり、設備、床、壁又は清浄区域や無菌操作区域に搬入する容器及び環境モニタリング用培地を梱包した資材の表面等の局所的な部位に生存する微生物を減少させるのに用いられる。本法を適用する表面の消毒剤に対する腐食性などの性質、及び汚染微生物の種類や数などの汚染状態を考慮し、通例、表1に示す消毒剤を単独又は併用して用いる。本法は、対象物又は局所的な部位に生存する微生物を全て死滅させたり、除去したりするものではないが、適用に当たっては有効性が確認された消毒剤を採用すること。また、消毒剤として使用する化学薬剤の微生物に対する効果は、使用濃度、作用温度、接触時間、表面の汚染状態等によって異なる。本法を適用するに当たっては、消毒剤の使用期限、消毒剤の汚染、残存した化学物質の医薬品品質に与える影響、及び対象となる資材の変色、変形、腐食などの劣化について注意を要する。

2.1. 消毒剤

汎用される消毒剤とその濃度、また各消毒剤の微生物に対する有効性の例を表1に示す。なお、ここに示した消毒剤以外、あるいは使用濃度以外でも、その有効性及び安全性が確認された消毒剤は使用することができる。

表1 消毒剤の種類、使用濃度例、作用機作

分類	消毒剤	使用濃度例	作用機作
酸化剤	過酢酸	0.3 w/v%	酸化作用
	過酸化水素	3 w/v%	
	次亜塩素酸ナトリウム	0.02 ~ 0.05%	
アルコール系	イソプロパノール	50 ~ 70%	タンパク質や核酸の変性
	エタノール	76.9 ~ 81.4 vol%	
界面活性剤系	ベンザルコニウム塩化物	0.05 ~ 0.2%	タンパク質の変性
	ベンゼトニウム塩化物		
	アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩	0.05 ~ 0.5%	
ビグアナイド系	クロルヘキシジングルコン酸塩	0.05 ~ 0.5%	細菌の酵素阻害や細胞質膜を変質・損傷

2.2. 評価法

清浄区域及び無菌操作区域等に消毒法を適用する場合は、消毒剤の濃度、作用時間、消毒対象となる表面の材質、その消毒剤で減少させたい微生物の種類等を考慮し、その条件の有効性を確認する。以下に評価法の例を示す。なお、科学的に正しいことが立証できれば、例示した評価法以外の方法を採用しても差し支えない。

2.2.1. 試験菌懸濁法

実際に使用する希釈液(精製水、水道水、他)を用いて、実際に使用する濃度の消毒剤を調製する。調製した消毒剤1 mL当たり $10^5 \sim 10^6$ CFUの試験菌を接種する。規定時間(通例、5 ~ 15分間)作用させた後、消毒剤を希釈、又は除去(ろ過)する。希釈液又はろ過後の洗浄液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和¹⁾する。接種した菌数及び消毒後の菌数の計測は、微生物限度試験法(4.05) I. 3.4. 製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす条件で実施する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、細菌及び真菌では3 log以上、芽胞では2 log以上の減少を認めた場合、各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表2を参照し、必要な菌種を選定する。これらの試験菌は微生物限度試験法(4.05)に記載されている条件で培養及び希釈して評価に使用する。ただし、*Bacillus subtilis*については抗生物質の微生物学的力価試験法(4.02)を参考に芽胞懸濁液を調製して評価に使用する。なお、試験の目的にかなえばその菌種を使用することができる。

2.2.2. 硬質表面キャリア法

約5 cm×5 cmの各種表面材質の担体(キャリア)を適切な精度が得られる数量準備する。試験菌をキャリア当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ CFUになるように広範囲に接種する。接種菌が乾燥する前に実使用濃度の消毒剤を滴下する。接種菌を乾燥する際の条件によっては接種菌数が減少し、消毒効果を適切に評価できない場合があるので注意する。規定時間(通例、5 ~ 15分間)作用させた後、回収液でキャリア上の試験菌を回収する。回収液には、必要に応じてレシチン、ポリソルベート80、チオ硫酸ナトリウムなどの不活化剤を含有する液を用いて消毒剤を中和¹⁾する。回収方法はJIS T11737-1²⁾を参考にストマック法、振とう法、スワブ法等を採用する。接種した試験菌数及び回収した試験菌

数は、微生物限度試験法 (4.05) I. 非無菌製品の微生物学的試験：生菌数試験 3.4. 製品存在下での測定法の適合性の要件を満たす試験条件で計測する。消毒剤作用前後の試験菌数から対数減少量を算出し、2.2.1 試験菌懸濁法に規定された減少量と同等の効果を認めた条件を各々の対象微生物に対して有効であると判断する。有効性の評価に使用する試験菌は表2を参照し、必要な菌種を選定するほか、環境モニタリングで検出頻度の高い代表菌1～2株を追加することが望ましい。なお、試験の目的にかなえばその菌種を使用することができる。試験菌の培養及び希釈等については2.2.1 試験菌懸濁法の規定を参考にし、また、清浄区域又は無菌操作区域で使用される各種表面の材質の例を表3に示すが、評価においては実際に使用する状況を考慮の上、適宜追加する。

3. 除染法

本法は、化学薬剤を気化又は噴霧させるなどで除染を行い、無菌医薬品の製造工程で用いるアイソレーター、RABS (Restricted Access Barrier System) や清浄区域又は無菌操作区域の空間や作業室を含む構造設備に生存する微生物をあらかじめ指定された菌数レベルまで減少させるのに用いられる。

本法を無菌医薬品の製造における構造設備に適用する場合は、除染剤及び除染条件の有効性に関するバリデーションを実施すると共に、作業者の安全性を確保すること。

表2 試験菌

分類	試験菌
細菌	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, NBRC 3972
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NBRC 13276
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NBRC 13275
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, NBRC 3134
真菌	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NBRC 1594
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, NBRC 9455

表3 消毒対象となる材質例

材質	適用例
ステンレス	作業台、タンク、機器類
ガラス	窓、遮蔽板
ポリカーボネート	遮蔽板、容器
化粧ケイ酸カルシウム	壁、天井
エポキシ樹脂コート	床
塩化ビニル	床、カーテン、ビニル袋
硬質ウレタンゴム	床
ニトリルゴム	手袋

3.1. 除染剤

汎用される除染剤を以下に示す。ここに示した除染剤以外にも、その有効性及び安全性が確認された除染剤は使用することができる。

3.1.1. 過酸化水素

過酸化水素(30)を蒸発させ、拡散することで除染を行う。ヒーターで気化した過酸化水素をアイソレーター内部や作業室に拡散させ、過酸化水素が持つ酸化力により、微生物を死滅させる方法である。無菌操作用アイソレーター内部を除染する場合のように高度な微生物学的清浄度を達成することが必要な場合は、指標菌の芽胞を6 log以上、作業室を除染する場合は3 log以上減少させる条件で実施する。常温で実施することの可能な方法であるが、材質によっては過酸化水素の強い酸化力の影響で変色、変形、腐食などの劣化を生じたり、過酸化水素を分解したりすることがあるため、事前に適合性を検討する必要がある。

なお、アイソレーター内部に、製品接触面が存在する場合は内部の除染と製品接触面の無菌性保証を同時に達成させる必要がある。このような場合は、参考情報「滅菌法及び滅菌指標体 (G4-10-162)」の項を参照し、滅菌前のバイオバーデン、パラメーター、ユーティリティなどについて、滅菌法としての管理を行う。

3.1.2. 過酢酸

例えば0.2%過酢酸水溶液をミスト状にして噴霧し、拡散することで除染を行う。作業室の清浄化に利用され、指標菌の芽胞を3 log以上減少させる条件で実施する。過酢酸の酸化力により微生物を死滅させる方法である。常温で実施することの可能な方法であるが、材質によっては過酢酸の強い酸化力の影響で変色、変形、腐食などの劣化を生じることがあるため、事前に材質適合性を検討する必要がある。

3.1.3. ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドを36.0～38.0%含む水溶液であるホルマリンを加熱により気化、若しくはパラホルムアルデヒドを加熱により昇華させ、拡散することで除染を行う。ホルムアルデヒド分子中のアルデヒド基(-CHO)がタンパク質を変性させることで微生物を死滅させる方法である。作業室の清浄化に利用され、指標菌の芽胞を3 log以上減少させる条件で実施する。ホルムアルデヒドは人体に有害であり、毒物及び劇物取締法で劇物に指定されているため、強制排気装置を備えた作業空間で取り扱う必要がある。また、薬剤の廃棄処理に際しても無害化が必要である。

3.2. 評価法

通例、バイオロジカルインジケーターを用いて、除染効果を評価する方法が採用される。除染剤に対して抵抗性を有するバイオロジカルインジケーターを、空間や作業室を含む構造設備の各所に配置し、除染を行う。除染後にバイオロジカルインジケーターを回収し、培養法により、生残菌の有無を確認する方法が一般的である。また、培養法以外にも、同等以上の方法であれば迅速法などを使用することができる。なお、過酸化水素によるアイソレーターの除染において、 10^6 CFUのバイオロジカルインジケーターを用いて指標菌の芽胞が6 log以上減少することを実証する場合、除染後のバイオロジカルインジケーターを全数死滅させることが要件ではない。バイオロジカルインジケーターを回収し、培養法により生残菌数を測定し、指標菌の対数減少量を算出することで効果を評価する方法や統計学的解析手法の活用により、芽胞の6 log減少に適切な除染条件を確立することも可能である。

上述した過酸化水素及びホルムアルデヒドについては *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, 12980の芽胞は抵抗性が強いことが知られており、指標体として使用することが可能である。また作業室を対象とした除染については、環境微生物の代表として、*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372の芽胞を指標菌として使用することも可能である。

4. 留意事項

4.1. 作業者の安全性

消毒剤及び除染剤は人体に少なからず影響を及ぼす、すなわち毒性を有する化学薬剤である。したがって、その使用においては、用法・用量を守り、必要に応じて保護具等を正しく使用すると共に適宜、残留量を確認する必要がある。

181 4.2. 医薬品製造環境に用いる消毒剤及び除染剤の選択

182 医薬品製造環境で使用する消毒剤及び除染剤を選択する際は、
183 その使用目的によって以下に示すことを考慮し、適切なものを
184 選択する。また、消毒剤及び除染剤をより安全かつ的確に使用
185 するために、以下に示す(1)～(13)を考慮する必要がある。

- 186 (1) 対象とする微生物の種類と数
- 187 (2) 抗菌スペクトルの範囲
- 188 (3) 化学薬剤の使用法、濃度、接触時間、使用期限
- 189 (4) 無菌操作区域で使用する場合における無菌化を含めた消
190 毒剤の調製方法
- 191 (5) 消毒剤及び除染剤の対象物に対する材質適合性(劣化の程
192 度等)
- 193 (6) タンパク質等の有機物の存在下での効果
- 194 (7) 作用の持続性
- 195 (8) 人体に対する影響(安全性)
- 196 (9) 洗浄剤等との適合性
- 197 (10) 消毒剤のローテーションの要否及び必要な場合はその方
198 法
- 199 (11) 化学薬剤による医薬品の汚染を避けるために必要な手段
200 (不活化の方法、残留量の確認等)
- 201 (12) 廃棄処理方法の容易性(中和、不活化)
- 202 (13) 廃棄に伴う環境への影響

203 5. 参考資料

- 204 1) US Pharmacopeia 38 (2015), <1072> Disinfectants and
205 Antiseptics.
- 206 2) JIS T 11737-1 : 2013, 医療機器の滅菌—微生物学的方法
207 —第1部：製品上の微生物群の測定方法 (ISO 11737-1 :
208 2006)

1 滅菌法及び滅菌指標体〈G4-10-162〉

滅菌とは、物質中の全ての微生物を殺滅又は除去すること
いう。本参考情報は、無菌製品の製造のほか滅菌が必要な場合
に適用する。滅菌法を適用する場合には、各滅菌法の長所・短
所を十分理解した上で、包装を含む被滅菌物(製品又は滅菌が
必要な設備、器具、材料など)の適合性に応じて、適切な滅菌
法を選択する。

滅菌においては、滅菌装置据付け(滅菌工程の設計・開発を
含む)後、その工程が科学的根拠や妥当性をもって設計どおり
に正しく稼動していることを評価する適格性評価に基づき設備
の保守点検プログラムを設定すること。また、無菌医薬品の製
造所では、製造全般に関わる品質システムを確立すること。例
えば、滅菌後の無菌性を含め品質に影響を及ぼし得る全ての作
業を明確にし、製品の微生物汚染を回避するために必要な手順
書等を設定し、適切に運用すること。

滅菌条件を設定し、滅菌後の無菌性を保証するためには、被
滅菌物の滅菌前のバイオバーデンを定期的又は一定滅菌単位ご
とに測定すること。測定方法は、4.05微生物限度試験法等を参
照する。

本参考情報には代表的な滅菌法を示すが、これら以外にも

- ・滅菌機構が十分に解明されている
- ・滅菌工程の物理的な重要パラメーターが明確であり、それ
らの制御と測定が可能である
- ・滅菌操作を効果的かつ再現性よく実施できる

といった要件を満たし、かつ被滅菌物に悪影響を及ぼさない場
合は、他の滅菌法を用いることができる。

1. 定義

本法で用いる用語の定義は、以下のとおりである。

- ・フィルターの完全性試験：フィルターの微生物捕捉性能デー
タとの相関性が実証された非破壊試験をいう。
- ・バイオバーデン：被滅菌物に生存する微生物群をいう。
- ・ D 値：微生物の死滅率を表す値で、供試微生物の90%を死
滅させ、生存率を1/10に低下させるのに要する時間
(Decimal Reduction Time)をいう。
- ・ F_H 値：乾熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程
度であり、20℃の z 値(D 値を10倍変化させる温度変化の度
数)を持つ微生物について、160℃の温度に等価な時間(分)で
表される値。
- ・ F_0 値：湿熱滅菌におけるプロセスの微生物不活化能力の程
度であり、10℃の z 値(D 値を10倍変化させる温度変化の度
数)を持つ微生物について、121.1℃の温度に等価な時間(分)
で表される値。
- ・無菌性保証水準(SAL)：滅菌後に、生育可能な1個の微生物
が製品中に存在する確率をいう。10⁻⁶で表される。
- ・線量(吸収線量)：物質の単位質量当たり付与された吸収エ
ネルギーの量。単位はグレイ(Gy)で表す。
- ・重要パラメーター：滅菌工程に本質的に必要であり、計測可
能なパラメーター。
- ・載荷形態(ローディングパターン)：被滅菌物の滅菌装置又は
照射容器内での数、方向、配置方法について規定した組み合

わせ。

2. 滅菌法

2.1. 加熱法

加熱法は、熱によって微生物を殺滅する方法である。

2.1.1. 湿熱滅菌法

湿熱滅菌法には、一般的に広く用いられる飽和蒸気滅菌とそ
の他の湿熱滅菌とがある。湿熱滅菌における管理項目、ユーティ
リティ及び制御装置を、参考として表1に示した。

表1 湿熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装
置(参考)

	飽和蒸気滅菌	その他の湿熱滅菌
管理項目	・熱履歴(通例F_0値で表記) ・温度(必要に応じてドレインなど) ・圧力(滅菌器内) ・所定の温度における保持時間 ・被滅菌物の載荷形態 ・蒸気品質(過熱度、乾燥度、非凝縮性ガス濃度、必要に応じて化学的純度) ・滅菌器の中に復圧などのため導入する空気品質 ・冷却のために用いる水の品質 ・その他必要な事項	・熱履歴(通例F_0値で表記) ・温度(必要に応じてドレインなど) ・必要に応じて圧力(滅菌器内) ・所定の温度における保持時間 ・被滅菌物の載荷形態 ・滅菌器の中に復圧などのため導入する空気品質 ・冷却のために用いる水の品質 ・その他必要な事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	・蒸気 ・滅菌器の中に復圧などのため導入する空気 ・冷却のために用いる水 ・温度制御装置 ・圧力制御装置 ・時間制御装置 ・その他	・蒸気 ・熱水 ・滅菌器の中に復圧などのため導入する空気 ・冷却のために用いる水 ・温度制御装置 ・圧力制御装置 ・時間制御装置 ・連続式滅菌装置の場合の搬送装置 ・その他

飽和蒸気滅菌は、加圧飽和水蒸気中で微生物を殺滅する方法
をいう。本法の重要パラメーターとしては、温度、圧力及び所
定の温度における保持時間がある。したがって、通常の滅菌工
程管理においては、温度、圧力及び保持時間を常時測定、監視
すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含
まれていること。

また、その他の湿熱滅菌には、密封容器中の被滅菌物を滅菌
する場合に用いる蒸気加圧運転サイクル、水散布サイクル、水
浸漬サイクルなどがある。これらの方法の重要パラメーターと
しては、容器内の温度、所定の温度における保持時間がある。

2.1.2. 乾熱滅菌法

乾熱滅菌法は、加熱乾燥空気中で微生物を殺滅する方法である。
通例、バッチ式乾熱滅菌器又は連続式乾熱滅菌装置を用いる。
いずれの場合においても滅菌装置に流入する空気清浄度に留
意する必要がある。乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ
及び制御装置を、参考として表2に示した。本法はガラス製、
磁製、金属製など耐熱性の高い材質のものや鉱油、脂肪油、固
形の医薬品などで熱に安定なものが被滅菌物として適している。
本法の重要パラメーターとしては、温度及び所定の温度にお

ける保持時間(ベルト速度)がある。同じ加熱による滅菌でも、
湿熱滅菌法より高い温度又は長い保持時間が必要となる。通常
の滅菌工程管理においては、温度及び保持時間を常時測定、監
視すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として
含まれていること。

表2 乾熱滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	バッチ式乾熱滅菌	連続式乾熱滅菌
管理項目	・熱履歴(通例 t_H 値で表記) ・温度 ・所定の温度における保持時間 ・器内外の差圧 ・被滅菌物の载荷形態 ・空気(加熱用, 冷却用)の品質 ・その他必要事項	・熱履歴(通例 t_H 値で表記) ・温度 ・ベルト速度(保持時間) ・装置内外の差圧 ・载荷密度 ・空気(加熱用, 冷却用)の品質 ・その他必要事項
管理すべきユーティリティ及び制御装置	・空気(加熱用, 冷却用) ・温度制御装置 ・時間制御装置 ・器内の差圧計 ・HEPAフィルター ・その他	・空気(加熱用, 冷却用) ・温度制御装置 ・時間制御装置 ・装置内の差圧計 ・HEPAフィルター ・冷却装置(必要な場合) ・その他

2.1.3. 高周波滅菌法

高周波(マイクロ波)を薬液などの被滅菌物に照射すると、吸収された高周波により、被滅菌物の極性分子が配向を変えようと振動し、分子同士の摩擦によりエネルギーを発生する。このとき生じる熱(マイクロ波加熱)によって微生物を殺滅する方法を高周波滅菌法という。高周波は、通例、 2450 ± 50 MHzのものを用いる。

高周波滅菌装置は、マグネトロンを用いて高周波照射を行い加熱する加熱照射部、赤外線ヒーターなどを用いて滅菌温度を保持するための保持部、被滅菌物を冷却する冷却部から構成され、常圧下で被滅菌物を連続的に滅菌する装置である。高周波滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置を、参考として表3に示した。

本法は、密封容器等に充填された液状製品又は水分含量の多い製品に適用される。

本法の重要パラメーターとしては、被滅菌物の温度、処理時間がある。したがって、通常の滅菌工程管理においては、被滅菌物の温度、処理時間を常時測定、監視すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含まれていること。

高周波による加熱は、熱効率及び応答性に優れ、高温短時間滅菌を連続処理できることが特徴である。ただし、被滅菌物の熱の伝わりやすさによって均一な加熱が難しい場合もある。さらに常圧環境下での加熱のため、内圧が高くなることから、使用する容器の耐圧性に注意する必要がある。

表3 高周波滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	・熱履歴(通例 t_H 値で表記) ・温度 ・処理時間 ・被滅菌物の形状 ・その他必要事項
管理すべきユーティリティ	・高周波制御装置 ・外部加熱装置(必要な場合)

及び制御装置	・冷却装置(必要な場合) ・温度監視装置 ・時間監視装置 ・その他
--------	--

2.2. ガス法

ガス法は、滅菌ガスが微生物と接触することによって、微生物を殺滅する方法である。加熱法と比較して低い温度での滅菌が可能で、一般に被滅菌物の熱損傷が少ない方法である。そのため、熱抵抗性の低いプラスチック製容器などに適用される事例が多い。

一般的なガスを用いた滅菌法では、汚れや水分が滅菌効果を阻害するため、十分な洗浄、乾燥が重要となる。また、ガスが被滅菌物に吸着される場合では、滅菌効果が減少する。

2.2.1. 酸化エチレン(EO)ガス滅菌法

EOガス滅菌は、微生物が持つタンパク質、核酸を変性させることにより、微生物を殺滅する方法である。EOガスは、爆発性があるため、通例、二酸化炭素などで10～30%に希釈して用いる。EOガスは、反応性の強いアルキル化剤であるので、EOガスと反応する製品又はEOガスを吸収しやすい製品の滅菌には適用できない。

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。EOガスは、変異原性などの毒性があるので、被滅菌物については、エアレーションにより残留EOガスや他の二次生成有毒ガス(エチレンクロロヒドリンなど)の濃度を安全レベル以下に下げることがある。ガスは、法規制に適合する処理を施して排気する。EOガス滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置を、参考として表4に示した。

本法の重要パラメーターとしては、温度、湿度、ガス濃度(圧力)及び時間がある。したがって、通常の滅菌工程管理においては、温度、湿度、ガス濃度(圧力)、及び時間を常時測定、監視すべきであり、そのための測定装置は滅菌設備の仕様として含まれていること。

2.2.2. 過酸化水素による滅菌法

過酸化水素による滅菌には、過酸化水素が持つ酸化力により微生物を殺滅する過酸化水素滅菌と、過酸化水素をプラズマ状態にすることにより発生するラジカルによる酸化反応によって微生物を殺滅する過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌とがある。加熱法と比較して低い温度での滅菌が可能であるが、セルロースを材料として用いた使い捨ての作業衣、メンブレンフィルターなど過酸化水素を吸着するような被滅菌物では、滅菌効果が減少するため、このような被滅菌物の滅菌法としては適していない。過酸化水素滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置を、参考として表5に示した。

本法の重要パラメーターとしては、濃度、時間、温度がある。プラズマ状態にして滅菌する場合は、高周波装置の管理も重要である。被滅菌物の残存水分、滅菌環境中の湿度が滅菌効果に影響するので、必要な場合は管理すること。

表4 EOガス滅菌における管理項目、ユーティリティ及び制御装置(参考)

管理項目	・滅菌ガス導入による圧力上昇、導入時間、最終圧力 ・温度(滅菌器内及び被滅菌物) ・湿度 ・EOガス濃度(滅菌器内ガス濃度の直接分析が望ましいが、困難な場合は以下の場合も許容される) i) 使用するガスの質量
------	--

	ii) 使用するガスの容積 iii) 初期滅圧度とガス投入圧からの換算式採用 ・作用時間(暴露時間) ・被滅菌物の載荷形態 ・バイオロジカルインジケーターの設置点及び培養結果 ・プレコンディショニング条件(温度, 湿度, 時間, その他) ・エアレーション条件(温度, 時間, その他) ・その他必要事項
管理するべきユーティリティ及び制御装置	・EOガス ・注入する蒸気又は水 ・滅菌終了後, 置換する空気 ・温度制御装置 ・湿度制御装置 ・圧力制御装置 ・時間制御装置 ・その他

表5 過酸化水素による滅菌における管理項目, ユーティリティ及び制御装置(参考)

	過酸化水素滅菌	過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌
管理項目	・濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが, 困難な場合庫内均一性も許容される) ・時間 ・温度 ・湿度 ・圧力 ・過酸化水素の品質 ・過酸化水素の消費量 ・被滅菌物の残存水分 ・被滅菌物の載荷形態 ・バイオロジカルインジケーターの設置点及び培養結果 ・ケミカルインジケーターの設置点及び結果 ・その他必要事項	・濃度(滅菌器内濃度の直接分析が望ましいが, 困難な場合庫内均一性も許容される) ・時間 ・温度 ・湿度 ・圧力 ・過酸化水素の品質 ・過酸化水素の消費量 ・被滅菌物の残存水分 ・被滅菌物の載荷形態 ・バイオロジカルインジケーターの設置点及び培養結果 ・ケミカルインジケーターの設置点及び結果 ・その他必要事項
管理するべきユーティリティ及び制御装置	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置 ・高周波発生装置 ・その他	・過酸化水素 ・圧力計 ・過酸化水素注入装置 ・高周波発生装置 ・その他

2.3. 放射線法

2.3.1. 放射線滅菌法

放射線滅菌法には, ^{60}Co を線源とした γ 線が被滅菌物に照射することで微生物を殺滅する γ 線照射滅菌と, 電子線加速器から放出される電子線を照射することで微生物を殺滅する電子線照射滅菌とがある。滅菌方法の選択に当たっては, 被滅菌物の品質劣化を含む適合性を事前に確認しておくこと。

γ 線照射滅菌では γ 線が二次的に発生する電子で微生物を殺滅し, 電子線照射滅菌では電子が直接微生物を殺滅する。このような電子による直接作用がある一方で, γ 線及び電子線がそれぞれ水分子と反応してラジカルなどを生成し, 微生物のDNAに損傷を与えることによって殺滅する間接作用がある。

両法とも室温で滅菌が可能であるため, 熱に不安定な物質適用でき, 放射線が透過するためこん包状態での滅菌も可能である。 γ 線照射滅菌は, 電子線に比べると透過力が高いため, 主に金属, 水, 粉末などを含む高密度製品に適している。電子線照射滅菌は, γ 線に比べて単位時間当たりの放射線の量(線量

率)が高いため, 処理時間が短くなる。放射線滅菌における管理項目, ユーティリティ及び制御装置を, 参考として表6に示した。

2.4. ろ過法

ろ過法は, 滅菌用フィルターによって液体又は気体中の微生物を物理的に除去する方法である。したがって, 熱, 放射線に対して不安定な被滅菌物にも適用できる。なお, ここに記載したろ過による被滅菌物は, $0.2\ \mu\text{m}$ メンブランフィルターで除去できる微生物であり, 細菌の中でもマイコプラズマやレプトスピラ, またウイルスは対象としない。ろ過法における管理項目, ユーティリティ及び制御装置を, 参考として表7に示した。

液体ろ過滅菌では, ろ過時間, ろ過量, ろ過流速, ろ過差圧, 温度などがフィルターの微生物除去に影響を及ぼす重要パラメーターとして挙げられる。気体ろ過滅菌では, ろ過差圧, 温度などが影響を及ぼす重要パラメーターとして挙げられる。フィルターの微生物除去では, 滅菌の対象が液体の場合には, ろ過を行う液体の物理化学的性質(粘度, pH, 界面活性作用など)に影響される。一般に, 適切な条件下で培養された指標菌 *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146, NBRC 14213)又はこれより小さな適切な菌を用いて, フィルターの有効ろ過単位面積(cm^2)当たり 10^7 CFU以上をチャレンジし, フィルターの二次側に無菌のろ液が得られることにより, 滅菌用フィルターの微生物捕捉性能は検証される。

なお, ろ過前の液体中のバイオバーデンは, ろ過滅菌性能に影響を及ぼすため, その管理について考慮する。

3. 滅菌指標体(インジケーター)

3.1. バイオロジカルインジケーター(BI)

3.1.1. 概要

BIとは, ある滅菌法に対して強い抵抗性を示す微生物の芽胞を用いて作られた指標体であり, 当該滅菌法の滅菌条件の決定及び滅菌工程の管理に使用される。

表6 放射線滅菌における管理項目, ユーティリティ及び制御装置(参考)

	γ 線照射滅菌	電子線照射滅菌
管理項目	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・照射時間(コンベア速度又はサイクルタイム) ・その他必要な事項	・吸収線量 ・被滅菌物の載荷形態(密度) ・電子ビーム特性(平均電子ビーム電流, 電子エネルギー, 走査幅) ・その他必要な事項
管理するべきユーティリティ及び制御装置	・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他	・電子ビーム測定装置 ・ベルトコンベア ・線量測定システム ・その他

表7 ろ過法における管理項目, ユーティリティ及び制御装置(参考)

	液体ろ過滅菌	気体ろ過滅菌
管理項目	・ろ過時間 ・ろ過量 ・ろ過流速 ・ろ過差圧 ・温度 ・フィルターの完全性 ・多回使用の場合は, 使用期間及びフィルターの滅菌回数	・ろ過差圧 ・必要に応じて温度 ・フィルターの完全性 ・使用期間 ・フィルターの滅菌回数

	・その他必要な事項	・気体流れ方向(双方向に流す場合) ・その他必要な事項
管理するべきユーティリティ及び制御装置	・圧力計 ・流量計 ・完全性試験装置 ・その他	・圧力計 ・流量計 ・完全性試験装置 ・その他

指標体は、その形状から、「ペーパーストリップタイプ」、
「金属などの表面に接種するタイプ」、「液体タイプ」及び

「培地とペーパーストリップがあらかじめ封入された培地一体タイプ」などに分類される。また、担体から分類すると、ろ紙、ガラス、ステンレス又はプラスチックなどを担体として、指標菌の芽胞を接種して包装したものと、製品又は類似品を担体として指標菌の芽胞を接種したものがある。代表的な滅菌法別指標菌の例を表8に示した。

表8 代表的な滅菌法別指標菌一覧

滅菌法	菌種	株名	D値等(参考)
湿熱滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953, NBRC 13737	1.5分間以上(121℃)
乾熱滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(160℃)
EOガス滅菌法	<i>Bacillus atrophaeus</i>	ATCC 9372, NBRC 13721	2.5分間以上(54℃) 12.5分間以上(30℃) ガス濃度600±30 mg/L, 相対湿度60%RH
過酸化水素滅菌法	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980, NBRC 12550 又は ATCC 7953, NBRC 13737	—

3.1.2. 市販BIの表示事項

ISO 11138-1に従って製造された市販BIの使用者は、BI製造者より使用者に対して提供された次のような情報を確認すること。

- ・製造トレーサビリティ(微生物、単体、包装材料など)
- ・菌種名
- ・公称菌数
- ・抵抗性
- ・使用方法
- ・保管条件(温度、使用期間など)
- ・培養条件(温度、期間、培地など)
- ・廃棄方法

BIの性能を決める項目としては、「菌種」、「抵抗性」、「菌数」などがある。抵抗性は、同じ菌種であっても担体又は包装材料の材質若しくは形状によっても変動するため、包装材料を含めた評価が必要である。

3.1.3. 市販BI使用時の管理

BIを使用する場合には、BI製造者が提示した保管条件、滅菌後から培養開始までの期間、培養条件、廃棄方法などに従い取り扱うこと。特に、保管条件はBIの性能に影響を及ぼすおそれがあるため、取り出してから使用するまでの期間についても長時間放置しないなどの留意をする必要がある。

BIは、被滅菌物全体を評価できるように設置する。また、加熱による滅菌におけるコールドスポットのような、それぞれの方法において、滅菌効果が低いと予測される場所にも設置する。回収する場合は、BIの包装材料や担体を破壊しないように留意する。また、包装材料を破壊してしまった場合は、指標菌が放出・拡散する可能性があるため、微生物汚染防止の観点から、手順をあらかじめ定めておくこと。

BIを購入して使用する場合、使用者は、必要に応じて受入

時に芽胞菌数などの測定を行い、BI製造者の公称菌数との間に大きな差がないことを確認すること。

3.1.4. 使用者による滅菌指標体作製時の注意

購入したBIを使用せず、製造環境や被滅菌物から回収したバイオバーデンを利用して指標体自作する場合は、使用前に少なくとも次のような事項を評価すること。

- ・菌種名
- ・菌数
- ・抵抗性(当該滅菌温度又は滅菌ガス濃度におけるD値)
- ・保管条件(温度、使用期間など)
- ・培養条件(温度、期間、培地など)

なお、抵抗性についてはバイオバーデン中の最大の抵抗性菌であることを継続的に示すための評価プログラムを定めること。

3.1.5. 市販BIの使用者による改変時の注意

購入したBIを包装から取り出し、薬液や資材などの被滅菌物に接種して使用する場合は、菌数や抵抗性が変動するため、使用前にこれらの性能を評価すること。

評価を行う場合は、ISO 11138シリーズや米国薬局方（55）を参照することができる。抵抗性の評価には、生物指標抵抗性評価装置(BIER)又はオイルバスを用いたキャピラリー法がある。自社にて評価することが困難な場合は、外部試験検査機関を利用することもできる。

3.2. ケミカルインジケータ（CI）

CIとは、熱、ガス、又は放射線などの作用により化学的又は物理的に変化する指標体である。指標体の形状としては、それを塗布又は印刷した紙片などがある。滅菌方法に応じて変化する原理は異なるため、使用する滅菌方法に合ったCIを選ぶ必要がある。CIは、使用用途に基づいて以下の6クラスに分類される。ここに示すクラスは性能の優劣に関与するものではない。

なお、CIは滅菌工程の一つ又は複数の重要パラメーターの達成を示す指標であるが、滅菌効果や無菌性の保証に用いる指標ではないため、BIの代わりとして用いることはできない。

クラス1：プロセス・インジケーター

被滅菌物が滅菌工程を経たかどうかを区別することを目的とする。重要パラメーターの一つ又はそれ以上に反応する。

クラス2：特定試験用インジケーター

ISO 11140シリーズで規定される、真空型高压蒸気滅菌装置の排気能力及び蒸気浸透の試験で使用される。Bowie-Dickタイプが該当する。

クラス3：単一変数インジケーター

重要パラメーターの一つのみに反応する。指定されたパラメーターの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを示す。

クラス4：複数変数インジケーター

重要パラメーターの二つ又はそれ以上に反応する。指定されたパラメーターの規定値で、滅菌工程に暴露されたことを示す。

クラス5：インテグレーション・インジケーター

全ての重要パラメーターに反応する。ISO 11138シリーズに規定されているBIの性能要求と同等又はそれ以上の規定値を持つ。

クラス6：エミュレーション・インジケーター

規定された滅菌サイクルの全ての重要パラメーターに反応する。規定値は、指定した滅菌工程の重要パラメーターである。

3.3. 線量計

3.3.1. 線量計の種類

放射線照射プロセスにおける線量計とは、放射線を吸収することによる変化から吸収線量を読み取る計器又はシステムであり、「再現性」と「放射線の測定が可能な応答性」を持つことが要求される。線量計の多くは、使用する照射施設における照射前後及び照射中の温度並びに線量率などの環境条件(工程パラメーター)によって影響を受ける場合があるため注意を要する。線量計の選定や使用については、放射線照射プロセスに対する線量計システムの選定及び校正指針(ISO/ASTM 51261)が規定されている。放射線の吸収線量を測定する線量計を表9に示した。なお、 γ 線用線量計は、通例、エネルギー3 MeV未満の電子線を用いる滅菌の工程管理には適さない。

表9 線量計の種類

放射線種類	線量計
γ 線	着色ポリメチルメタクリレート線量計
	透明ポリメチルメタクリレート線量計
	セリックスラス線量計
	アラニン線量計
γ 線、電子線	セルロースアセテート線量計
	ラジオクロミックフィルム線量計

3.3.2. 線量計使用方法

線量計は、放射線の照射条件を決定するために実施する線量分布測定時に、また、通常の放射線滅菌における被滅菌物の吸収線量を評価するために使用する。前者では、あらかじめ被滅菌物内部に線量計を配置し、放射線照射後に回収して、測定システムで計測することにより、各部位の吸収線量を明確にする。このとき、放射線の透過性や線量のばらつきからこん包形態の妥当性を確認すると共に、最小及び最大線量と工程パラメータ

一との関係を決定する必要があるため、線量計を垂直方向、水平方向の広い範囲に配置する。後者では、線量計を必ずしも被滅菌物内部の最小や最大線量部位に設置する必要はない。線量計の設置/回収が容易な管理点を選定し、管理点での吸収線量を基に被滅菌物の吸収線量を保証する。そのために線量分布測定において、この管理点と被滅菌物内の最大/最小線量部位との量的な関係を明確にすると共に、管理点における合格線量範囲も算出しておくこと。

なお、線量計は、新しく購入して使用する前に校正を行うほか、線量計のバッチ切り替え時、及び1年を超えないごとに1回、校正する。

4. 滅菌条件設計法

4.1. ハーフサイクル法

ハーフサイクル法は、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法に対する抵抗性とは関係なく、BIに含まれる 10^6 CFUの指標菌の全てが死滅する処理時間の2倍の滅菌時間を採用する方法である。本法は、主にEOなどガス滅菌法の滅菌条件の設定に使用される。

4.2. オーバーキル法

オーバーキル法は、被滅菌物上のバイオバーデン数や検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性とは関係なく、 10^{-6} 以下のSALが得られる条件で滅菌を行う方法である。

蒸気滅菌の場合は $12D$ の滅菌条件をいう。ただし、 F_0 値12以上での滅菌条件もオーバーキル法と称している。

4.3. バイオバーデン/BI併用法

バイオバーデン/BI併用法は、広範なバイオバーデン調査結果から最大バイオバーデン数を決定し、目標とするSALを基に、最大バイオバーデン数以上の試験菌数を有する適当な市販BIを用いて滅菌時間(又は滅菌線量)を算出する方法である。

本法を用いる場合は、被滅菌物のバイオバーデン数を日常的に調査し、検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の指標菌より抵抗性の強い菌が検出された場合には、それを用いて指標菌とする。また、必要に応じて滅菌条件の見直しを行う。

$$\text{滅菌時間(又は滅菌線量)} = D \times \log(N_0/N)$$

D : BIの D 値

N : 目的とする無菌性保証水準(SAL)

N_0 : 被滅菌物の最大バイオバーデン数

4.4. 絶対バイオバーデン法

絶対バイオバーデン法は、被滅菌物や製造環境から検出された菌について、当該滅菌法に対する抵抗性調査を行い、湿熱滅菌法の場合には、その中から最も抵抗性の強い菌を選び、その D 値を用い、被滅菌物のバイオバーデン数を基に滅菌条件を設定する方法である。

バイオバーデン数は、広範なバイオバーデン調査によって決定する。本法を用いる場合は、日常のバイオバーデン管理において、菌数計測及び検出菌の当該滅菌法に対する抵抗性測定を日常的に行う必要がある。

放射線滅菌法の場合は、ISO 11137-2の方法により実施する。

5. 参考資料

- ISO 11138-1: 2006, Sterilization of health care products-

- 383 Biological indicators-Part1: General requirements.
384 2) ISO 11137-2: 2013, Sterilization of health care products-
385 Radiation-Part2: Establishing the sterilization dose.
386 3) ISO/ASTM 51261: 2013, Practice for calibration of
387 routine dosimetry systems for radiation processing.
388 4) ISO 11140-1: 2014, Sterilization of health care products-
389 Chemical indicators-Part1: General requirements.
390 5) US Pharmacopeia 38 (2015), <55> Biological Indicators-
391 Resistance Performance Tests.

1 G5. 生薬関連

2 日本薬局方収載生薬の学名表記について〈G5-1-182〉

4 日本薬局方収載生薬の基原植物、藻類、真菌類及び基原動物
 5 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
 6 名表記と若干異なっている。これは、日局が学術書ではなく法
 7 令であるために生じる問題である。日局での学名表記と、分類
 8 学的に通常使用される学名表記との不一致について、日局利用

9 者の誤解を避けるため、本表に、日局で表記した学名と分類学
 10 的に通常使用される学名表記との関係を示す。また、日局に記
 11 載されている植物の科名は、新エングラの分類体系に基づく
 12 ものが採用されている。1998年に、DNAの塩基配列情報に基
 13 づくAPGの分類体系が発表されて以降、数度の改訂を経て、
 14 植物分類学では現在、主にAPGの分類体系が用いられている
 15 ことから、新エングラとAPGの分類体系における科名の関
 16 係を併記する。

17 なお、APGの分類体系の対象外である裸子植物、藻類、真
 18 菌類及び動物については、米倉¹⁾及びGBIF²⁾に従った。

19 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 ^{3,4)} 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 日本薬局方の表記	科名 APG IV など ^{1,2,5,6)}
アカメガシワ	アカメガシワ <i>Mallotus japonicus</i> Müller Argoviensis = <i>Mallotus japonicus</i> (Thunb.) Müll. Arg.	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
アセンヤク	<i>Uncaria gambir</i> Roxburgh = <i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.	<i>Rubiaceae</i>	<i>Rubiaceae</i>
アヘン末	ケシ <i>Papaver somniferum</i> Linné = <i>Papaver somniferum</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaveraceae</i>
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>	<i>Hydrangeaceae</i>
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>	<i>Leguminosae</i> <i>Fabaceae</i>
アロエ	<i>Aloe ferox</i> Miller = <i>Aloe ferox</i> Mill. <i>Aloe ferox</i> Miller と <i>Aloe africana</i> Miller との種間雑種 <i>Aloe africana</i> Miller = <i>Aloe africana</i> Mill. <i>Aloe ferox</i> Miller と <i>Aloe spicata</i> Baker との種間雑種	<i>Liliaceae</i>	<i>Asphodelaceae</i>
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>	<i>Styracaceae</i>
イレイセン	<i>Clematis mandshurica</i> Ruprecht = <i>Clematis mandshurica</i> Rupr. サキシマボタンヅル <i>Clematis chinensis</i> Osbeck <i>Clematis hexapetala</i> Pallas = <i>Clematis hexapetala</i> Pall.	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Ranunculaceae</i>
インチンコウ	カワラヨモギ <i>Artemisia capillaris</i> Thunberg = <i>Artemisia capillaris</i> Thunb.	<i>Compositae</i>	<i>Compositae</i> <i>Asteraceae</i>
インヨウカク	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 <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. トキワイカリソウ <i>Epimedium sempervirens</i> Nakai	<i>Berberidaceae</i>	<i>Berberidaceae</i>
ウイキョウ	ウイキョウ <i>Foeniculum vulgare</i> Miller = <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Umbelliferae</i>	<i>Umbelliferae</i> <i>Apiaceae</i>
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> <i>Illiciaceae</i>	<i>Umbelliferae</i> <i>Apiaceae</i> <i>Schisandraceae</i>
ウコン	ウコン <i>Curcuma longa</i> Linné = <i>Curcuma longa</i> L.	<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiberaceae</i>

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>	<i>Lauraceae</i>
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>	<i>Ericaceae</i>
エイジツ	ノイバラ <i>Rosa multiflora</i> Thunberg = <i>Rosa multiflora</i> Thunb.	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosaceae</i>
エンゴサク	<i>Corydalis turtschaninovii</i> Besser forma <i>yanhusuo</i> Y. H. Chou et C. C. Hsu = <i>Corydalis turtschaninovii</i> Besser f. <i>yanhusuo</i> (W. T. Wang) Y. H. Chou & C. C. Hsu ----- <i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang	<i>Papaveraceae</i>	<i>Papaveraceae</i>
オウギ	<i>Astragalus mongholicus</i> Bunge ----- <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge var. <i>mongholicus</i> (Bunge) Hsiao キバナオウギ <i>Astragalus membranaceus</i> Bunge = <i>Astragalus membranaceus</i> (Fisch.) Bunge	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
オウゴン	コガネバナ <i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
オウセイ	<i>Polygonatum kingianum</i> Collett et Hemsley = <i>Polygonatum kingianum</i> Collett & Hemsl. カギクマバナルコユリ <i>Polygonatum sibiricum</i> Redouté <i>Polygonatum cyrtonema</i> Hua ナルコユリ <i>Polygonatum falcatum</i> A. Gray	<i>Liliaceae</i>	<i>Asparagaceae</i>
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 オオバノキハダ <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. var. <i>japonicum</i> (Maxim.) Ohwi ミヤマキハダ <i>Phellodendron amurense</i> Rupr. var. <i>lavalleyi</i> (Dode) Sprague ----- <i>Phellodendron chinense</i> Schneider = <i>Phellodendron chinense</i> C. K. Schneid.	<i>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
オウヒ	ヤマザクラ <i>Prunus jamasakura</i> Siebold ex Koidzumi = <i>Prunus jamasakura</i> Siebold ex Koidz. ----- カスミザクラ <i>Prunus verecunda</i> Koehne = <i>Prunus verecunda</i> (Koidz.) Koehne	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosaceae</i>
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.	<i>Ranunculaceae</i>	<i>Ranunculaceae</i>
オリブ油	<i>Olea europaea</i> Linné = <i>Olea europaea</i> L.	<i>Oleaceae</i>	<i>Oleaceae</i>
オレンジ油	<i>Citrus</i> 属諸種植物	<i>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
オンジ	イトヒメハギ <i>Polygala tenuifolia</i> Willdenow = <i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	<i>Polygalaceae</i>	<i>Polygalaceae</i>
ガイヨウ	ヨモギ <i>Artemisia princeps</i> Pampanini = <i>Artemisia princeps</i> Pamp. ----- オオヨモギ <i>Artemisia montana</i> Pampanini = <i>Artemisia montana</i> (Nakai) Pamp.	<i>Compositae</i>	<i>Compositae</i> / <i>Asteraceae</i>
カカオ脂	カカオ <i>Theobroma cacao</i> Linné = <i>Theobroma cacao</i> L.	<i>Sterculiaceae</i>	<i>Malvaceae</i>
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	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
カシュウ	ツルドクダミ <i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg = <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb.	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonaceae</i>
ガジュツ	ガジュツ <i>Curcuma zedoaria</i> Roscoe ----- <i>Curcuma phaeocaulis</i> Valetton ----- <i>Curcuma kwangsiensis</i> S. G. Lee et C. F. Liang	<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiberaceae</i>
カッコウ	<i>Pogostemon cablin</i> Benthham = <i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
カッコン	クズ <i>Pueraria lobata</i> Ohwi = <i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
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	<i>Valerianaceae</i>	<i>Caprifoliaceae</i>

カルナウバロウ	カルナウバヤシ <i>Copernicia cerifera</i> Martius = <i>Copernicia cerifera</i> Mart.	<i>Palmae</i>	<i>Palmae</i> / <i>Arecaeae</i>
カロコン	<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz = <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucurbitaceae</i>
	キカラスウリ <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maximowicz var. <i>japonica</i> Kitamura = <i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim. var. <i>japonica</i> (Miq.) Kitam.		
	オオカラスウリ <i>Trichosanthes bracteata</i> Voigt = <i>Trichosanthes bracteata</i> (Lam.) Voigt		
カンキョウ	ショウガ <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiberaceae</i>
カンゾウ	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer = <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linné = <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.		
カンテン	マクサ(テングサ) <i>Gelidium elegans</i> Kuetzing	<i>Gelidiaceae</i>	<i>Gelidiaceae</i> #
	その他同属植物		
	諸種紅藻類		
キキョウ	キキョウ <i>Platycodon grandiflorus</i> A. De Candolle = <i>Platycodon grandiflorus</i> (Jacq.) A. DC.	<i>Campanulaceae</i>	<i>Campanulaceae</i>
キクカ	シマカンギク <i>Chrysanthemum indicum</i> Linné = <i>Chrysanthemum indicum</i> L.	<i>Compositae</i>	<i>Compositae</i> / <i>Asteraceae</i>
	キク <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramatuelle = <i>Chrysanthemum morifolium</i> Ramat.		
キササゲ	キササゲ <i>Catalpa ovata</i> G. Don	<i>Bignoniaceae</i>	<i>Bignoniaceae</i>
	<i>Catalpa bungei</i> C. A. Meyer = <i>Catalpa bungei</i> C. A. Mey.		
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>	<i>Rutaceae</i>
	ナツミカン <i>Citrus natsudaidai</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		
牛脂	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>	<i>Bovidae</i> #
キョウカツ	<i>Notopterygium incisum</i> Ting ex H. T. Chang	<i>Umbelliferae</i>	<i>Umbelliferae</i> / <i>Apiaceae</i>
	<i>Notopterygium forbesii</i> Boissieu		
キョウニン	ホンアンズ <i>Prunus armeniaca</i> Linné = <i>Prunus armeniaca</i> L.	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosaceae</i>
	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.		
クコシ	クコ <i>Lycium chinense</i> Miller = <i>Lycium chinense</i> Mill.	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>
	<i>Lycium barbarum</i> Linné = <i>Lycium barbarum</i> L.		
クジン	クララ <i>Sophora flavescens</i> Aiton	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
木クレオソート	<i>Pinus</i> 属諸種植物	<i>Pinaceae</i>	<i>Pinaceae</i> #
	<i>Cryptomeria</i> 属諸種植物	<i>Taxodiaceae</i>	<i>Cupressaceae</i> #
	<i>Fagus</i> 属諸種植物	<i>Fagaceae</i>	<i>Fagaceae</i>
	<i>Azelia</i> 属植物(<i>Intsia</i> 属植物)	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
	<i>Shorea</i> 属植物	<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Dipterocarpaceae</i>
	<i>Tectona</i> 属植物	<i>Verbenaceae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
ケイガイ	ケイガイ <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briquet = <i>Schizonepeta tenuifolia</i> Briq.	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
ケイヒ	<i>Cinnamomum cassia</i> J. Presl = <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl	<i>Lauraceae</i>	<i>Lauraceae</i>
ケイヒ油	<i>Cinnamomum cassia</i> J. Presl = <i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J. Presl	<i>Lauraceae</i>	<i>Lauraceae</i>
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Nees		

ケツメイシ	エビスグサ <i>Cassia obtusifolia</i> Linné = <i>Cassia obtusifolia</i> L.	Leguminosae	Leguminosae/ Fabaceae
	<i>Cassia tora</i> Linné = <i>Cassia tora</i> L.		
ケンゴシ	アサガオ <i>Pharbitis nil</i> Choisy = <i>Pharbitis nil</i> (L.) Choisy	Convolvulaceae	Convolvulaceae
ゲンチアナ	<i>Gentiana lutea</i> Linné = <i>Gentiana lutea</i> L.	Gentianaceae	Gentianaceae
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.	Geraniaceae	Geraniaceae
コウイ	トウモロコシ <i>Zea mays</i> Linné = <i>Zea mays</i> L.	Gramineae	Gramineae/ Poaceae
	キヤッサバ <i>Manihot esculenta</i> Crantz	Euphorbiaceae	Euphorbiaceae
	ジャガイモ <i>Solanum tuberosum</i> Linné = <i>Solanum tuberosum</i> L.	Solanaceae	Solanaceae
	サツマイモ <i>Ipomoea batatas</i> Poirét = <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Poir. ----- <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Convolvulaceae	Convolvulaceae
	イネ <i>Oryza sativa</i> Linné = <i>Oryza sativa</i> L.	Gramineae	Gramineae/ Poaceae
コウカ	ベニバナ <i>Carthamus tinctorius</i> Linné = <i>Carthamus tinctorius</i> L.	Compositae	Compositae/ Asteraceae
コウジン	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	Araliaceae	Araliaceae
コウブシ	ハマズグ <i>Cyperus rotundus</i> Linné = <i>Cyperus rotundus</i> L.	Cyperaceae	Cyperaceae
コウベイ	イネ <i>Oryza sativa</i> Linné = <i>Oryza sativa</i> L.	Gramineae	Gramineae/ Poaceae
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 E. H. Wilson ----- <i>Magnolia officinalis</i> Rehder et E. H. Wilson var. <i>biloba</i> Rehder et E. H. Wilson	Magnoliaceae	Magnoliaceae
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	Bovidae	Bovidae [#]
ゴシツ	<i>Achyranthes bidentata</i> Blume	Amaranthaceae	Amaranthaceae
	ヒナタイノコズチ <i>Achyranthes fauriei</i> H. Léveillé et Vaniot = <i>Achyranthes fauriei</i> H. Lev. & Vaniot		
ゴシユク	<i>Euodia officinalis</i> Dode ----- * <i>Evodia officinalis</i> Dode ----- <i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. var. <i>officinalis</i> (Dode) Huang	Rutaceae	Rutaceae
	<i>Euodia bodinieri</i> Dode ----- * <i>Evodia bodinieri</i> Dode ----- <i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. var. <i>bodinieri</i> (Dode) Huang		
	ゴシユク <i>Euodia ruticarpa</i> Hooker filius et Thomson = <i>Euodia ruticarpa</i> (A. Juss.) Hook. f. & Thomson ----- * <i>Evodia rutaecarpa</i> Benth.		
	<i>Evodia rutaecarpa</i> (A. Juss.) Benth. ----- <i>Tetradium ruticarpum</i> (A. Juss.) T.G. Hartley		
ゴボウシ	ゴボウ <i>Arctium lappa</i> Linné = <i>Arctium lappa</i> L.	Compositae	Compositae/ Asteraceae
ゴマ	ゴマ <i>Sesamum indicum</i> Linné	Pedaliaceae	Pedaliaceae
ゴマ油	= <i>Sesamum indicum</i> L.		
ゴミシ	チョウセンゴミシ <i>Schisandra chinensis</i> Baillon = <i>Schisandra chinensis</i> (Turcz.) Baill.	Schisandraceae	Schisandraceae
コロンボ	<i>Jateorhiza columba</i> Miers	Menispermaceae	Menispermaceae
コンズランゴ	<i>Marsdenia cundurango</i> Reichenbach filius = <i>Marsdenia cundurango</i> Rehb. f.	Asclepiadaceae	Apocynaceae
サイコ	ミシマサイコ <i>Bupleurum falcatum</i> Linné = <i>Bupleurum falcatum</i> L. ----- <i>Bupleurum chinense</i> DC.	Umbelliferae	Umbelliferae/ Apiaceae
	<i>Bupleurum scorzonrifolium</i> Willd.		

サイシン	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>	<i>Aristolochiaceae</i>
	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.		
	ウスゲサイシン <i>Asarum sieboldii</i> Miq. var. <i>seoulense</i> Nakai		
サフラン	サフラン <i>Crocus sativus</i> Linné = <i>Crocus sativus</i> L.	<i>Iridaceae</i>	<i>Iridaceae</i>
サンキライ	<i>Smilax glabra</i> Roxburgh = <i>Smilax glabra</i> Roxb.	<i>Liliaceae</i>	<i>Smilacaceae</i>
サンザシ	サンザシ <i>Crataegus cuneata</i> Siebold et Zuccarini = <i>Crataegus cuneata</i> Siebold & Zucc.	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosaceae</i>
	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.		
サンシシ	クチナシ <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis ----- <i>Gardenia jasminoides</i> J. Ellis f. <i>longicarpa</i> Z. W. Xie & M. Okada	<i>Rubiaceae</i>	<i>Rubiaceae</i>
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>	<i>Cornaceae</i>
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>inerme</i> Makino	<i>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
サンソウニン	サネブトナツメ <i>Ziziphus jujuba</i> Miller var. <i>spinosa</i> Hu ex H. F. Chow = <i>Ziziphus jujuba</i> Mill. var. <i>spinosa</i> (Bunge) Hu ex H. F. Chow	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Rhamnaceae</i>
サンヤク	ヤマノイモ <i>Dioscorea japonica</i> Thunberg = <i>Dioscorea japonica</i> Thunb.	<i>Dioscoreaceae</i>	<i>Dioscoreaceae</i>
	ナガイモ <i>Dioscorea batatas</i> Decaisne = <i>Dioscorea batatas</i> Decne. ----- <i>Dioscorea opposita</i> Thunb.		
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>Scrophulariaceae</i>	<i>Orobanchaceae</i>
	<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz = <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.		
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>	<i>Araliaceae</i>
ジコッピ	クコ <i>Lycium chinense</i> Miller = <i>Lycium chinense</i> Mill.	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>
	<i>Lycium barbarum</i> Linné = <i>Lycium barbarum</i> L.		
シコン	ムラサキ <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold et Zuccarini = <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.	<i>Boraginaceae</i>	<i>Boraginaceae</i>
シツリシ	ハマビシ <i>Tribulus terrestris</i> Linné = <i>Tribulus terrestris</i> L.	<i>Zygophyllaceae</i>	<i>Zygophyllaceae</i>
シャカンゾウ	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer = <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> <i>Fabaceae</i>
	<i>Glycyrrhiza glabra</i> Linné = <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.		
シャクヤク	シャクヤク <i>Paeonia lactiflora</i> Pallas = <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	<i>Paeoniaceae</i>	<i>Paeoniaceae</i>
ジャシヨウシ	<i>Cnidium monnieri</i> Cusson = <i>Cnidium monnieri</i> (L.) Cusson	<i>Umbelliferae</i>	<i>Umbelliferae</i> <i>Apiaceae</i>
シャゼンシ	オオバコ <i>Plantago asiatica</i> Linné = <i>Plantago asiatica</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantaginaceae</i>
シャゼンソウ	オオバコ <i>Plantago asiatica</i> Linné = <i>Plantago asiatica</i> L.	<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantaginaceae</i>
ジュウヤク	ドクダミ <i>Houttuynia cordata</i> Thunberg = <i>Houttuynia cordata</i> Thunb.	<i>Saururaceae</i>	<i>Saururaceae</i>

シュクシャ	<i>Amomum villosum</i> Loureiro var. <i>xanthioides</i> T. L. Wu et S. J. Chen = <i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>xanthioides</i> (Wall. ex Baker) T. L. Wu & S. J. Chen ----- <i>Amomum xanthioides</i> Wallich = <i>Amomum xanthioides</i> Wall. ex Baker ----- <i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>nanum</i> H. T. Tsai & S. W. Zhao	Zingiberaceae	Zingiberaceae
	<i>Amomum villosum</i> Loureiro var. <i>villosum</i> = <i>Amomum villosum</i> Lour. var. <i>villosum</i> ----- <i>Amomum villosum</i> Lour.		
	<i>Amomum longiligulare</i> T. L. Wu		
	ショウガ <i>Zingiber officinale</i> Roscoe		
	ショウブク <i>Elettaria cardamomum</i> Maton		
ショウマ	<i>Cimicifuga dahurica</i> Maximowicz = <i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz.) Maxim.	Ranunculaceae	Ranunculaceae
	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Komarov = <i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom.		
	<i>Cimicifuga foetida</i> Linné = <i>Cimicifuga foetida</i> L.		
	サラシナショウマ <i>Cimicifuga simplex</i> Turczaninow = <i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Turcz.		
シンイ	<i>Magnolia biondii</i> Pampanini = <i>Magnolia biondii</i> Pamp.	Magnoliaceae	Magnoliaceae
	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.		
	<i>Magnolia sprengeri</i> Pampanini = <i>Magnolia sprengeri</i> Pamp.		
	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.		
シンギ	<i>Hedysarum polybotrys</i> Handel-Mazzetti = <i>Hedysarum polybotrys</i> Hand.-Mazz.	Leguminosae	Leguminosae/ Fabaceae
セネガ	セネガ <i>Polygala senega</i> Linné = <i>Polygala senega</i> L.	Polygalaceae	Polygalaceae
	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		
センキュウ	センキュウ <i>Cnidium officinale</i> Makino	Umbelliferae	Umbelliferae/ Apiaceae
ゼンコ	<i>Peucedanum praeruptorum</i> Dunn	Umbelliferae	Umbelliferae/ Apiaceae
	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.		
センコツ	コウホネ <i>Nuphar japonica</i> De Candolle = <i>Nuphar japonica</i> DC.	Nymphaeaceae	Nymphaeaceae
	ネムロコウホネ <i>Nuphar pumila</i> De Candolle = <i>Nuphar pumila</i> (Timm) DC.		
	上記種の種間雑種		
センソ	アジアヒキガエル <i>Bufo gargarizans</i> Cantor ----- = <i>Bufo bufo gargarizans</i> Cantor	Bufonidae	Bufonidae ^e
	<i>Bufo melanostictus</i> Schneider = <i>Duttaphrynus melanostictus</i> Schneider		
センナ	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl	Leguminosae	Leguminosae/ Fabaceae
	<i>Cassia acutifolia</i> Delile		
センブリ	センブリ <i>Swertia japonica</i> Makino = <i>Swertia japonica</i> (Shult.) Makino	Gentianaceae	Gentianaceae
ソウジュツ	ホソバオケラ <i>Atractylodes lancea</i> De Candolle = <i>Atractylodes lancea</i> (Thunb.) DC.	Compositae	Compositae/ Asteraceae
	シナオケラ <i>Atractylodes chinensis</i> Koidzumi = <i>Atractylodes chinensis</i> (Bunge) Koidz.		
	上記種の種間雑種		
ソウハクヒ	マグワ <i>Morus alba</i> Linné = <i>Morus alba</i> L.	Moraceae	Moraceae
ソボク	<i>Caesalpinia sappan</i> Linné = <i>Caesalpinia sappan</i> L.	Leguminosae	Leguminosae/ Fabaceae

ソヨウ	シソ <i>Perilla frutescens</i> Britton var. <i>crispa</i> W. Deane = <i>Perilla frutescens</i> (L.) Britton var. <i>crispa</i> (Thunb.) W. Deane	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
ダイオウ	<i>Rheum palmatum</i> Linné = <i>Rheum palmatum</i> L.	<i>Polygonaceae</i>	<i>Polygonaceae</i>
	<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		
ダイズ油	ダイズ <i>Glycine max</i> Merrill = <i>Glycine max</i> (L.) Merr.	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
タイソウ	ナツメ <i>Ziziphus jujuba</i> Miller var. <i>inermis</i> Rehder = <i>Ziziphus jujuba</i> Mill. var. <i>inermis</i> (Bunge) Rehder	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Rhamnaceae</i>
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>	<i>Alismataceae</i>
タンジン	タンジン <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	<i>Labiatae</i>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
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>	<i>Araliaceae</i>
チモ	ハナスゲ <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Bunge	<i>Liliaceae</i>	<i>Asparagaceae</i>
チョウジ チョウジ油	チョウジ <i>Syzygium aromaticum</i> Merrill et L. M. Perry = <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L. M. Perry * <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunberg = <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb. <i>Eugenia caryophyllus</i> (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison	<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>
チョウトウコウ	カギカズラ <i>Uncaria rhynchophylla</i> Miquel = <i>Uncaria rhynchophylla</i> (Miq.) Miq.	<i>Rubiaceae</i>	<i>Rubiaceae</i>
	<i>Uncaria sinensis</i> Haviland = <i>Uncaria sinensis</i> (Oliv.) Havil.		
	<i>Uncaria macrophylla</i> Wallich = <i>Uncaria macrophylla</i> Wall.		
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>	<i>Polyporaceae</i> #
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>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
	<i>Citrus reticulata</i> Blanco		
ツバキ油	ヤブツバキ(ツバキ) <i>Camellia japonica</i> Linné = <i>Camellia japonica</i> L.	<i>Theaceae</i>	<i>Theaceae</i>
テレピン油	<i>Pinus</i> 属諸種植物	<i>Pinaceae</i>	<i>Pinaceae</i> #
テンマ	オニノヤガラ <i>Gastrodia elata</i> Blume	<i>Orchidaceae</i>	<i>Orchidaceae</i>
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>	<i>Asparagaceae</i>
トウガシ	トウガン <i>Benincasa cerifera</i> Savi ----- <i>Benincasa hispida</i> (Thunb.) Cogn.	<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Cucurbitaceae</i>
	<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		
トウガラシ	トウガラシ <i>Capsicum annuum</i> Linné = <i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>
トウキ	トウキ <i>Angelica acutiloba</i> Kitagawa = <i>Angelica acutiloba</i> (Siebold & Zucc.) Kitag.	<i>Umbelliferae</i>	<i>Umbelliferae</i> / <i>Apiaceae</i>
	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		
トウジン	ヒカゲツルニンジン <i>Codonopsis pilosula</i> Nannfeldt = <i>Codonopsis pilosula</i> Nannf.	<i>Campanulaceae</i>	<i>Campanulaceae</i>
	<i>Codonopsis tangshen</i> Oliver = <i>Codonopsis tangshen</i> Oliv.		
トウニン	モモ <i>Prunus persica</i> Batsch = <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	<i>Rosaceae</i>	<i>Rosaceae</i>
	<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.		
トウヒ	<i>Citrus aurantium</i> Linné = <i>Citrus aurantium</i> L.	<i>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>

	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>		
トウモロコシ油	トウモロコシ <i>Zea mays</i> Linné = <i>Zea mays</i> L.	<i>Gramineae</i>	<i>Gramineae</i> / <i>Poaceae</i>
ドクカツ	ウド <i>Aralia cordata</i> Thunberg = <i>Aralia cordata</i> Thunb.	<i>Araliaceae</i>	<i>Araliaceae</i>
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>	<i>Rubiaceae</i>
トチュウ	トチュウ <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver = <i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	<i>Eucommiaceae</i>	<i>Eucommiaceae</i>
トラガント	<i>Astragalus gummifer</i> Labillardière = <i>Astragalus gummifer</i> Labill.	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> / <i>Fabaceae</i>
豚脂	ブタ <i>Sus scrofa</i> Linné var. <i>domesticus</i> Gray = <i>Sus scrofa</i> L. var. <i>domesticus</i> Gray	<i>Suidae</i>	<i>Suidae</i> [#]
ナタネ油	セイヨウアブラナ <i>Brassica napus</i> Linné = <i>Brassica napus</i> L. ----- アブラナ <i>Brassica rapa</i> Linné var. <i>oleifera</i> De Candolle = <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>oleifera</i> DC.	<i>Cruciferae</i>	<i>Cruciferae</i> / <i>Brassicaceae</i>
ニガキ	ニガキ <i>Picrasma quassioides</i> Bennet = <i>Picrasma quassioides</i> (D. Don) Benn.	<i>Simaroubaceae</i>	<i>Simaroubaceae</i>
ニクジュヨウ	<i>Cistanche salsa</i> G. Beck = <i>Cistanche salsa</i> (C. A. Mey.) Beck ----- <i>Cistanche deserticola</i> Y. C. Ma = <i>Cistanche deserticola</i> Ma ----- <i>Cistanche tubulosa</i> Wight	<i>Orobanchaceae</i>	<i>Orobanchaceae</i>
ニクズク	ニクズク <i>Myristica fragrans</i> Houttuyn = <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	<i>Myristicaceae</i>	<i>Myristicaceae</i>
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>	<i>Araliaceae</i>
ニンドウ	スイカズラ <i>Lonicera japonica</i> Thunberg = <i>Lonicera japonica</i> Thunb.	<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Caprifoliaceae</i>
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>	<i>Liliaceae</i>
バクガ	オオムギ <i>Hordeum vulgare</i> Linné = <i>Hordeum vulgare</i> L.	<i>Gramineae</i>	<i>Gramineae</i> / <i>Poaceae</i>
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>	<i>Asparagaceae</i>
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>	<i>Apidae</i> [#]
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>	<i>Labiatae</i> / <i>Lamiaceae</i>
ハマボウフウ	ハマボウフウ <i>Glehnia littoralis</i> F. Schmidt ex Miquel = <i>Glehnia littoralis</i> F. Schmidt ex Miq.	<i>Umbelliferae</i>	<i>Umbelliferae</i> / <i>Apiaceae</i>
ハンゲ	カラスビシャク <i>Pinellia ternata</i> Breitenbach = <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Breitenb.	<i>Araceae</i>	<i>Araceae</i>
ヒマシ油	トウゴマ <i>Ricinus communis</i> Linné = <i>Ricinus communis</i> L.	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Euphorbiaceae</i>
ビャクゴウ	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>	<i>Liliaceae</i>
ビャクシ	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>	<i>Umbelliferae</i> / <i>Apiaceae</i>

ビャクジュツ	オケラ <i>Atractylodes japonica</i> Koidzumi ex Kitamura = <i>Atractylodes japonica</i> Koidz. ex Kitam.	Compositae	Compositae/ Asteraceae
	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.		
ビワヨウ	ビワ <i>Eriobotrya japonica</i> Lindley = <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.	Rosaceae	Rosaceae
ビンロウジ	ビンロウ <i>Areca catechu</i> Linné = <i>Areca catechu</i> L.	Palmae	Palmae/ Arecaceae
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	Polyporaceae	Polyporaceae [#]
ブシ	ハナトリカブト <i>Aconitum carmichaeli</i> Debeaux	Ranunculaceae	Ranunculaceae
	オクトリカブト <i>Aconitum japonicum</i> Thunberg = <i>Aconitum japonicum</i> Thunb.		
ベラドンナコン	ベラドンナ <i>Atropa belladonna</i> Linné = <i>Atropa belladonna</i> L.	Solanaceae	Solanaceae
ヘンズ	フジマメ <i>Dolichos lablab</i> Linné = <i>Dolichos lablab</i> L.	Leguminosae	Leguminosae/ Fabaceae
ボウイ	オオツツラフジ <i>Sinomenium acutum</i> Rehder et E. H. Wilson = <i>Sinomenium acutum</i> (Thunb.) Rehder & E. H. Wilson	Menispermaceae	Menispermaceae
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.	Gramineae	Gramineae/ Poaceae
ボウフウ	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin = <i>Saposhnikovia divaricata</i> (Turcz.) Schischk.	Umbelliferae	Umbelliferae/ Apiaceae
ボクソク	クヌギ <i>Quercus acutissima</i> Carruthers = <i>Quercus acutissima</i> Carruth.	Fagaceae	Fagaceae
	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	Paeoniaceae	Paeoniaceae
ホミカ	<i>Strychnos nux-vomica</i> Linné = <i>Strychnos nux-vomica</i> L.	Loganiaceae	Loganiaceae
ボレイ	カキ <i>Ostrea gigas</i> Thunberg = <i>Ostrea gigas</i> Thunb.	Ostreidae	Ostreidae [#]
マオウ	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	Ephedraceae	Ephedraceae [#]
	<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	Rhodomelaceae	Rhodomelaceae [#]
マシニン	アサ <i>Cannabis sativa</i> Linné = <i>Cannabis sativa</i> L.	Moraceae	Cannabaceae
ミツロウ	ヨーロッパミツバチ <i>Apis mellifera</i> Linné = <i>Apis mellifera</i> L.	Apidae	Apidae [#]
	トウヨウミツバチ <i>Apis cerana</i> Fabricius		
モクツウ	アケビ <i>Akebia quinata</i> Decaisne = <i>Akebia quinata</i> (Thunb. ex Houtt.) Decne.	Lardizabalaceae	Lardizabalaceae
	ミツバアケビ <i>Akebia trifoliata</i> Koidzumi = <i>Akebia trifoliata</i> (Thunb.) Koidz.		
	上記種の種間雑種		
モッコウ	<i>Saussurea lappa</i> Clarke = <i>Saussurea lappa</i> (Decne.) C. B. Clarke <i>Aucklandia lappa</i> Decne.	Compositae	Compositae/ Asteraceae
ヤクチ	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miquel = <i>Alpinia oxyphylla</i> Miq.	Zingiberaceae	Zingiberaceae
ヤクモソウ	メハジキ <i>Leonurus japonicus</i> Houttuyn = <i>Leonurus japonicus</i> Houtt.	Labiateae	Labiateae/ Lamiaceae
	<i>Leonurus sibiricus</i> Linné = <i>Leonurus sibiricus</i> L.		
ヤシ油	ココヤシ <i>Cocos nucifera</i> Linné = <i>Cocos nucifera</i> L.	Palmae	Palmae/ Arecaceae

ユウタン	<i>Ursus arctos</i> Linné = <i>Ursus arctos</i> L. その他近縁動物	<i>Ursidae</i>	<i>Ursidae</i> [#]
ユーカリ油	ユーカリノキ <i>Eucalyptus globulus</i> Labillardiere = <i>Eucalyptus globulus</i> Labill. 近縁植物	<i>Myrtaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>
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>	<i>Gramineae</i> [#] <i>Poaceae</i>
ラッカセイ油	ラッカセイ <i>Arachis hypogaea</i> Linné = <i>Arachis hypogaea</i> L.	<i>Leguminosae</i>	<i>Leguminosae</i> [#] <i>Fabaceae</i>
精製ラノリン	ヒツジ <i>Ovis aries</i> Linné = <i>Ovis aries</i> L.	<i>Bovidae</i>	<i>Bovidae</i> [#]
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>	<i>Sapindaceae</i>
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>Gentiana manshurica</i> Kitagawa = <i>Gentiana manshurica</i> Kitag. <i>Gentiana triflora</i> Pallas = <i>Gentiana triflora</i> Pall. エゾリンドウ <i>Gentiana triflora</i> Pall. var. <i>japonica</i> Hara	<i>Gentianaceae</i>	<i>Gentianaceae</i>
リョウキョウ	<i>Alpinia officinarum</i> Hance	<i>Zingiberaceae</i>	<i>Zingiberaceae</i>
レンギョウ	レンギョウ <i>Forsythia suspensa</i> Vahl = <i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	<i>Oleaceae</i>	<i>Oleaceae</i>
レンニク	ハス <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner = <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	<i>Nymphaeaceae</i>	<i>Nelumbonaceae</i>
ロジン	<i>Pinus</i> 属諸種植物	<i>Pinaceae</i>	<i>Pinaceae</i> [#]
ロートコン	ハンリドコロ <i>Scopolia japonica</i> Maximowicz = <i>Scopolia japonica</i> Maxim. <i>Scopolia carniolica</i> Jacquin = <i>Scopolia carniolica</i> Jacq. <i>Scopolia parviflora</i> Nakai = <i>Scopolia parviflora</i> (Dunn) Nakai	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanaceae</i>
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. トウヨウミツバチ <i>Apis cerana</i> Fabricius	<i>Apidae</i>	<i>Apidae</i> [#]

- 1) 米倉浩司, 新維管束植物分類表, 北隆館, 東京, 2019, ISBN 978-4-8326-1008-8.
- 2) Global Biodiversity Information Facility, <https://www.gbif.org>. (Accessed April 15, 2022).
- 3) 寺林進ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, 407-418 (2010).
- 4) 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.
- 5) 高野昭人ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 52, 291-302 (2021).
- 6) APG IV の対象外である裸子植物, 藻類, 真菌類及び動物には, #印を付している.

1 生薬等の定量指標成分について〈G5-2-170〉

2 医薬品としての生薬及び生薬を主たる原料とする製剤(生薬
3 製剤)の最大の特徴は、非常に多くの成分からなる多成分系で
4 あることである。世界的に見て最も重要な生薬の一つであるカ
5 ンゾウを例にとると、これまでに同植物での存在が確認された
6 二次代謝成分は少なくとも100以上存在し、生合成を考慮すれ
7 ば、低分子だけで1000以上の物質が含まれていると考えても
8 おかしくない。カンゾウの薬効には、これらの成分全体が複合
9 的に関与しているものと考えられる。

10 植物を原材料とする医薬品の構成成分の多様性は、基本的
11 植物の二次代謝の多様性に由来するが、それだけではない。医
12 薬品の原材料である植物は、その承認書において種が規定され
13 るが、同一種でも様々な遺伝的多様性があるために、遺伝的な
14 要因に伴って成分の多様性が生じる。さらに、植物の生育地の
15 土壌条件(土質、保水性、pH等)及び気象条件(降水量、気温、
16 湿度等)といった環境要因に従って二次代謝産物の種類と量は
17 変化し、さらに、野生・栽培の別や、栽培方法、採取時期が異
18 なれば成分組成は変化することになる。また、生薬の場合には、
19 最終的に、周皮を除く、蒸す、煎る等、様々な加工方法がある
20 ことから、この加工方法の違いによっても、構成成分は異なるこ
21 とになる。

22 生薬や生薬製剤における成分の含量(定量値)の規定は、天然
23 物医薬品の品質を規格化する上で、非常に重要な意味を持つ。
24 生薬の場合、これらの規定は、通常最低限度値規定となってい
25 る。例えば、日局「カンゾウ」では、グリチルリチン酸含量の
26 規定が2.0%以上となっている。生薬の場合、植物体一個体ご
27 とに比較すると、前述した様々な要因から、二次代謝産物の含
28 量は、大きく異なることが知られている。例えば、カンゾウの
29 グリチルリチン酸含量を比較した場合、同一圃場で同一時期に
30 収穫したものであったとしても10倍程度変化することが報告
31 されている。したがって、生薬資源の有効利用を考えたとき、
32 生薬段階で成分の規格値の幅を記載することは困難となる。一
33 方で、最終製品である製剤の段階では、有効成分は一定量含ま
34 れていることが医療の再現性の面から重要である。したがって、
35 ほとんどの場合、生薬利用の最終形態と考えられる漢方処方エ
36 キス製剤や生薬エキス製剤では、成分規格は含量の幅を記載す
37 ることとなり、様々な含量の生薬の組み合わせにより一定の成
38 分含量の製剤が調製されるように規定されている。

39 生薬における成分の含量規定で注意しておかなくてはならな
40 いこととして、含量が規定されている成分には様々なタイプが
41 存在する点が挙げられる。例えば、センナにおけるセンノシド
42 は、センナの薬効である瀉下作用をある程度説明できる明ら
43 かな有効成分である。センナに含まれるレインやアロエエモジン
44 といった他のアントラキノン類も同様の作用を持つとはいえ、
45 量的な面を考えても、本化合物の含量をコントロールすること
46 で、センナの薬効をかなり規格化できるものと考えられる。た
47 だし加熱等によりセンノシドはアントラキノン類に一部分解さ
48 れるので、センノシド含有生薬であるダイオウを構成生薬に持
49 つ漢方処方エキスでは、センノシドだけでなく増加したレイン
50 も含めて規格化される場合もある。一方、前述したグリチルリ

51 チン酸は、非常に著名な生理活性成分であり、生薬カンゾウの
52 一部の薬効を説明できる有効成分であるが、カンゾウの薬効に
53 はそれ以外の多数の成分も関与していることが知られている。
54 したがって、グリチルリチン酸は有効成分の一つとして含量規
55 定がなされていると考えるべきである。さらに、ローヤルゼリ
56 ーにおける10-ヒドロキシデセン酸や、漢方処方エキスにお
57 ける(*E*)-ケイ皮酸のように、強い生理活性があるとは考えら
58 れないが、それぞれの医薬品における特徴的な成分として規格
59 値が定められているものもある。天然物の生合成を考えると、
60 これらの成分だけが突出して含量が変化するということは考
61 えにくい。したがって、これらの成分について含量がコント
62 ロールされることで、生薬や生薬製剤全体がある程度規格化さ
63 れることを念頭に、製造工程管理のために規格値が定められて
64 いる。

65 生薬と生薬を原材料とする天然物医薬品の世界では、センナ
66 のような事例は例外であり、ほとんどのものは多様性のある成
67 分全体が相まって、その薬効を示している。このような医薬品
68 では、多成分系を構成する全ての成分の規格化が不可能であ
69 ることを前提として、一部の成分を定量の指標成分(定量指標
70 成分)に指定し、その含量を規定することで規格化を行ってい
71 る。したがって、化学薬品のように、定量成分が直ちにその薬
72 品の薬効の全てを説明する有効成分ではないことに注意が必要で
73 ある。

1 生薬及び生薬製剤の薄層クロマトグラフィー 2 〈G5-3-182〉

3 生薬及び生薬を主たる原料とする製剤(生薬製剤)の薄層クロ
4 マトグラフィーは、生薬及び漢方処方エキスに配合される生薬
5 の特徴的な成分又は成分群の含有の有無を確認することなどに
6 用いられる。本参考情報では、生薬及び生薬製剤について薄層
7 クロマトグラフィーの試験を実施する際に、薄層クロマトグラ
8 フィー〈2.03〉を補完する事項を以下に記載する。

9 1. 器具及び装置

10 薄層クロマトグラフィー〈2.03〉を準用する。ただし、薄層
11 板については、多成分系である生薬及び生薬製剤においては、
12 より精密な成分分離を要求されることがあるため、一般試験法
13 〈9.42〉に規定される薄層クロマトグラフィー用担体のシリカ
14 ゲルより粒径が小さいクロマトグラフィー用シリカゲル(5～7
15 μm)を塗布した高性能薄層板(HPTLC板)を用いることもでき
16 る。なお、検出装置の光源の適合性の確認は、ランプ、照射シ
17 ステムの仕様を変更した場合、又は、各条に規定される線光源
18 の波長の照射により、規定されるスポットが認められない場合
19 等に行う。

20 2. 操作方法

21 薄層クロマトグラフィー〈2.03〉を準用する。

22 3. 確認及び純度の試験

23 薄層クロマトグラフィー〈2.03〉を準用する。薄層クロマト
24 グラフィーによる生薬及び生薬製剤の確認及び純度試験には、
25 一般的に標準品、被検成分の試薬、試薬としての生薬又は各条
26 品を標準物質として使用するが、多成分系の試料溶液において
27 は、被検成分が単一のスポットとして認められ、特徴的な蛍光
28 や発色などを示し、明瞭に確認することが可能な場合は、標準
29 物質を使用せず、スポットの色調及び R_f 値で判定する試験法を
30 設定することもできる。また、生薬及び生薬製剤は天産物由来
31 であるため、成分パターンが複雑であることから、薄層クロマ
32 トグラフィー〈2.03〉に分光学的測定法(紫外可視吸光度測定法
33 〈2.24〉、核磁気共鳴スペクトル測定法〈2.21〉など)や質量分析
34 法〈2.62〉を組み合わせることで、確認又は純度試験の更なる
35 信頼性向上が期待できる。

36 4. 確認試験の試験条件の変更に関する留意事項

37 薄層クロマトグラフィー〈2.03〉を準用する。また、標準物
38 質を規定しない試験法が設定されている場合であっても、標準
39 物質を用いて色調及び R_f 値の一致により確認する方法へ変更す
40 ることができる。

41 5. 用語

42 クロマトグラフィー総論〈2.00〉の定義を準用する。

43 6. その他

44 薄層クロマトグラフィーで定量を行う際は、自動化された試
45 料のスポット装置及びデンシトメトリーなどを用いることによ
46 り定量的に測定することが可能となる。それらの薄層クロマト
47 グラフィー用走査装置を用いる際のシステム適合性については、
48 必要に応じ、液体クロマトグラフィー〈2.01〉のシステム適合
49 性の規定を準用する。

1 アリストロキア酸について〈G5-4-141〉

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、発がん性があるとの報告もある(参考参照)。

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、規定された基原植物を用いていれば、アリストロキア酸の混入は考えられないが、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て試験を行うことが可能となる。

1. 参考資料

- 1) 医薬品・医療用具等安全性情報, No.161, 2000年7月,
<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/calling-attention/safety-info/0092.html#10> (参照 2019-7-18) .
- 2) J.L. Nortier, et al., N. Engl. J. Med., 342, 1686-1692 (2000).
- 3) A. Kohara, et al., Mutation Research, 515, 63-72 (2002).

1 核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用〈G5-5-190〉

1. 日本薬局方における生薬中の定量指標成分と定量分析用標品の設定

日本薬局方における生薬、漢方処方エキスにおいて、定量値を規定する場合、定量指標成分が天然物であるため、多くの化学医薬品と同様に日本薬局方標準品を設定し用意するには、以下のような課題がある。

化学医薬品と異なり、生薬・漢方処方エキスは非常に多くの化合物の混合物であり、医薬品(生薬・漢方処方エキス)中の0.1～数%程度の含量の化合物を定量指標成分として設定する必要があるが、多くの場合これらの化合物の合成は容易ではない。したがって、天然物より、十分な純度を持つ化合物を精製、単離することになる。この場合、多大な労力が必要となり、標準品を準備する経済的コストが多量となる。また、原料の差、抽出、精製、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間格差が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい。また天然物の場合、最大の不純物は水である場合が多いが、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な化合物を多量に消費することになる。

このような隘路があるため、日局の生薬、漢方処方エキス各条規格では、多くの場合、日本薬局方標準品の設定が難しく、便宜上その時点で市販されている試薬、又は市販可能な試薬について規格を日局の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品と規定し、定量法と定量規格を規定している。ところが、このような試薬を定量分析用標品とした場合、得られた定量値は計量学的に値付けが行われていないものであるため、厳密に議論すると、使用した場合の分析値の信頼性が問題となる。

2. 生薬・漢方処方エキスの分析に用いる定量分析用標品への定量NMRの応用

このような天然物に由来する試薬の純度の問題は、定量NMRを用いることで解決することが可能である。日本薬局方生薬試験法10.1.核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術の原理で示された考え方にに基づき、これらの試薬に対して定量NMRを用いて正しい含量を値付けすることができれば、試薬を計量トレーサビリティが保証された分析用標品として利用することが可能となる。

現在、このような試薬に対する定量NMRは、順次実施されており、試薬の定量値付けの際、考慮すべき点を考察した論文が公表されている。また、HPLCによる定量分析用標品として使用される可能性の高い物質を使用して、定量NMRのパリデーション実験も行われており、分子量300程度の測定対象化合物の場合、測定に10 mg程度使用すれば、使用機器間誤差を含めても通常の実験室レベルで、有効数字2桁を保証しながら値付けが可能であることが示されている²⁾。通常、生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり、規制値も0.1%が最小単位であることから、天然物である生薬ごとのばらつきを考慮すれば、定量分析用標品の含量精度は有効数字2桁の保証で

十分と考えられる。

これらのことを考慮すると、試薬を定量分析用標品として使用して得られた分析値の曖昧さは、定量NMRによって値付けされた試薬をHPLC等の定量分析用標品として使用し、値付けされた試薬の純度を定量値の算出に組み込むことで、現実的に回避することができる。例えば、日局17までは、日局「サンシシ」のゲニポンド含量をHPLC分析に基づき3.0%以上と規定していた。しかし、前述した論文²⁾では、定量分析用標品となる定量用ゲニポンドとして使用可能な試薬について定量NMRを実施し、その純度が92%程度であることが示されている。したがって、この試薬の純度を100%と仮定して定量分析用標品としたときのHPLCによる定量値が3.0%と導かれる場合、定量NMRによる純度を考慮した定量値は、2.8%であることになる。

定量用ゲニポンドの試薬規格には、日局16第二追補より定量NMRによる純度規定が(定量用2)として導入され、日局18からは、このものに一本化されている。そこで日局18への改正時に、日局「サンシシ」中のゲニポンド含量について、従来の試薬を用いて算出した定量値と定量NMRで値付けされた試薬を用いて算出した定量値を比較した結果、前述の論文²⁾同様、定量NMRによる純度を考慮するか否かで定量値には約10%の差が見られた。以上のことから、定量NMRによる純度規定への一本化にともない、その純度差を考慮して、日局18より「サンシシ」のゲニポンド含量を2.7%以上と規定している。

3. 定量NMRで値付けされた試薬の供給

現在、独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター(IAJapan)の認定プログラム(ASNITE)において、校正されたNMR装置を用いて試薬の値付けを行う機関に対する認定をどのように行うか検討が開始されている。さらにIAJapanでは、試験方法区分への「定量NMR分析」の追加を予定している。したがって、近い将来、試薬会社はこの認定を受けて試薬の値付けを行うことが可能となる。この場合、SIトレーサブルな値を得るために、試薬ユーザーが個々に定量NMRを実施する必要がなくなる。さらに、機関間誤差(機器間誤差を含む)は無視できることになり、試薬に表示された値を指標成分の定量値の算出の際に組み込むことで、より精度の高い値付けを行えることになる。

なお、内部基準物質のSIトレーサブルな値付けに用いる認証標準物質(NMIJ CRM)は、国立研究開発法人産業技術総合研究所計量標準総合センター(AIST NMIJ)より供給されている。

4. 定量NMRに使用する機器の性能の管理

日本薬局方試薬の純度決定に使用される定量NMRは、SIトレーサブルな内標準物質を基準として同一試料管内の測定対象物を同時に測定する内標準法である³⁾。この方法は、NMR現象を利用して原子核の数を観測していることから、試料溶液中の測定対象物のモル数を標準物質で直接的に校正している状態といえる。

このような定量NMR条件における測定機器の性能の管理では、測定対象シグナルの積分値が、シグナルが観測されるスペクトル幅内(通常0～10 ppmの範囲)において正確に定量できることを確認する。その際、定量積分では、不純物に由来するシグナルを定量範囲に含めないことが最も重要である。したがって、機器の性能の管理を行う際には、純度が高い純度既知の化合物(定量NMRで規定された純度が99.0%以上のものが望ましい)

を用いる。このとき、なるべく単純なスピン系由来の複数のシグナルについて定量積分を行い、複数のシグナルから得られる理論上の原子核数の比が正確(どちらも1 H分のシグナルであれば、0.995～1.005)であることを確認する。

なお、NMRの励起波長を考えると、800 MHzの共鳴周波数の機器を使用した時、観測中心が5 ppm付近、観測スペクトル幅20 ppm(定量NMR純度規定のある試薬の項で規定された条件)とすると、通常、測定対象物のシグナルが観測される0～10 ppmにおける励起効率は、90度パルス幅が10 μ 秒であるとき99.95%以上であることから、プローブのチューニングとシムの調整が行われた機器であれば、通常の測定レベルで有効数字2桁の精度が全く問題なく保証できる。さらに400 MHzの共鳴周波数の機器であれば、同様の励起効率は、90度パルス幅20 μ 秒まで得られるので、特に特別なプローブを使用しなくても十分に定量NMRが測定可能である。

5. 参考資料

- 1) 細江潤子ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41, 960-970 (2010).
- 2) 細江潤子ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 43, 182-193 (2012).
- 3) 細江潤子ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45, 243-250 (2014).

1 ¹H スピン情報に基づいた参照 NMR スペクトルと日本薬局方試薬への応用 (G5-9-190)

医薬品等の定量又は定性試験においては、当該試験の用途に相応しい品質を有する日本薬局方標準品が設定されている。生薬等においては、生薬等に含有する指標成分を対象とした各種理化学試験が設定されており、これらの試験のために指標成分について日本薬局方標準品を設定することが望まれる。しかしながら、参考情報「核磁気共鳴(NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用 (G5-5-190)」に記載されているとおり、生薬等の指標成分は天然物であり、標準品の設定には様々な課題がある。

日本薬局方では多くの場合、その時点で試薬として入手可能な指標成分の規格を試薬・試液 (9.41) の項で定め、分析用の標準物質として規定している。しかしながら、これらの試薬には、指標成分の類縁物質が含まれている場合がある。このためこれらの試薬の規格では、確認試験に加えて不純物を確認する純度試験が設定される。純度試験は、多くの場合、クロマトグラフィーが設定されているが、ジアステレオマーなどの不純物は、同法で指標成分との分離が難しい場合がある。一方、この種の識別に有用な分光学的手法として核磁気共鳴 NMR 測定法 (2.21) がある。ジアステレオマーなどの非常に構造が類似した不純物を含む場合においても、現在一般的に利用されている超電導磁場を用いた ¹H NMR 測定では、試薬に含まれる指標成分と不純物の構造が異なる部分を中心として、¹H 核に由来するシグナルが測定スペクトル上に明確に異なっており観察される。したがって、確認試験に ¹H NMR が設定されていれば、得られたスペクトルから容易に試薬中の不純物の存在を確認することができる。

本来、¹H NMR スペクトルから観測される化学シフト及びスピンスピン結合定数のような ¹H スピン情報は、NMR 装置の磁場の大きさに依存しない化合物に固有の情報である。加えて、測定された ¹H NMR スペクトルから正確な ¹H スピン情報を得るための反復計算ソフトウェアが利用可能なため¹⁾、純度の非常に高い試薬の ¹H NMR スペクトルから、その試薬に含まれる指標成分の正確な ¹H スピン情報を得ることが可能である。さらに、その ¹H スピン情報から求める磁場サイズにあったスペクトルを表示させるソフトウェアも存在しているため²⁾、あらゆる磁場強度に合った参照 NMR スペクトルを容易に作成することができる。したがって、日本薬局方に正確な ¹H スピン情報を規定すれば、参照紫外可視吸収スペクトルや参照赤外吸収スペクトルと同様に、スペクトルの直接比較による確認試験の実施が可能となる。さらに、スペクトルの比較から、構造類似不純物が存在することによるスペクトルの歪みや不要なシグナルを確認することで、純度試験としても利用可能となる。以下に、¹H スピン情報の詳細と参照 NMR スペクトルを用いた確認試験の留意点について説明する。

1. ¹H スピン情報

¹H スピン情報は、一般に、スペクトルから直接得られるシグナルの位置及び多重度(ピークパターン)を測定し、それぞれを化学シフト及びスピンスピン結合定数として明示することができる。¹H スピン情報は、当該物質に含まれる全てのプロトンのシグナルについて明らかにしておくことが望ましい。し

かしながら、純度が非常に高い物質の場合でも、限られた観測範囲ではシグナルが重なり合い、極めて複雑なピークパターンとなることがある。そのため、視覚的なスペクトル解析では、これらのシグナルについて多重線(マルチプレット)のシグナルと表現するに留まり、正確な ¹H スピン情報を得ることが難しく、また正確な参照 NMR スペクトルを作成することができない。

このような複雑なピークパターンを示すスペクトルから正確な ¹H スピン情報を得るためには反復計算を用いた方法が有効である。既に ¹H スピン情報に基づいてスペクトルを表示させるソフトウェアが存在し、それに加えて反復計算機能を搭載したものが簡便に利用できるようになった。この方法では、当該物質の実測スペクトルから計算スペクトルの ¹H スピン情報(化学シフトとスピンスピン結合定数)の値を得るために線形フィッティングを行いながら反復的に調整する。反復計算が収束し、計算スペクトルが実測スペクトルに一致すると、この際に得られる ¹H スピン情報は正確な解に限りなく近づいたものと見なすことができる。この ¹H スピン情報を規定することにより、参照 NMR スペクトルを用いた試験が可能となる。

2. 参照 NMR スペクトルを用いた確認試験

試料について規定の条件で ¹H NMR 測定を行い、得られたスペクトルを試料の NMR スペクトルとする。試験対象の成分については、その正確な ¹H スピン情報が明らかとなるとき、ソフトウェアを介して上記測定と同じ磁場の参照 NMR スペクトルを作成することができる。このとき、試料の NMR スペクトルと確認しようとする物質の参照 NMR スペクトルを比較し、両者のスペクトルが同一化学シフトのところに同様の多重度及び面積強度比のシグナルを与えると、試料と確認しようとする物質の同一性が確認され、確認試験に適合すると判断される。なお、この同一性の確認においては以下について留意する必要がある。

2.1. シグナルの半値幅について

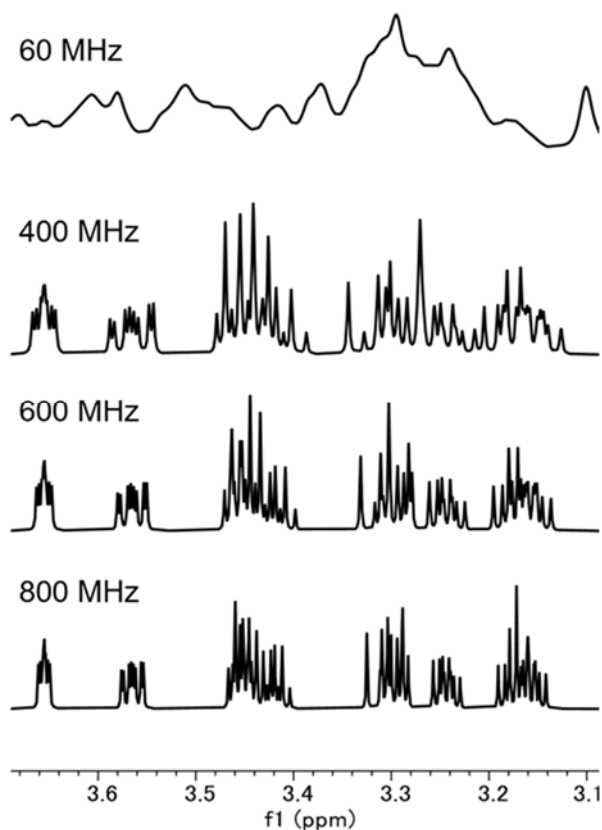
¹H 共鳴周波数が 60, 400, 600, 800 MHz の条件下でのヘスペリジンの参照 NMR スペクトルの一部を図 1 に示す。磁場の大きさの違いにより、スペクトルのピークパターンが異なることが分かる。これらのピークパターンは、それぞれの磁場におけるヘスペリジンに固有であるが、ピークが近接している観測領域においては、シグナルの半値幅が変わることによりピークパターンが変化することに留意する必要がある。なお、図 1 の参照 NMR スペクトルの作成に際して、シグナルの半値幅は 1 Hz に統一されている。

試料のスペクトルにおいては、装置のシム調整又は分解能調整により試料のシグナルの半値幅が変わる。そのため、試料の NMR スペクトルと確認しようとする物質の参照 NMR スペクトルの同一性を確認する際は、参照 NMR スペクトルのシグナル半値幅を試料のそれらに合わせるか、又は両スペクトルに対して 2 Hz 程度のブロードニングファクターを適用することが望ましい。

2.2. 重水素化溶媒及び水に由来するシグナルについて

試料の NMR スペクトル上には、試料を溶解させるために用いた重水素化溶媒の残留プロトン及び残存した水に由来するシグナル、また化学シフト基準物質を用いた際には、化学シフト基準物質由来のシグナルが観察される。これらのシグナルが試料中の指標成分のシグナルと重なる場合は、この領域を参照

107 NMRスペクトルとの同一性を確認するための判定に使用して
108 はならないことに留意する。また、重水素化溶媒中の僅かな不
109 純物のシグナルが観察されることもあるため、事前に重水素化
110 溶媒のみのブランクを測定し、不純物のシグナルが観察される
111 範囲や強度について確認しておくことが望ましい。また、容器
112 を開封してからしばらく経過した吸湿性の高い重水素化溶媒に
113 ついては、水に由来するシグナルが大きくなる傾向がある。し
114 たがって、開封して間もない重水素化溶媒又はアンプルタイプ
115 の重水素化溶媒を使用することが望ましい。



116
117 図1 ^1H 共鳴周波数が60, 400, 600, 800 MHzの条件下でのヘ
118 スペリジンの参照NMRスペクトル(重水素化ジメチルスルホキシ
119 ド中)

120 3. 参考資料

- 122 1) P.S. Achanta, et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 192,
123 113601 (2021).

1 遺伝子情報を利用する生薬の純度試験 (G5-6-172)

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。生薬の基原を鑑別する方法には、形態学的方法や、官能試験、化学的方法があり、それぞれ各条に適切な方法が明示されている。形態学的方法や、官能試験、化学的方法は、生薬の表現形質に基づく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やすい等の利点がある。

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、核ゲノム上のリボソームRNA (rRNA)をコードする遺伝子領域(rDNA)の塩基配列を利用し、系統発生的に種を区分する方法が採用されている。同様に遺伝子型を用いた高等植物の鑑別にも、このrDNAの塩基配列が最もよく用いられている。特にrDNAのITS (Internal Transcribed Spacer)領域では、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、近縁種を区別しやすいことになる。また、核ゲノム上の遺伝子は、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、種間雑種の確認はできない。

ここに示した三つの方法は、近年、論文報告¹⁻⁴⁾されたrDNAのITS領域の遺伝子配列の違いに基づき開発された、1)ビャクジュツ中のソウジュツに関する純度試験法及び2)ボウフウ中のペウケダヌム・レデボウリエルロイデスに関する純度試験法で、バリデーションのための共同試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、*Atractylodes lancea* De Candolle又は*A. chinensis* Koidzumi (*Compositae*)、ビャクジュツの基原植物は、*A. japonica* Koidzumi ex Kitamura又は*A. macrocephala* Koidzumi (*Compositae*)と規定されている。また、両者の基原の適否は、基本的に鏡検を含む生薬の性状と確認試験の薄層クロマトグラフィーで規定されている。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)、又は、種特異的配列を認識する制限酵素の利用により、塩基配列の解析を行わずに種の鑑別が簡便に行えることが示されている。

同じく、ボウフウの基原植物は、*Saposhnikovia divaricata* Schischkin (*Umbelliferae*)と規定されており、基原の適否は、生薬の性状と確認試験の薄層クロマトグラフィーで規定されている。論文⁴⁾では、陝西省や山西省でボウフウとして扱われて

いる生薬の中には、ペウケダヌム・レデボウリエルロイデスを基原とするものが、高い頻度で含まれており、両者は、rDNAのITS領域の塩基配列により区別可能であることが示されている。

遺伝子情報を利用する生薬の純度試験では、試験の簡便さを最大限考慮し、塩基配列の解析を行わず、種特異的なプライマー対を利用し、PCR増幅バンドを観察する方法(Mutant Allele Specific Amplification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し、生成するDNA断片を観察する方法(PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism法：方法2)を設定した。このような、PCR法を利用する試験法では、微量の鋳型DNAが理論的には、数十億～数千億倍に増幅される。したがって、粉末生薬の確認試験として用いる場合、分析する生薬のほとんどが不適なもので僅かに適合植物由来の生薬の粉末が存在していても、検出対象のDNA断片が観察されることになる。このため、確認試験法として利用するには、他生薬由来の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、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明らかとなる。

なお、ここで示した方法は参考情報であり、現段階で本法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ものではない。また、単一個体からなる生薬試料に対して、論文で示されたシーケンスを行うことで、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

生薬より抽出精製して得られたDNAの増幅に用いる。機器により、温度調節方法等が微妙に異なるため、指定された条件でPCRを行っても、PCR増幅バンドの強度等が異なることがある。したがって、方法1のようにPCRの増幅バンドの有無のみで、結果を判定する場合、JAS分析試験ハンドブック、遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル⁵⁾に記載の装置を用いることが推奨される。他の装置を使用する場合、事前にあらかじめ基原種が判明している試料を用い、得られたDNAを用いてPCRを行い、適切な増幅バンドのみが得られることを確認し、得られない場合には、PCRの温度条件を微調整することが必要となる。同装置は、方法2における制限酵素処理にも転用することができる。

2. 一般的注意

生薬は、新鮮な植物体とは異なり乾燥物で、採取されてからある程度の時間を経たものである。したがって、DNAが断片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、周皮を清潔なメスなどで剥ぎ落として除いた試料を使用する。

また、本試験で使用されるPCRは、検出対象のDNAを数億倍以上に増幅する技術であり、僅かなコンタミネーションがあっても、誤った結果を導いてしまう。このため、コンタミネーションの防止には、細心の注意が必要である。コンタミネーシ

105 ャン防止処置については、上記のマニュアルのコンタミネー
106 ション防止編⁹⁾を参照されたい。

107 3. バックジュツのソウジュツに関する純度試験

108 3.1. 方法1 (Mutant Allele Specific Amplification 法)

109 本法は、一般に Mutant Allele Specific Amplification
110 (MASA)法又は Amplification Refractory Mutation System
111 (ARMS)法と呼ばれる方法で、種特異的プライマー対による
112 PCRにおけるDNA増幅の有無により、検体由来の鋳型DNAの
113 塩基配列情報を得る方法である。

114 3.1.1. 操作法

115 以下、操作法の一例を示す。

116 3.1.1.1. 鋳型DNAの調製

117 試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有
118 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べ
119 ば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。その
120 場合、最終的に得られるDNA量(濃度)に注意して、最初の試料
121 量とDNAを溶出させる液量を調整する必要がある。組換え
122 DNA技術応用食品の検査方法に関する通知⁷⁾で使用されている
123 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
124 を行う場合、試料採取量は200 mgとし、AP1緩衝液1 mL、
125 RNase Aを2 µL、AP2緩衝液325 µLを用いるのが適当である。
126 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
127 要で、無理に1 mLを負荷する必要はない。また、最終的に
128 DNAを溶出させる液量は、50 µLが適当であり、通常1回目の
129 溶出液をDNA試料原液として用いる。

130 3.1.1.2. DNA試料原液中のDNAの純度の確認及びDNAの定量

131 原液中のDNAの純度は、分光光度計を用いOD_{260nm}／
132 OD_{280nm}の比で確認することができる。同比が1.5になれば、
133 DNAが十分に精製されていることを示す。DNA量は、1
134 OD_{260nm}=50 µg/mLで換算する。上記の測定は、適当に希釈し
135 たDNA試料原液を用いて行い、得られた結果を基に、以後
136 PCRの反応に必要な濃度で水で希釈し、DNA試料液として、
137 マイクロ試料管に分注し、必要な場合は-20℃以下で冷凍保
138 存する。分注したDNA試料液は、融解後直ちに使用し、残っ
139 た溶液は再度保存せず廃棄する。なお、DNA試料原液の濃度
140 がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試
141 料液として用いる。

142 3.1.1.3. PCR

143 上記の通知で例示された定性PCR法⁸⁾で用いる市販の酵素を
144 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
145 2.5 µL、酵素に添付されたdNTP (0.2 mmol/L)、5'及び3'プ
146 ライマー(0.4 µmol/L)及びTaq DNAポリメラーゼ(1.25 units)を
147 含む液に、10 ng/µLに調製したDNA試料液5 µL (DNAとして
148 50 ng)を氷中で加え、全量が25 µLで反応を行うのが適当であ
149 る。なお、バックジュツ中のソウジュツに関する純度試験を実
150 施する場合、プライマー対は、前述の論文¹⁾で示されたC、D (C
151 は、*A. lancea*で陽性、Dは、*A. chinensis*で陽性)を使用するが、
152 プライマー対A、Bを組み合わせて使用すると、それぞれの検
153 体の基原種を確認することができる。また、DNAが正しく抽
154 出されていることを確認するため、以下の陽性対照プライマー
155 対を用いた反応液を調製すると共に、陰性対照として、調製し
156 たDNA試料液を加えないもの、それぞれのプライマー対を加
157 えないものも調製し、同時にPCRを行う必要がある。

158 Pr : 5'-CAT TGT CGA AGC CTG CAC AGC A-3'

Pr : 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'

160 PCR反応は、以下の条件で行う。95℃に10分間保ち反応を
161 開始させた後、95℃で0.5分間、68℃(プライマー対Cを用いる
162 場合のみ69℃)で0.75分間を1サイクルとして、30サイクルの
163 PCR増幅、次に終了反応として72℃で7分間保った後、4℃で
164 保存し、得られた反応液をPCR増幅反応液とする。

165 3.1.1.4. アガロースゲル電気泳動とPCR産物の検出

166 反応終了後、PCR増幅反応液5 µLを、適当量のゲルローディ
167 ング緩衝液と混合し、2 w/v%アガロースゲルのウェルに添加
168 し、1倍TAE緩衝液(参考情報「遺伝子解析による微生物の迅
169 速同定法 (G4-7-160)」参照)を用いて電気泳動を行う。この際、
170 適当なDNA分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディン
171 グ緩衝液に含まれるブロモフェノールブルー色素がゲルの1/
172 2から2/3まで進んだところで電気泳動を終了する。

173 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
174 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
175 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312
176 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標
177 準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。

178 3.1.2. 結果の判定

179 まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で305 bpのバン
180 ドが確認され、プライマー対を加えないもの、DNA試料液を
181 加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、
182 Cプライマー対を加えたもので226 bpのバンド、あるいはDプ
183 ライマー対を加えたもので200 bpのバンドが確認された場合、
184 試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
185 の混入が認められ)、不合格となる。陽性対照プライマー対を
186 加えたもので305 bpのバンドが確認され、プライマー対を加
187 えないもの、DNA試料液を加えないものでバンドが確認され
188 ず、Cプライマー対で226 bpのバンド、Dプライマー対で200
189 bpのバンドが確認されない場合、試料はソウジュツではない
190 (刻み生薬の場合は、ソウジュツの混入がない)と判定され、純
191 度試験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバンドが
192 確認されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考えられ
193 るので、DNAの抽出からやり直すことが求められる。また、
194 プライマー対を加えないもの、DNA試料液を加えないもので
195 バンドが確認された場合は、PCR操作に間違いがあったもの
196 として、3.1.1.3.のPCRから実験をやり直すことになる。

197 3.2. 方法2 (PCR-Restriction Fragment Length 198 Polymorphism 法)

199 本法は、一般に PCR-Restriction Fragment Length
200 Polymorphism (RFLP)法と呼ばれる方法であり、対象植物の
201 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
202 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
203 行い、生成するDNA断片のパターンを観察することにより、
204 検体由来の鋳型DNAの塩基配列情報を得る方法である。

205 試験は、各ロット、25個体に番号を付し、各個体別にPCR
206 -RFLPによる基原種鑑別を行い、若い番号から順に、鑑別可
207 能な20個体中に不適合試料が幾つ存在するかで、純度試験の
208 可否判定を行う。

209 3.2.1. 操作法

210 以下に操作の一例を示す。

3.2.1.1. 鋳型DNAの調製

試料からのDNAの抽出精製法には様々な方法があるが、有害試薬を用いず、煩雑な精製操作が不要である利点を考慮すれば、市販のDNA抽出キットを用いることが推奨される。近年では、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場合、検体からの鋳型DNAの調製は、DNA抽出試薬によるイ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、ここでは、このようなPCR試薬を用いる場合のDNA調製法を示す。

検体20 mgを清潔なナイフで刻み、細片化し、DNA抽出用試薬400 μ Lを加え、55°Cで一晩(16～18時間)インキュベーションする。終了後、95°C、5分間加温し、試薬中の酵素を失活させる。検体が沈殿するまで、遠心分離を行い、上清50 μ Lを分取し、鋳型DNA溶液とする。なお、この方法で調製したDNA溶液は、検体由来の多くの夾雑物を含んでおり、OD_{260nm}に基づく濃度測定は、適用できない。

DNA 抽出用試薬の組成は、下記のとおりである。

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール・塩酸(pH 8.0)	20 mmol/L
エチレンジアミン四酢酸	5 mmol/L
塩化ナトリウム	400 mmol/L
ドデシル硫酸ナトリウム	0.3%
プロテインナーゼK	200 μ g/mL

3.2.1.2. PCR

論文³⁾で示されたPCR酵素及びPCR試薬を用いた場合、2倍濃縮PCR試薬10.0 μ L、5'及び3'プライマー(0.5 μ mol/L)及びTaq DNAポリメラーゼ(0.5 units)を含む液に、鋳型DNA溶液0.5 μ Lを氷中で加え、全量が20 μ Lで反応を行うのが適当である。

PCR反応は、以下の条件で行う。95°Cに10分間保ち反応を開始させた後、95°Cで0.5分間、65°Cで0.25分間、72°Cで0.25分間を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PCR増幅反応液とする。PCR反応の際には、陰性対照(鋳型DNA溶液の代わりに水)を必ず置く。各プライマーの配列は下記のとおりである。

5'-プライマー: 5'-GGC ACA ACA CGT GCC AAG GAA AA-3'

3'-プライマー: 5'-CGA TGC GTG AGC CGA GAT ATC C-3'

3.2.1.3. 制限酵素処理

2種の制限酵素、*FauI*及び*MspI*を用い、それぞれ、個別に処理する。*FauI*については、酵素に添付の反応緩衝液及び1.0 unitの酵素からなる反応液にPCR産物3.0 μ Lを氷中で加え、全量を15.0 μ Lとする。同様に、*MspI*では、反応緩衝液及び20.0 unitsの酵素からなる反応液にPCR産物3.0 μ Lを加え、全量を15.0 μ Lとする。これらの反応液をメーカー推奨の温度条件で、2時間インキュベーションし、終了後、72°Cで10分間加温し、酵素を失活させる。PCR反応における陰性対照試料についても、制限酵素処理を行う。

3.2.1.4. アガロースゲル電気泳動とDNA断片の検出

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ング緩衝液と混合し、4 w/v%アガロースゲルのウェルに添加し、1倍TAE緩衝液(参考情報「遺伝子解析による微生物の迅速同定法 (G4-7-160)」参照)を用いて電気泳動を行う。この際、適当なDNA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まれるブロモフェノールブルー色素がウェルより2 cm程度進んだところで電気泳動を終了する。4 w/v%アガロースゲルは、粘度が高く、調製、取扱いが難しいことから、市販のプレキャスト型ゲルを使用した方が良い。

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。ゲルイメージ解析装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。

3.2.2. 結果の判定

3.2.2.1. 各個体の判定

PCR反応の際の陰性対照試料にプライマーダイマー(約40 bp)を除くバンドが検出されないことを確認する。次に、*FauI*処理した各検体において、約80 bp及び60 bpのバンドが検出される場合、あるいは、*MspI*処理した各検体において、約90 bp及び50 bpのバンドが検出される場合、このものは、ソウジュツと判断する。いずれの酵素処理においても、約140 bpの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、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、その検体からは、PCR産物が得られていないと判断し、判定不能とする。

3.2.2.2. 純度試験の判定

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個体の結果を用いる。20個体中、ソウジュツと判断される個体がなければ、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、同様の試験を行い、ソウジュツと判断される個体がなければ、合格とする。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。

4. ボウフウのペウケダヌム・レデボウリエルロイデスに対する純度試験

4.1. 方法1

3.1.と同様に、種特異的プライマー対によるPCRにおけるDNA増幅の有無により、検体由来の鋳型DNAの塩基配列情報を得る方法である。

4.1.1. 操作法

以下、操作法の一例を示す。

4.1.1.1. 鋳型DNAの調製

ジュツ類生葉の際には、シリカゲル膜タイプのキットによる調製法を採用したが、ボウフウ及びペウケダヌム・レデボウリエルロイデスでは、3.2.1.1で示した簡易的な調製法によるDNA試料溶液を鋳型に用いた場合においても、安定したPCRが可能であることが確認できたことから、試験実施者の利便性を考え、以下に示す簡易調製法を採用した。

検体10 mgを清潔なナイフで刻み、細片化し、DNA抽出用試薬400 μ Lを加え、55°Cで一晩(16～18時間)インキュベシ

317 ョンする。終了後、95℃で5分間加温し、試薬中の酵素を失活
318 させる。検体が沈殿するまで、遠心分離し、上清50 µLを分取
319 し、鋳型DNA溶液とする。なお、この方法で調製したDNA溶
320 液は、検体由来の多くの夾雑物を含んでおり、OD_{260nm}に基づ
321 く濃度測定は、適用できない。

322 DNA抽出用試薬の組成は、下記のとおりである。

323	2-アミノ-2-ヒドロキシメチ	20 mmol/L
324	ル-1,3-プロパンジオール・	
325	塩酸(pH 8.0)	
326	エチレンジアミン四酢酸	5 mmol/L
327	塩化ナトリウム	400 mmol/L
328	ドデシル硫酸ナトリウム	0.3%
329	プロテインナーゼK	200 µg/mL

330 4.1.1.2. PCR

331 論文³⁾で示されたPCR酵素及びPCR試薬を用いた場合、2倍
332 濃縮PCR試薬10.0 µL、5'及び3'プライマー(0.5 µmol/L)及び
333 Taq DNAポリメラーゼ(0.5 units)を含む液に、鋳型DNA溶液
334 0.5 µLを氷中で加え、全量が20 µLで反応を行うのが適当であ
335 る。

336 ボウフウのペウケダヌム・レデボウリエルロイデスに関する
337 純度試験を実施する場合、種特異的プライマー対を用いた反応
338 液のほかに、DNAが正しく抽出されていることを確認するた
339 め、以下の陽性対照プライマー対を用いた反応液を調製すると
340 ともに、陰性対照として、調製したDNA試料液を加えないも
341 のも調製し、同時にPCRを行う必要がある。

342 PCR反応は、以下の条件で行う。95℃に10分間保ち反応を
343 開始させた後、95℃で0.5分間、62℃で0.5分間、72℃で0.75
344 分間を1サイクルとして、45サイクルのPCR増幅、次に終了反
345 応として72℃で7分間保った後、4℃で保存し、得られた反応
346 液をPCR増幅反応液とする。各プライマーの配列は、下記の
347 とおりである。なお、陽性対照PCR用3'-プライマーと種特異
348 的PCR用3'-プライマーは同一のものである。

349 陽性対照PCR用5'-プライマー：5'-GCC TGG GTG TCA
350 CGC ATC G-3'

351 陽性対照PCR用3'-プライマー：5'-GTA GTC CCG CCT
352 GAC CTG-3'

353 種特異的PCR用5'-プライマー：5'-CTG AGA AGT TGT
354 GCC CGG-3'

355 種特異的PCR用3'-プライマー：5'-GTA GTC CCG CCT
356 GAC CTG-3'

357 4.1.1.3. アガロースゲル電気泳動とPCR産物の検出

358 反応終了後、PCR増幅反応液5 µLを、適量のゲルローディ
359 ング緩衝液と混合し、2 w/v%アガロースゲルのウェルに添加
360 し、1倍TAE緩衝液(参考情報「遺伝子解析による微生物の迅
361 速同定法 (G4-7-160)」参照)を用いて電気泳動を行う。この際、
362 適当なDNA分子量標準も並行して泳動する。ゲルローディン
363 グ緩衝液に含まれるプロモフェノールブルー色素がウェルより
364 2 cm程度進んだところで電気泳動を終了する。

365 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
366 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
367 装置に、電気泳動と染色が終了したゲルをのせ、紫外線(312
368 nm)を照射し、電気泳動パターンを確認する。DNA分子量標
369 準と比較して、目的の増幅バンドの有無を判定する。

370 4.2. 結果の判定

371 まず陽性対照プライマー対を加えた反応液で250 bpのバン
372 ドが確認され、DNA試料液を加えないものでは、プライマー
373 ダイマー(約40 bp)を除くバンドが確認されないことを確かめ
374 る。次に、種特異的プライマー対を加えたもので200 bpのバン
375 ドが確認された場合、試料はペウケダヌム・レデボウリエル
376 ロイデスが混入していると判定され、不合格となる。陽性対照
377 プライマー対を加えたもので250 bpのバンドが確認され、
378 DNA試料液を加えないものでバンドが確認されず、種特異的
379 プライマー対で200 bpのバンドが確認されない場合、試料は
380 ペウケダヌム・レデボウリエルロイデスの混入がないと判定さ
381 れ、純度試験は合格となる。また、陽性対照プライマー対でバン
382 ドが確認されない場合は、DNAの抽出が失敗したものと考
383 えられるので、DNAの抽出からやり直すことが求められる。
384 また、DNA試料液を加えないものでバンドが確認された場合
385 は、PCR操作に間違いがあったものとして、4.1.1.2.のPCRか
386 ら実験をやり直すことになる。

387 5. 参考資料

- 388 1) Y. Guo, et al., J. Nat. Med., 60, 149-156 (2006).
- 389 2) K. Kondo, et al., J. Jpn. Bot., 84, 356-359 (2009).
- 390 3) 丸山卓郎ら、生薬学雑誌, 64, 96-101 (2010).
- 391 4) T. Maruyama, et al., J. Nat. Med., 72, 267-273 (2018).
- 392 5) (独)農林水産消費安全技術センター編、JAS分析試験ハン
393 ドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」第3版、
394 I基本操作編、4.4.1 PCR、平成24年9月24日、p.10.
- 395 6) (独)農林水産消費安全技術センター編、JAS分析試験ハン
396 ドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル」第3版、
397 VIコンタミネーション防止編、平成24年9月24日、p.61-64.
- 398 7) 平成13年3月27日付食発第110号厚生労働省医薬局食品保
399 健部長通知「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」
400 (平成18年6月29日付食安発第0629002号により一部改正)
401 2.2.1.2.
- 402 8) 平成13年3月27日付食発第110号厚生労働省医薬局食品保
403 健部長通知「組換えDNA技術応用食品の検査方法について」
404 (平成18年6月29日付食安発第0629002号により一部改正)
405 2.1.3.1.1.

1 生薬及び生薬製剤のアフラトキシン試験法 〈G5-7-170〉

アフラトキシンは、一部の真菌が産生する二次代謝産物であり、ヒトに対する発がん性が認められる物質と評価されている¹⁾。アフラトキシンは、ナッツ類、香辛料、穀類など農産物での汚染が確認されており、食品中のアフラトキシンは日本をはじめ世界各国で規制対象となっている^{2, 3)}。一方、生薬においても農産物と同様にアフラトキシンによる汚染の可能性は否定できず、実際、諸外国では植物薬原料よりアフラトキシンの検出例が報告されている⁴⁻⁶⁾。そのため、生薬及び生薬を主たる原料とする製剤(生薬製剤)では、リスクに応じてアフラトキシンの試験検査を実施することが求められる。なお、アフラトキシン汚染のリスクについては、産生菌の存在、加工調製や製造の過程における汚染の可能性を考慮することが必要である。

参考となる基準の例として、日本では、総アフラトキシン(アフラトキシンB₁、B₂、G₁及びG₂の総和)を10 µg/kgを超えて検出する食品は、食品衛生法第6条第2号に違反するものとして取り扱うこととしている³⁾。

1. 試験の概要

アフラトキシンの分析法としては、蛍光検出液体クロマトグラフィー(蛍光検出HPLC法)、液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)等による機器分析が用いられている⁷⁻¹⁰⁾。機器分析において定量の指標として用いるアフラトキシンは強い毒性を有することから、取扱いに際しては安全性に配慮する必要がある(4.注意事項を参照)。また、アフラトキシン溶液を用いることなく簡便にアフラトキシンを分析する方法として、簡易測定装置や定性用検査キットも一般的に用いられている。

試料の調製には、精製を目的としてカートリッジ型の精製用カラムが広く用いられる。カートリッジ型の精製用カラムには、アフラトキシン抗体が吸着した樹脂を充填したカラム(イムノアフィニティカラム)や複数の担体混合物を充填したカラムが存在するが、生薬製剤等の精製が困難な試料の前処理にはイムノアフィニティカラムの使用が効果的である。また、試料の性質によっては、複数の担体混合物を充填したカラムを使用して試料を調製することもできる。

本参考情報では、アフラトキシン溶液を用いることなく簡易的に一定濃度以上のアフラトキシンの有無を確認できるスクリーニング法として、定性用検査キットを用いた方法について記載する。併せて、一般的に用いられる機器分析法として蛍光検出HPLC法による試験法についても記載する。試験法は適用するものの性質及び汚染程度に応じて適切に選択し、単独又は併用して行う。必要に応じて操作及び条件の適正化を検討し、分析法バリデーションの実施、システム適合性等を設定する。なお、アフラトキシン試験は日本国内において食品での試験実績があることから、厚生労働省医薬食品局食品安全部通知^{7, 11)}を参考にすることも可能である。また、欧州薬局方⁸⁾及び米国薬局方⁹⁾に記載されている試験法の記載及びWHOガイドライン¹⁰⁾も参考にできる。

2. 試験法

2.1. 定性用検査キットを用いた試験法

キットに固定したアフラトキシン抗体とアフラトキシンの抗原抗体反応を利用することにより、試料中の一定濃度以上存在するアフラトキシンの有無を判定する試験である。定性試験においては総アフラトキシンの確認が可能なものを適用する。以下の試験法は、日本薬局方に収載されている一部のエキス剤(黄連解毒湯エキス、葛根湯エキス、小青竜湯エキス、八味地黄丸エキス、牛車腎気丸エキス、大黃甘草湯エキス、無コウイ大建中湯エキス)において4 ppb以上のアフラトキシンの有無を判断できると示された方法である¹²⁾。アフラトキシン陽性と判断されるもので定量値を求める必要がある場合には、機器分析による試験法を実施する。

(i) 試料溶液の調製

均一に粉碎した試料約1 gを精密に量り、アセトニトリル/水/メタノール混液(6:4:1) 4 mLを正確に加え、試料が分散するまで振り混ぜた後、30分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。この液2 mLを正確に量り、ポリソルベート20(4%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液を加えて50 mLとする。この液をイムノアフィニティカラム(使用直前にリン酸塩緩衝塩化ナトリウム試液を流して調整したもの)に入れる。ポリソルベート20(0.01%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液10 mL、水10 mLの順にカラムを洗い、次にアセトニトリル1 mLを注入して5分間静置した後、アセトニトリル2 mLで溶出させる。溶出液は窒素気流下で溶媒を留去し、残留物に薄めたメタノール(7→10) 0.5 mLを正確に加えて溶かし、試料溶液とする。このとき試料溶液0.5 mL中の試料量は0.5 g相当である。

(ii) 測定方法及び評価方法

キットによる測定は、試験紙、内部底面を金コロイドで覆ったウェル及び専用の希釈液を用いる。ウェル中に希釈液50 µLを正確に添加し、ピペッティングにて金コロイドを剥がして混合する。試料溶液50 µLを正確に加えて混合したのち、試験紙をウェル中の溶液に浸し、5分間静置して吸収、反応させる。試験紙を取り出し、コントロールラインとテストラインを判別することにより結果を読み取る。テストラインが目視にて判別できるものを4 ppb未満と判断する。

2.2. 機器分析による試験法

アフラトキシンは蛍光物質であるため蛍光検出器にて測定できるが、アフラトキシンB₁及びG₁は極性溶媒中での蛍光強度が得にくい物質であるため、アフラトキシンB₁及びG₁の蛍光強度を増加させる誘導体化操作が必要となる。誘導体化の方法として、フォトケミカルリアクターによる誘導体化法、トリフルオロ酢酸による誘導体化法、電気化学的誘導体化法等が用いられる。なお、いずれの誘導体化法操作でもアフラトキシンB₂及びG₂は誘導体化されない。以下に示す試験法は、日本薬局方に収載されている一部のエキス剤において適用できると確認された方法である¹²⁾。本法はあくまで例示であり、その他の適切な条件の適用を妨げるものではない。

(i) 試料溶液の調製

均一に粉碎した試料約1 gを精密に量り、アセトニトリル/水/メタノール混液(6:4:1) 4 mLを正確に加え、試料が分散するまで振り混ぜた後、30分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。この液2 mLを正確に量り、ポリソルベート20(4%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液を加えて50 mLとする。

103 この液をイムノアフィニティカラム(使用直前にリン酸塩緩衝
104 塩化ナトリウム試液を流して調整したもの)に入れる。ポリソ
105 ルベート20 (0.01%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶液10 mL,
106 水10 mLの順にカラムを洗い、次にアセトニトリル1 mLを注
107 入して5分間静置した後、アセトニトリル2 mLで溶出させる。
108 溶出液は窒素気流下で溶媒を留去し、残留物に薄めたメタノール
109 (7→10) 0.5 mLを正確に加えて溶かし、試料溶液とする。こ
110 のとき試料溶液0.5 mL中の試料量は0.5 g相当である。

111 (ii) 測定方法及び評価方法

112 分離にはODSカラムを用いる。アフラトキシンの蛍光は励
113 起波長365 nm, 蛍光波長450 nmで検出できるため、蛍光検出
114 HPLC法を用いる。アフラトキシンB₁及びG₁の誘導体化には
115 トリフルオロ酢酸を用いる。移動相として水/メタノール/ア
116 セトニトリル混液(6:3:1)を用いた場合、アフラトキシンG₁
117 誘導体、B₁誘導体、G₂、B₂の順に検出する。継続的にアフラ
118 トキシン試験を実施する際は、トリフルオロ酢酸による誘導体
119 化ではなく、カラムと蛍光検出器の間にフォトケミカルリアク
120 ターを連結したポストカラム誘導体化が便利である。この場合
121 の検出順は、アフラトキシンG₂、G₁誘導体、B₂、B₁誘導体と
122 なる。本法によりアフラトキシンを定量するとき、各アフラト
123 キシンの濃度が0.5 ~ 20 µg/Lのアフラトキシン溶液を試料溶
124 液と同様の溶解溶媒にて数点調製し、必要範囲の直線性を検証
125 することが必要である。

126 3. 標準溶液及び試薬・試液

127 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
128 溶液及び試薬・試液を用いる。

129 (i) ポリソルベート20 (4%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム溶
130 液 塩化ナトリウム8.0 g, 塩化カリウム0.2 g, リン酸水素二
131 ナトリウム十二水和物2.9 g, リン酸二水素カリウム0.2 g及び
132 ポリソルベート20 40 gを水900 mLに溶かした後、必要ならば
133 0.1 mol/L塩酸試液又は希水酸化ナトリウム試液でpH 7.4に調
134 整後、水を加えて1000 mLとする。2 ~ 8℃で保存する。

135 (ii) ポリソルベート20 (0.01%)リン酸塩緩衝塩化ナトリウム
136 溶液 塩化ナトリウム8.0 g, 塩化カリウム0.2 g, リン酸水素
137 二ナトリウム十二水和物2.9 g, リン酸二水素カリウム0.2 g及
138 びポリソルベート20 0.1 gを水900 mLに溶かした後、必要なら
139 ば0.1 mol/L塩酸試液又は希水酸化ナトリウム試液でpH 7.4に
140 調整後、水を加えて1000 mLとする。2 ~ 8℃で保存する。

141 (iii) アフラトキシン溶液 アフラトキシン標準原液の一定量
142 をとり、アセトニトリル又はメタノールを用いて希釈したもの。
143 アフラトキシン標準原液は、正確に濃度調整された市販標準原
144 液を使用する。

145 4. 注意事項

146 (i) アフラトキシンは強い発がん物質であるため、取扱いに
147 注意する必要がある。特に高濃度のアフラトキシンを扱うとき
148 は、最大限の注意を払う。操作時には、実験衣、手袋、眼鏡、
149 マスク等の保護具を着用すること。また、アフラトキシン溶液
150 を取扱う際には局所排気装置を用いることが望ましい。

151 (ii) 使用した器具は廃棄、洗浄する前に次亜塩素酸ナトリウ
152 ム溶液に2時間以上浸漬すること。次亜塩素酸ナトリウム溶液
153 は次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) を水に溶かし0.5 ~ 1.0%
154 に調製したものである。市販の消毒用又は食品添加物規格の次
155 亜塩素酸ナトリウム溶液を濃度調整した後、利用することでも
156 きる。

157 (iii) アフラトキシン溶液は、遮光して保冷庫内で保管する。
158 市販のアフラトキシン標準原液は定められた保管条件にて保管
159 すること。

160 (iv) ガラス等の容器にアフラトキシンが吸着する場合がある。
161 この場合、シラン処理した容器(使用前に薄めたアセトニトリ
162 ル(1→5)等で洗浄し、乾燥させたもの)を用いることが望まし
163 い。

164 (v) イムノアフィニティカラムは、使用前にカラム中のゲル
165 に気泡や亀裂が生じていないことを確認し、気泡や亀裂が生じ
166 ている場合には、カラム上部から加圧し除去すること。

167 (vi) イムノアフィニティカラムを使用する際、必要に応じて
168 添加回収試験などにより性能を確認すること。

169 (vii) 試料溶液の調製において、イムノアフィニティカラムで
170 はなく、複数の担体混合物を充填したカラムを使用する場合、
171 イムノアフィニティカラムと同等の試験結果が得られることを
172 あらかじめ添加回収試験などにより検証しておくことが必要で
173 ある。

174 5. 参考資料

175 1) IARC, "IARC Monographs on the Evaluation of Carcino-
176 genic Risks to Humans", Vol. 82 (2002).

177 2) FAO, "FAO Food and Nutrition Paper 81, Worldwide
178 Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003"
179 (2004).

180 3) 平成23年3月31日付食安発0331第5号厚生労働省医薬食品
181 局食品安全部長通知「アフラトキシンを含有する食品の取扱
182 いについて」。

183 4) M. Trucksess, et al., J. AOAC Int., 89 (3), 624-630
184 (2006).

185 5) C. Bircan, Int. J. Food Science and Technology, 40, 929-
186 934 (2005).

187 6) H. Tosun and R. Arslan, The Scientific World Journal,
188 2013, Article ID 874093 (2013).

189 7) 平成23年8月16日付食安発0816第1号厚生労働省医薬食品
190 局食品安全部長通知「総アフラトキシンの試験法につい
191 て」。

192 8) European Pharmacopoeia 8.0 (2013), 2.8.18. Determina-
193 tion of aflatoxin B₁ in herbal drugs.

194 9) US Pharmacopoeia 37 (2014), <561> Articles of Botanical
195 Origin.

196 10) WHO: WHO Guidelines for Assessing Quality of
197 Herbal Medicines with Reference to Contaminants and
198 Residues.

199 11) 平成23年8月16日付食安監発0816第7号厚生労働省医薬
200 食品局食品安全部監視安全課長通知「トウモロコシ中の総ア
201 フラトキシンの試験法について」。

202 12) 佐久間久子ら, 生薬学雑誌, 68 (2), 53-57 (2014).

1 生薬の放射能測定法〈G5-8-180〉

生薬は栽培品を収穫あるいは野生品を採取し、水洗、乾燥などの加工調製を経て製せられるいわゆる天産品である。本参考情報は、天然由来を超える一定レベル以上の放射性物質を含むことが懸念される場合に適用可能な、生薬の放射能測定法を示すものである。

本測定法は、 γ 線スペクトロメトリーによる放射能を測定する方法であり、放射性物質である ^{131}I 、 ^{134}Cs 及び ^{137}Cs が対象である。

1. 原理¹⁾

試料中の放射性核種の放射能を測定するには、放射性核種が崩壊したときに放出されるヘリウムの原子核の α 線、電子の β 線、光子の γ 線を測定して、放射線のエネルギーから放射性物質を決定し、単位時間当たりに計数した放射線の数から放射能を決定する。放射線はその種類、エネルギーによって透過力が異なる。一般に α 線は最も透過力が弱く、紙で遮蔽できる。 β 線は α 線より透過力があるが、数mm程度の軽金属板で遮蔽でき、弱透過性放射線に分類される。一方、 γ 線は透過力があり、遮蔽するには原子番号が高く、密度の大きな数cm～10cm程度の鉛などの物質が必要となる。

放射線の透過力の違いは、放射線・放射能測定において重要な要素となる。放射性核種の決定には、一般に γ 線が用いられる。 α 線や β 線は弱透過性放射線のため自己遮蔽(吸収)されやすく、表面汚染の測定などには適しているが、スペクトロメトリーによる放射性核種の同定は、試料調製など専門的な技術が必要で、容易ではない。一方、 γ 線は物質内部からの放出でも物質透過に際して大部分の γ 線はエネルギーを失うことなく、放射性核種から放出された γ 線エネルギーの情報が測定スペクトルから得られる。放射性核種が放出する γ 線のエネルギーは放射性核種ごとに決まっているため、得られたエネルギースペクトルから放射性核種の同定が比較的容易にできる。生薬中の放射能濃度を測定するには、含まれる放射性核種の同定と、その放射性核種の濃度を測定する必要があるため、 γ 線スペクトロメトリーによる放射能測定法が推奨される。

γ 線スペクトロメトリーによる放射能測定法に用いられる γ 線の検出器としては、放射線の入射で電子-正孔対をつくる半導体検出器と、光を出すシンチレータが知られている。シンチレータとはシンチレーション(閃光や蛍光)を出すもので、その光は非常に弱く、光による電子信号を増幅する光電子増倍管(Photo-Multiplier Tube)などと組み合わせて用いられる。生薬の放射性核種を測定できる検出器としては、半導体検出器の一つであるゲルマニウム半導体検出器(以下「Ge検出器」という。)が最も高性能である。また、取扱いが簡便な検出器として、タリウム活性化ヨウ化ナトリウムシンチレーション検出器(以下「NaI(Tl)検出器」という。)があり、生薬の放射能を測定することが可能である。

1.1. 測定対象核種

測定の対象となる核種は ^{131}I 、 ^{134}Cs 及び ^{137}Cs の3核種である。

1.1.1. Ge検出器

Ge検出器を用いた γ 線スペクトロメトリーによる放射能測

定法の解析に必要な放射線のデータを表1に示す。

表1 Ge検出器の測定対象核種放射線データ¹⁾

核種	半減期	エネルギー	γ 線 放出割合	サム効果の補正が必要な γ 線 ()内は γ 線放出割合
^{131}I	8.021 日	364.5keV	0.817	284.3keV(0.061), 637.0keV(0.072), 他
^{134}Cs	2.065 年	604.7keV	0.976	569.3keV(0.154), 801.9keV(0.087) *, 他
		795.9keV	0.855	
^{137}Cs	30.17 年	661.7keV	0.851	ない(単一 γ 線)

* 分解能があまりよくない場合には、795.9keVと801.9keVを一つのピーク(0.942)として扱ってもよい。

1.1.2. NaI(Tl)検出器

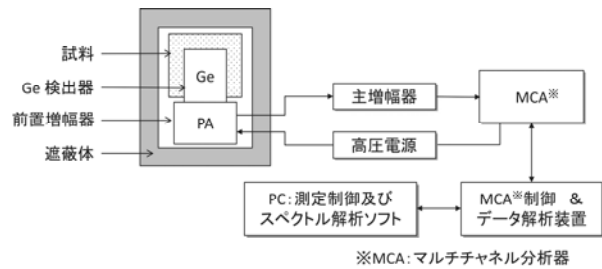
NaI(Tl)検出器を用いた γ 線スペクトロメトリーによる放射能測定法の解析に必要な放射線のデータを表2に示す。なお、NaI(Tl)スペクトロメーターを用いた測定では、核種を精密に弁別して定量することが困難な装置を用いるため、放射性セシウムは ^{134}Cs 及び ^{137}Cs の合計として扱う。

表2 NaI(Tl)検出器の測定対象核種放射線データ¹⁾

核種	半減期	エネルギー	γ 線 放出割合	サム効果の補正が必要な γ 線 ()内は γ 線放出割合
^{131}I	8.021 日	364.5keV	0.817	284.3keV(0.061), 637.0keV(0.072), 他
^{134}Cs	2.065 年	604.7keV	0.976	795.9keVは801.9keVと一つのピーク(0.942)として扱う
		795.9keV	0.855	
		801.9keV	0.087	
^{137}Cs	30.17 年	661.7keV	0.851	ない(単一 γ 線)

2. 装置

γ 線スペクトロメーターの構成を図1に示す。装置は一般に、検出器、増幅器などの計測回路部及び解析部(パーソナルコンピュータ:PC)により構成される(図1)。市販の装置には、高圧電源、増幅器、多重波高分析器(マルチチャンネル分析器)などの計測回路部が検出器と一体化し、遮蔽体を含む検出部と解析用PCにより構成されているような装置もある。詳細は、後述する。



※MCA:マルチチャンネル分析器

図1 γ 線スペクトロメーターの構成²⁾

なお、Ge検出器には液体窒素を用いる冷却装置が付属されている。

3. 試料の採取、調製、保存及び運搬

3.1. 試料の採取

3.1.1. 採取容器、器具及び表示

採取容器は、未使用のポリエチレン袋を用いる。試料採取のための補助器具は、ステンレス、ポリエチレン、又はそれと同等の材質を用いる。試料と接する部位は、汚染されないように、運搬時にはポリエチレン袋などで保護するとよい。試料採取の現場で使用するので、複数の地点で試料採取を

82 行う場合には、これら補助器具からの汚染に注意する。
 83 採取容器には、試料の採取前、又は採取後、以下の事項を速
 84 やかに記入する。

- 85 ①試料番号(ロット)
- 86 (同一試料を複数容器に分けて採取する場合にはそれぞれ
- 87 が区別できるようにする)
- 88 ②品名
- 89 ③産地名
- 90 ④採取年月日
- 91 ⑤採取者名
- 92 ⑥特記事項
- 93 ⑦その他評価に必要な事項

94 3.1.2. サンプルング及び試料の取扱い

95 測定対象単位を代表する試料を採取するためにランダムサン
 96 プリングを行い、採取した試料はよく混合して均一化する。原
 97 則として1測定対象単位当たり1サンプルとする。

98 直接の採取が困難な状況では、採取用スcoopなどで試料を
 99 採取し、必要に応じて漏斗などを用いて、採取容器に移す。

100 3.1.3. 採取量

101 試験に必要な量の2倍程度が望ましい。

102 3.2. 試料の調製

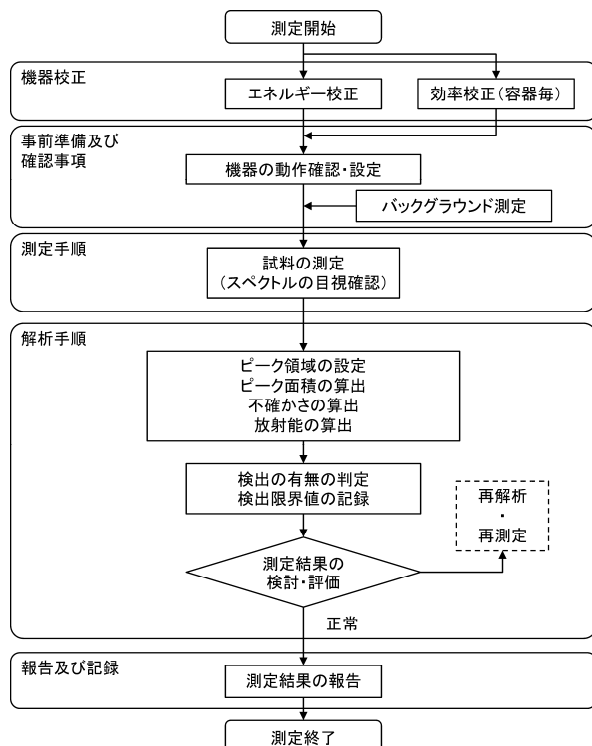
103 必要に応じて個々の測定装置に適した大きさに調製する。生
 104 薬は、植物、鉱物、動物などの様々な部位を使用するため、
 105 種々の大きさ、形状、固さがあり、その特性に応じた切裁や破
 106 砕などをする。なお、試料を採取した後に洗浄など検査結果に
 107 影響を与える処置をしてはならない。

108 3.3. 試料の保存及び運搬

109 採取後、速やかに試験する。試料の運搬時に、採取容器が破
 110 損し、採取容器から試料が漏れないようにする。速やかに試験
 111 できない場合は、湿気及び虫害などを避けて保存する。

112 4. 試料の測定

113 γ 線スペクトロメーターによる分析フローの例を図2に示す。



115 図2 分析フローの例

116 4. 1. γ 線スペクトロメーターによる測定

117 4.1.1. 測定法の特徴

118 γ 線検出器を用いる γ 線スペクトロメトリーによる放射能測
 119 定法は、エネルギー分解能が非常に高いためエネルギー決定の
 120 精度が高く核種の同定が容易かつ確実であり、接近したエネ
 121 ルギーの他の γ 線と明確に分別して解析することができる。また、
 122 γ 線ピークの広がり狭いため、ピーク計数値に対するバック
 123 グラウンド計数値の比率が低いので低レベル放射能の分析に適
 124 している。

125 4.1.2. 機器・器具など

126 4.1.2.1. 機器の構成

127 (1) γ 線検出器

128 検出器の相対効率20%程度以上とする。

129 エネルギー分解能は半値幅で1.8 ~ 2.0 keVが一般的である。

130 (2) 遮蔽体

131 低レベル放射能測定では検出器の遮蔽は大変重要である。天
 132 然核種(^{40}K , ウラン及びトリウム系列核種)などによる γ 線が
 133 十分遮蔽されている必要がある。

134 検出器周りの遮蔽体としては、厚さ10 ~ 15 cmの鉛遮蔽体
 135 が一般的に使われている。

136 遮蔽体内部空間のサイズは測定に使用する試料容器が納まる
 137 大きさとなければならない。

138 検出器の形状には、縦型(ディップスティック), L型(液体室
 139 素容器の側面にクライオスタットが付いている)などがあり、
 140 遮蔽体の構造は検出器の形状や検出器と液体室素容器との接続
 141 関係によって異なる。

142 4.1.2.2. 器具など

143 (1) 試料容器

144 試料容器は、密封性がよく、機械的強度が高く、酸や熱など
 145 に強く、内部の試料が見える必要がある。試料容器として、内
 146 容積1 ~ 2 Lのマリネリ容器、内容積100 ~ 500 mLの円筒形
 147 容器などが使われている。試料容器は試料量を参考に決定する
 148 こと。

149 (2) エネルギー校正用線源

150 エネルギー校正用の線源としては ^{22}Na (511 keV, 1275
 151 keV), ^{54}Mn (835 keV), ^{60}Co (1173 keV, 1332 keV), ^{88}Y
 152 (898 keV, 1836 keV), ^{137}Cs (662 keV), ^{139}Ce (166 keV)のよ
 153 うに100 keVから2000 keVまでをカバーするようにいくつか
 154 選んで用いる。それぞれの放射能は1000 ~ 3000 ベクレル(Bq)
 155 とする。

156 (3) 効率校正用線源

157 ^{137}Cs などを含む市販の標準試料で、容器と媒体の容積は試
 158 料と同じもの。それぞれの放射能は1000 ~ 3000 Bqとする。

159 (4) スペクトル解析ソフトウェア

160 ピーク探索、核種の同定、ピーク面積の算出、計数の統計に
 161 よる不確かさの算出などが行えるもの。さらに、自己吸収の補
 162 正やサム効果の補正が行えるものであることが望ましい。

163 4.1.3. 機器校正

164 4.1.3.1. エネルギー校正

165 エネルギー校正用線源を対象にして、次の手順により γ 線エ
 166 ネルギーとピーク中心チャンネルとの対応関係を一次式で求める。

167 (1) エネルギー校正用の線源を検出器の定まった位置に取り

168 付け、主要な γ 線のピーク面積が数千カウント以上になるまで
169 スペクトルを測定する。

170 (2) γ 線エネルギー(E)とピーク中心チャンネル(p)が直線関係
171 にあるとして、スペクトル解析ソフトを用いて次の関係を求め
172 る。

$$173 \quad E = a + b \times p$$

174 なお、 γ 線のエネルギー範囲を0 ~ 2000 keV、マルチチャ
175 ネル分析器のチャンネルフルスケールを4000 chとすることによ
176 って、計数値が低いときにもピーク領域を簡単に設定でき、
177 この場合、上式の a は0に近い値、 b はできるだけ0.500に近い
178 値となる。

179 (3) 以上のデータを記録・保存する。

180 4.1.3.2. 効率校正

181 測定した γ 線スペクトルから放射能を決定するには、ピーク
182 に対する計数効率(以下「ピーク効率」という。)が必要であり、
183 放射能分析にはピーク効率の校正が正しく行われていることが
184 前提である。

185 効率校正には、濃度が分かっている効率校正用線源を用いる。
186 通常はおよそ50 ~ 2000 keVのエネルギー範囲に適用できるよ
187 うに、いろいろな核種を含む標準線源を測定して、エネルギー
188 を変数とするピーク効率関数を求める。なお、ピーク効率は試
189 料容器によって異なるため、複数の試料容器を使用する場合に
190 は、試料容器ごとに効率校正を行う必要がある。

191 4.1.4. 測定操作

192 4.1.4.1. 事前準備及び確認事項

193 (1) 機器の動作確認と設定

194 試料を測定する前に、スペクトル解析ソフトを用いて、エネ
195 ルギー校正用線源のスペクトルを解析し、主要な γ 線について、
196 ピーク中心チャンネル、半値幅及びピーク計数率が正常な値であ
197 ることを確認する。

198 (2) バックグラウンド測定

199 設定した測定条件におけるバックグラウンドの測定を行う。
200 試料と同一の条件を持つバックグラウンド測定用試料(同一試
201 料容器に対象とする放射能が含まれていない同一量の測定対象
202 核種を含まない水を封入)を置いて測定することが原則である。

203 試料の放射能分析には最近測定したバックグラウンドスペク
204 トルの解析結果を用いるので、測定に備えて、表1に示す測定
205 対象核種の主要 γ 線エネルギーに相当するピークが認められた
206 場合には計数率と計数の統計による不確かさを算出し、結果を
207 保存する。なお、バックグラウンドスペクトルにはウラン系列
208 の ^{214}Bi から放出される609.3 keV (0.426)があり、このスペク
209 トルは ^{134}Cs の604.7 keVに近いので注意する。

210 4.1.4.2. 測定手順

211 試料容器へ試料を充填する際は、できる限り空隙を少なくし、
212 均一になるよう留意する。そのため、測定する生薬の特質に合
213 わせ、必要に応じ、切裁や破砕などの方法で、前処理する。

214 効率校正に用いた標準試料と同じ容器に同一量の試料を充填
215 したものを検出器の中心に合わせ取り付ける。その際、中心
216 からのずれは、マリネリ容器では1 cm程度以内、円筒形容器
217 では2 mm程度以内にする。

218 ピーク効率及びバックグラウンド測定の結果などから目標と
219 する検出限界値が得られるよう試料の測定時間を設定して測定
220 を開始する。なお、計数率が非常に高いときには、ピーク形状

221 が劣化することがあるので注意する。

222 測定終了後、スペクトルデータを保存する。

223 4.1.4.3. 解析手順

224 (1) ピーク領域の設定

225 測定が終了後、スペクトル解析ソフトにより測定対象核種の
226 γ 線に対してピーク領域(ROI)を設定する。その際、計数が不
227 足している場合にはスムージング処理によって、チャンネルごと
228 の計数のばらつきを平準化することもできる。

229 ピーク中心チャンネル(p)と半値幅(FWHM)から、測定したス
230 ペクトルが正常であることを確認できるが、微弱なピークにつ
231 いてはその値が変動することがある。

232 (2) ピーク面積の算出

233 ピーク面積(N_s)は、解析ソフトによるROIの自動設定ではピ
234 ーク探索に基づいて計算されるが、特に微弱なピークについて
235 は、ROIの位置と幅が適切であるか否かを確認する。

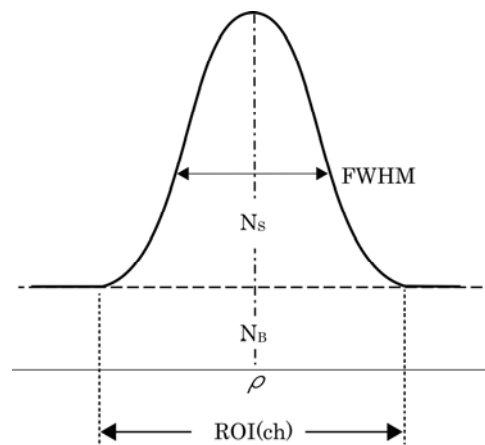


図3 ピーク領域(ROI)の設定とピーク面積(N_s)及びバックグラウンド面積(N_b)の算出

241 (3) バックグラウンド計数率の差引きと計数の統計による不
242 確かさの算出

243 通常の γ 線スペクトロメトリーではバックグラウンド計数率
244 n_{BG} (以下「BG計数率」という。)の差引きは必ずしも必要では
245 ないが、検出器と遮蔽体内部の汚染がある場合には、BG計数
246 率の差引きを行う必要がある。正味の計数率 $n(s^{-1})$ を、試料の
247 計数率($n_s = N_s/t_s$)から同一のピーク領域におけるBG計数率
248 を差し引いた値として求める。

$$249 \quad n = n_s - n_{BG}$$

250 計数誤差である σ_n と計数率(n)の関係は以下の式で表される。

$$251 \quad n \pm \sigma_n = n \pm (n/t)^{1/2}$$

252 正味計数率に対する計数の統計による不確かさ $\sigma_n(s^{-1})$ はそれ
253 ぞれの計数率の統計による不確かさ(σ_s 及び σ_{BG})の合成として
254 次のように表される。

$$255 \quad \sigma_n = (\sigma_s^2 + \sigma_{BG}^2)^{1/2}$$

256 (4) 放射能の算出

257 試料の放射能 A (Bq)と放射能濃度 C (Bq/kg)は次式で求めら
258 れる。

$$A = \frac{n}{a \varepsilon f_{\text{SUM}}} \quad C = \frac{A}{M}$$

上式において、

n : 計数率

a : 表1 に示される γ 線放出割合 (Bq^{-1})

ε : ピーク効率

f_{SUM} : サム効果補正係数

M : 試料容器中の試料の質量(kg)

ただし、標準試料との比較測定の場合は、 a 、 ε 、 f_{SUM} は同一であるから考慮する必要はない。すなわち、標準試料の放射能を A_{STD} 、計数率を n_{STD} とすると、 $A = (n/n_{\text{STD}}) A_{\text{STD}}$ で求められる。

(5) 検出に関する不確かさ

試料容器中の試料の質量の不確かさの考慮が必要でない場合、試料の放射能の計数の統計による不確かさ δ_A (Bq) と放射能濃度の計数の統計による不確かさ δ_c (Bq/kg) は次の関係で求められる。

$$\delta_A = \frac{\sigma_n}{n} A \quad \delta_c = \frac{\delta_A}{M}$$

測定された放射能濃度 C が $3\delta_c$ を超えた場合、統計的に有意であると考えられる。

(6) 検出限界値の記録

不検出となった場合にはその分析を行った際に検出されるであろう放射能値における $3\delta_c$ を検出限界値として記録する。

検出限界値は、BG計数率、試料の測定時間、試料の質量の影響を受ける。放射能測定では、測定対象ピークのバックグラウンド部分の計数率(通常ピーク脇のベースライン領域から算出)、BG計数率、試料の測定時間及びバックグラウンド測定時間、試料の質量などから算出する方法が広く用いられている。

(7) 測定結果の検討・評価

測定対象核種ごとの測定結果を整理し、計数の統計による不確かさ、ピーク中心チャネル、半値幅などにより正常であることを確認する。確認結果に何らかの疑義がある場合は、必要に応じて再測定を行う。

4.1.5. 測定実施の注意点

4.1.5.1. バックグラウンドの管理

定量目的核種と同じ核種がバックグラウンドから検出される場合には、その原因を確認し、可能な限りバックグラウンドの影響を抑えることが必要である。室内の汚染による場合には、機器周りの遮蔽装置を清掃・確認し、適切な遮蔽を行うことで影響を抑えることができる。遮蔽体内や検出器そのものが汚染した場合には、除染に努めることが原則であるが、万一、除染できない場合には、放射能計算の際にバックグラウンドからの寄与を差し引く必要がある。

4.1.5.2. 機器、器具などの汚染防止

検出器はポリエチレンなどで覆い、汚染を防ぐようにする。万一汚染した場合もポリエチレンの包装を交換することで対処できる。検出器表面が汚染した場合には、中性洗剤やエタノールをしみ込ませたガーゼなどでふき取る。遮蔽体を開ける場合に、粉塵などの汚染物が入らないように注意する。

試料容器は簡単な洗浄を行ったうえで使用する。試料を試料容器に入れる際に試料容器の周りに試料が付着しないようにす

ることも重要である。

高濃度の試料を測定する場合や除染が困難な場合には使い捨て容器を使用する。試料容器を繰り返し使用する場合は、フッ素コーティングなどを施すとよい。試料容器内にプラスチック袋を用いることも有効である。

4.1.5.3. 機器の日常管理

測定システム全体の定期的な性能テストを行うことは機器の管理として大変重要である。性能テストでは、チェック用 γ 線源を検出器上の一定の位置に置いて測定し、低・中・高エネルギーの γ 線についてピーク中心チャネル、半値幅、ピーク計数率を求め、それらを時系列データとして保存する。性能テストはできれば毎日、少なくとも一連の試料測定に先立って行うことによって常に正確なエネルギー校正を用いることができる。

また、定期的に試料がない状態又は空容器を設置して測定を行うことにより、検出器周辺部や試料容器の汚染がないことを確認する。

検出器トラブルの一つとしてクライオスタット内の真空度劣化がある。これは、液体窒素の消耗量、エネルギー分解能の低下、目視検査(クライオスタットのネック部分における結露の有無)などから判断することもできる。

4.2. NaI (Tl) スペクトロメーターによる測定

4.2.1. 測定法の特徴

シンチレーション検出器は、シンチレータと呼ばれる固体の結晶に放射線が入射した際に生じる微弱な発光を光電子倍增管で電気信号に変えて放射線のエネルギーや数を求めるものである。Ge検出器に比べて比較的安価であり、常温で使えることが利点としてあげられる。また、市販されている固体結晶はサイズが規格化されていることから、結晶の大きさで検出効率が決まる点も特徴である。固体結晶の中には、NaIやLaBr₃などがある³⁾。

4.2.2. 機器・器具など

4.2.2.1. 機器の構成

シンチレーションスペクトロメーターは、一般的に、シンチレーション検出器、高圧電源、増幅器、マルチチャネル分析器、解析用PCから構成される。シンチレーションスペクトロメーターは γ 線スペクトル解析機能を有し、放射能測定から定量計算までを実施できるものとする。

(1) 検出器

エネルギー分解能は8%以下とする。

(2) 遮蔽体

環境放射線(バックグラウンド)の影響を低減するため、検出器の周りを鉛で遮蔽した構造のものが望ましい。検出器の側面のみの遮蔽では、低減効果は低いことから全面を囲むことがより望ましい。

(3) 試料台

遮蔽体の中に収め、検出器と試料が常に一定の空間的位置関係(ジオメトリ)で固定できる試料台を設置すること。その際には、検出効率や測定時の安定性の点から、検出器と垂直にビーカー試料容器を直上に置くことが望ましい。また、角形の試料容器の場合は、検出器と水平に容器側面と試料台を密着させることも可能である。

4.2.2.2. 器具など

(1) 試料容器

試料容器には、マリネリ容器、プラスチック瓶、ポリタンク

などが用いられる。緊急時の場合には、試料を入れたバケツに検出器を差し込むことでも定量が可能である。ただし、それぞれの測定容器に対して、あらかじめ検出効率を算出しておくことが必要となる。

(2) エネルギー校正用線源

エネルギー校正用の線源としては ^{22}Na (511 keV, 1275 keV), ^{54}Mn (835 keV), ^{60}Co (1173 keV, 1332 keV), ^{88}Y (898 keV, 1836 keV), ^{137}Cs (662 keV), ^{139}Ce (166 keV) のように100 keVから2000 keVまでをカバーするようにいくつか選んで用いる。γ線エネルギーとピーク中心チャンネルの関係を1次式で求める。

Ge検出器とは異なり、エネルギー分解能が低いため、γ線のエネルギーが接近した核種を混合した線源は用いない。

(3) 効率校正用線源

効率校正には、放射能が分かっている効率校正用線源を用いる。ピーク効率は試料容器によって異なるため、複数の試料容器を使用する場合には、試料容器ごとに効率校正を行う必要がある。スペクトロメーターのエネルギー分解能を考慮して、1, 2本のγ線を放出する核種を用いることが望ましい。測定対象核種の ^{134}Cs と ^{137}Cs が含まれていることが望ましい。

(4) スペクトル解析ソフトウェア

多核種によるピークの重なりがあってもピーク関数フィッティングなどにより着目するピークを分離して面積を求めることができる。「放射能測定法シリーズNo.7 ゲルマニウム半導体検出器によるγ線スペクトロメトリ」⁴⁾に準拠したピーク分析ができることが望ましい。また、定量する核種の放射線データ(半減期, γ線放出割合), 検出効率から、放射能濃度を計算することができることが望ましい。

4.2.3. 機器校正

4.2.3.1. エネルギー校正

マルチチャンネル分析器のチャンネル幅は1000 ch程度とし、2000 keVまでのγ線が測定できるように調整した上で、幾つかのエネルギー校正用線源を用いて、エネルギー校正式を求める。γ線エネルギー(E)とピーク中心チャンネル(p)には以下の関係がある。

$$E = a + b \times p$$

上式のaはできるだけ0に近い値, bはチャンネル数にもよるができるだけ2.0に近い値であることが望ましい。

4.2.3.2. 効率校正

γ線のエネルギーによってそれぞれの計数効率が異なることから、幾つかの核種を既知量含む効率校正用線源を使用して、検出効率(ϵ)をγ線エネルギー(E)の関数として求める。数100 keV ~ 2000 keVの領域では、以下の関係がある。

$$\log(\epsilon) = a + b \times \log(E)$$

定量を目的とする ^{134}Cs 及び ^{137}Cs を含む校正用線源があれば、目的とするγ線ピークに対する計数効率を直接求めることができる。

4.2.4. 測定操作

4.2.4.1. 事前準備及び確認事項

(1) 機器の動作確認と設定

光電子増倍管にメーカーが規定する極性と電圧を印加する。線源を検出器に近づけた場合に、プリアンプからの出力波形が

仕様にあっていないことをオシロスコープで確認することが望ましいが、使用する機種の取扱説明書を参考にしても良い。又は、マルチチャンネル分析器に接続して、通常見られないノイズ信号が出ていないことと、デッドタイムメータが振り切れていないことを確認する。なお、マルチチャンネル分析器は1000 ch程度までとする。測定エネルギー範囲は100 keVから2000 keV程度とする。

エネルギー校正は電源投入時及び毎日確認し、基準となるγ線(例えば ^{137}Cs や ^{40}K)があらかじめ設定しているチャンネルにおいて検出できることを確認する。設定しているチャンネルと大幅なずれが生じている場合には増幅器のGAIN(ゲイン)を調整する。

(2) バックグラウンド測定

バックグラウンド測定について試料がない状態又は、空容器を設置して週1回程度測定を行い、検出器周辺部や測定容器の汚染がないことを確認する。また、定量するγ線と同じチャンネルにピークが認められる場合で、除染できない場合には、その計数率を求めて記録する。

4.2.4.2. 測定手順

基本的にはGe検出器による方法とほぼ同じであることから、Ge検出器を用いたγ線スペクトロメーターの操作に従う。

(1) 測定時間の設定: 目的とする検出限界値, 試料の量によって測定時間を決定する。検出限界値をより低くするためには、バックグラウンドの低減が最も有効である。

(2) 測定の開始, 終了操作とその時間の記録

(3) スペクトルデータの保存: ファイル名は試料が分かるような名称や日時などが分かる名称にしておく。

4.2.4.3. 解析手順

基本的にはGe検出器による方法とほぼ同じであることから、Ge検出器を用いたγ線スペクトロメーターの操作に従うこと。なお、この解析における留意点は以下のとおり。

(1) ピーク領域の設定

定量に利用するγ線ピークとしてバックグラウンドに対して有意な計数が得られている領域を設定する。その際、計数が不足してばらつきが大きく、領域の設定が難しい場合にはスムージング処理によって、チャンネルごとの計数を平滑化してからピーク領域を設定する。

(2) 核種同定

エネルギー校正曲線から、定量する核種のγ線がどのチャンネルに対応するかを換算できるようにしておく。核データブックや環境放射線のスペクトルを備えておき、未知のピークが検出された場合には、γ線のエネルギーを調べ、核種の同定を行い、定量に利用するγ線の妨害の可能性を検討する。

(3) ピーク面積の算出

ピーク部分の全計数からピーク下のバックグラウンド部分の計数を差し引く方法を行う。その方法で定量することが困難なほど多重ピークとなっている場合は、ピーク関数フィッティング法でピーク分離を行ったうえでピーク面積の計算を行う。

(4) 放射能の算出

放射能の算出に当たって、試料やバックグラウンドに含まれる天然の放射性同位元素を考慮して、放射能の計算結果を評価する必要がある。その場合、定量に利用する核種のγ線ピークに相当する領域における計数を求めて差し引き、正味の計数(n)を求める。

測定時間で割った計数率(n)から以下の式によって試料の放射能 $A(\text{Bq})$ 及び放射能濃度 $C(\text{Bq/kg})$ を求める。

$$A = \frac{n}{\epsilon \cdot f_{\text{SUM}}} \quad C = \frac{A}{M}$$

上式において、

n : 計数率

a : 表2に示される γ 線放出割合(Bq^{-1})

ϵ : ピーク効率

f_{SUM} : サム効果補正係数、ただし、サム効果の補正は ^{134}Cs について行う必要があるが、補正を行わない場合にはその旨記載する。

M : 試料容器中の試料の質量(kg)

(5) 検出限界値の算出

検出限界値はバックグラウンドスペクトルのチャンネルを対象とする核種の γ 線が存在したと仮定した場合に算出される。ピーク領域のバックグラウンド計数を加算し、その計数誤差の3倍を検出限界値として表す。市販されている遮蔽体付きのスペクトロメーターでは、 ^{131}I 及び ^{137}Cs で 30Bq/kg 程度であるが、検出器の大きさ、遮蔽体の厚み、試料量で大きく異なる。実際の試料におけるピークの検出限界値は、試料のスペクトルにも大きく依存する。試料中に他の核種が共存する場合には、その核種によるコンプトンバックグラウンドも影響することになり、検出限界値が大きくなる場合がある。

(6) 測定結果の検討・評価

測定対象核種ごとの測定結果を整理し、計数の統計による不確かさ、ピーク中心チャンネル、半値幅などにより正常であることを確認し、確認結果に何らかの疑義がある場合は、必要に応じて再測定を行う。

4.2.5. 測定実施の注意点

4.2.5.1. 温度の影響

NaI (TI) スペクトロメーターでは、検出器周辺温度の変動があると、ピーク中心チャンネルが変動することがある。特に、夜間や冬期などは測定室の温度が変動しやすいことから、温度を一定に保つようにする。試料が測定室の温度より低温で保存されているような場合には、測定に先立って測定室の温度付近に戻しておく。

4.2.5.2. バックグラウンドの管理

4.1.5.1.を準用する。

4.2.5.3. 測定器の汚染防止

検出器はポリエチレンなどで覆い、汚染を防ぐようにする。万一汚染した場合もポリエチレンの包装を交換することで対処できる。検出器表面が汚染した場合には、中性洗剤やエタノールをしみ込ませたガーゼなどでふき取る。遮蔽体を開ける場合に、粉塵などの汚染が入らないように注意する。

試料容器は必要な場合、簡単な洗浄を行ったうえで使用する。容器内にポリエチレン袋を用いることもできる。試料溶液を容器に入れる際に測定容器の周りに汚染が付着しないようにする。

5. 報告及び記録

記載事項の例は次のとおりである。

① 使用機器情報 : 機器名(検出器サイズ、分解能)、測定チャンネル数、解析ソフトウェアの種類、処理方法

② 試料情報 : 試料名(番号)、採取場所、採取日時、採取量、採

取容器の種類、採取担当者氏名

③ 測定条件 : 試料容器の種類、試料量、ジオメトリ

④ 測定記録 : 測定開始日時、測定時間(Live Time, Real Time)

⑤ 解析記録 : ピーク中心チャンネル、半値幅、ピーク面積とその計数の統計による不確かさ、試料計数率とその計数の統計による不確かさ、BG計数率とその計数の統計による不確かさ、ピーク効率、減衰補正係数、放射能及び放射能濃度とそれぞれの計数の統計による不確かさ、検出限界放射能又は検出限界放射能濃度、測定・解析担当者氏名

なお、解析記録については、転記ミス为了避免するため使用する解析ソフトの報告書をそのまま用いてもよい。数値については、計数の統計による不確かさの有効桁数を基にして放射能又は放射能濃度の有効桁数の「丸め」を行う。

⑥ 測定結果 : 核種名、放射能濃度(Bq/kg)、検出限界値

なお、測定業務を受託する場合には、原則として、測定業務の委託者が定める書式に測定結果を記載し報告するとともに、元データとともに保存する。

6. 参考資料

- 1) 日本アイソトープ協会編、アイソトープ手帳第11版、丸善出版、東京、2011、ISBN 978-4-89073-211-1.
- 2) 平成23年10月12日付厚生労働省健康局水道課事務連絡「水道水等の放射能測定マニュアルの送付について」、別添「水道水等の放射能測定マニュアル」。
- 3) 昭和49年1月制定、文部科学省科学技術・学術政策局「放射能測定法シリーズNo.6 NaI(Tl) シンチレーションスペクトロメータ機器分析法」。
- 4) 平成4年8月第3改訂、文部科学省科学技術・学術政策局「放射能測定法シリーズNo.7 ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー」。

1 G6. 製剤関連

2 プロセス解析工学によるリアルタイムリリース試験における含量均一性評価のための判定基準 (G6-1-171)

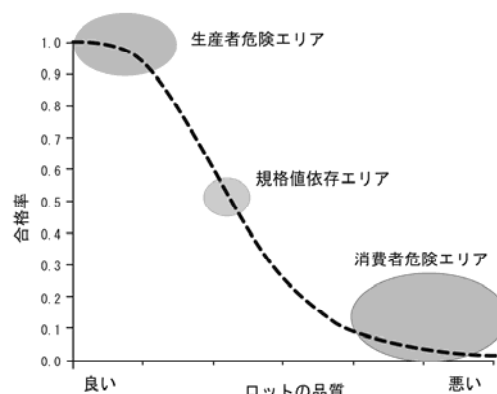
5 1. はじめに

6 近年、プロセス解析工学(Process Analytical Technology;
7 PAT)の発展に伴い、リアルタイムリリース試験(Real Time
8 Release Testing; RTRT)における含量均一性評価のための試料
9 数と判定基準が必要となってきた。PATによるRTRTでは
10 近赤外吸収スペクトル測定法(NIR)のような非破壊的測定法に
11 より工程内で多量のサンプルをリアルタイムで測定することが
12 でき、結果として大量のデータが短時間で生成される。これに
13 より工程管理及び工程能力を向上させることが可能となるが、
14 このような、試験するサンプル量(サンプルサイズ)が100を超
15 えるシステムでは、日本薬局方一般試験法の製剤均一性試験法
16 の判定基準、すなわちサンプルサイズとして1段階目10個、2
17 段階目30個を用いた2段階試験のための判定基準では適切な判
18 定ができない可能性がある。例えば、現行の判定基準では30
19 個の試料を用いて試験した場合、表示量から25.0%を超える偏
20 差を示した製剤がサンプル中に1個でもあると不適となるが、
21 サンプルサイズが100を越すようなPATでは、1回の試験で外
22 れ値を示す製剤(outlier)が出現する確率は、サンプルサイズが
23 大きくなるほど無視できない頻度となる。この参考情報ではサ
24 ンプルサイズが100を超えるRTRTに適用可能な判定基準の考
25 え方を示す。

26 2. 判定基準の理論的背景

27 日本薬局方の含量均一性試験は出荷のための最終試験である
28 が、いわゆる抜き取り試験の一種である。抜き取り試験とは大
29 量の母集団、すなわちロット又はバッチから一部を抜き取って
30 試験することであり、抜き取ったサンプルの量すなわちサンプ
31 ルサイズによって元の母集団ロットに対する推定の良さが異な
32 る。一般にはサンプルサイズが大きければ大きいほど推定が良
33 くなり、ロットの品質を確実に見極めることが可能になると考
34 えられている。一方、多すぎるサンプルを抜き取ることは経済
35 的、労力的な負担になることから、日本薬局方のような公定法
36 では、最小限のサンプルサイズを採用している。したがって、
37 規格値は最小限のサンプルサイズでも品質の悪い製品が世に出
38 ないように厳しく定められている。しかし、上述したように分
39 析技術の発展により非破壊で多量のサンプル(Large-N)が試験
40 に用いられるようになった現在、Large-Nに見合った規格値の
41 設定が求められている。

42 規格値の設定に際しては、担保可能な品質の限度(許容限度)
43 と、現実的に対応可能な試験の厳しさとの兼ね合いで決められ
44 る。試験は厳しいほど許容品質は良くなるが、厳しすぎると実
45 際の製品が合格せず欠品になったり、コストが異常に高くなっ
46 たりする。許容品質を保持するためには、消費者危険(悪い品
47 質のものが合格するリスク)と生産者危険(良い品質のものが不
48 合格になるリスク)を比較し、最適な試験の厳しさを決めるこ
49 とが最も合理的である。検査特性(operating characteristic;
50 OC)曲線におけるこれらの関係を、図1に模式図として示した。

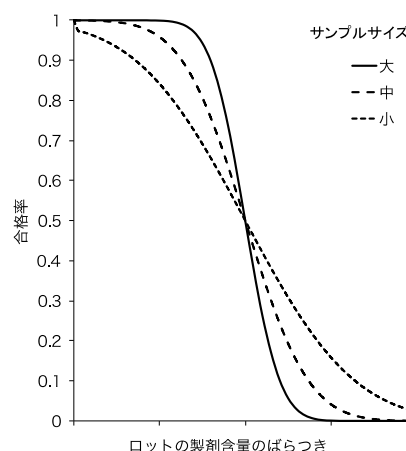


51 図1 OC曲線における消費者危険と生産者危険

52
53 試験に合格して出荷される製品の品質を最終的に担保するの
54 は、合格率が5%の消費者危険レベルに相当する許容品質であ
55 る。すなわち許容品質より悪い製品が試験に合格して出荷され
56 る可能性は低い(5%以下)と考えられる。一方、生産者にとつ
57 て重要なのは、どの程度良い品質の製品を生産したら十分合格
58 できるのかといった問題であり、特に合格率の高い(通常90 ~
59 95%)品質レベルの製品の合否が生産者危険として重要視され
60 る。そして、規格値とほぼ同じレベルの品質に関してはサンプ
61 ルサイズに関わらずほぼ50%合格となる。したがって、規格
62 値を変えずにサンプルサイズだけを大きくすると図2のAのよ
63 うになる。

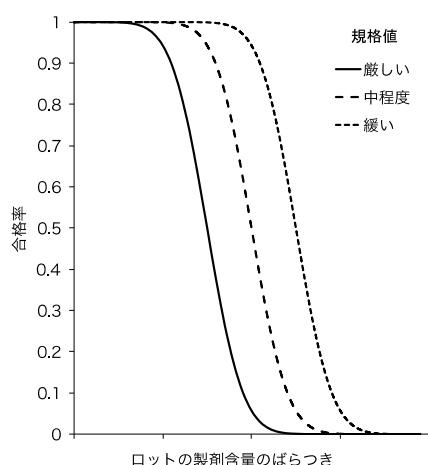
64 すなわちOC曲線の50%合格レベルの品質(RSD)は変わらない
65 が、OC曲線の傾きはサンプルサイズが大きいほどきつくな
66 る。対照的にサンプルサイズを変えずに規格値を変えるとOC
67 曲線は、傾きは一定で規格が厳しいほど左に移行する(図2のB)。
68 サンプルサイズが変わっても消費者危険レベルを一致させるた
69 めには、図3のAのようにサンプルサイズの変化に応じた規格
70 値の設定が必要になる。一般に、サンプルサイズが大きくな
71 ると規格値が緩くなっても同じ消費者危険レベルを保つことが
72 できる。

73 A. サンプルサイズの影響



74

75 B. 試験規格の影響

76 図2 含量均一性試験のOC曲線—サンプルサイズと試験規格
77 の影響
78

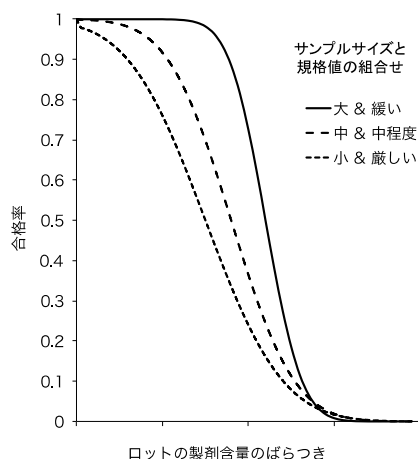
79 しかし、PATにより大きなサンプルサイズで試験して出荷
80 された場合、出荷後に安定性試験や収去試験などで通常の小さ
81 いサンプルサイズで試験を行うケースが出てくる。この場合、
82 出荷後はサンプルサイズの小さい精度の悪い試験を行うことにな
83 り、図3のAのように消費者危険は一定でも生産者危険が増
84 大する。出荷後の生産者危険を増大させないためには、PAT
85 の試験規格と通常の試験規格で生産者危険が大きく異ならない
86 よう試験規格を設定する必要がある。この場合、図3のBで示
87 されているように大きなサンプルサイズになるほど規格値を厳
88 しくする必要がある。

89 この参考情報で提案されている試験規格はこのような点に配
90 慮して決められた¹⁾。なお、この試験規格は、多数の試料測定
91 の際に計算が簡易で、かつ含量の分布に依存しないノンパラメ
92 トリックな判定基準であり、既出のLarge-Nに対応した基準で
93 あるEuropean Pharmacopoeia (EP)のAlternate 2²⁾ の考え方
94 と同様である。なお、同じくEPのAlternate 1を判定基準とし
95 て用いた場合についても、品質保証の観点からは問題がないと
96 考えられる。

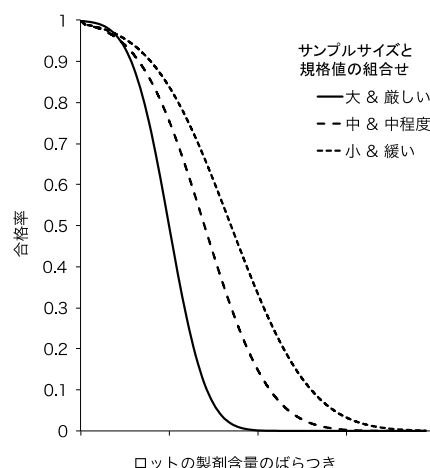
97 3. サンプルサイズが100以上の場合の含量均一性の判定基準

98 ここで提案するのは限度値の異なる2種の計数試験(CIの規

99 A. 消費者危険レベル一定の場合



101 B. 生産者危険レベル一定の場合

102 図3 含量均一性試験のOC曲線—消費者及び生産者危険が一
103 定の場合
104

105 定、C2の規定)の組合せによる判定基準である。サンプルサイ
106 ズと合格判定個数を表1に示す。

107 判定基準

108 ロットを代表する n 個の試料について適切な方法により測定
109 し、有効成分の含量を表示量に対する%として求める。個々の
110 製剤の含量の偏差が、15.0%を超えるものがC1個以下で、か
111 つ25.0%を超えるものがC2個以下のときは適合とする。なお、
112 品質管理上必要な場合には、偏差の基準点を表示量から含量目
113 標値等の適当な値に変更することができる。

表1 含量均一性判定基準

サンプルサイズ (n)	合格判定個数*	
	C1** ($\pm 15.0\%$)	C2** ($\pm 25.0\%$)
100 未満	6.02 製剤均一性試験法の判定基準	
100 以上 150 未満	3	0
150 以上 200 未満	4	0
200 以上 300 未満	6	1
300 以上 500 未満	8	2
500 以上 1000 未満	13	4
1000 以上 2000 未満	25	8
2000 以上 5000 未満	47	18
5000 以上 10000 未満	112	47
10000 以上	217	94

* outlierがこの個数以下の場合に適合となる

** Critical Acceptance Number

114 4. 参考資料

- 115 1) 香取典子ら、厚生労働科学研究費補助金「医薬品のライフ
116 サイクルを通じた品質確保と改善に関する研究—製剤のラ
117 イフサイクルにわたる品質保証に関する研究—」平成26年度
118 分担研究報告書(研究代表者: 奥田晴宏「医薬品のライフサ
119 イクルに通じた品質保証に関する研究」), 2015.3.
- 120 2) European Pharmacopoeia 7.7 (2012), 2.9.47.
121 Demonstration of Uniformity of Dosage Units Using
122 Large Sample Sizes.

1 溶出試験装置の機械的校正の標準的方法〈G6-2-170〉

本参考情報は、溶出試験の装置1（回転バスケット法）と装置2（パドル法）に関し、試験結果に影響を及ぼすと考えられる装置の機械的な変動要因を減らし、試験結果の再現性を確保することを目的として、溶出試験装置の機械的校正の標準的な方法と推奨される規定を示すものである。溶出試験の適格性の確認には、機械的校正が有効であることが、溶出試験に関わる薬局方の国際調和の場で確認されており、その後、米国では溶出試験装置の適格性評価の標準的方法¹⁾が示され、機械的校正のガイダンス²⁾が出されるに至った。

溶出試験装置の備えるべき基本的な材質やサイズ等の要件、装置の適合性に関しては、溶出試験法〈6.10〉の記載に従う。本参考情報に収載する機械的校正のためのパラメーターの幾つかは、溶出試験法〈6.10〉で規定された装置の許容幅に比べ、より厳しく設定されている場合がある。下表に、各校正パラメーターの規定値を比較した。機械的校正により試験結果の変動をより少なくすることを目指すためには、本参考情報を適用することが推奨される。

表 溶出試験法〈6.10〉と本参考情報の機械的校正パラメーターの規定値

校正パラメーター	溶出試験法〈6.10〉	本参考情報
回転軸の振れ	結果に影響する揺動、振動がなく、滑らかに回転	≤1.0 mm全振れ
回転軸の垂直度	—	≤0.5°（垂直からのずれ：気泡は水準器の線内に入る）
バスケットの振れ	—	≤1.0 mm全振れ
容器の中心度	≤2.0 mm垂直方向からの隔たり	≤1.0 mm（上部と下部で中心線からの隔たり）
容器の垂直度	—	≤1.0°（垂直からのずれ）
バスケット及びパドルの深さ	25±2 mm	25±2 mm
回転速度	±4%（規定回転数からのずれ）	±2%又は±2 rpm（規定回転数からのずれ）

なお、我が国では、USPのブレドニゾン標準錠剤を用いた溶出試験結果の妥当性の検証が推奨されてきた経緯があるが、標準錠剤による試験結果は、必ずしも装置の機械的な変動要因を検出できないことから、基本的に機械的校正の実施が望ましい。ただし、装置の校正のみでは捉えられない試験液の脱気状態や装置の振動などを含む総合的な要因の把握のためには、ブレドニゾン標準錠剤を用いる試験を適宜実施することも有効と考えられる。その他、試験液の脱気状態の確認には、溶存酸素計によるモニターも有効であることが知られている。

1. 溶出試験装置の受入れと定期的な管理

機械的校正は、溶出試験装置の購入又は受入れ時、装置の移設後、試験結果に影響を及ぼすような装置の修理後に行うと共に、また、通常は、一年ごとに実行することが望ましい。もし、装置が日常的に使用されていない場合には、機械的校正は、一年以上間隔を空けても、最初の溶出試験を行う前に実施することであり、

2. 機械的校正の方法

2.1. 使用器具

機械的校正に使用する器具には、汎用的なものとして、ダイヤルゲージ、水準器、中心度計、タコメーター等があるが、可能な限りJIS（日本産業規格）等のトレーサビリティの下に校正されたものを使用することが望ましい。また、溶出試験装置の機械的校正のための特別な器具として、芯出し治具、デブスゲージ、プラスチックボール等がある。さらに、溶出試験装置によっては、測定を実施するために、装置メーカーの供給する特別な器具を必要とする場合や、自動の校正装置を組み込んでいる場合もある。原則的に以下の方法に従うのであれば、これらの器具や装置を使用することができる。

2.2. 実施方法

溶出試験装置の機械的校正は以下の定められた手順に従って実施する。それぞれの測定値が規定に適合しない場合には、調整と測定を繰り返すことが必要となる場合もある。

なお、あらかじめ装置が水平であることを確認する。また、容器を固定している板（容器固定板）の水平度は、あらかじめ気泡水準器を容器固定板に置いて、気泡が水準器の基準線内に入ることを確認しておく。

2.2.1. 回転軸の振れ

容器固定板の上にダイヤルゲージを置き、ダイヤルゲージの測定子がパドルの攪拌翼又はバスケットの上端から約2 cm上の部分で回転軸に触れるようにダイヤルゲージを設置する。測定値の最大値と最小値の差の絶対値が振れである。全振れの値は1.0 mmを超えてはならない。

2.2.2. 回転軸の垂直度

回転軸を動かす駆動部を実際の溶出試験時と同じ位置へ下げる。必要ならば、回転軸の垂直度は、駆動部を上げて回転軸をチェックしてもよい。正確な気泡水準器を回転軸の上部の端に側面に接するように当てる。気泡は水準器の基準線内に入らなければならない。水準器を回転軸の側面に接するようにほぼ90°回転して回転軸側部に当てる。このときも、気泡は水準器の基準線内に入らなければならない。

回転軸の垂直度の測定では、デジタル水準器を使用しても良い。

回転軸の垂直度は0.5°以下でなければならない。

2.2.3. バスケットの振れ

容器固定板の上にダイヤルゲージを置き、ダイヤルゲージの測定子がバスケット底部の端に触れるように駆動部を設置する。ダイヤルゲージを、測定子が回転する回転軸に軽く押し付けるように設置する。全振れの値は1.0 mmを超えてはならない。

2.2.4. 容器の中心度

容器内の中心度は、溶出試験装置用の芯出し治具を使用して測定するか、又は代替法により測定する。

芯出し治具を用いる場合には、二つの芯出し治具を使用し、パドル又はバスケット回転軸が容器の中心に位置するようにし、側面が垂直となるように容器を調整する。

測定方法の例として、パドル法では、一つの芯出し治具の底部をパドルの回転翼の上部から上へ2 mm付近に取り付け、他方の芯出し治具はその底部を回転翼の上部80 mm付近にクランプで留め、両方の測定子が容器の壁に対して同一方向となるようにする。回転バスケット法では、一つの芯出し治具の底部を、バスケットの上部から上へ2 mm付近に取り付け、他方の

92 芯出し治具の底部をバスケット上端から上に60 mm付近に取
93 り付け、測定子を容器の壁に対して同一方向となるようにする。
94 パドルの回転翼やバスケットの底部が容器の底より約2.5 cm
95 上になるように、注意深く回転軸と芯出し治具を容器の中へ下
96 げる。回転軸をゆっくり手で回し、両方の中心度をチェックす
97 る。もし、容器がいずれかの高さで中心からずれている場合に
98 は、容器を中心となるように調整する。

99 代替法として、一般的なメカニカル中心度計又はデジタル中
100 心度計を用いて、回転軸又は代用回転軸の周りの容器内壁で、
101 容器の中心度を合わせることができる。中心度は円筒形部分の
102 中の容器の内側の適切な2点で測定する。2点とは、容器の縁
103 のすぐ下及び容器底部のバスケット又はパドルのすぐ上に当た
104 る位置である。

105 回転軸は中心線から1.0 mm以内になければならない。

106 2.2.5. 容器の垂直度

107 容器の垂直度は、2.2.4の容器の中心度の2点での測定値と、
108 2点間の高さの差を用い、2点と垂線からなる三角形の頂点の
109 角度を計算することができる。又は、容器の内側の壁にデジタ
110 ル水準器を当てて測定することもできるが、垂直度は90°ずら
111 した2点で測定する。

112 容器の垂直度は1.0°以下でなければならない。

113 容器の中心度と垂直度が得られたら、それぞれの容器は、必
114 ず容器固定板開口部の同じ位置に同じ向きとなるように設置す
115 る。

116 2.2.6. バスケット及びパドルの深さ

117 容器の内底とバスケット又はパドルの下端部までの実際の距
118 離を測定する。もしバスケット又はパドルの高さが調節できる
119 のであれば、まずデプスゲージを用いてパドル攪拌翼又はバス
120 ケットの底部と容器の内底の距離を測定する。デプスゲージを
121 25 mmに設定し、容器の底に置く。各回転軸を装置の駆動部
122 内に一旦上げた後、運転位置に下ろし、パドル又はバスケット
123 が、デプスゲージに触れるところで止める。デプスゲージの代
124 わりに、直径 25 ± 2 mmのプラスチックボールを底部に沈め、
125 パドル又はバスケットが、ボールに触れるところで止めること
126 でも良い。回転軸はこの高さで固定する。バスケット及びパド
127 ルの深さは、通例 25 ± 2 mmとする。

128 2.2.7. 回転速度

129 パドルやバスケットの回転速度を測定するためにはタコメー
130 ターを使用する。規定速度の $\pm 2\%$ 又は ± 2 rpmのいずれか大
131 きい方の値以内の回転速度で、滑らかに回転しなければならない。
132

133 3. 参考資料

- 134 1) ASTM E2503-13: 2013, Standard Practice for
135 Qualification of Basket and Paddle Dissolution Apparatus.
- 136 2) FDA Guidance for Industry : The Use of Mechanical
137 Calibration of Dissolution Apparatus 1 and 2 - Current
138 Good Manufacturing Practice (CGMP), U.S. Department
139 of Health and Human Services Food and Drug
140 Administration Center for Drug Evaluation and Research
141 (CDER), January 2010.

1 ガラスインピンジャーによる吸入剤の空気力
2 学的粒度測定法〈G6-3-171〉

3 本測定法は吸入剤から生成するエアゾールの微粒子特性を評
4 価するもので、以下の装置や測定手順に従って行われる。もし
5 正当な理由があれば、修正された装置又は測定手順を使用する
6 ことができる。

7 1. 分級ステージの測量

8 各々の分級ステージの分級特性の最も信頼のおけるキャリブ
9 レーションは、エアゾールとしてインパクターを通過する粒子
10 や液滴の空気力学的粒子径と、分級ステージの捕集効率の関係
11 に基づいて行われる。

12 通常のキャリブレーションは、ジェットの寸法、ジェットと
13 その捕集部分の空間的配置及びインパクターを流れる空気流量
14 といった特性を調べることにより行う。

15 ジェットは時間と共に腐食又はすり減りがあるので、分級ス
16 テージの限界寸法が規定内にあることを定期的に確認する必要
17 がある。

規格に適合した分級ステージを装着した測定装置のみがガラスインピンジヤーによる吸入剤の空気力学的粒度測定法に使用できる。その他のキャリブレーション方法も正当にバリデーションされれば使用できる。

22 2. 分級ステージ間の薬物損失(ウォールロス)

23 測定方法の設定やバリデーションではウォールロスを考慮す
24 べきである。ウォールロスが薬物の回収率(マスバランス)に影
25 響を与える量であれば、コントロールしなければならない。ウォ
26 ールロスには、インパクターの種類、測定条件、製剤のタイプ、
27 インパクターへの噴射量などの多くの要因が影響する。空気力
28 学的粒子径の計算にウォールロスをどのように反映させるかは、
29 ウォールロスの程度と変動に基づいて判断すべきである。例え
30 ば、ウォールロスが少ない、又は変動が小さい場合は、捕集板
31 から回収された薬物量の定量結果から、空気力学的粒子径を算
32 出することができる。ウォールロスが多い、又は変動が大きい
33 場合は、ウォールロス別途回収し、空気力学的粒子径を算出
34 する際に考慮する必要がある。

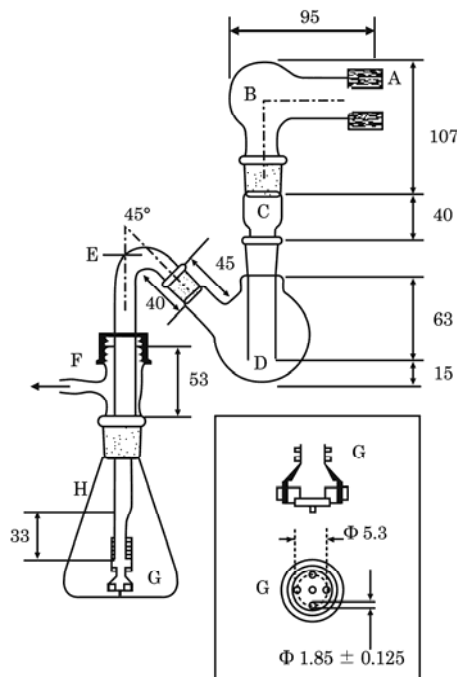
35 3. 薬物の回収率(マスバランス)

36 粒度分布に加え、良好な分析が行われたことを示すためには、
37 吸入器から噴射された量、すなわちマウスピースアダプターと
38 測定装置で回収された薬物量が期待値に対して許容範囲内であ
39 ることを確認するため、マスバランスをとることが必要である。
40 マウスピースアダプター及び測定装置の全ての構成部分から回
41 収された総薬物量を、用法・用量に記載された最小用量当たり
42 に換算した値が、吸入剤の送達量均一性試験法〈6.14〉で測定
43 された平均送達量の75%以上、かつ125%以下でなければなら
44 ない。このマスバランスは、吸入剤の粒度分布の測定結果の妥
45 当性を保証するために必要である。

46 4. ガラスインピンジャー法

47 ガラスインピンジャー法に用いる測定装置を図1に示す。本
48 装置は、スロート(B)から下部衝突チャンパー(H)までのガラス
49 製パーツ及びそれらを保持するためのプラスチック製クリップ
50 により構成されている。

51 本装置は、液体面への衝突を基に操作し、吸入器から放出さ
52 れた薬剤を吸入部分と非吸入部分に分離する。吸入時に口腔や
53 咽頭部に衝突して、結果的には飲み込まれる非吸入部分の薬剤
54 は、スロートの後方面及び上部衝突チャンバー(合わせてステ
55 ージ1)に回収される。肺へ到達する吸入部分の薬剤は下部衝突
56 チャンバー(ステージ2)に回収される。上部衝突チャンバーは、
57 吸入流量が毎分60 Lのときカットオフ径が6.4 μm になるよう
58 に設計されており、6.4 μm 以下の粒子は下部衝突チャンバー
59 へ流下する。



アルファベット大文字は表1を参照。数字はmmを示す。（他に記載がない場合には許容範囲は ± 1 mmである。）

図1 ガラスインピンジャー測定装置

85 表1 図1に示した装置の構成部品の規格

コード	部品	詳細	寸法*
A	マウスピースアダプター	吸入器のマウスピースに接続するゴム製のアダプター	
B	スロート	改良した丸型フラスコ —磨りガラス製インレットソケット —磨りガラス製アウトレットコーン	50 mL 29/32 24/29
C	ネック	改良したガラス製アダプター —磨りガラス製インレットソケット —磨りガラス製アウトレットコーン 下部アウトレット用高精度ガラス管 —内径 決められた口径と薄い肉厚のガラス管 —外径	24/29 24/29 14 17
D	上部衝突チャンバー	改良した丸型フラスコ —磨りガラス製インレットソケット —磨りガラス製アウトレットコーン	100 mL 24/29 14/23
E	カップリングチューブ	通常の肉厚のガラス管 —磨りガラス製コーン 屈曲部と上部直立部 —外径 下部直立部 —外径	14/23 13 8
F	ねじ山付サイドアームアダプター	プラスチック製スクリューキャップ シリコーンゴム製リング ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)製ワッシャ ガラス製ねじ山 —ねじ山サイズ 吸入ポンプに接続するためのサイドアーム —最小内径	28/13 28/11 28/11 28 5
G	下部ジェットアッセンブリー	PTFE製チューブによりカップリング チューブの下部直立部と接続している改良したポリプロピレン製フィルターホルダー 直径5.3 mmの円周上の決められた位置に四つのジェットの中心を配置した、 ジェットスパーサーペグ付きアセタール樹脂製円盤 ペグ径 ペグの突出部	図1参照 10 2 2
H	下部衝突チャンバー	三角フラスコ —磨りガラス製インレットソケット	250 mL 24/29

86 *他に記載がない場合には寸法はmmを示す。

87 4.1. ネブライザの測定手順

88 上部と下部の衝突チャンバーに、それぞれ7 mLと30 mLの
89 適切な溶媒を入れる。

90 全ての部品を接続した後、装置が垂直で、しっかり保持され
91 ていること、下部ジェットアッセンブリーのジェットスパー
92 ーペグが下部衝突チャンバーの底に触れていることを確認する。
93 フィルター(適切な孔径を有する)を装着した適切な吸引ポンプ
94 を装置の出口に接続する。スロートの入口で測定した吸入流量
95 が毎分 60 ± 5 Lとなるように調節する。

96 ネブライザのリザーバーに吸入液剤を入れ、これにマウスビ
97 ースを装着し、適切なマウスピースアダプターを用いて装置に
98 接続する。

99 吸引ポンプのスイッチを入れ、10秒後にネブライザのスイ
100 ャッチを入れる。

101 特に正当な理由がなければ、60秒後にネブライザのスイッ
102 チを切り、5秒間待ってから、吸引ポンプのスイッチを切る。

103 装置を分解し、上部衝突チャンバーの内壁面を洗浄し、洗浄
104 液をメスフラスコに回収する。下部衝突チャンバーの内壁面を
105 洗浄し、洗浄液を別のメスフラスコに回収する。最後に、吸引
106 ポンプの前に装着したフィルターと下部衝突チャンバーとの接
107 合部を洗浄し、下部衝突チャンバーから得られた洗浄液と合わ
108 せる。二つのフラスコに回収された有効成分をそれぞれ定量し、

109 それぞれ装置の二つの部分の結果を有効成分の総量に対するパー
110 セントとして表す。

111 4.2. 吸入エアゾール剤の測定手順

112 適切なマウスピースアダプターをスロートの端に取り付ける。
113 マウスピースアダプターに吸入器のマウスピースの端を深さ
114 10 mm程度挿入するとき、吸入器のマウスピースの端はスロ
115 ートの水平軸に並ばなければならない。加圧容器を装着する吸
116 入器の開口部が最も上にあり、装置の他の部分と同一垂直面で
117 なければならない。

118 上部と下部の衝突チャンバーに、それぞれ7 mLと30 mLの
119 適切な溶媒を入れる。

120 全ての部品を接続した後、装置が垂直で、しっかり保持され
121 ていること、下部ジェットアッセンブリーのジェットスパー
122 ーペグが下部衝突チャンバーの底に触れていることを確認する。
123 適切な吸引ポンプを装置の出口に接続する。スロートの入り口
124 で測定した吸入流量が毎分 60 ± 5 Lとなるように調節する。

125 吸入剤の使用 방법에特に記載がなければ、5秒間吸入器を振
126 り混ぜた後、1回捨て噴霧を行う。噴霧後5秒間以上待ち、再
127 度振り混ぜた後、捨て噴霧を行う。この操作手順を更に3回繰
128 り返す。

129 約5秒間吸入器を振り混ぜた後、吸引ポンプのスイッチを入
130 れ、吸入器のマウスピースの端をアダプターに接続し、直ちに

131 装置内に1回噴霧する。取り付けられている吸入器をアダプタ
132 ーから取り外す。5秒間以上吸入器を振り混ぜた後、吸入器の
133 マウスピースの端をアダプターに再び挿入し、再び噴霧する。
134 この手順を繰り返し行う。噴霧回数はある限り少なく、通例、
135 10回を超えない回数とする。最後の噴霧を終了した後、5秒間
136 以上待ち、吸引ポンプのスイッチを切る。

137 装置を分解する。下部衝突チャンバーに接続されたカップリ
138 ングチューブの内壁面とチャンバー内に突き出している部分の
139 チューブの外壁面を適切な溶媒で洗浄し、下部衝突チャンバー
140 内に洗浄液を回収する。この溶液中の有効成分を定量する。噴
141 霧当たりの下部衝突チャンバーに捕集された有効成分量を計算
142 し、表示有効成分量に対するパーセントとして表す。

143 4.3. 吸入粉末剤の測定手順

144 上部と下部の衝突チャンバーに、それぞれ7 mLと30 mLの
145 適切な溶媒を入れる。

146 全ての部品を接続した後、装置が垂直で、しっかり保持され
147 ていること、下部ジェットアセンブリーのジェットスプレー
148 ーベグが下部衝突チャンバーの底に触れていることを確認する。
149 適切な吸引ポンプを装置の出口に接続する。スロートの入り口
150 で測定した吸入流量が毎分 60 ± 5 Lとなるように調節する。

151 吸入器を準備し、適切なアダプターを用いて吸入器をスロー
152 トに取り付ける。吸引ポンプのスイッチを入れ、5秒間吸引し
153 た後、吸引ポンプのスイッチを切り、放出手順を繰り返し行う。
154 放出回数はある限り少なくし、通例、10回を超えない回数
155 とする。

156 装置を分解する。下部衝突チャンバーに接続されたカップリ
157 ングチューブの内壁面とチャンバー内に突き出している部分の
158 チューブの外壁面を適切な溶媒で洗浄し、下部衝突チャンバー
159 内に洗浄液を回収する。この溶液中の有効成分を定量する。放
160 出当たりの下部衝突チャンバーに捕集された有効成分量を計算
161 し、表示有効成分量に対するパーセントとして表す。

1 吸入液剤の空気力学的粒度測定法 (G6-8-190)

本測定法は吸入液剤からネブライザを用いて生成されるエアゾールの微粒子特性を評価するものである^{1,2)}。

1. 装置

試験には、通常、毎分15 Lの流量で校正された吸入剤の空気力学的粒度測定法 (6.15) の装置3を用いる。限界寸法と装置のバリデーション(分級ステージの測定)についても吸入剤の空気力学的粒度測定法 (6.15) を参照する。吸入液剤は、吸入粉末剤や吸入エアゾール剤で一般的に使用される範囲よりも低い流量で評価する必要がある、毎分15 Lの流量が推奨される。これは、成人の一般的な換気量(500 mL)に基づいている。毎分15 Lで噴霧された液滴を定量的に回収するために、マイクロオリフィスコレクター(MOC)に加えてバックアップフィルターを使用する。バックアップフィルターは、MOCの下(内部フィルターオプション)又は外部フィルターホルダーを使用して設置し、最終ステージ(MOC)を通過する微細な液滴を捕集する。ネブライザで生成される液滴の評価に、プレセパレーターは使用しない。

2. 試験に関する留意事項

2.1. 蒸発の防止

ネブライザで生成された液滴の蒸発を制御することは、液滴サイズの評価過程におけるバイアスを回避するために重要である。蒸発は装置を約5℃まで冷却することで最小限に抑えることができるため、あらかじめ装置を冷蔵庫(約5℃)で約90分間冷却しておく³⁾。

2.2. 装置への過量噴霧

試験法の開発及びバリデーションでは、ネブライザから噴霧される流量が装置に対して過量とならないことを確認する。過量噴霧が発生した場合、捕集ステージ表面に筋状模様の発生を目視で確認できる。この現象は通常、最終ステージとバックアップフィルターに回収される薬物量の増加とも関連している。過量噴霧を回避し、分析感度とのバランスをとるためには、サンプリング時間(T_0)を短くすることが最も効果的である。

2.3. マスバランス(薬物の回収率)

吸入液剤では薬物が連続して放出されるため、吸入粉末剤や吸入エアゾール剤と同じ方法でマスバランスを評価することは容易ではない。回収実験は、試験法の開発及びバリデーションの一環として実施する必要がある。

2.4. 再飛散

ネブライザより噴霧される液滴は、固体の吸入粒子よりも跳ね返りや再飛散が起こりにくいため、通常、捕集カップの表面のコーティングは必要としない。

2.5. 装置の洗浄

通常、少なくとも使用した日には、ステージ間流路を含めて装置を完全に洗浄する必要がある。これは、装置を冷却した際に生じる塩を含む液滴の凝縮/蓄積によるステージ間の金属部品の腐食を防ぐためである。装置の全ての表面は、洗浄後に適切な方法(例えば圧縮空気)で乾燥させる必要がある。ただし、MOCは圧縮空気乾燥させてはならない。

3. 測定手順

3.1. 準備

あらかじめ装置とインダクションポートを冷蔵庫(約5℃)で

90分以上冷却しておく。粒度分布の結果に差がないことがバリデートされていれば、装置を一定温度で冷却しながら測定できる他の方法(例えば、冷却キャビネットの使用)を用いることができる。

ネブライザを使用手順に従い準備する。測定対象の吸入液剤の用法・用量に従い、1回投与あたりの薬液をネブライザに充填する。

冷蔵庫から装置を取り出す。装置にインダクションポートを取り付け、図1のように、装置内を毎分15 Lで吸引できる吸引ポンプに、装置/外部フィルターの出口を接続する。流出する体積流量について校正されている流量計をインダクションポートに接続する。吸引ポンプを作動させ、装置と吸引ポンプの間にある流量調節バルブにより、毎分15 L (±5%)の安定した流量に調節する。その後、装置から流量計を取り外す。

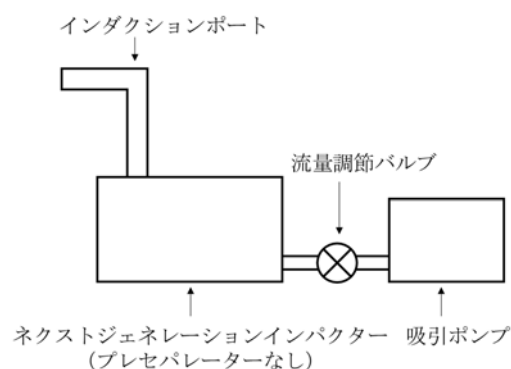


図1 吸入液剤の空気力学的粒度測定のためのネクストジェネレーションインパクターの構成

3.2. 測定

測定は冷蔵庫から取り出した後、5分以内を目安に開始する。使用時と同じ向きでネブライザのマウスピースをインダクションポートに接続する。必要に応じてマウスピースアダプターを用いる。ネブライザのスイッチを入れる。質量分率を算出できるよう、あらかじめ規定したサンプリング時間(T_0)だけ薬物を回収したのちに、ネブライザのスイッチを切る。ネブライザをインダクションポートから取り外し、吸引ポンプのスイッチを切る。装置を分解し、吸入剤の空気力学的粒度測定法 (6.15) を準用して、インダクションポート、各ステージ及びバックアップフィルターに回収された有効成分の量を適切な分析方法で測定する。MOC及びバックアップフィルター/外部フィルターに回収された薬物は、合算して一つの試料として扱う。

4. 計算

規定されたサンプリング時間(T_0)あたりの微粒子量を計算する。インダクションポートから順に装置内の各ステージに回収された有効成分の質量分率($F_{m,comp}$)を、以下の式で算出する。

$$F_{m,comp} = m_{comp} / M$$

m_{comp} = 各ステージに回収された有効成分の量

M = 装置から回収された総有効成分の量

$F_{m,comp}$ を、インダクションポートからバックアップフィルターまで、装置内の位置順に並べる(図2)。グループ分けにより複数のステージを単一の値として報告する場合には、隣接する

93 ステージの $F_{m,comp}$ 値を合算してもよい。

94 吸入剤の空気力学的粒度測定法 (6.15) を準用し、装置によ

95 り分級された液滴の積算有効成分割合を算出する。フィルタ

96 ーから始めて、各ステージのカットオフ径に対する積算有効成

97 分量を算出する(毎分15 Lにおける適切な装置3のカットオフ径

98 は表1を参照4)。カットオフ径に対する有効成分の積算割合を、

99 適切なグラフ、例えば対数グラフ又は対数確率グラフでプロッ

100 トする。必要であれば、このプロットを用いて、所定のサイズ

101 未満又はサイズの上限と下限の間の割合を内挿法で求めること

102 ができる。

103 また、このプロットを使用して、空気力学的質量中位径

104 (MMAD)と幾何標準偏差(GSD)を求めることもできる。

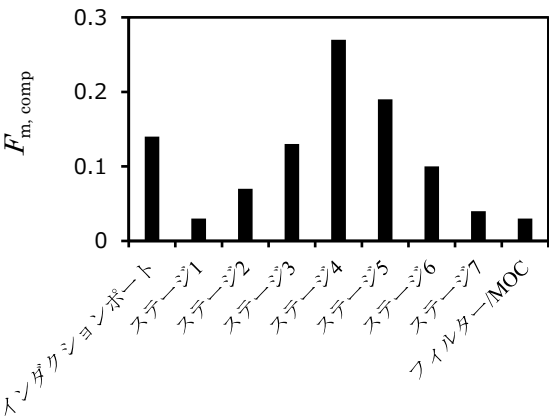


図2 各ステージに回収された有効成分の質量分率の表示例

表1 流量毎分15 Lを用いた場合の装置3のカットオフ径

ステージ	カットオフ径(μm)
1	14.1
2	8.61
3	5.39
4	3.30
5	2.08
6	1.36
7	0.98

5. 参考資料

- 1) European Pharmacopoeia 11.0 (2022), 2.9.44. Preparations for Nebulisation: Characterisation.
- 2) US Pharmacopeia (2023), <1601> Products for Nebulization - Characterization Tests.
- 3) E. Berg, et al., J. Aerosol Med., 20, 97-104 (2007).
- 4) V.A. Marple, et al., J. Aerosol Med., 17, 335-343 (2004).

1 点鼻剤の噴霧量均一性試験法 (G6-9-190)

本参考情報は、一定量の有効成分を鼻腔内に噴霧する定量噴霧式の点鼻剤に適用される。本参考情報では、点鼻用の噴霧容器を容器と呼ぶ。

複数回噴霧用の点鼻剤は、容器内及び容器間の噴霧量均一性が確保されなければならない。単回噴霧用の点鼻剤では、容器間試験を実施する。

正当な理由があれば、容器内及び容器間の噴霧量均一性を同時又は別々に評価できる試験やサンプリング手順も設定可能である。容器内及び容器間を同時に評価できる試験を行う場合、容器内と容器間について別々に試験する必要はない。正当な理由があれば、以下に示す容器内及び容器間の噴霧量均一性を同時又は別々に評価する試験の他、独自の試験を設定することも可能である。

容器内及び容器間の噴霧量均一性を同時に評価できる試験におけるサンプリング手順の例としては、10個の容器をとり、3個の容器から使用開始時の用量を、4個の容器から中間期の用量を、3個の容器から使用終了時の用量を捕集し、噴霧量を決定する方法がある。

全ての試験で、容器を使用する方法に従って準備して使用する。

必要に応じて捕集前や捕集間に静置又は他の適切な方法により容器から静電気を放電する。

2種類以上の有効成分を含む製剤では、各有効成分について噴霧量の均一性試験を行う。

1. 容器内の噴霧量の均一性の評価

1.1. 定量噴霧式点鼻液剤

1.1.1. 装置

薬物捕集装置は噴霧する薬物を定量的に捕集可能な装置を用いる。噴霧方向（垂直か傾いているか）、容器と装置の接続、サンプリング効率、空気流路システムの必要性、捕集装置の通気口及び噴霧方法は最低限考慮すべき事項である。

1.1.2. 手順

別に規定するもののほか、以下の手順により容器1個に対して、使用開始時の3回、中間期の4回、使用終了時の3回、合計10回の噴霧量測定を実施する。

点鼻剤の使用方に特に記載がなければ、最初の1回空噴霧を行う。その後、容器を装置に取り付ける。最小の1回用量に対応する噴霧回数に達するまで装置内に噴霧する。装置への捕集物を回収し、有効成分を定量し、噴霧量とする。

この手順で同じ容器を用いて更に噴霧量測定を2回繰り返す。

残り $(n/2)+1$ の噴霧回数になるまで、容器の捨て噴霧を行う。 n は表示されている噴霧可能回数である。上記と同様の手順で噴霧量測定を4回繰り返す。

残り3回用量の噴霧回数になるまで容器の捨て噴霧を行う。

上記と同様の手順で噴霧量測定を残り3回繰り返す。

溶液の定量噴霧式点鼻液剤は、適当であれば、すなわち、噴霧された有効成分量と容器の質量の変化に相関があれば、噴霧量の均一性の試験を質量の均一性の試験で置き換えることができる。上記の手順の噴霧において、各ステップで噴霧前と噴霧後に容器の質量を測定しその差を計算することにより、噴霧量を求める。

1.1.3. 判定

噴霧量の均一性は、噴霧量10個の平均値と個々の噴霧量を用いて判定する。点鼻剤に求められる噴霧量均一性の許容幅は、有効成分や含量、噴霧量、剤形などにより異なるため、製剤ごとに適切な範囲を設定する。

1.2 定量噴霧式点鼻粉末剤

1.2.1. 装置

薬物捕集装置は噴霧する薬物を定量的に捕集可能な装置を用いる。噴霧方向（垂直か傾いているか）、容器と装置の接続、サンプリング効率、空気流路システムの必要性、捕集装置の通気口及び噴霧方法は最低限考慮すべき事項である。

1.2.2. 手順

別に規定するもののほか、以下の手順により容器1個に対して、使用開始時の3回、中間期の4回、使用終了時の3回、合計10回の噴霧量測定を実施する。

点鼻剤の使用方に特に記載がなければ、最初の1回空噴霧を行う。その後、容器を装置に取り付ける。最小の1回用量に対応する噴霧回数に達するまで装置内に噴霧する。装置への捕集物を回収し、有効成分を定量し、噴霧量とする。

この手順で同じ容器を用いて更に噴霧量測定を2回繰り返す。

残り $(n/2)+1$ の噴霧回数になるまで、容器の捨て噴霧を行う。 n は表示されている噴霧可能回数である。上記と同様の手順で噴霧量測定を4回繰り返す。

残り3回用量の噴霧回数になるまで容器の捨て噴霧を行う。

上記と同様の手順で噴霧量測定を残り3回繰り返す。

1.2.3. 判定

噴霧量の均一性は、噴霧量10個の平均値と個々の噴霧量を用いて判定する。点鼻剤に求められる噴霧量均一性の許容幅は、有効成分や含量、噴霧量、剤形などにより異なるため、製剤ごとに適切な範囲を設定する。

2. 容器間の噴霧量の均一性の評価

容器間試験は、単回投与及び複数回投与の点鼻剤の容器に適用される。適切な装置、試験方法及び判定方法は、1.容器内の噴霧量の均一性の評価の項に示す。

適切なサンプリング手順の例として、10個の容器をとり、各容器から最初の用量を捕集し、噴霧量を得る方法がある。

正当な理由があれば、容器内及び容器間を同時に評価するサンプリング手順又はその他の試験を設定することも可能である。

溶液の定量噴霧式点鼻液剤は、適当であれば、すなわち、噴霧された有効成分量と容器の質量の変化に相関があれば、噴霧量の均一性の試験を質量の均一性の試験で置き換えることができる。

1 錠剤硬度測定法 (G6-4-180)

本参考情報は、錠剤硬度測定の実験・種類・装置構成や考慮すべき点をまとめたものである。結果は摩損度など錠剤の強度に関する他の情報と併せて、製造工程から使用までの衝撃や圧迫などのストレスに対する錠剤の機械的強度の確保などに用いられる。

測定は通例、錠剤を2枚の加圧板に挟み、一方の加圧板を一定速度で動かして錠剤が破壊される直前の力(N)を得る。錠剤硬度の値は、用いる装置により、圧縮負荷で錠剤断面中に破断が起こる破断強度(breaking strength)、実質的な破壊により構造を失う破壊強度(crushing strength)のいずれかあるいは両方を反映する。破断を経て外観上の破壊を起こす場合もある。なお、本測定により得られる錠剤硬度は、材料科学などの分野で一般に用いられる硬度の定義(小さなプローブによる貫通や押込みに対する表面の抵抗)とは合致しない。

測定には、錠剤を保持する部分の構造、加圧板の移動機構、力の測定方法などが異なる複数の硬度計が用いられる。手動式又は比較的単純な構造の硬度計として、ばねとねじにより圧子で錠剤を圧縮するMonsanto (Stokes)型錠剤硬度計、プライヤー(plier)で錠剤に圧力をかけるPfizer型錠剤硬度計、圧搾空気により錠剤に荷重を負荷するStrong Cobb型硬度計、電動錘荷重により圧子で錠剤に荷重を負荷するErweka型錠剤硬度計がある。また硬度を測定する過程を自動化し、多様な測定方法への対応と、データ補正機能などを持つ測定装置も用いられる。

錠剤硬度の測定には、試料となる錠剤の形状や大きさ、向きと共に機器の構造と測定条件が影響を与える。そのため結果と共に測定機器や条件の記録が重要となる。データの直接比較には、同じ条件での測定が必要となる。測定の際には、下記のポイントについても考慮する。

(i) 加圧板：錠剤への接触面が滑らかで実際に錠剤が接触する面積より大きい2枚の加圧板を平行にして用いる。加圧板の移動により負荷をかける間、錠剤が曲げやねじれによる変位を受けないようにする。

(ii) 荷重負荷速度：測定は加圧板による圧縮力の負荷速度(荷重負荷速度)を一定に保持する機構を有する装置を用いる。若しくは加圧板の移動速度を一定に保持する装置を用い、錠剤との接触直前より低速で移動させることにより荷重負荷速度の変動を抑制して測定する。加圧板の高速移動は短時間の測定を可能とする一方で、荷重負荷速度の変動による制御不能な破砕や急激な圧縮荷重の蓄積の原因となる。

(iii) 装置の測定単位と校正：測定には測定単位が1N以下で精度を校正した装置を一貫して用いる。

(iv) 測定装置の変更：装置により圧縮力の負荷方法や力の測定方法などの機構が異なるため、類似の機構を持つ装置への変更が望ましい。変更時には装置の機構について考察すると共に、同ロットの錠剤などを試料としたデータを荷重負荷速度や加圧板移動速度など測定パラメーターと合わせて比較し、変更によるリスクを管理する。

(v) 錠剤の向き：割線のない円形の錠剤は通例、錠剤の直径に対しての圧縮が可能となるよう2枚の加圧板間に置き測定す

る。割線入り錠剤の場合、割線が加圧板と垂直あるいは平行になるように錠剤を置き測定する。異形錠や複雑な形状の錠剤では容易に再現性のとれる向きでの測定が望ましく、直径あるいは長径に並行に荷重をかける場合が多い。

(vi) 単位：錠剤硬度の単位として、Nと共に、kgf、kpあるいはStrong Cobb Unit (SCU)などが用いられる。

(vii) 試料数：工程管理では錠剤硬度の平均値と共に、測定値のばらつきが重要な情報となる。そのため試料数は測定目的に応じた統計的に適切な数とする。通例6試料以上について測定するが、10試料を用いることが多い。

1 錠剤の摩損度試験法〈G6-5-181〉

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 三薬局方の調和合意に関する情報については、独立行政法人医薬品医
 4 療機器総合機構のウェブサイトに掲載している。

5 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
 6 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
 7 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
 8 ど他の物理的強度の試験を補足するものである。

9 装置

10 内径283.0～291.0 mm、深さ36.0～40.0 mmの内面が滑ら
 11 かな透明な合成樹脂製で、静電気をおびにくいドラムを用いる
 12 (典型的な装置については図参照)。ドラムの一方の側面は取り
 13 外しができる。錠剤はドラムの中央から外壁まで伸びている内
 14 側半径75.5～85.5 mmの湾曲した仕切り板に沿ってドラムの
 15 回転ごとに転がり落ちる。中心軸リング部の外径は24.5～
 16 25.5 mmとする。ドラムは、24～26 rpmで回転する装置の水
 17 平軸に取り付けられる。したがって、錠剤は各回転ごとに転が
 18 り若しくは滑ってドラム壁に又は他の錠剤の上に落ちる。

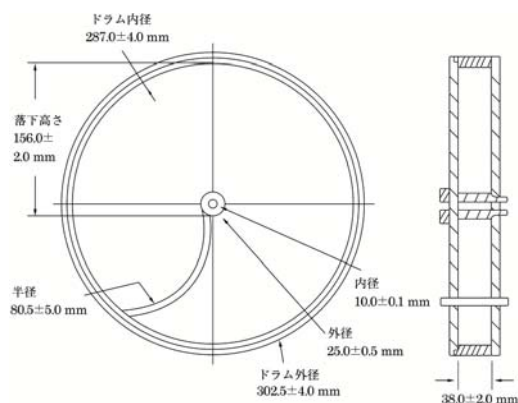


図1 錠剤の摩損度試験装置

21 操作法

22 1錠の質量が650 mg以下のときは、6.5 gにできるだけ近い量
 23 に相当する n 錠を試料とする。1錠の質量が650 mgを超えると
 24 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
 25 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
 26 れる。ドラムを24～26 rpmで100回転させた後、錠剤を取り
 27 出す。試験開始前と同様に錠剤に付着した粉末を取り除いた後、
 28 質量を精密に量る。

29 通常、試験は一回行う。試験後の錠剤試料に明らかにひび、
 30 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
 31 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
 32 が目標値より大きいときは、更に試験を二回繰り返す。三回の
 33 試験結果の平均値を求める。多くの製品において、一回の試験
 34 又は三回の試験の平均として得られる質量減少は、1.0%以下
 35 であることが望ましい。発泡錠やチュアブル錠の摩損度規格は
 36 この範囲を超えることがある。

37 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、

38 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
 39 を妨げることをしないよう、水平面とドラムの装置下台との角度
 40 が約10°になるよう装置を調整する。

41 吸湿性の錠剤の場合の試験は、適切な湿度の雰囲気下で行う
 42 必要がある。

43 多くの試料を同時に試験できるように設計された、仕切り板を
 44 二つ持ったドラムや二つ以上のドラムを備えた装置を利用して
 45 もよい。

1 胃腸薬のpH試験法〈G6-6-131〉

胃腸薬のpH試験法は、制酸の効果を標榜する胃腸薬を0.1 mol/L塩酸の一定量中で一定時間かき混ぜ、この液のpHを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られるpH値で示す。

1. 試料の調製

固体製剤で製剤総則散剤の規定に適合するものは、そのまま試料とする。ただし、分包されているものは、その20包以上を取り、その内容物の質量を精密に量り、1回服用量当たりの内容物の平均質量を算出し、均一に混合して試料とする。固体製剤で製剤総則散剤の規定に適合しないもので、分包されている顆粒剤などは、その20包以上を取り、その内容物の質量を精密に量り、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回服用量以上を取り、粉末とし、試料とする。カプセル剤、錠剤などは、その20回服用量以上を取り、その質量を精密に量り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した後、粉末とし、試料とする。

液体製剤は、よく振り混ぜ、試料とする。

2. 操作法

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

1 中心静脈栄養剤中の微量アルミニウム試験法 (G6-7-160)

中心静脈栄養剤(TPN)は、静脈注射用の栄養剤である。一方、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、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HPLC法)、誘導結合プラズマ蛍光分析法(ICP-AES法)及び誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS法)が利用できる。蛍光検出HPLC法の検出感度は、約1 µg/L (ppb)であるが、特別な付属装置を用いたICP-AES法及びICP-MS法を用いる場合、更に高い検出感度を得ることができる。

TPNは栄養剤であることから、糖類、アミノ酸類、電解質など、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、それぞれの分析法の採用にあたっては、特別な注意が必要となる。

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)について記載する。

1. キノリノール錯体法

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、液体クロマトグラフィーの蛍光誘導体法により試験を行う。

1.1. 試料溶液の調製

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

1.2. 検量線作成用標準溶液系列の調製

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

1.3. 標準的試験法

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

試験条件

検出器：蛍光光度計(励起波長：380 nm, 蛍光波長：520 nm)
 カラム：内径4.6 mm, 長さ15 cmのステンレス管に5 µmの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を充填する。
 カラム温度：40℃付近の一定温度
 移動相：8-キノリノールのアセトニトリル溶液(3→100)／薄めた0.5 mol/L酢酸アンモニウム試液(2→5)混液(1：1)
 流量：アルミニウム／キノリノール錯体のピークの保持時間が約9分になるように調整する。
 システム適合性

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関係数は0.99以上である。

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ない方法もある。

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波長が異なることから(励起波長：370 nm, 蛍光波長：504 nm)測定感度にも差異がみられ、検量線の作成は0～25 ppb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要がある。

2. ルモガリオン錯体法

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、液体クロマトグラフィーの蛍光誘導体法により試験を行う。

2.1. 試料溶液の調製

試料(TPN製剤) 70 µLを正確に量り、ルモガリオン塩酸溶液0.15 mLを正確に加えた後、アルミニウム試験用pH緩衝液0.6 mLを正確に加えて混合する。この液を40℃で4時間放置した後、試料溶液とする。

2.2. 検量線作成用標準溶液系列の調製

アルミニウム標準溶液(1)～(5)の各標準溶液1 mLずつを正確に量り、それぞれ薄めたアルミニウム試験用硝酸(1→100)を加えて正確に100 mLとする。これらの液70 µLずつを正確に量り、それぞれルモガリオン塩酸溶液0.15 mL及びpH 7.2のアルミニウム試験用緩衝液0.6 mLを正確に加えて混合した後、40℃で4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, 1.07, 2.13, 4.27及び8.54 ppb)を調製する。

2.3. 標準的試験法

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

試験条件

検出器：蛍光光度計(励起波長：505 nm, 蛍光波長：574 nm)
 カラム：内径6.0 mm, 長さ10 cmのステンレス管に5 µmの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を充填する。
 カラム温度：40℃付近の一定温度
 移動相：2-プロパノール100 mLに薄めたpH 5.0の1 mol/L酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液(1→10)を加えて1000 mLとする。
 流量：アルミニウム／ルモガリオン錯体のピークの保持時間が約5分になるように調整する。

システム適合性

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関係数は0.99以上である。

3. 注意事項

(i) 試験で使用する水及びその他の試験用溶媒、試薬、器具などにつき、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

- る。
- (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おく必要がある。
- (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ができる。
4. 標準溶液及び試薬・試液
- 本試験には、日本薬局方に規定するもののほか、以下の標準溶液及び試薬・試液を用いる。
- (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硝酸(1→100)を用いて希釈し、アルミニウム濃度0, 1.25, 2.5, 5.0及び10 ppmのアルミニウム標準溶液(1)～(5)を調製する。
- (ii) アルミニウム試験用水 アルミニウム濃度1 ppb以下の水を用いる。
- (iii) アルミニウム試験用硝酸：硝酸。ただし、アルミニウム濃度1 ppb以下のものを用いる。
- (iv) アルミニウム試験用緩衝液、pH 7.2：*N,N*-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸106.6 gをアルミニウム試験用水800 mLに溶かした後、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シドを加えてpHを7.2に調整し、アルミニウム試験用水を加えて1000 mLとする。
- (v) *N,N*-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸： $C_6H_{15}NO_5S$ 白色の結晶又は粉末である。
- (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シド溶液： $(CH_3)_4NOH$ アルミニウム試験用に製した約25%水溶液。ただし、アルミニウム濃度10 ppb以下のものを用いる。
- (vii) ルモガリオン塩酸溶液：ルモガリオン0.86 gを2-プロパノール300 mLに溶かし、薄めたアルミニウム試験用塩酸(9→50) 350 mL及びアルミニウム試験用水を加えて正確に1000 mLとする。
- (viii) ルモガリオン： $C_{12}H_9ClN_2O_6S$ 赤褐色～暗褐色の粉末である。ただし、アルミニウム濃度1 ppm以下のものを用いる。
- (ix) アルミニウム試験用塩酸：塩酸。ただし、アルミニウム濃度1 ppb以下のものを用いる。

1 G7. 容器・包装関連

2 ガラス製医薬品容器〈G7-1-171〉

ガラス製医薬品容器は、錠剤、カプセル剤等の経口固形剤においてはパラ包装に使用する気密容器又は密閉容器としてガラス瓶が、注射剤等の密封容器としてアンプル、バイアル若しくはガラス製シリンジが汎用されている。

医薬品の一次包装として使用するガラス製医薬品容器は、強度があり、透明性が高く、通気性又は透湿性がないことに加え、化学的耐久性が高いなどの特徴を持つ。一方、質量が重くかさばることに加え、脆く製造時又は輸送時の物理的な衝撃により破損しやすいことなど取扱いに注意を要する面もある。

本参考情報は、ガラス製医薬品容器に関する基本情報、製剤の設計段階におけるガラス製医薬品容器の選択とそれに伴う品質評価を的確に実施するために確認すべき事項、及び製剤の製造段階における品質管理に関する情報を提供するものである。

1. ガラス製医薬品容器に関する基本情報

ガラス製医薬品容器は、物理的又は化学的に作用して内容医薬品の性状又は品質に影響を与えないものであり、特に注射剤用ガラス製医薬品容器は、完全に融封できるか、又は他の適切な方法によって微生物が侵入しないようにし、内容医薬品を保護できるものである。

有効期間にわたって内容医薬品の品質を保証するためには、適切なガラス製医薬品容器を選択する必要がある。容器を選択するに当たっては、内容医薬品が固体であるか液体であるかなど物理化学的な状態を考慮すること、内容医薬品の化学的安定性を確保するために、密閉容器、気密容器、密封容器若しくは着色容器などの選択を考慮すること、更に、製剤処方との相互作用により異物の発生が想定される場合は、容器内表面に表面処理を施すことなどを考慮する必要がある。

1.1. ガラス組成と成形

医薬品の一次包装に使われるガラス製医薬品容器のガラス組成は、ほうけい酸塩ガラス(Borosilicate glass)又はソーダ石灰ガラス(Sodalime glass)である。

ほうけい酸塩ガラスは、二酸化ケイ素(シリカ: SiO_2)、無水ホウ酸(B_2O_3)によって網目状構造が形成されているガラスである。ほうけい酸塩ガラスは熱膨張率が小さく比較的硬く耐水性が高い¹⁾。なお、本組成の容器は、米国薬局方及び欧州薬局方においては、Type I glassに分類される。

ほうけい酸塩ガラスを用いたガラス製医薬品容器は、円筒状の長い生地管を切断し、二次加工することによりアンプル、管瓶(バイアル)若しくはシリンジとして成形され、小容量の注射液又は凍結乾燥製剤の容器として用いられることが多い。

ソーダ石灰ガラスは、二酸化ケイ素(シリカ: SiO_2)、酸化ナトリウム(Na_2O)、酸化カルシウム(CaO)を主成分とするガラスである。耐水性が低いとの欠点があるが製造及び加工が容易である¹⁾。なお、本組成の容器は、米国薬局方及び欧州薬局方においては、Type II 及び III glassに分類される。

ソーダ石灰ガラスを用いたガラス製医薬品容器は、溶融させたガラスを型に流し空気を吹き込むことにより成形するため吹製瓶といわれるが、型瓶と称することもあり、また、安価に大量生産されるため規格瓶又は自動瓶と称することもある。経口

固形剤用のガラス瓶等に広く用いられるほか、注射剤の容器としては輸液剤等に用いる大容量バイアル若しくは抗生物質等の粉末注射剤用のバイアルとして用いられる。

1.2. ガラス製医薬品容器内表面の表面処理

ガラス製医薬品容器の内表面の性質を改質するために表面処理が行われる。これらには、脱アルカリ処理、コーティングなどがある。

脱アルカリ処理とは、例えば、ガラス転移点付近の温度において、硫黄化合物をガラス表面で反応させ、表面層のアルカリ成分を中和、選択的に抽出除去して、シリカに富む表面を露出させる方法をいう。この処理により、アルカリ成分の溶出を減少させる効果がある。コーティングには、シリカ(SiO_2)、シリコーン樹脂、フッ素樹脂などを用いた方法がある。

シリカ加工とは、ガラス内表面にシリカ(SiO_2)を高温で溶融コーティングし、内表面にシリカの薄膜を形成させる方法をいう。この薄膜は高純度のシリカであり、アルカリなどの水溶性成分を含まず、ガラス容器の内表面と溶着しており、薬液がガラス内表面に直接接触しなくなるため、ガラス成分の溶出を抑制し、かつフレークスの発生の抑制が期待できる。

シリコーン加工とは、通常ジメチルポリシロキサン溶液に浸漬、焼付け処理を行うことによりガラス表面にシリコーン樹脂の薄膜を形成させる方法をいう。この処理によりはつ水性を高め、ガラス内表面への薬液の残留を防ぐ、また、薬液がガラス内表面に直接接触しなくなるため、ガラス成分の溶出を抑制し、かつフレークスの発生の抑制が期待できる。

フッ素樹脂加工とは、カップリング剤を用いてフッ素樹脂を塗布、焼付け処理を行い、内表面にフッ素樹脂の薄膜を形成させる方法をいう。この処理により、はつ水性を高め、ガラス内表面への薬液の残留を防ぐ、また、薬液がガラス内表面に直接接触しなくなるため、ガラス成分の溶出を抑制し、かつフレークスの発生の抑制が期待できる。

2. 製剤の設計段階におけるガラス製医薬品容器の品質評価

製剤の設計段階において、使用するガラス製医薬品容器及びガラス製医薬品容器と内容医薬品の適合性について、品質評価を実施する必要がある。

個々のガラス製医薬品容器はその特有の性質を持ち、ガラス製医薬品容器に充填される医薬品の性質も様々であるので、ガラス製医薬品容器の適合性は両者の組合せの中で判断されるべきである。

評価に当たっては、製剤総則[2]製剤包装通則、参考情報「医薬品包装における基本的要件と用語〈G0-5-170〉」、「プラスチック製医薬品容器及び輸液用ゴム栓の容器設計における一般的な考え方と求められる要件〈G7-2-162〉」を参照し、製剤に用いるガラス製医薬品容器が基本的要件、すなわち、設計仕様に適合するか否かを試験や学術文献などに基づいて検証すべきである^{2,3)}。また、その適合性は適切な品質保証計画に基づいて維持されなければならない。

2.1. 栓体付きガラス製医薬品容器

栓体付きガラス製医薬品容器とは、例えば、経口固形製剤の場合は、ガラス瓶とパッキン付き樹脂キャップやコンパウンド付き金属キャップの組み合わせであり、凍結乾燥注射剤の場合は、バイアルとゴム栓である。また、シリンジ製剤の場合は、ガラス製外筒(パレル、一部は針付き)とガスケット及びトップキャップの組合せとなる。

106 酸化されやすい医薬品の場合には、酸素を透過しやすい栓体
107 材料を選択することは不適切であり、また、水溶液医薬品や吸
108 湿性がある医薬品の場合には、水蒸気が透過しやすい栓体材料
109 を選択することは不適切である。栓体は、内容医薬品によって
110 変形したり、劣化したり、変質したりしてはならない。また、
111 貯蔵・運搬時に考えられる高温又は低温、若しくはその繰り返
112 し、また、運搬時の振動により、許容できないような容器の機
113 能の低下をきたしてはならない。分割使用する栓体付きガラス
114 製医薬品容器は、開封後の適切な安定性を保持することが求め
115 られる。

116 栓体とガラス製医薬品容器等との適合性(嵌合性)は適切な品
117 質保証計画に基づいて維持されなければならない。

118 2.2. ガラス製医薬品容器の透明性とガラス製着色容器

119 異物や濁りの有無を目視によって検査する必要がある注射剤
120 等の医薬品の場合は、ガラス製医薬品容器には検査可能なレベ
121 ルの透明性が必要である。

122 一方、ガラス製医薬品容器は透明性が高いため、光に不安定
123 な医薬品の場合は、保存中に内容医薬品の品質が低下してはな
124 らない。光安定性確保のためには一定の遮光性が必要であり、
125 ガラス製着色容器を選択することも考慮しなければならない。

126 注射剤において、ガラス製着色容器を使用する際は、注射剤
127 用ガラス容器試験法〈7.01〉の着色容器の遮光性試験に適合す
128 る必要がある。

129 2.3. 無菌を要求される医薬品のガラス製医薬品容器

130 注射剤の一次包装としてガラス製医薬品容器(アンプル)又は
131 栓体付きガラス製医薬品容器(バイアル、シリンジ)を選択する
132 に当たっては、添加された物質などを含めてガラス製医薬品容
133 器の製造過程に関する情報を得ることが望ましい。

134 最終滅菌を必要とする医薬品にあつては、ガラス製医薬品容
135 器の基本的要件は滅菌後にも満たされる必要がある。滅菌後に、
136 一定以上の新たな毒性物質の残留や生成があつてはならない。

137 また、ガラス製医薬品容器の構造及び材質は、滅菌後の貯蔵・
138 運搬時にあつて内容医薬品の微生物汚染を招くものであつては
139 ならない。

140 2.4. 注射剤のガラス製医薬品容器由来の異物

141 注射剤に使用するガラス製医薬品容器では、アンプルカット
142 時に発生混入するガラス片、ガラス内表面が剥離して発生する
143 フレークス、ガラス成分の溶出又はガラス内表面の汚れにより
144 発生する不溶性異物についても検討すべきである。

145 ガラス製医薬品容器からの溶出物又はフレークス等は安全性
146 の見地から十分に低くなければならない。またそれらが内容医
147 薬品の有効性と安定性を損なってはならない。

148 ガラス製医薬品容器由来の異物については、製剤の設計段階
149 で十分に評価する必要がある。ガラス製医薬品容器の成形工程
150 や購入先を変更した場合も同様である。

151 ガラス製医薬品容器由来のフレークス、反応生成物である煙
152 霧状異物等の無機異物の解析には、走査型電子顕微鏡・エネ
153 ルギー分散型X線分光法(SEM-EDX)が有用である。

154 3. 管理単位ごとに保存する試験成績

155 ガラス製医薬品容器の製造段階においては、少なくとも以下
156 の試験項目について規格値を設定し、ガラス製医薬品容器の管
157 理単位ごとに試験成績を保管すべきである。

158 1) 経口固形剤等に用いるガラス瓶：

159 (i) 外観⁴⁾：形状及び寸法が正しく、使用上支障となる肉回

160 り不良、色調不良、割れ、かけ、ひび、びり、きず、気泡、異
161 物、脈理、すじ、形はだ、ばり、汚れ及び不溶解物があつては
162 ならない。

163 (ii) 品質試験⁴⁾：アルカリ溶出試験、耐熱度、ひずみ

164 (iii) その他：必要な事項

165 2) 注射剤等に用いるアンプル又はバイアル：

166 (i) 外観：形状及び寸法が正しく、使用上支障となる肉回り
167 不良、色調不良、割れ、かけ、ひび、びり、きず、異物、脈理、
168 すじ、汚れ及び不溶解物があつてはならない。

169 (ii) 品質試験：注射剤用ガラス容器試験法〈7.01〉に規定する
170 試験の他、耐熱度(ソーダ石灰ガラス製のみの)、ひずみ

171 (iii) その他：必要な事項

172 4. 参考資料

173 1) JIS R 1600：2011, ファインセラミックス関連用語。

174 2) US Pharmacopeia 40 (2017), <660> Containers-Glass.

175 3) US Pharmacopeia 40 (2017), <1660> Evaluation of the
176 Inner Surface Durability of Glass Containers.

177 4) JIS R 3522：1995, ガラス製薬品びん。

1 プラスチック製医薬品容器及び輸液用ゴム栓の容器設計における一般的な考え方と求められる要件 (G7-2-162)

本参考情報では、プラスチック製医薬品容器及び輸液用ゴム栓において求められる基本要件、設計段階における毒性評価の方法について記載する。

医薬品に用いられる容器は、医薬品の有効性と安全性、安定性を損なうものであってはならない。

容器の適合性は個別の材質と医薬品の組合せの中で判断されるべきである。この判断は、試作した容器が基本要件、すなわち、設計仕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計画に基づいて維持されなければならない。容器の選択に当たっては、製造時に添加された物質に関する情報などを含む容器の製造過程に関する全ての情報を得ることが望ましい。

1. 設計における一般的要件

容器は、保存中に医薬品の品質を低下させてはならない。医薬品が容器の表面に吸着したり、容器材料内部に移行したりして、医薬品濃度が一定以上変動してはならない。また、容器材料との相互作用によって医薬品が変質してはならない。

容器は、医薬品によって変形したり、劣化したり、変質したりしてはならない。また、貯蔵・運搬時の温度変化により、許容できないような容器の変形等により、本来の機能の低下をきたしてはならない。

容器からの溶出物又は移行物が医薬品の有効性と安定性を損なってはならない。また、容器から医薬品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全性の見地から十分に低くなければならない。

滅菌を必要とする医薬品にあっては、容器の品質が滅菌前後に変化する可能性があれば、上記の容器の基本要件は滅菌後に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の残留や生成があってはならない。また、容器の構造及び材質は、滅菌後の貯蔵・運搬時にあって医薬品の微生物汚染を防ぐものでなければならない。

1.1. プラスチック製医薬品容器

プラスチック製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でなければならない。材料組成を保証できないようリサイクル・プラスチックは使用してはならない。

光に不安定な医薬品の場合には、保存中に医薬品の品質が低下しないように、必要に応じて容器に一定の遮光性が必要である。また、酸化されやすい医薬品の場合には、酸素を透過しやすい容器材料は不適切である。水溶液医薬品や乾燥を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過性に同様の注意が必要である。

また、材料プラスチックは、容器の用途に見合ったレベルの硬さや柔軟性、耐衝撃性、引っ張り強度、引き裂き強度、曲げ強度、耐熱性などの物理的性質を備える必要がある。さらに、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の

場合には、プラスチック製容器においても必要なレベルの透明性が必要である。

また、プラスチック製容器の導入に当たっては、適切な廃棄処理を考慮することが望ましい。

1.2. 輸液用ゴム栓

ゴム栓には、アレルギーを惹起する恐れのある天然ゴムや材料組成を保証できないようリサイクル材料を使用してはならない。また、容器の栓として、必要に応じて、酸素、水蒸気、溶媒を通さない適切な材料を使用する。

さらに、ゴム栓は、その用途に見合ったレベルの密閉・密封性、針刺し針抜け性、強度(耐コアリング性)など、また、針刺し後の自己密閉性などの物理的機能を備える必要がある。

2. 容器の設計段階における毒性評価

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基準を設定する。また、その根拠を明らかにすることが望ましい。試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。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(ラミネート、コンポジットなど)の場合は1種類の材料とみなすが、できるだけ医薬品が接する面が抽出液などによく接するように工夫して試験することが望ましい。

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目及び試験方法は、「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」(平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知)に従って設定すること。

3. プラスチック製医薬品容器及び輸液用ゴム栓において管理単位ごとに保管する試験成績

3.1. プラスチック製医薬品容器

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験成績を保管する。また、規格値の設定の根拠を示すことが望ましい。ただし、液状以外の内用剤には適用しない。

(i) 灰化試験：強熱残分、重金属。必要がある場合は特定の金属含量(鉛、カドミウムなど)

(ii) 溶出物試験：pH、紫外吸収スペクトル、過マンガン酸カリウム還元性物質、泡立ち、蒸発残留物

(iii) 細胞毒性試験

(iv) その他：必要な事項

3.2. 輸液用ゴム栓

ゴム栓の製造においては、少なくとも輸液用ゴム栓試験法〈7.03〉の試験項目のほか、管理すべき試験項目について規格値を設定し、輸液用ゴム栓の管理単位ごとに試験成績を保管する。また、規格値の設定の根拠を示すことが望ましい。

1 固形製剤のブリスター包装の水蒸気透過性試験法〈G7-3-171〉

本試験法は、PTP包装に代表されるブリスター包装の水分透過速度を測定する方法であり、製剤の包装を通した吸湿性の評価を目的に、次のような検討を行う際に利用できる。

(i) 開発段階において、プラスチックシートの材質、厚さ、ポケット成形条件、ポケットの大きさなどをスクリーニングする。

(ii) 開発段階及び生産段階において、プラスチックシートの材質、厚さ、ポケット成形条件、ポケットの大きさなどを変更する際に、変更前後の水分透過速度を比較する。

ただし、ポケットが微小で吸湿剤の充填量が微量となる場合には、信頼性のある結果が得られないことがあるため注意を要する。また、本試験法は、正常に作製されたブリスター包装の水分透過速度を求める方法であり、ピンホールなどによる漏れを検出する方法ではない。

1. 用語

(i) 成形材：ポケット及びシール面を形成する材料。通常、単層、複層又はアルミ箔をラミネートした複層のプラスチックシートが使用される。

(ii) 蓋材：製剤収容後のポケットを密閉するためにシールされる材料。通常、アルミ箔が使用される。

(iii) ポケット：製剤を収容するために成形材を凸状に膨らませた部分。

(iv) 水分透過速度：ブリスター包装のポケット内に単位時間あたりに侵入する水分の量(mg/日/ポケット)。

2. 装置

(i) 恒温恒湿装置：保存条件の温度及び湿度を保持できる装置。

(ii) 天秤：化学はかり。

3. 吸湿剤

吸湿剤は、次の中から選択する。

(i) 塩化カルシウム、水分測定用

使用時の前処理：微粉を入れないように注意しながら、本品を浅い容器にとり、110℃で1時間乾燥後、デシケーター[酸化リン(V)]中で放冷する。

(ii) 合成ゼオライト、乾燥用

水分吸着能：15%以上。本品約10 gを精密に量り、40℃、相対湿度75%RHで24時間放置した後、質量を量り、試料に対する増量を求める。

使用時の前処理：本品を浅い容器にとり、350 ～ 600℃で2時間乾燥後、デシケーター[酸化リン(V)]中で放冷する。

4. 試料

4.1. 試料の作製

吸湿剤の充填量は、ポケットの形状や大きさによって適宜決定するものとするが、蓋材を変形、損傷させない範囲でポケット容量の8割程度の量とする。試料作製に当たっては、吸湿剤の吸湿に十分留意する。全ポケットに吸湿剤をできるだけ均等に充填し、蓋材をシールした後、適当な大きさに裁断する。別に同程度の質量のガラスビーズを充填した対照を同様に作製す

る。可能な限り、試料と対照は同一の形状及び大きさとする。

作製した試料及び対照の外観を肉眼、実体顕微鏡などで検査する。ポケットは所定の形状を保持しており、成形不良、蓋材の異常なしわ、ピンホール、シール不良などがないものを使用する。

4.2. 試料数

試料数は、シート当たりのポケット数が10以上のものにあつては5 ～ 10シートとし、シート当たりのポケット数が10未満のものにあつては、シート当たりのポケット数を勘案し20 ～ 100ポケットに相当するシート(ただし、10シートを下回らない)とする。対照は試料と同数が望ましく、少なくとも2シートとする。

5. 方法

5.1. 保存条件

保存条件は、次の中から選択することが望ましいが、他の保存条件で試験を行うこともできる。

(i) 25±2℃/60±5%RH

(ii) 40±2℃/75±5%RH

5.2. 保存

試料及び対照を恒温恒湿装置内に入れる。このとき、試料及び対照を重ねたり立てたりせず、ポケット面を上面とし、空気が循環できるように遮蔽物がないとともに、吹出し口からの気流が直接当たらないように注意する。

5.3. 質量測定

恒温恒湿装置から試料及び対照を取り出して室温まで戻し、速やかに各シートの質量を測定して恒温恒湿装置に戻す。0.1 mgの桁まで正確に量る。

5.4. 測定間隔

測定間隔は、水分透過速度の大小により適宜調整するとともに、恒温恒湿装置内の環境維持を考慮して設定する(例えば、開始時、1日後、3日後、7日後、14日後、21日後及び28日後)。

5.5. 測定の終了

各測定時点で、試料及び対照の各シートの質量を測定し、各測定時点での試料と対照の平均値の差(試料の質量の増加量)を求める。縦軸に試料の質量の増加量(mg)、横軸に時間(日)をとり、最小二乗法により直線回帰式を求める。少なくとも連続する3時点(開始時を除く)の増加量が直線性を示し、かつ、充填した吸湿剤の質量に対して10%吸湿するまでに測定を終了する。なお、直線性は相関係数が0.98以上あることが望ましい。

5.6. その他

質量測定の結果、他の試料と比較して極端に大きな質量増加を示す試料があった場合は、ピンホールなどに由来しているおそれがあるので、その試料は試験から除外する。必要に応じて、適切な統計的検定を実施する。

6. 水分透過速度の算出

最小二乗法により求めた勾配すなわち質量増加量(mg/日)をシート当たりのポケット数で除し、得られた値を水分透過速度(mg/日/ポケット)とする。水分透過速度は、保存条件及び使用した吸湿剤の名称とともに記録する。

7. 参考

7.1. ポケットの水分透過速度に影響を及ぼす要因

次のようなものが挙げられる。

(i) 成形材の材質(分子構造、密度、結晶化度など)、材質構成、厚さ

- 105 (ii) ポケット成形条件, 成形方法
- 106 (iii) ポケットの大きさ, 肉厚の均一性
- 107 (iv) 保存条件, ポケット内水分活性

108 7.2. ポケットの肉厚測定

109 必要に応じて, 精度1 μm 以上のマイクロメーター若しくは
110 ダイヤルゲージ又は同等の精度を有する測定器を使用し, 別途
111 採取した成形シートの10ポケット以上について天面, 側面, R
112 部のうち少なくとも1点の肉厚を1 μm 単位まで測定する. ポケッ
113 ト成形条件の検討時にあらかじめ複数の部位を測定して肉厚が
114 最も薄くなりやすい部位を特定しておき, 測定時の加圧に留意
115 しつつその部位の肉厚を測定することが望ましいが, ポケット
116 形状や測定の難易度を考慮して測定部位を選定する.

117 8. 参考資料

- 118 1) 大久保恒夫ら, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス,
119 45, 155-165 (2014).

1 無菌医薬品の包装完全性の評価 (G7-4-190)

1. まえがき

無菌医薬品の包装完全性は、無菌製剤の包装が製剤品質を維持するのに必要な微生物の侵入及び物質の出入りを防止する能力である。

本参考情報は、製剤の保護の観点から、品質に影響を及ぼす微生物、反応性ガス及び他の物質からのバリア機能を有することが求められる無菌医薬品の一次包装又は場合によって二次包装について、包装完全性を評価するために用いられる。不適切な設計によって、又は製剤の製造工程若しくは有効期間までの保存中における何らかの異常によって生じた予期しない漏れにより、この包装の目的としているバリア性を保てず、その結果、製剤の無菌性を始めた品質を維持できない場合、それは包装欠陥となる。

包装完全性試験の適用は、製剤の開発から始まり、上市後の製品安定性プログラムを通して、その製品ライフサイクル中、継続するものである。

2. 包装完全性と試験

2.1. 包装完全性の考え方

無菌医薬品の包装完全性は、製品の品質を使用時まで保証するために必要である。無菌医薬品の一次包装は、外部からの微生物の侵入がないことを保証する必要がある。加えて、水蒸気や酸素などのガスが一次包装内外を移動することにより製剤品質に影響を及ぼす場合、一次包装でガスの移動量を管理するか、又は二次包装も含めた複数の包材の組み合わせにより、品質を維持する必要がある。

この際、ほとんどの包装は、その種類によりガスの漏れと透過が存在することに留意する必要がある。多くの場合、適格な包装に対して漏れと透過とを区別することは困難である。そのため、完全な包装とは、個々の製剤包装の最大許容漏れ限度に適合することで微生物の侵入を防ぐと共に、ガス／その他の物質の侵入／移動による製剤の品質不良を防ぐものであり、その製剤が物理化学的及び微生物学的な規格に適合することをデータで結び付けて保証するべきものである。包装完全性試験には、物理化学的手法にてリークを見つける方法(漏れ試験)、包装のシール部分の適格性を確認することで、漏れが発生しないことを保証する方法(シール試験)、及び微生物学的手法にて微生物に対するバリア性を確認する方法(微生物チャレンジ試験)がある。無菌医薬品の包装完全性は、これらのいずれか又は複数の試験によって、保証される。

定量的漏れ試験の適用に当たっては、個々の製剤の包装が持つ特性に合わせた最適化が必要である。また設定する試験法の検出限界、正確性及び精度を把握しておくことが求められる。

2.1.1. 漏れ試験

物理化学的な手法により、漏れの生じるその孔若しくは経路を定性的に検出又は定量的に測定することによって、その包装の完全性を維持する能力を保証する試験である。漏れ試験は定性的漏れ試験及び定量的漏れ試験からなる。

定性的漏れ試験の結果は不確実性を伴っており、信頼できる結果を得るためには、大きなサンプルサイズと厳しい試験条件

管理を必要とする。定性的漏れ試験法は、有用なリークの検出手段であるが、決定的な包装完全性の検証として適していない。一方で、リーク箇所を正確に位置づけするためには有効な試験である。

定量的漏れ試験は、漏れに伴って生じる物理化学的な変化を定量的に評価する試験であり、最大許容漏れ限度を設定し管理するための客観的なデータが得られるものである。

主な定性的及び定量的漏れ試験法の例を下記に挙げる。目的によりその他の方法も用いられる。

〈定性的漏れ試験法〉

液没試験法

液体漏れ試験法

トレーサ液体試験法(染料浸透試験法)

スニッフ法(ヘリウム漏れ試験法1)

〈定量的漏れ試験法〉

密封チャンバー法(圧力変化漏れ試験法1)

真空度低下法(圧力変化漏れ試験法2)

加圧積分法(ヘリウム漏れ試験法2)

真空チャンバー法(ヘリウム漏れ試験法3)

浸漬法(ヘリウム漏れ試験法4)

高電圧リーク試験法(ピンホール試験法)

ヘッドスペースガス・レーザー分析法

2.1.2. シール試験

容器シール又は嵌合に関するパラメーターが妥当であることを確認し、包装の完全性を維持する能力を間接的に保証するための試験である。根拠に基づいて設定したシール試験の実施は、閉塞に必要な特性を継続的に把握し、包装完全性を保証するために有用である。シール試験法として示した例(表1)の他、各種の方法が用いられる。

2.1.3. 微生物チャレンジ試験

本試験は微生物(又は微生物胞子)を用いて包装の完全性を定性的に評価する微生物学的試験であり、微生物侵入阻止の直接証拠を求める場合に有用である。試験で評価される微生物侵入には、微生物の増殖又は運動による経路の通過と、液体を介する微生物の受動的輸送が含まれる。

本試験は、微生物侵入阻止の証拠となり得る適切な物理化学的漏れ試験法が確立されていない場合、又は最大許容漏れ限度が微生物の侵入の可否に依存している場合に効果的である。

本試験の一般的な実施事項は以下のとおりである。試験には適切に維持管理された微生物株を用いる。科学的に妥当な他の方法も用いることができる。

対象となる製剤の滅菌した一次包装内に無菌的に液体培地を入れたものを検体とする。容器の形態や製造方法により、無菌的に液体培地を入れることが難しい場合、包装欠陥の閉塞リスク及び滅菌作業時の汚染リスクに対する妥当な説明が可能であれば、液体培地を入れた後に検体の滅菌を行うことも可能である。この検体を適切な条件で培養した菌液に浸漬した後、適切な方法で培養し、培地の混濁の有無を適切な方法で確認する。推奨される試験条件を以下に記載する。試験菌の調製方法、使用する培地に関しては、微生物限度試験法 (4.05)、無菌試験法 (4.06)などを参照されたい。菌種に関してはリスクに応じて必要な菌種を選択する。

菌種：

Escherichia coli 例えば、ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP

105 53.126, NBRC 3972
 106 *Serratia marcescens* 例えば, ATCC 13880, NBRC 102204
 107 又はATCC 14756, NBRC 12648
 108 *Clostridium sporogenes* 例えば, ATCC 11437, NBRC
 109 14293, NCIMB 12343, CIP 100651又はATCC 19404,
 110 NCTC 532, CIP 79.3
 111 *Pseudomonas aeruginosa* 例えば, ATCC 9027, NCIMB
 112 8626, CIP 82.118, NBRC 13275
 113 *Staphylococcus epidermidis* 例えば, ATCC 12228,
 114 NBRC12993
 115 *Brevundimonas diminuta* 例えば, ATCC 19146, NBRC
 116 14213
 117 菌数: 1 mL当たり 10^5 CFU以上
 118 浸漬時間: 30分以上
 119 適切な包装欠陥を持つ陽性対照の使用により試験結果の妥当
 120 性を確認する。
 121 使用菌種に対して十分な培地性能を有する液体培地を用いる。
 122 培養時間: 7 ~ 14日
 123 その他, 以下の試験条件は試験結果に影響を与える可能性が
 124 あるため, 試験実施時に考慮する。
 125 液体培地組成と液体培地の表面張力
 126 浸漬時の差圧の設定
 127 **2.2. 製剤の開発と製造における包装完全性とその試験**
 128 無菌医薬品の包装完全性を確保するには, 製品ライフサイク
 129 ルのステージに応じた試験法の選択が重要となる。
 130 **2.2.1. 包装の設計**
 131 製剤の開発段階における包装設計では, 微生物の侵入による
 132 無菌性の破綻に加えて, 一次包装を通過する各種のガスが品質
 133 に及ぼす影響を評価し, その知見に基づいて最大許容漏れ限度
 134 を設定することが求められる。評価に当たっては, 製品の品質
 135 に影響を与える漏れを検出できることが検証された定量的漏れ
 136 試験法を用いることが望ましい。評価に用いるサンプルは, 設
 137 計におけるワーストケースを想定し作製すること。
 138 微生物以外の影響が無視できるものであれば, 管理すべき
 139 許容漏れ限度は微生物侵入リスクを考慮し設定されることにな
 140 る。これは微生物チャレンジ試験によって検証するか, 又は漏
 141 れ試験により論理的に微生物の侵入なきことを証明することに
 142 より, 設定が可能である。一方で製剤品質の維持にヘッドス
 143 ペース内の酸素濃度を低値に維持する必要がある場合など, 微生
 144 物侵入の防止だけでなく物質の通過を管理できる許容漏れ限度
 145 の設定が必要な場合, 定性的な微生物チャレンジ試験の検証の
 146 みでは不十分となる。その他の定性的試験も目的に応じた情報
 147 を得るために有意義である。
 148 **2.2.2. 製剤の製造**
 149 内容物を充填した製剤の製造において包装完全性試験は, 不
 150 完全な包装の医薬品の出荷を防止するために重要である。試験
 151 は開発段階での包装の設計及び初期の工程バリデーションで認
 152 められた包装欠陥に基づいて, 漏れ試験及びシール試験と共に,
 153 補助的な情報を得るための製造中の目視検査の適切な組合せに
 154 より設定される。
 155 製剤の製造工程において包装完全性評価に用いられる漏れ試
 156 験の例には, 液没試験法, 液体漏れ試験法, トレーサ液体試験
 157 法(染料浸透試験法), 密封チャンパー法(圧力変化漏れ試験法1),
 158 真空度低下法(圧力変化漏れ試験法2), 高電圧リーク試験法(ビ

159 ンホール試験法), ヘッドスペースガス・レーザー分析法が含
 160 まれる。またシール試験の例には, 表1に示した方法が挙げら
 161 れる。
 162 工程中に製造ロットの一部をサンプルとして用いる抜き取り
 163 試験は, 工程がバリデートされている状態に維持できているこ
 164 とを通して, ロットの包装完全性を確認する手段となる。抜き
 165 取りの頻度とサンプル数は, 工程バリデーション段階で得られ
 166 た統計的工程管理結果及び製造開始後の製品品質の傾向分析に
 167 基づいて, 必要な検体数を設定し, その妥当性を示すことが求
 168 められる。これに対し製造ロット全数の非破壊漏れ試験は, 包
 169 装完全性の連続的かつ全数の保証となる。
 170 シール試験の結果と包装完全性との関連性があらかじめ検証
 171 されている場合は, シール試験の実施により包装完全性を間接
 172 的に保証することができる。口部を熔閉又は熔着して封じるガ
 173 ラス製又はプラスチック製アンプルには, 通例, 全数非破壊漏
 174 れ試験が実施される。
 175 工程バリデーションにおける包装完全性試験の主目的は, 設
 176 定された操作パラメーター内で問題なく運転した工程で高品質
 177 の製剤包装を得ると共に, 重大な包装欠陥の発生率を十分に低
 178 くすることである。工程内及び最終製品の包装完全性試験は,
 179 実施した場合でも, 完全な包装設計を補完するものであり, 初
 180 期の設計時の確認に代わるものではない。
 181 **2.2.3. 安定性試験及び安定性モニタリングでの包装完全性の**
 182 **評価**
 183 医薬品の保存中における新たな漏れの発生リスクを評価する
 184 ため, 製剤の開発段階で, 安定性試験の一部として包装完全性
 185 を評価する必要がある。上市後の安定性モニタリングにおいて
 186 も, 包装完全性を評価することが望ましい。試験はその機構と
 187 非汚染を保証する論拠を理解した上で, 最大許容漏れ限度に可
 188 能な限り近接した検出能力をもつ方法を用いることが推奨され
 189 る。
 190 安定性試験における包装完全性試験に必要な試料の量は過去
 191 の開発及びバリデーション試験を考慮し, その試験目的を達成
 192 できる量とする。非破壊試験である場合は製剤の安定性を試験
 193 するサンプルについて, 試験前に包装完全性を点検できる。
 194 物理化学的漏れ試験法又は微生物の侵入可否を適切に評価で
 195 きる試験で, 一定の水準が確保されている場合には, 安定性試
 196 験における無菌試験を代替することができる。反対に, 品質に
 197 対する微生物以外の影響が無視できる製剤では, 微生物侵入の
 198 可能性を考慮することにより, 無菌試験の実施をもって安定性
 199 モニタリングにおける製剤の包装完全性評価に代えることがで
 200 きる。
 201 **2.3. 試験法の選択基準**
 202 個々の漏れ試験又はシール試験の方法は, 全ての製剤の包装
 203 に適用できるものではない。製剤包装によっては, 製品のライ
 204 フサイクル中に, 複数の試験法が必要となることがある。その
 205 ため包装完全性の保証には適切な試験法の選択やパラメーター
 206 の設定と, 選択した試験法がその製剤に適用できるかの検証が
 207 必要である。試験法の選択に関して, 下記の製剤特性が考慮さ
 208 れる。
 209 包装の内容物: 物理状態(液体, 固体)。液体の電気伝導度。
 210 ヘッドスペースの気体の有無とその種類。試験材料/試験条件
 211 との適合性。
 212 包装の構造と物理化学的特性: 包装の硬度。可動性の有無。

213 重合体に添加する揮発性物質の影響。材質の電気伝導度及び静
214 電容量、漏れではない通過するガス量。

215 包装と内容物への影響(破壊試験と非破壊試験)：例えば、ア
216 ンプルなどの全数検査を必要とする包装完全性試験は、包装と
217 内容物に対して品質影響を与えない非破壊試験でなくてはなら
218 ない。

219 2.4. 試験方法の設定と検証

220 漏れ試験又はシール試験の適用対象となる個々の製剤包装系
221 に対して高感度かつ正確で頑健な、再現性の高い漏れの検出を
222 保証するために、試験条件の最適化が必要となる。試験方法の
223 設計と検証には、包装栓システムの設計、構成する物質、予測
224 される漏れの性質、及び製剤内容物が試験結果に及ぼす影響を
225 適切に考慮して、陽性対照(意図的又は既知の漏れを有した包
226 装)及び陰性対照(既知の漏れを有しない包装)が用いられる。定
227 量的な評価には包装を構成する物質の種類や構造を考慮し、一
228 定の径を持つ開口部を作る必要がある。

229 3. 用語

230 本参考情報で用いる用語の定義は、次のとおりである。

231 **包装完全性**：包装が、製剤の損失を防ぎ、微生物の侵入を阻
232 止し、有害なガスや他物質の侵入を防ぐ能力であり、このこと
233 により、その製剤が、全ての必要な安全性及び品質基準に適合
234 することを保証している。「容器栓システムの完全性」及び
235 「容器の完全性」は「包装完全性」を意味する。

236 **定量的漏れ試験法**：定量的漏れ試験法では、検出又は測定す
237 る漏れが、予測できる一連の事象による現象に基づいている。
238 さらに、漏れ検出の手段は、容易に管理・モニターでき、具体
239 的な数量データが得られる物理化学的技術に基づいている。

240 **定性的漏れ試験法**：定性的漏れ試験法は、本質的に確率的で
241 ある。定性的試験は、一連の連続的又は同時的な事象で、それ
242 ぞれ確率分布で表されるランダムな結果を伴う事象に依存して
243 いる。したがって、その結果は不確実性を伴っており、有意な
244 結果を得るためには、大きなサンプルサイズと厳しい試験条件
245 管理を必要とする。

246 **漏れ**：包材の破損又は包材の間隙を通して、液体又はガスが
247 移動することで、特定の温度・圧力条件下で漏れ経路を通過す
248 るガス流速の尺度(質量又は容量単位)で表される。漏れ速度
249 は、圧力に容量を乗じ、時間で除した次元を有している。例え
250 ば、国際標準のSI名称は、毎秒パスカル立方メートル
251 ($\text{Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)である。

252 **リーク**：漏れ、又は漏れの生じるその孔若しくは経路のこと
253 をいう。

254 **透過**：包材を通して、物質が通過することである。無菌医薬
255 品の包装において水蒸気を含めたガスの透過は通常起こりえる。
256 プラスチック製医薬品容器(主に水性注射剤容器)における水蒸
257 気の透過については「水蒸気透過試験」が適用される。

258 **最大許容漏れ限度**：製品安全性へのリスクがなく、製品安定
259 性への影響がないか無視できる、ある製剤包装に許容できる最
260 大の漏れ速度(又は孔若しくは経路のサイズ)である。

261 **陽性及び陰性対照**：陽性対照として欠陥の種類とサイズが異
262 なる包装が用いられる。試験法の開発時には大きな欠陥を、試
263 験法の開発及びバリデーションには小さな欠陥を持つ包装が主
264 に陽性対照となる。

265

表1 シール試験の例

シール試験名称	適用する包装	試験内容
引張強度試験	バッグ製剤、プリスター バックなど	二枚の結合面を剥ぎ離すのに必要な力を測定する。
栓(開栓、閉栓)トルク試験	ねじにより施栓する包装	開栓又は閉栓に必要なトルクを測定する。
破裂試験	バッグ製剤、プリスター バックなど	包装シールが破裂して開くまで圧力を与えて破裂時の圧力又は力を測定する。
残留シール力試験	バイアル製剤など	バイアル上部からキャップを下方に一定速度で押し下げていき、移動距離・反発力のプロットが変曲点に達した時点の反発力を測定する。非破壊での試験が可能。
ゴム栓陥没試験	バイアル製剤など	バイアル上部からゴム栓を下方に一定速度で押し下げていき、陥没に至るまでの強度を測定する。
巻締めキャップの回転抵抗試験	バイアル製剤など	キャップを空回りさせるときの初期抵抗値を測定する。残留シール力試験と同様に、ゴム栓の弾力によるシール性を評価できる。
空中超音波法	熔着／圧着により接合する包装	超音波信号を包装又は物品のシール区域に通し信号強度の測定により、シール品質を検査する。適切な包装シールと比べ、シールの悪い区域の超音波エネルギーは少なくなる。非破壊での試験が可能。

1 無菌医薬品包装の漏れ試験法〈G7-5-180〉

本参考情報は、無菌医薬品の包装と容器における気体(ガス)及び液体の流入又は流出を測定し、漏れによる意図しない移動を把握するための試験法であり、測定値は漏れの生じる孔若しくは経路の有無、部位、大きさ又は度合いを示す。

漏れ試験法は、定性的漏れ試験法と定量的漏れ試験法に分類される。本参考情報では、定性的漏れ試験法として、液没試験法、液体漏れ試験法、トレーサ液体試験法(染料浸透試験法)及びスニッフ法(ヘリウム漏れ試験法1)を、また、定量的漏れ試験法として、密封チャンバー法(圧力変化漏れ試験法1)、真空度低下法(圧力変化漏れ試験法2)、加圧積分法(ヘリウム漏れ試験法2)、真空チャンバー法(ヘリウム漏れ試験法3)、浸漬法(ヘリウム漏れ試験法4)、高電圧リーク試験法(ピンホール試験法)及びヘッドスペースガス・レーザー分析法を示す。妥当性が確認された他の方法も用いることができる。

試験法は検体の特性と試験の目的に応じて選択される¹⁻⁶⁾。検体及び装置の構造、温度、圧力、測定時間などの条件は、結果の妥当性と操作の安全性に影響を与えるため、各種の技術資料を参考に適切に設定する。装置は必要に応じて国家計量標準にトレーサブルな標準器を用いて校正されたものを用いることが望ましい。漏れ試験は空の状態又は溶液若しくは固体の無菌医薬品などを入れて施栓した剛体又は柔軟な包装と容器の試験に用いられ、具体的にはアンブル、バイアル、シリンジ、点眼剤容器及びプラスチックバッグなどが対象となる。

1. 定性的漏れ試験法

定性的漏れ試験は漏れ現象を直接的に観察又は測定する方法であり、漏れの有無や漏れの部位、漏れ方などを確認することができる。

1.1. 液没試験法

内部に気体を含む検体を液体に沈め、液槽のヘッドスペースを減圧することにより欠陥部位から泡として出る気体を観察し、漏れの有無や漏れ部位を検出する試験法である。液体として水を用いる場合が多く、その場合は水没試験とも呼ばれる。減圧が完了してから規定の時間まで気泡の発生を観察し、漏れ部位及び気泡の大きさや発生頻度などを評価する。気体を加圧充填した検体を用い、液槽内で発泡を観察する場合もある。発生した気泡を液槽内でメスシリンダーなどにより一定時間採取し、その量を測定することで漏れ量を定量化できる。漏れ量は気泡採取時間と大気圧下に置き換えた採取量の関数で表すことができる。試験は必要に応じて規定した温度で行い、液槽ヘッドスペースの減圧値及び測定時間は、検体の耐圧性や想定される欠陥などにより設定する。剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

1.2. 液体漏れ試験法

漏れによる液体の移動を添加剤又は現像剤を用いて可視化して観察する試験法である。本試験法は、検体内に蛍光染料を添加した液体を入れ、漏れ出た液体を紫外線照射により検出する方法と、液体が入った検体の表面に現像剤を塗布し、漏れ出た液体が現像剤と化学反応を起こすことにより生じる指示模様を観察する方法がある(表1)。

表1 液体漏れ試験法の種類

	試験方法	液体への添加剤	現像剤	観察	指示模様
添加剤使用	蛍光染料添加法	蛍光染料	なし	紫外線下(暗所)	蛍光
現像剤使用	白色現像法	なし	白色現像剤	白色光下	灰色
	発色現像法	なし	発色現像剤	白色光下	赤色
	蛍光現像法	なし	蛍光現像剤	紫外線下(暗所)	蛍光

蛍光染料添加法は、蛍光染料を添加した液体を検体内部に注入、又は検体内部の液体に溶解させ、暗所での紫外線照射により漏れを検出する。必要に応じて、検体内を加圧して漏れによる変化を観察する。現像剤を使用する試験法は、十分にかき混ぜた現像剤をスプレーや刷毛などで検体面に均一に塗布し、現像塗膜の乾燥後、白色現像法と発色現像法では白色光下で漏れによる指示模様を観察する。蛍光現像法では、漏れによる指示模様を暗所での紫外線照射により観察する。漏れによる指示模様は位置、大きさや数などの記述、又は画像として記録する。剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

1.3. トレーサ液体試験法(染料浸透試験法)

液体浸漬による検体へのトレーサ液の流入又は流出を観察する方法である。本試験法は、非多孔質の剛体又は柔軟な容器における漏れ箇所を検出や相対的漏れ量の評価に用いられる。トレーサ液として染色液、又は金属イオンを含む液体が使用される。色素の移動は目視により観察、又は機器を用いて測定される。本試験法は空又は内容物(液体又は固形)を含む、透明で加圧又は減圧可能な施栓された剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

a) トレーサ液を流入させる試験法は、トレーサ液を入れたチャンバーに、トレーサ液を含まない検体を沈めた後、チャンバーに蓋をし、ヘッドスペース部分が規定圧力になるよう加圧又は減圧し、保持する。規定時間経過後、ヘッドスペース部分を大気開放して規定時間放置した後に、検体を取り出して表面を洗浄し、検体内部に侵入したトレーサ液を目視により観察又は化学分析の手法により測定する。

b) トレーサ液を流出させる試験法は、トレーサを含まない溶液を入れたチャンバーに、トレーサ液を含む検体を沈めた後、チャンバーに蓋をし、ヘッドスペース部分が規定圧力になるよう加圧又は減圧し、保持する。規定時間経過後、トレーサ液を流出させる。ヘッドスペース部分を大気圧で規定時間放置した後に検体を取り出し、チャンバー内部の液の観察又は化学分析の手法によりトレーサ液の移動を測定する。剛体容器に適用される。

1.4. スニッフ法(ヘリウム漏れ試験法1)⁷⁾

スニッフ法によるヘリウム漏れ試験法は吸込み法ともいう。本試験法は、検体にヘリウムガスを常圧又は加圧充填し、外部へ漏れ出すヘリウムガスを吸引プローブで吸引し、漏れを検出する方法である。また、吸引プローブを測定部位にあて、又は走査して漏れの有無や位置を評価する方法も用いられる。剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

2. 定量的漏れ試験法

定量的漏れ試験法は漏れ量を物理量に変換し、数値として表現する測定方式である。測定値は試験法と試験条件(検体温度、試験時間など)及び環境条件(気温、湿度、気圧など)の影響を受けるため、その特性を十分考慮して使用する必要がある。

2.1. 密封チャンバー法(圧力変化漏れ試験法1)⁸⁾

密封チャンバー法による圧力変化漏れ試験法は、施栓された検体の漏れを、検体とマスタ容器(検体と同様の構造を持つ漏れのない容器)を入れたチャンバーを加圧又は減圧した後の圧力変化から測定する方法である。本試験法は、検体の耐圧特性及びチャンバーの圧力設定により破壊又は非破壊での試験が可能となる。剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

本試験法は図1の装置を用い、検体とマスタ容器をそれぞれチャンバーに入れ、加圧又は減圧して弁を閉止し、チャンバー間の圧力差を規定時間保持後に測定する。大きな漏れの検出には、両チャンバー内の圧力を放出容器に開放した後に圧力差を測定する。漏れ量は、チャンバー間の差圧値と検体とチャンバーの空間容積及びチャンバーと放出容器の容積比率などの関数により表される。

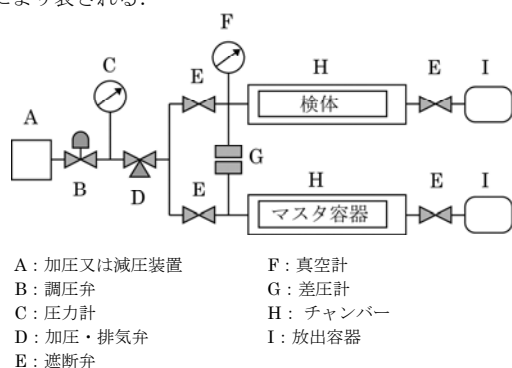


図1 密封チャンバー法の装置構成例(加圧法)

2.2. 真空度低下法(圧力変化漏れ試験法2)

真空度低下法による圧力変化漏れ試験法は、液体が封入された検体の漏れ試験に適用され、バキュームディケイ法ともいう。試験には密封チャンバー法と類似の装置を用いる。操作は検体とマスタ容器をそれぞれチャンバー内に入れ、チャンバー内を液体の蒸気圧以下に減圧し、漏出した液体が蒸発することによる圧力上昇を真空計又は差圧センサーにて測定する。圧力上昇の度合いは、検体とチャンバーとの隙間容積と測定時間の関数によって表され、漏出した液体の量及び液体の蒸気圧、真空度、温度などの影響を受ける。液体を含みヘッドスペースがない剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

2.3. 加圧積分法(ヘリウム漏れ試験法2)

加圧積分法によるヘリウム漏れ試験法は、内部にヘリウムガスを常圧又は加圧充填した検体をフード(被覆材料)で覆い、フードと検体の間の空間に漏れ出たヘリウムガスを一定時間溜めた後に吸引プローブで吸引し、漏れを測定する試験法である。

本試験法は図2の装置を用い、漏れ量はヘリウムガス濃度、フードと検体の隙間容積、ヘリウムガスの溜込み時間、吸引プローブの吸引量などの関数によって表される。検体全体からの漏れを測定でき、周囲のヘリウム濃度の影響を受けにくいなどの特徴がある。内容物がなく栓がされていない剛体容器に適用される。

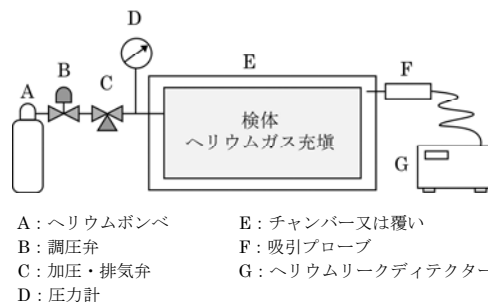


図2 加圧積分法の装置構成例

2.4. 真空チャンバー法(ヘリウム漏れ試験法3)

真空チャンバー法によるヘリウム漏れ試験法は真空容器法ともいう。本試験法は、ヘリウムガスを加圧充填した検体を真空チャンバーの中に入れ、チャンバー内を排気することにより高い真空度を保ち、真空チャンバー内に漏れ出すヘリウムガスを測定する方法である。加圧積分法に比べ高い検出感度を得ることができる。内容物がなく栓がされていない剛体容器に適用される。

本試験法は図3の装置を用い、検体にヘリウムガスを加圧充填して真空チャンバーにセットし、チャンバーを閉じて減圧し、チャンバー内が所定の真空度まで達した時点でのヘリウムリークディテクターの測定値と、真空チャンバーに検体を入れない状態の測定値の差が漏れの値となる。

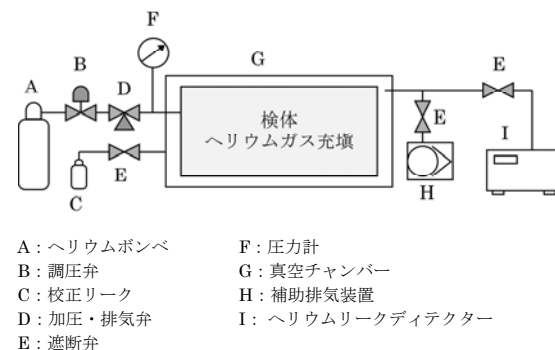
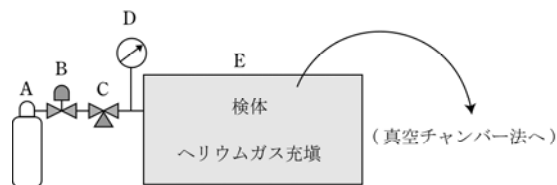


図3 真空チャンバー法の装置構成例

2.5. 浸漬法(ヘリウム漏れ試験法4)

浸漬法によるヘリウム漏れ試験法はボンピング法ともいう。本試験法は図4の装置を用い、ヘリウムガスを充填したチャンバー内で検体内部の空間に欠陥部分からヘリウムガスを流入させた後に検体を取り出して、漏れによる流出を真空チャンバー法により測定する方法である。内部に空間が存在する検体を、ヘリウムガスを加圧した容器に入れ、漏れ孔を通して外部からヘリウムガスを浸漬させ内部のヘリウム濃度を上昇させる。その後検体の漏れを真空チャンバー法にて測定する。大きな漏れがある検体には適用できない。漏れの度合いは、放置時間、検体内容積、充填時間、充填圧などの関数で表される。検体内部に空間を持つ施栓された剛体容器に適用される。



A : ヘリウムポンプ D : 圧力計
B : 調圧弁 E : ヘリウムガス充填チャンバー
C : 加圧・排気弁

図4 浸漬法の装置構成例

2.6. 高電圧リーク試験法(ピンホール試験法)

検体が高電圧を加えた際に流れる電流値の測定により、電極をあてた部位間に存在し漏れの原因となるピンホールを検出する方法である。測定条件により短時間で非破壊の試験が可能である。絶縁包装材料で覆われ、内容物に導電性があり、印加電圧の影響を受けない剛体又は柔軟な包装と容器に適用される。

2.7. ヘッドスペースガス・レーザー分析法

漏れによる検体のヘッドスペースガスの変化をレーザー光の透過による特定周波数帯の吸収又は周波数変調から得る方法である。光源と検出器の間に保持した検体に測定目的のガスに合わせた波長の光を照射することにより、酸素、二酸化炭素又は水蒸気の濃度及び内圧などの情報が得られる。測定値を基準となる欠陥検体で得られた値と比較することによりリークの可能性が判断される。測定条件により短時間で非破壊の試験が可能であるが、温度や湿度が結果に影響を与えるため、目的に応じた環境下で行う必要がある。ガス部分を有し、光を透過する剛体容器、ヘッドスペース部分を有する製剤に適用される。

3. 参考資料

- 1) JIS Z 2330 : 2012, 非破壊試験—漏れ試験方法の種類及びその選択.
- 2) 一般社団法人日本非破壊検査協会編, 漏れ試験 I, 2012.
- 3) 一般社団法人日本非破壊検査協会編, 漏れ試験 II, 2012.
- 4) 一般社団法人日本非破壊検査協会編, 漏れ試験 III, 2016.
- 5) US Pharmacopeia 40 (2017), <1207.1> Package Integrity Testing in The Product Life Cycle—Test Method Selection and Validation.
- 6) US Pharmacopeia 40 (2017), <1207.2> Package Integrity Leak Test Technologies.
- 7) JIS Z 2331 : 2006, ヘリウム漏れ試験方法.
- 8) JIS Z 2332 : 2012, 圧力変化による漏れ試験方法.

1 G8. 標準品関連

2 日本薬局方における標準品及び標準物質〈G8-1-190〉

医薬品等の定量的又は定性的計測、測定装置の校正や正確さの確認、分析システムの適合性試験などにおいて基準として用いる物質を標準物質といい、日本薬局方における標準品とは、標準品〈9.01〉の項に規定されているように、医薬品の品質評価における試験等に用いるために一定の品質に調製され、特定の用途に相応しい品質を有することが公的に保証され、供給される標準物質をいう。

本参考情報では、一般的な標準品に関連する基本用語の定義と解説、及び日本薬局方標準品の、用途による分類、設定に関する要件、求められる品質評価項目、頒布及び使用上の注意などについて記載する。なお、これらの記載は原則的な考え方を示したものであり、実際の適用に際しては当面柔軟な運用が必要である。

1. 標準品関連の基本用語

・標準物質 一つ以上の規定特性について、十分均質かつ安定であり、測定プロセスでの使用目的に適するよう作製された物質(JIS Q 0035 : 2022)。医薬品等の標準物質は、定量的又は定性的計測、測定装置の校正や正確さの確認などにおいて基準となる物質で、その使用目的に適するように調製されたものである。

・標準品 医薬品の品質評価における試験等に用いるために一定の品質に調製され、特定の用途に相応しい品質を有することが公的に保証され、供給される標準物質。

・日本薬局方標準品 日本薬局方の医薬品各条又は一般試験法において規定された標準品。

・認証標準物質 一つ以上の規定特性について、計量学的に適切な手順によって値付けされ、規定特性の値及びそれに付随する不確かさ、並びに計量トレーサビリティを記載した標準物質認証書が付いている標準物質(JIS Q 0035 : 2022)。

2. 日本薬局方標準品の用途による分類

日本薬局方標準品には、定量、確認試験、純度試験、生物活性試験、測定装置の校正、分析システムの適合性試験などに用いられる種々のものがあり、その用途により定量的試験用、定性的試験用、装置校正用などに大別される。これらの標準品は更に有効成分又は指標成分の定量、類縁物質の定量、スペクトル測定やクロマトグラフィーによる確認試験、又は一般試験法に規定された試験法、測定法及び分析法で用いられる装置の校正、分析システムの適合性試験などの具体的な用途によって細分類される。

2.1. 定量的試験に用いる標準品

2.1.1. 有効成分等の定量用標準品 医薬品各条に規定された化学薬品、抗生物質、添加剤及び生物薬品の定量に用いる標準品。

2.1.2. 指標成分の定量用標準品 医薬品各条に規定された生薬等の指標成分の定量に用いる標準品。

2.1.3. 類縁物質の定量用標準品 医薬品各条に規定された化学薬品、抗生物質、添加剤及び生物薬品の純度試験における特定の類縁物質の定量又は不純物の限度試験に用いる標準品。

2.1.4. その他の定量用標準品 一般試験法あるいは医薬品各条に規定された定量的試験の実施に必要な標準品。

2.2. 定性的試験に用いる標準品

2.2.1. 確認試験用標準品 医薬品各条に規定された化学薬品、抗生物質、添加剤、生物薬品及び生薬等の紫外可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、クロマトグラフィーでの保持時間や R_f 値、ペプチドマップ、電気泳動法での移動度などの比較による確認試験に用いる標準品。

2.2.2. 類縁物質の同定用標準品 医薬品各条に規定された化学薬品、抗生物質、添加剤、生物薬品及び生薬等の純度試験における類縁物質のピーク又はスポット等の同定に用いる標準品。

2.3. 生物活性試験に用いる標準品

生物薬品の力価や比活性を求める試験に用いる標準品。

2.4. 装置の校正等に用いる標準品

2.4.1. 装置校正用標準品 一般試験法に規定された装置の二次校正に用いる標準品。

2.4.2. 装置適合性確認用標準品 一般試験法に規定された装置により得られる測定値が定められた範囲内であることを確認するための標準品。

2.5. システム適合性試験に用いる標準品

2.5.1. システム適合性試験用標準品 医薬品各条に規定された化学薬品、抗生物質、添加剤、生物薬品及び生薬等のシステム適合性試験に用いる標準品。

3. 日本薬局方標準品の名称と用途

日本薬局方標準品は医薬品各条及び一般試験法に規定された定量法、確認試験、純度試験、生物活性試験、装置の校正、分析システムの適合性試験などで使用されるが、これら標準品には特定の用途のみを有するものと複数の用途に使用できるものがある。日本薬局方標準品の名称は、定量法及び製剤均一性試験並びに溶出試験での有効成分の定量に用いるものは原則として物質名に“標準品”の用語を付して命名する。有効成分等の定量に用いる標準品は、可能な場合は確認試験などの他の試験の標準品として用いることができる。有効成分等の定量以外の用途のみを有する標準品は必要に応じその用途を付して命名する。この命名に用いる用途名には次のようなものが考えられ、括弧内に例を示した。

- ・確認試験用(確認試験用モンテルカストナトリウム標準品)
- ・純度試験用(純度試験用ギトキシシン標準品)
- ・システム適合性試験用(システム適合性試験用モンテルカスト標準品)
- ・装置校正用(装置校正用シュウ酸カルシウム一水和物標準品)
- ・装置適合性確認用(装置適合性確認用カフェイン標準品)

4. 日本薬局方標準品を設定するための要件

従来、日本薬局方においては有効成分等の定量における基準物質としての使用が標準品の主たる用途であった。しかし、欧州薬局方や米国薬局方などでは純度試験における類縁物質標準品、分析システムの適合性試験用標準品、確認試験用標準品など、有効成分等の定量以外の特定の用途を有する標準品又は標準物質が積極的に設定されてきている。このような現状を踏まえ、日本薬局方においてもこの国際的な動向に沿った対応が求められるようになったが、日本薬局方に標準品を新規に設定す

- るには、次の点を考慮し、慎重に検討する必要がある。
- (i) 定量的試験にクロマトグラフィーなどの相対的分析法を採用するときは、原則として定量用標準品を設定する。その場合、通例、マスバランス法によって値付けされた物質を標準品として設定する。なお、計量学的トレーサビリティのある純度表示のなされた物質を標準品として設定することができる。
- (ii) 確認試験において、紫外可視吸収スペクトル、赤外吸収スペクトル又は核磁気共鳴スペクトルの比較による方法、クロマトグラフィーでの保持時間や R_f 値の比較による方法、ペプチドマップの比較による方法又は電気泳動での移動度の比較による方法などを規定するときは、定量用標準品の利用が可能な場合を除き、原則として確認試験用標準品を設定する。
- (iii) 純度試験において、特定の類縁物質の定量又は不純物の限度の規定に際し、クロマトグラフィーなどの相対的分析法を採用する場合は、原則として定量的試験に用いる純度試験用標準品を設定する。特定の類縁物質をクロマトグラフィーでの相対保持時間などで同定することが困難な場合には、定性的試験に用いる標準品として、類縁物質のピーク又はスポット等の同定に用いる純度試験用標準品を設定する。
- (iv) 分析システムの適合性試験用の標準品は、システム適合性が従前の方法(理論段数やシンメトリー係数等の規定)で十分に評価できない場合に設定する。
- (v) 純度試験における類縁物質の標準品及びシステム適合性試験用の標準品は、標準品原料が継続的に入手できない可能性がある場合には設定しない。
- (vi) 基準として用いる物質の用途が有効成分等の定量以外であるときで、当該物質が認証標準物質又は他の標準物質として入手できる場合は、これらの認証標準物質等を試薬・試液〈9.41〉の項に規定し、日本薬局方標準品としては設定しない。
- (vii) 基準として用いる物質の用途が有効成分等の定量以外であるときで、当該物質が試薬として入手できる場合は、用途に応じた規格及び試験方法を設定した当該試薬を試薬・試液〈9.41〉の項に規定することができる。
- ## 5. 日本薬局方標準品に求められる品質評価項目
- 日本薬局方標準品を設定するとき、その用途に相応しい品質を有することを保証するために必要な品質評価項目を規定する。基本的な品質評価項目は、次のとおりである。
- ### 5.1. 定量的試験に用いる標準品の品質評価項目
- 通例用いられるマスバランス法により純度を規定する場合、又は定量NMR法により純度を規定する場合に検討すべき品質評価項目の例を以下に示す。また、定量NMR法で純度を規定する場合は、⑧定量法に定量NMR法を設定し、他の品質評価項目については、標準品の用途等を勘案して設定する。
- ① 性状：色及び形状
 - ② 確認試験：化学構造を同定又は支持する試験法を設定する。
 - i) 紫外可視吸収スペクトル
 - ii) 赤外吸収スペクトル
 - iii) 核磁気共鳴スペクトル
 - iv) マススペクトル(高分解能マススペクトルを含む)
 - v) 粉末X線回折像(結晶形が規定されている場合)
 - vi) 対イオン
 - ③ 純度試験
 - i) 類縁物質(総量)
 - ii) 残留溶媒
 - iii) 無機不純物
 - ④ 示性値
 - i) 旋光度
 - ii) 融点
 - ⑤ 乾燥減量又は水分
 - ⑥ 強熱残分
 - ⑦ マスバランス純度：マスバランス法での純度評価は、原則として類縁物質、強熱残分、残留溶媒を控除項目とし、乾燥物又は脱水物としての純度(%)を求める。
 - ⑧ 定量法(設定可能な場合に滴定法等の絶対定量法を設定。定量NMR法で純度を規定する場合は定量NMR法を設定)
- ### 5.2. 定性的試験に用いる標準品、装置の校正等に用いる標準品、システム適合性試験に用いる標準品の品質評価項目
- 標準品としての用途等を勘案して、必要に応じて検討すべき品質評価項目の例を以下に示す。
- ① 性状：色及び形状
 - ② 確認試験：化学構造を同定又は支持する試験法を設定する。
 - i) 紫外可視吸収スペクトル
 - ii) 赤外吸収スペクトル
 - iii) 核磁気共鳴スペクトル
 - iv) マススペクトル(高分解能マススペクトルを含む)
 - v) 粉末X線回折像(結晶形が規定されている場合)
 - vi) クロマトグラフィーにおける保持時間又は R_f 値
 - ③ 純度試験
 - i) 類縁物質(総量)
 - ii) 残留溶媒
 - iii) 無機不純物
 - ④ 乾燥減量又は水分
 - ⑤ マスバランス純度
 - ⑥ 用途に関わる試験
 - i) 類縁物質のピーク又はスポット等の同定に用いる純度試験用標準品及びシステム適合性試験用標準品では、標準品を使用する医薬品各条の試験法と同じ条件でのピークの相対保持時間を確認する。
 - ii) システム適合性試験用標準品では、標準品を使用する医薬品各条の試験法と同じ条件での分離度を確認する。
- ### 5.3. 生物薬品の試験に用いる標準品の品質評価項目
- 生物薬品の標準品は、定量法、確認試験、示性値、純度試験、生物活性試験等に用いられる。含量が単位で表示される製品の場合、定量法として、力価を測定する生物活性試験、あるいは、力価との相関が明らかにされた物質量を測定する理化学的試験が設定される。標準品としての用途等を勘案して、必要に応じて検討すべき品質評価項目の例を以下に示す。
- ① 本質、由来
 - ② 性状：色及び形状
 - ③ 確認試験：構造を同定又は支持する試験法を設定する。
 - i) 液体クロマトグラフィー／質量分析法(LC/MS)を用いたペプチドマップ法
 - ii) 等電点電気泳動法

- 214 ④ 純度試験
 215 i) 類縁物質(総量)
 216 ii) その他の不純物
 217 ⑤ 示性値
 218 i) 分子量
 219 ii) 等電点
 220 iii) 電荷プロファイル
 221 iv) 糖鎖プロファイル
 222 ⑥ 乾燥減量又は水分
 223 ⑦ マスバランス純度
 224 ⑧ 定量法
 225 物質量を定めた経緯を明確にしておく。また、力価を表
 226 示する場合、単位の値付けの方法(単位の定義設定の経緯
 227 も含む)を明確にしておく。適切な国際標準品がある場合、
 228 国際標準品を基準にする。
 229 ⑨ 用途に関わる試験

230 6. 日本薬局方における標準物質

231 日本薬局方には、標準物質に相当する物質が試薬・試液
 232 (9.41)の項に試薬として記載されており、次のものがそれに
 233 該当する。

- 234 ・定量用として記載された物質
- 235 ・薄層クロマトグラフィー用として記載された確認試験に用
 236 いる物質(一部該当しないものがある)
- 237 ・純度試験用として記載された物質
- 238 ・医薬品各条の純度試験の類縁物質の項で特定類縁物質とし
 239 て記載されている物質
- 240 ・JISに規定された標準物質

241 日本薬局方では、製剤中の有効成分の定量のための標準物質
 242 として定量用試薬が規定され、製剤中の有効成分の薄層クロマ
 243 トグラフィーによる確認のための標準物質として一定の品質を
 244 有する当該有効成分物質が試薬として規定されているものがあ
 245 る。しかし、試薬として規定されたこれらの標準物質が公的に
 246 供給されることはない。

247 相対的定量法による定量は、標準品を基準として行われるべ
 248 きであるが、やむなく定量用の試薬を基準物質として使用する
 249 場合には、なるべく計量学的トレーサビリティのある純度表示
 250 のなされた標準物質を定量用試薬として設定することが望まし
 251 い。

252 試薬・試液(9.41)の項に試薬として記載された定量用試薬
 253 は「生薬等」に使用されるものを除き原則として、順次、標準
 254 品として設定する。新規に収載される医薬品各条においては、
 255 定量用の標準物質は定量用試薬としてではなく、原則として標
 256 準品として設定する。

257 一方で、「生薬等」では、指標成分の標準品を設定すること
 258 は困難であることから、指標成分の定量用標準物質を試薬とし
 259 て規定し、試薬の規格には、可能なものについては計量学的ト
 260 レーサビリティのある定量NMRを組み込んだ定量規格を順次
 261 設定している。

262 7. 日本薬局方標準品の使用上の留意点

263 (i) 日本薬局方標準品は、日本薬局方の医薬品各条及び一般
 264 試験法において使用することが定められている標準品である。
 265 それらの具体的な用途及び使用法は、医薬品各条又は一般
 266 試験法に規定されており、それらの用途に用いる場合におい
 267 て、標準品として適切な品質を有することが保証されている。

268 したがって、それら以外の用途に用いる場合の品質は保証さ
 269 れない。

270 (ii) 日本薬局方標準品を医薬品各条に規定された定量的な用
 271 途に用いる場合、標準品の添付文書等に純度の補正係数が表
 272 示されている場合は、その補正係数を乗じて標準品の秤取量
 273 を補正する。補正係数が表示されていない場合は、純度を
 274 100.0%とみなして使用する。

275 (iii) 医薬品各条の定量法において「乾燥物に換算した標準品
 276 の秤取量」又は「脱水物に換算した標準品の秤取量」が計算
 277 式に記載されている場合、標準品の乾燥減量又は水分を別途
 278 測定しなければならない。ただし、標準品の添付文書に乾燥
 279 減量値又は水分値が表示されている場合には、その表示値を
 280 用いることができる。

281 (iv) 日本薬局方標準品には有効期限は設定されていない。そ
 282 のため、必要時に必要量入手し、入手後は指定された条件
 283 で保管し、速やかに使用する。

284 (v) 開封後に保存した標準品の品質は保証されない。

285 (vi) 標準品1包装単位には、通常、複数回の繰り返し試験が
 286 可能な量が充填されている。しかし、標準品原料の供給量が
 287 少ないため、1回試験分しか充填されていないものもある。

288 (vii) 日本薬局方標準品を医薬品各条又は一般試験法に規定さ
 289 れた用途に用いる際に必要な情報は、標準品の添付文書等に
 290 記載されている。ただし、試験成績は非開示であり、試験成
 291 績書は発行されない。

292

1 G9. 医薬品添加剤関連

2 製剤に関連する添加剤の機能性関連特性につ 3 いて〈G9-1-181〉

4 添加剤の機能性関連特性 (Functionality Related
5 Characteristics, FRC)とは、製剤の製造工程・保管・使用に
6 おいて、有効成分及び製剤の有用性の向上に密接に関連する添
7 加剤の物理的・化学的特性である。

8 添加剤は製剤総則[1]製剤通則(6)に記載されるように、「そ
9 の製剤の投与量において薬理作用を示さず、無害」でなくては
10 ならず、「有効成分及び製剤の有用性を高める、製剤化を容易
11 にする、品質の安定化を図る、又は使用性を向上させる」など
12 の役割も担う。添加剤各条では、物質の確認と品質の確保を主
13 な目的として、規格と試験法が規定されている。

14 FRCは、添加剤が上記の役割を果たすための有効な指標と
15 なるが、添加剤に求められるFRCの特性値は、使用目的や製
16 剤処方に依存し、添加剤の安全性や安定性に直接関わる品質特
17 性とは異なることから、試験法には規格を設定しない。また、
18 本参考情報に記載されたFRCの試験法は、他の適切な試験法
19 の適用を制限するものではない。

20 黄色ワセリン及び白色ワセリンに関して、FRCとなる項目
21 とその試験法の例を以下に示す。

22 黄色ワセリン、白色ワセリン：稠度に関する試験法

23 黄色ワセリン及び白色ワセリンは石油から得た炭化水素類の
24 混合物を精製したものであり、通常、軟膏剤などの半固形製剤
25 の基剤として使用される。軟膏剤は製剤総則[3]製剤各条11.4.
26 軟膏剤(3)において「本剤は、皮膚に適用する上で適切な粘性
27 を有する。」とされており、当該剤形の流動学的性質の一つで
28 ある硬さ・軟らかさは、特性値として稠度を測定することによ
29 り示すことができる。一般試験法「半固形製剤の流動学的測定
30 法」の2. 稠度試験法(penetrometry)を用いて本品の稠度を評
31 価する場合の試験法を記載する。

32 (i) 器具 標準円錐又はオブション円錐により試験を行う。

33 なお、試料容器は直径 100 ± 6 mm、深さ65 mm以上の金属製
34 の平底円筒形のものをを用いる。

35 (ii) 操作法 オープンに必要な数の空の試料容器を入れ、それ
36 らの容器と共に容器に入れた一定量の本品を $82 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ に加温
37 する。融解した本品を1個以上の試料容器に注ぎ込み、試料容
38 器の縁から6 mm以内まで満たす。通風を避けて $25 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ で
39 16時間以上冷やす。試験開始2時間前に、試料容器を $25 \pm$
40 0.5°C の水浴中に入れる。室温が 23.5°C 未満又は 26.5°C を超え
41 る場合には円錐を水浴中に入れて円錐の温度を $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に調
42 整する。試料の表面を乱さないように、試料容器をペネトロ
43 メーターの試料台に乗せ、円錐を、先端が試料容器の縁から
44 25 ~ 38 mm離れた位置で試料の表面に接触するように下げる。
45 ゼロ点を調整し、直ちに留金具を離し、5秒間放置する。留金
46 具を固定し、目盛りから進入の深さを読む。進入した部位が重
47 ならないよう間隔を空けて3回以上測定する。進入の深さが20
48 mmを超える場合には、別の試料容器を使用して各測定を行う。
49 進入の深さは最短0.1 mmまで読みとる。3回以上の測定値の平
50 均値を求める。

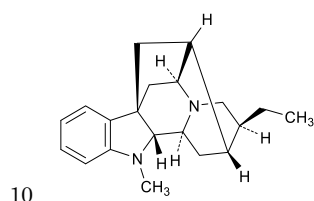
1 G10. 名称関連

2 化学名参考事項 〈G10-1-190〉

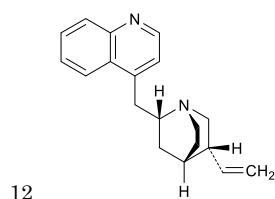
3 日局においては、化学名はIUPACが定める体系的命名法に
 4 より命名されているが、天然物及びその関連化合物については、
 5 類似性を示すために慣用名を基本母体構造名として半体系的に
 6 命名する場合があります、以下の母体構造を有する化合物について
 7 は、慣用名を基に命名している医薬品各条がある。

8 1. アルカロイド

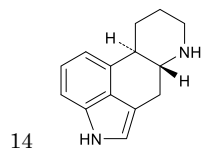
9 ajmalan



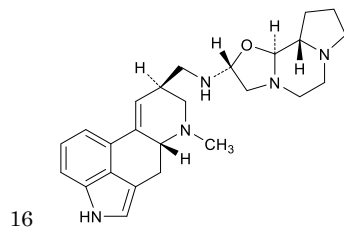
11 cinchonan



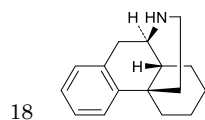
13 ergoline



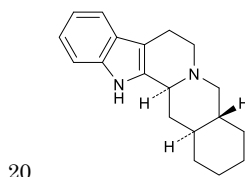
15 ergotaman



17 morphinan

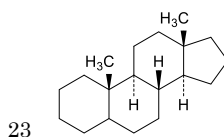


19 yohimban

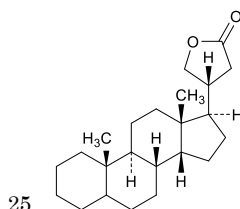


21 2. ステロイド

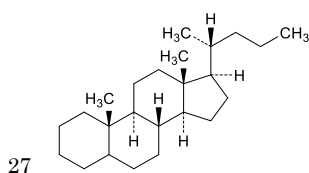
22 androstane



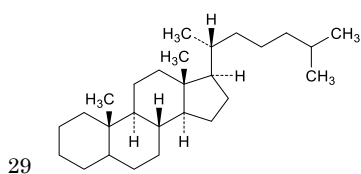
24 cardanolide



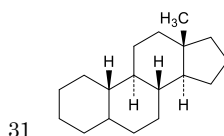
26 cholane



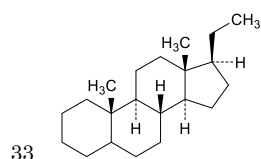
28 cholestane



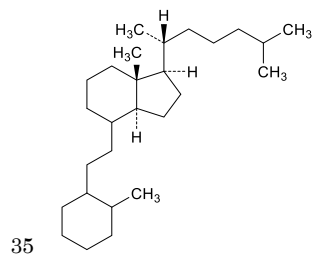
30 estrane



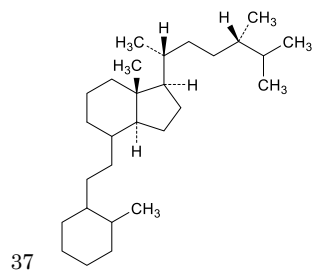
32 pregnane



34 9,10-secocholestane

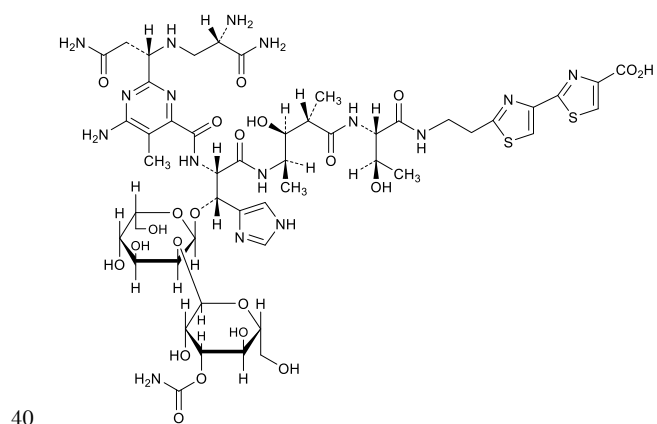


36 9,10-secoergostane

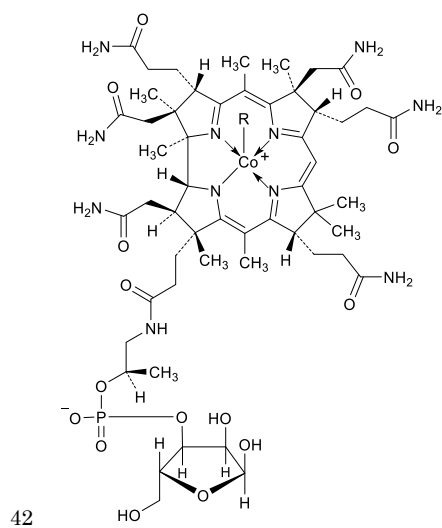


38 3. その他

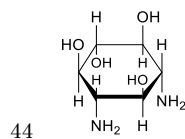
39 bleomycinic acid



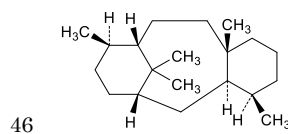
41 cobamide



43 D-streptamine



45 taxane



47

48

1 GZ. その他

2 医薬品等の試験に用いる水〈GZ-1-161〉

3 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
4 21に「試験を行うのに適した水とする．」とされているよう
5 に、当該試験の目的にかなう水であることを確認した上で用い
6 る必要がある．

7 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
8 て別に規定される場合を除いて、「精製水」、「精製水(容器
9 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
10 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
11 製造された水を入手して用いてもよい．

12 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
13 ては、例えば、以下のものがある．

- 14 ・アンモニウム試験用水：〈1.02〉アンモニウム試験法(アン
15 モニウム標準液)
- 16 ・有機体炭素の測定に用いる水(測定用水)：〈2.59〉有機体炭
17 素試験法
- 18 ・ICP分析用水：〈2.63〉誘導結合プラズマ発光分光分析法
19 及び誘導結合プラズマ質量分析法
- 20 ・エンドトキシン試験用水：〈4.01〉エンドトキシン試験法
- 21 ・微粒子試験用水(注射剤試験用)：〈6.07〉注射剤の不溶性微
22 粒子試験法
- 23 ・微粒子試験用水(点眼剤試験用)：〈6.08〉点眼剤の不溶性微
24 粒子試験法
- 25 ・微粒子試験用水(プラスチック製医薬品容器試験用)：
26 〈7.02〉プラスチック製医薬品容器試験法の微粒子試験

27 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
28 は、以下のものがある．

- 29 ・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
30 ウム試験法

31 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
32 れる場合は、通則21に規定された「医薬品等の試験に用いる
33 水」を指す．

1 製薬用水の品質管理〈GZ-2-181〉

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、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により検証するとともに、日常的な水質管理によりそれを保証し続けることが重要である。

1. 製薬用水の種類

1.1. 常水

「常水」の規格及び試験方法は、日本薬局方の医薬品各条で規定されており、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により、上記の基準と併せてアンモニウム「0.05 mg/L以下」の規格に適合することが求められる。また、一定期間保存している場合は、微生物の増殖抑制を図る必要がある。

「常水」は、「精製水」や「注射用水」製造用の原水として用いられるほか、原薬中間体の製造や医薬品の製造設備の予備洗浄にも用いられる。

1.2. 精製水

「精製水」及び「精製水(容器入り)」の規格及び試験方法は、日本薬局方の医薬品各条で規定されている。

「精製水」は、原水として「常水」を用い、必要な前処理を経て、イオン交換、蒸留、逆浸透(RO: Reverse Osmosis)又は微生物及び分子量約6000以上の物質を除去できる限外ろ過(UF: Ultrafiltration)などを単独あるいは組み合わせて用いたシステムにより製造する。「精製水」の製造にあたっては、適切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殖抑制を図るか又は定期的な殺菌処理を行う。

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、その規格に適合した水質を維持するための適切な管理を行う。

「精製水(容器入り)」は、「精製水」を気密容器に入れたものである。

1.3. 滅菌精製水

「滅菌精製水(容器入り)」(別名: 滅菌精製水)の規格及び試験方法は、日本薬局方の医薬品各条で規定されている。

「滅菌精製水(容器入り)」は、「精製水」を密封容器に入れて、滅菌したもの、又はあらかじめ滅菌した「精製水」を無菌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。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いてもよいこととされている。

1.4. 注射用水

「注射用水」及び「注射用水(容器入り)」の規格及び試験方法は、日本薬局方医薬品各条で規定されている。

「注射用水」は、「常水」にイオン交換、逆浸透等による適切な前処理を行った水又は「精製水」の、蒸留又は超ろ過(RO/UF: Reverse Osmosis and/or Ultrafiltration)により製造する。蒸留法により製造する場合、飛沫同伴による汚染が起こ

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は、水質分析、計器によるモニタリング及び透過水量監視等の日常管理を行うとともに、定期的な膜の外観検査及びエアリーク試験を実施し、併せて使用済みの膜の引張り強度、リークの有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、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ましい。

なお、「注射用水」を製造システム中で一時的に保存する場合、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る。エンドトキシンについては、規格値として0.25 EU/mL未満であることが要求される。

「注射用水(容器入り)」は、「注射用水」を密封容器に入れて滅菌したもの、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。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いてもよいこととされている。

2. 超ろ過法

超ろ過法は、「精製水」又は「注射用水」の製造において、逆浸透膜又は限外ろ過膜を単独あるいは組み合わせて用いた製造システムにより水を精製する方法であり、蒸留法に替わり得る製造方法として用いられる。

超ろ過法により「注射用水」を製造するときは、通例、前処理設備、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。本設備は、凝集装置、沈降分離装置、ろ過装置、塩素殺菌装置、酸化・還元装置、残留塩素除去装置、精密ろ過装置、逆浸透装置、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、前処理水供給装置、紫外線殺菌装置、熱交換装置、膜モジュール、洗浄・殺菌用装置などから構成される。注射用水供給設備は、「注射用水」を一時的に保存するための貯水タンク、配管系、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、超ろ過法により「精製水」を製造する場合においても、製造システムの基本的構成は「注射用水」の場合と同様である。

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に保存する場合には、通例、80℃以上の高温で熱循環させることにより微生物の増殖を阻止する。

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「精製水」及び「注射用水」の製造に用いるときは、微生物及び分子量約6000以上の物質を除去できる膜モジュールを用いる。

3. 製薬用水の選択

医薬品製造用の水としては、日本薬局方に定める上記1.1～1.4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。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る。

なお、「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)に代えて「滅菌精製水(容器入り)」又は「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)を用いることができる。

3.1. 製剤

微生物に併せてエンドトキシンを厳しく管理する必要のある注射剤等の無菌製剤の製造には、「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)を用いる。微生物による汚染に注意が必要な点眼剤や眼軟膏剤などの無菌製剤の製造には、生菌数を低く抑えた「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いることができる。非無菌製剤の製造には、「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)以上の品質の水を用いる。吸入剤、点耳剤及び点鼻剤の製造には、生菌数を適切な水準に管理した「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いるが、吸入剤のうち、噴霧用の液状製剤には、生菌数を厳しく抑えた「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。微生物汚染に注意を払わなければならない経口液剤、シロップ剤、腔用坐剤、軟膏剤、クリーム剤などには、製剤中の保存剤などの影響を加味しながら、微生物学的に適切に管理された「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。

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、透析用剤(腹膜透析用剤、血液透析用剤)	血液透析用剤には、別に規定するもののほか、「注射用水」、「注射用水(容器入り)」又は透析に適した水を用いる。
	「精製水」 (又は「精製水(容器入り)」)	点眼剤、眼軟膏剤、吸入剤、点耳剤、点鼻剤	微生物による汚染に注意が必要な点眼剤、眼軟膏剤などの無菌製剤には、生菌数を低く抑えた「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いることができる。 吸入剤、点耳剤及び点鼻剤の製剤には、生菌数を適切な水準に管理した「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。ただし、吸入剤のうち、噴霧用の液状製剤には、生菌数を厳しく抑えた「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。
		経口投与する製剤、口腔内に適用する製剤、直腸に適用する製剤、腔に適用する製剤、皮膚などに適用する製剤、(生薬関連製剤のうちの)チンキ剤、芳香水剤	微生物汚染に注意を払わなければならない経口液剤、シロップ剤、腔用坐剤、軟膏剤、クリーム剤などには、製剤中の保存剤などの影響を加味しながら、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。
	「常水」	(生薬関連製剤のうちの)エキス剤、丸剤、酒精剤、浸剤・煎剤、茶剤、流エキス剤	生薬中の生菌数及び製剤において達成すべき微生物限度を考慮して製薬用水を選択する。
原薬	「注射用水」 (又は「注射用水(容器入り)」)	無菌原薬	
	「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製剤の製造に用いられ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、エンドトキシンが適切な水準に管理された「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。
	「常水」	原薬中間体	

4. 製薬用水の品質管理

4.1. 概要

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、初期に製薬用水の製造システム(製薬用水システム)のバリデーシ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、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る。日常的な管理項目としては、導電率及び有機体炭素(TOC)に

を用いる。

生薬を含有する製剤については、生薬中の生菌数及び製剤において達成すべき微生物限度を考慮した製薬用水の選択が求められる。

また、製品に直接触れる設備表面や容器などの予備洗浄水は、「常水」以上の品質の水とするが、最終リンス水は仕込み水と同等の品質の水とする。

3.2. 原薬

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ように選択しなければならない。

原薬の製造に用いる水及び原料や原薬中間体に直接触れる設備表面や容器の洗浄水は、合成や抽出プロセスの初期の段階であっても、理化学的及び微生物学的に管理された「常水」以上の品質の水を用いる。ただし、最終の精製工程では、「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)以上の品質の水を用いる。最終原薬に直接触れ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の品質の水とする。

無菌原薬の製造には、「滅菌精製水(容器入り)」又は「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)を用いる。また、エンドトキシン管理が必要な製剤に使用する原薬で、後の工程にエンドトキシンの除去工程がない場合は、「注射用水」(又は「注射用水(容器入り)」)又はエンドトキシンが適切な水準に管理された「精製水」(又は「精製水(容器入り)」)を用いる。

よる品質管理が有用であり、定期的管理項目としては、その使用目的によって、上記に加えて幾つかの特定不純物、生菌数、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。

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理事項(導電率及び有機体炭素(TOC))について記載する。なお、その他の管理項目についても必要に応じて試験を行い、それぞれの品質規格に適合することを確認する必要がある。

4.2. サンプリング

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、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、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リングポイントを選択する必要がある。なお、サンプリングポイント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応じて適切に定める。

サンプリングの頻度は、製薬用水システムのバリデーショ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、2～8℃に保存し、12時間以内に試験を行う。

4.3. 警報基準値(アラートレベル)と処置基準値(アクションレベル)

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。得られたモニタリングデータを、警報基準値、処置基準値、その他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ことができる。

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用されるものである。

4.3.1. 警報基準値(アラートレベル)の定義

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、警報基準値の設定は、過去の傾向分析による実測値の「平均値+2σ」又は「処置基準値の70%(生菌数は50%)」のうち、通例、低い方の値を採用する。

4.3.2. 処置基準値(アクションレベル)の定義

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ための是正措置を講じなければならない。

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。

4.4. 微生物モニタリング

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、存在する微生物の全てを検出する必要はないが、成長の遅い微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ング手法を採用する必要がある。

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く必要がある。

4.4.1. 培地及び培養条件

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カンテン培地を用いて水質をモニターすることが有用である。

表2に生菌数の評価に用いる計測方法、最少試料量、培地、培養条件の一例を示す。

表2に示された培地を以下に掲げる。

(i) 標準カンテン培地

カゼイン製ペプトン	5.0 g
酵母エキス	2.5 g
ブドウ糖	1.0 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは6.9～7.1とする。

(ii) R2Aカンテン培地

ペプトン(カゼイン製及び肉製)	0.5 g
カザミノ酸	0.5 g
酵母エキス	0.5 g
ビルビン酸ナトリウム	0.3 g
ブドウ糖	0.5 g
硫酸マグネシウム七水和物	50 mg
溶性デンプン	0.5 g
リン酸水素二カリウム	0.3 g
カンテン	15.0 g
水	1000 mL

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは7.1～7.3とする。

培地成分には、日本薬局方に規定するもののほか、以下の試薬を用いる。

(i) カザミノ酸 カゼインを酸により加水分解し、微生物試験用に製造したもの。

乾燥減量 (2.41) 8%以下(0.5 g, 105℃, 恒量)。

強熱残分 (2.44) 55%以下(0.5 g)。

窒素含量 (1.08) 7%以上(105℃, 恒量, 乾燥後)。

257 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	平板混釈法又はメンブランフィルター法	平板混釈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	1.0 mL	1.0 mL	100 mL
培地	R2Aカンテン培地 標準カンテン培地	R2Aカンテン培地	R2Aカンテン培地
培養期間	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)	4～7日間(又はそれ以上)	4～7日間(又はそれ以上)
培養温度	R2Aカンテン培地：20～25℃又は30～35℃ 標準カンテン培地：30～35℃	20～25℃又は30～35℃	20～25℃又は30～35℃

258 4.4.2. 培地性能試験

259 R2Aカンテン培地の性能試験には、次に示す試験菌株又は
260 これらと同等と考えられる試験菌株を使用する。

261 *Methylobacterium extorquens* : NBRC 15911

262 *Pseudomonas fluorescens* : NBRC 15842, ATCC 17386な
263 ど

264 培地性能試験前にこれらの試験菌を滅菌精製水中に接種し、
265 20～25℃に3日間おき、飢餓状態にする。飢餓状態にした試
266 験菌を更に滅菌精製水で希釈し、試験菌懸濁液を調製する。使
267 用するR2Aカンテン培地に試験菌(5×10¹～2×10² CFU)を接
268 種し、20～25℃で4～7日間培養するとき、十分な接種菌の
269 増殖が認められなければならない。

270 標準カンテン培地の性能試験には、次に示す試験菌株又はこ
271 れらと同等と考えられる試験菌株を使用する。

272 黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*) : ATCC 6538,
273 NCIMB 9518, CIP 4.83又はNBRC 13276

274 緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) : ATCC 9027, NCIMB
275 8626, CIP 82.118又はNBRC 13275

276 大腸菌(*Escherichia coli*) : ATCC 8739, NCIMB 8545,
277 CIP 53.126又はNBRC 3972

278 微生物限度試験法〈4.05〉に従って試験菌懸濁液を調製する。
279 使用する標準カンテン培地に少数の試験菌(100 CFU以下)を接
280 種し、30～35℃で48時間培養するとき、十分な接種菌の増殖
281 が認められなければならない。

282 4.4.3. 製薬用水システムの微生物に対する処置基準値

283 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
284 に対する処置基準値は下記のとおりである。

285 各種製薬用水に対する生菌数の処置基準値

286 「常水」：10² CFU/mL* (水道法第4条に基づく水質基準に
287 規定されている規格値)

288 「精製水」：10² CFU/mL**

289 「注射用水」：10¹ CFU/100mL**

290 (*標準カンテン培地を用いての値、**R2Aカンテン培地を用
291 いての値)

292 「精製水」に対する処置基準値は、「常水」と同一の値とさ
293 れているが、各製造施設において、別途、独自の処置基準値を
294 定め、より高いレベルでの微生物管理を行うことが望まれる。

295 また、バリデーション及び日常的な管理においてこれらの処置
296 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、
297 システムの殺菌・消毒を施す必要がある。

298 4.5. 理化学的モニタリング

299 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
300 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

301 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
302 知ることができ、TOCを指標とするモニタリング(TOCモニタ
303 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
304 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
305 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
306 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
307 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、
308 以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
309 完的事項を記載する。

310 なお、各製造施設において、導電率及びTOCを指標とする
311 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
312 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
313 を定めておく必要がある。

314 4.5.1. 導電率を指標とするモニタリング

315 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
316 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
317 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
318 いてオフラインのバッチ試験として行うこともできる。

319 (1) オンライン又はインラインでの測定

320 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
321 制御は困難である。したがって、任意の温度でモニタリングし
322 ようとする場合には、下記の方法を適用する。

323 (i) 温度非補償方式により試料水の温度及び導電率を測定す
324 る。

325 (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。
326 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、
327 測定された温度よりも低い方の温度における値を許容導電率と
328 する。

329 (iii) 測定された導電率が、許容導電率以下であれば、導電率
330 試験適合とする。許容導電率を超える場合には、オフラインで
331 の測定を行う。

332 表3 異なる測定温度における許容導電率*

温度(℃)	許容導電率 (μS・cm ⁻¹)	温度(℃)	許容導電率 (μS・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

333 * 温度非補償方式での導電率測定に対してのみ適用する。

(2) オフラインでの測定

(i) 下記の方法により、容器に採水後、強くかき混ぜることによって、大気中から二酸化炭素を平衡状態になるまで吸収させ、大気と平衡状態になった試料の導電率を測定する。

(ii) 十分な量の試料を適当な容器にとり、かき混ぜる。温度を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節し、強くかき混ぜながら、一定時間ごとにこの液の導電率の測定を行う。5分当たりの導電率変化が $0.1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以下となったときの導電率を本品の導電率(25°C)とする。

(iii) 前項で得られた導電率(25°C)が $2.1 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以下であれば、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。

4.5.2. TOCモニタリング

「精製水」及び「注射用水」のTOCの規格限度値はいずれも「 0.50 mg/L 以下」(500 ppb 以下)とされているが、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当たり、別途警報基準値と処置基準値を定めてTOCモニタリングを行うことが望ましい。

推奨されるTOCの処置基準値は、下記のとおりである。

処置基準値： $\leq 300 \text{ ppb}$ (インライン)

$\leq 400 \text{ ppb}$ (オフライン)

水道水(「常水」)のTOCの許容基準値は「 3 mg/L 以下」(3 ppm 以下)(水道法第4条に基づく水質基準)であるが、上記の管理基準を考慮し、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望ましい。

なお、日本薬局方では有機体炭素試験法(2.59)を定めており、通例、これに適合する装置を用いてTOCの測定を行うが、高純度の水(イオン性の有機物や分子中に窒素、硫黄、リン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水)を原水として用いる場合に限り、米国薬局方のGeneral Chapter <643> TOTAL ORGANIC CARBON又は欧州薬局方のMethods of Analysis 2.2.44. TOTAL ORGANIC CARBON IN WATER FOR PHARMACEUTICAL USEに定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TOCモニタリングに用いることができる。

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の分解前後の導電率の差からTOC量を求める方式の装置は、試料水中にイオン性の有機物が含まれている場合、若しくは分子中に窒素、硫黄、リン又はハロゲン原子を含む有機物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汚染リスクを考慮して適切な装置を選択する。

4.6. 注射用水の一時的保存

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づいて適切な保存時間を設定する。

5. 容器入りの水の品質管理に関する留意事項

製品として流通する容器入りの水(「精製水(容器入り)」, 「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」)の品質管理に関しては、別途、留意すべき事項が幾つかある。

5.1. 滅菌した容器入りの水の製法について

「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」の製法としては、次の二つの異なる方法がある。

(i) 「精製水」又は「注射用水」を密封容器に入れた後、滅菌する。

(ii) あらかじめ滅菌した「精製水」又は「注射用水」を無菌的な手法により無菌の容器に入れた後、密封する。

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良いのに対して、(ii)の製法では、全ての工程についてバリデーションを行う必要がある。これは、(ii)の製法があらかじめろ過滅菌などの方法によって滅菌したものを「無菌的に」容器に入れ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ためである。

5.2. 容器中での保存に伴う水質変化

5.2.1. 無機性不純物(導電率を指標として管理)

バルクの精製水又は注射用水の導電率が $1.3 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以下(25°C)で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、容器への充填時の空気との接触や保存中におけるプラスチック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、保存中における導電率の変化に注意する必要がある。

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TOCを指標として管理)

日本薬局方では、容器入りの水(「精製水(容器入り)」, 「滅菌精製水(容器入り)」及び「注射用水(容器入り)」)中の有機性不純物に対しては、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、バルクの水において、TOCによる管理(限度値「 0.50 mg/L 以下」(500 ppb 以下))を規定していることと対照的である。これは、容器中での保存により、TOC量が著しく増加する事例があり、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からの溶出物の増加に十分注意する必要がある。

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(ガラス、ポリエチレン、ポリプロピレンなど)やサイズ($0.5 \sim 2000 \text{ mL}$)及び保存期間の如何によらず、同一の試験法を用い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責任において、過マンガン酸カリウム還元性物質の代わりにTOCにより品質管理を行うことが望ましい。TOCにより品質管理を行う場合、下記のような目標値により管理することが望ましい。

内容量が 10 mL 以下のもの：TOC 1500 ppb 以下

内容量が 10 mL を超えるもの：TOC 1000 ppb 以下

ポリエチレン、ポリプロピレンなどのプラスチック製医薬品容器入りの水については、容器からのモノマー、オリゴマー、可塑剤などの溶出がまず懸念されるが、プラスチックにはガス透過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必要がある。

5.2.3. 微生物限度(総好気性微生物数)

「精製水(容器入り)」には無菌性が求められているわけでは

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「1 mL当たり 10^2 CFU」に適合するためには、衛生的あるいは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に使いきるように努めることが望ましい。

総好気性微生物数の許容基準「1 mL当たり 10^2 CFU」は、「精製水」(バルク)の生菌数の処置基準値と同じであるが、精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・ダイジェストカンテン培地を用いて試験を行う。

5.3. 容器入りの水を手入して医薬品の製造や試験に用いる場合の注意事項

市販の「精製水(容器入り)」、「滅菌精製水(容器入り)」又は「注射用水(容器入り)」を手入して、医薬品又は治験薬の製造用水、医薬品試験用の水として利用することができるが、下記の事項に留意する必要がある。

(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、速やかに使用すること。

(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ことを確認しておくこと。

(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とし、保存後の再使用はしないこと。

(iv) 開封直後からヒト及び試験室環境など等による汚染又は水質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操作手順書を作成しておくこと。

1 第十九改正日本薬局方における国際調和
2 〈GZ-3-190〉

3 日本薬局方、欧州薬局方(The European Pharmacopoeia)及
4 び米国薬局方(The United States Pharmacopeia)での調和合意
5 に基づき規定した試験法及び医薬品各条に関する情報は、以下
6 の独立行政法人医薬品医療機器総合機構のウェブサイトに掲載
7 している。

8 試験法：
9 [https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-](https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0021.html)
10 [development/jp/0021.html](https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0021.html)

11 医薬品各条：
12 [https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-](https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0020.html)
13 [development/jp/0020.html](https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/standards-development/jp/0020.html)

1 目的に応じた日本薬局方の適用方法〈GZ-4-190〉

日本薬局方は、わが国の医薬品の品質を適正に確保するために必要な規格・基準及び標準的試験法を示す公的な規範書である。また、医薬品開発時、承認申請時、製薬企業や薬局といった品質管理の現場、公的試験機関、薬学教育等で活用される試験法や国際的に推進される品質管理の考え方を公的に公開する書であり、科学の書といえる。さらに、保健医療上重要な医薬品を全面的に取り込むことを目指しており、医薬品のライフサイクルにおける時期が様々に異なる医薬品が収載された書でもある。

日本薬局方は、公的な規範書であるので、規格・基準及びその確保のための標準的試験法が記載されている。また日本薬局方医薬品各条には、原薬だけでなく製剤も収載されているが、収載時期は様々であり、収載時の品質確保の考えに基づいた規格・基準及びそのための試験法が規定されている。例えば、ある原薬では、性状、確認試験、純度試験、水分、強熱残分、定量法、貯法等の規格・基準と試験法が規定され、その製剤では、製法、確認試験、製剤均一性、溶出性、定量法、貯法等の規格・基準と試験法が規定されている。原薬に日本薬局方標準品が定められていない場合、製剤では、原薬を用いて定量的試験を実施するよう規定される場合がある。このような場合、製剤の定量試験では、通常、試薬・試液〈9.41〉の条に定量用〇〇として原薬が規定され、原薬の定量規格が一定以上のものを使用することになる。これは、主な試験の実施場所が、日本薬局方規格の原薬を容易に入手できる製薬企業であることを前提に規定されたものであるが、公的試験機関で製剤を試験する場合には、日本薬局方規格の原薬の入手が難しい場合がある。その場合、市販の試薬を原薬の代用とし、改めて日本薬局方に定められた試験を行い、この試薬が原薬の規格を満たすことを確認することになる。

このような場合、原薬の代用とする試薬についてどこまでの試験を実施する必要があるのだろうか。日本薬局方では、目的に応じた考え方(*fit for purpose*)に沿って試験を行うことが重要となる。したがって、例えば製剤の確認試験において、原薬が標準物質として指定され、その代わりとして試薬を利用する場合、その試薬が間違いなく原薬と同じ構造を持つことを、原薬の確認試験を実施することで確認する。このものを用いて、例えば薄層クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーで製剤の確認試験が規定されているのであれば、原薬で定められている純度試験や強熱残分試験、定量試験等を行う必要はないことになる。

それでは、製剤の定量的試験を行う際に必要な定量用原薬の代わりに試薬を利用する場合はどうだろうか。その試薬が間違いなく原薬と同じ構造を持つものであることを、まずなんらかの方法で確認し、ついで定量用〇〇として必要な規格、即ち原薬の定量試験を行って、その規格を満たすものであることを確認する必要がある。その場合、脱水物換算が必要であれば、水分含量も確認する必要がある。言い換えれば、もし製剤の定量的試験を行うために原薬でなく試薬で代用する場合、原薬の規格のうち、純度試験や強熱残分等の試験は、製剤の定量値に影響を与えない場合がほとんどであり、このことが明確であれば、

目的に応じた考え方に従い、行う必要がないことになる。同様に、原薬が液体クロマトグラフィーを利用した定量試験においてシステムの性能の確認に使用されているときに、試薬で代用する場合、その目的性を考慮すれば、その試薬が原薬と同じ構造を持つことの確認のみが求められることになる。

このように、日本薬局方の試験では、試験の本質をよく考えて実施することが重要で、必要な試験に関して目的に応じた適用を行うことが可能と考えられる。また、試験の本質をよく考えた結果として、日本薬局方の適用方法を変更した場合には、その変更の妥当性について論理的に説明できる必要がある。さらに、医薬品の製造においては、医薬品の品質を担保できる範囲内において、変更が行われるべきである。

「原子量表(2024)」について

日本化学会 原子量専門委員会

元素の原子量は1961年、「質量数12の炭素(^{12}C)の質量を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。国際純正・応用化学連合(IUPAC)の、原子量および同位体存在度委員会(CIAAW)では、新しく測定されたデータの収集と検討をもとに、2年ごと(奇数年)に原子量表の改定を行っている。これを受けて、日本化学会原子量専門委員会では、毎年4月にその年の原子量表を発表している。以下に示す2024年版の原子量表の数値はIUPACにおいて2021年に承認された原子量の改定*1に基づいている。さらに詳しいことはIUPACのCIAAWの報告書*2および総説*3を参照していただきたい。なお、2019年5月になされた単位の定義改定により、モルの定義はアボガドロ定数に基づく定義へと改定された。これに伴い、従来の $M(^{12}\text{C})=12\text{ g/mol}$ は、不確かさを持つ量となった。ただし、その相対不確かさは 10^{-9} 未満であり、ほとんどの計測において無視できる。

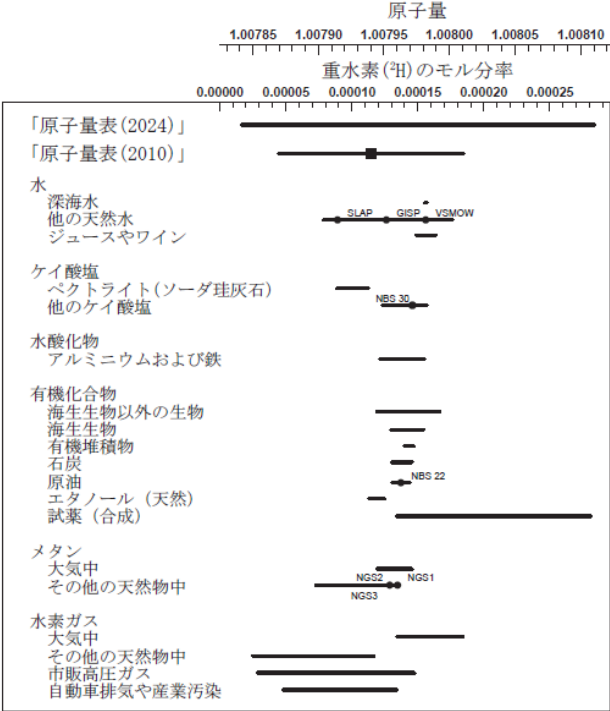
原子量表に記載されている各元素の原子量の値は、単核種元素(一つの安定核種からなる元素)以外の元素では、その元素を含む物質の起源や処理の仕方などによって変わらう。これは原子量がそれぞれの元素を構成している安定核種の相対存在度(元素の同位体比)に依存するからである。測定技術の進歩によって、各元素の同位体存在度はかならずしも一定ではなく、地球上で起こる様々な過程のために変動し、それが原子量に反映されることがわかってきた。そうした背景から、2009年IUPACは10の元素については原子量を単一の数値ではなく、変動範囲で示すことを決定した*4。日本化学会原子量専門委員会ではこの変更について検討し、「原子量表(2011)」以降、IUPACの方針を反映し、このような元素の原子量を変動範囲で、それ以外の元素については従来通り不確かさを伴う単一の数値で示すことにした。

変動範囲による原子量の表記について

現在、水素、リチウム、ホウ素、炭素、窒素、酸素、マグネシウム、ケイ素、硫黄、塩素、アルゴン、臭素、タリウム、鉛の14元素の原子量が変動範囲で示されている。これらの元素は地球上で採取された試料や試薬中の同位体組成の変動が大きいことが知られている。以前は変動範囲が概ね含まれるように原子量の値とその不確かさが定められ、その範囲に含まれない地質学的試料がある場合には“g”，人為的な同位体分別を受けた試薬が一般的に利用されている可能性がある場合には“m”の注が記された。また、このように変動範囲が大きい場合測定技術が進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は“r”という注が記された。例えば水素について様々な試料の同位体組成とそれに対応する原子量を下図に示す。最上段に原子量の変動範囲1.00784~1.00811、次に「原子量表(2010)」の値1.00794±0.00007が示されており、その下に様々な試料で測定された値が示されている。黒丸で示された点は代表的な同位体標準物質の値で、水素の同位体組成の測定精度は“best measurement”*5で±0.000 000 05であり、「原子

量表(2010)」までの値に付けられていた不確かさに比べて1/1000以下である。このような状況において不確かさを伴った単一の数値で表記すると、次のような問題点があった：

- 原子量の不確かさを測定精度と誤解される恐れがある。
- 原子量の値の分布は元素によって様々であり、ガウス分布をすることは限らない。
- 新しい測定がそれまでの原子量の範囲を超えた場合、その値を含むように不確かさだけでなく原子量の値も変更しなければならない可能性がある。
- 定められた原子量の値を持つ実際の物質を見つけることはしばしば難しく、場合によっては不可能である。



この改定でこのような元素の原子量は1つの値ではなく、知られているすべての試料の原子量が含まれるように変動範囲で表され、原子量は一定ではないことを明確に示した。また、この変動範囲の中での分布は原子量表には示されておらず、元素によって様々な分布を持っている*4*6。したがって、下記の点に注意してこの変動範囲を使用する必要がある：

- 変動範囲の中間点を原子量の値、変動幅の半分を不確かさとして表記しないこと。
- 上限、下限の値は地球上の通常物質の測定値に測定誤差を加味して定められているが、それ自体の値は不確かさを持っていない。
- 原子量の値として可能な限りの桁数を与えているので、場合によっては最後の桁がゼロである場合も表記する。

具体的な計算を行う際は下記の例を参考のこと*7：

- 対象とする元素について由来等の情報がなく原子量表の値のみから計算する場合は、不確かさや変動範囲で示されている範囲に真の原子量が同じ確率で存在すると考える(長方形分布)。この場合、計算で用いる原子量の値は変動範囲 $[a, b]$ とすると $(a+b)/2$ であり、標準不確かさは $(b-a)/(2\sqrt{3})$ となる。同様に、原子量が $A \pm u$ で表されている元素においても、正規分布ではなく長方形分布であるとすると、標準不確かさは $u/\sqrt{3}$ となる。

(例) 炭素とモリブデンの原子量

元素	原子量	不確かさの分布	値	標準不確かさ
----	-----	---------	---	--------

C	[12.0096, 12.0116]	長方形分布	12.0106	0.0006
Mo	95.95±0.01	長方形分布	95.95	0.006

132

©2024 日本化学会 原子量専門委員会

89

90 ・分子量などを計算する場合は上記の値と標準不確かさを入
91 れ、誤差伝播の式を用いて求める。

$$92 \quad u^2(M_r) = \sum_E v_E^2 u^2(A_r(E))$$

93 ここで $u(M_r)$ は分子量の標準不確かさ、 $u(A_r(E))$ は元素 E の
94 標準不確かさ、 v_E は元素 E の係数である。

95 (例) エタノール(C₂H₆O)の分子量炭素とモリブデンの原子量

元素/ 分子	原子量	不確かさの 分布	値	標準不確 かさ	係数	不確かさ の寄与
C	[12.0096, 12.0116]	長方形分布	12.010 60	0.000 58	2	0.001 15
H	[1.007 84, 1.008 11]	長方形分布	1.007 975	0.000 078	6	0.000 47
O	[15.999 03, 15.999 77]	長方形分布	15.999 40	0.000 22	1	0.000 22
C ₂ H ₆ O			46.068 45			0.001 26

96 ※炭素の変動範囲が大きいため、エタノールの分子量の標
97 準不確かさの 8 割以上が炭素の寄与である。より精密な
98 分子量が必要な場合は、炭素などの由来を明らかにして
99 文献（例えば*6）や実測により変動範囲を絞って計算す
100 る必要がある。

101 ・より複雑な計算を行う場合、モンテカルロ法による不確か
102 さの解析も行われる。

103

104 *1. IUPAC Inorganic Chemistry Division, CIAAW : STAND-
105 ARD ATOMIC WEIGHT OF LEAD REVISED
106 (<https://iupac.org/standard-atomic-weight-of-lead-revised/>)
107 (<https://www.ciaaw.org/atomic-weights.htm>)

108 *2. T. Prohaska *et al.*: Standard Atomic Weights of the
109 Elements 2021 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*,
110 **94**, 573 (2022). J. Meija *et al.*: Atomic Weights of the Elements
111 2013 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **88**, 265
112 (2016).

113 *3. J. R. De Laeter *et al.*: Atomic Weights of the Elements :
114 Review 2000 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*,
115 **75**, 683 (2003).

116 *4. M. E. Wieser and T. B. Coplen : Atomic Weights of the
117 Elements 2009 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*,
118 **83**, 359 (2011).

119 *5. M. Berglund and M. E. Wieser : Isotopic
120 Compositions of the Elements 2009 (IUPAC Technical
121 Report), *Pure Appl. Chem.*, **83**, 397 (2011).

122 *6. T. B. Coplen and Y. Shrestha : Isotope-abundance
123 variations and atomic weights of selected elements : 2016
124 (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **88**, 1203
125 (2016). (Erratum, *Pure Appl. Chem.*, **91**, 173 (2019))

126 *7. A. M. H. van der Veen *et al.* : Interpretation and use
127 of standard atomic weights (IUPAC Technical Report),
128 *Pure Appl. Chem.*, **93**, 629 (2021). A. Possolo *et al.*:
129 Interpreting and propagating the uncertainty of the
130 standard atomic weights (IUPAC Technical Report), *Pure
131 Appl. Chem.*, **90**, 395 (2018)

原子量表 (2024)

原子量 $A_r(E)$ を原子番号順に元素名および元素記号と共に示した。元素の英語名のうちよく使われるaluminium(アルミニウム)とcaesium(セシウム)は、aluminumやcesiumと表記される場合もある。原子量は、元素により不確かさ付きの単一の値あるいは範囲で示されている。原子量は、統一原子質量単位に対するその原子の平均質量の比として表される。ここで示した不確かさは、通常の物質に対する不確かさであり、測定の不確かさと天然での変動を考慮して示している。この表の備考は、表中の値を超える変動が認められる元素について、その変動の要因(脚注の対応する記号に記載)を示している。14の元素について、通常の物質中の原子量の変動範囲を4列目に $[a, b]$ で示す。この場合、元素Eの原子量 $A_r(E)$ は $a \leq A_r(E) \leq b$ の範囲にある。ある特定の物質に対してより正確な原子量が知りたい場合には、別途求める必要がある。その他の70元素については、原子量 $A_r(E)$ とその不確かさを示す。

Table 1. Standard atomic weights of the elements (Table of Standard Atomic Weights 2024).
Standard atomic weights, $A_r(E)$, are listed in increasing atomic number (column 1) with the element name (column 2) and element symbol (column 3). Commonly used alternative spellings for aluminium and caesium are aluminum and cesium. Standard atomic weights are given as single values (column 4) with uncertainties (column 5) or as intervals (column 4). Standard atomic weights are expressed as the ratio of the average mass of the atom to the unified atomic mass unit. The stated uncertainties (column 5) are uncertainties for normal materials and include evaluations of measurement uncertainty and natural variability. The footnotes (column 6) to this table elaborate the types of variations that may occur for individual elements and that may lie outside the values listed. Standard atomic weight intervals are given in column 4 with the symbol $[a, b]$ to denote the set of atomic weight values in normal materials for 14 elements($a \leq A_r(E) \leq b$ for element E).

1	2	3	4	5	6
原子量 Atomic number	元素 Element	元素記号 Symbol	原子量 Standard atomic weight	不確かさ Uncertainty‡	備考 Footnote
1	水素	hydrogen	H	[1.007 84, 1.008 11]	m
2	ヘリウム	helium	He	4.002 602	g r
3	リチウム	lithium	Li	[6.938, 6.997]	m
4	ベリリウム	beryllium	Be	9.012 1831	0.000 0005
5	ホウ素	boron	B	[10.806, 10.821]	m
6	炭素	carbon	C	[12.0096, 12.0116]	
7	窒素	nitrogen	N	[14.006 43, 14.007 28]	m
8	酸素	oxygen	O	[15.999 03, 15.999 77]	m
9	フッ素	fluorine	F	18.998 403 162	0.000 000 005
10	ネオン	neon	Ne	20.1797	0.0006
11	ナトリウム	sodium	Na	22.989 769 28	0.000 000 02
12	マグネシウム	magnesium	Mg	[24.304, 24.307]	
13	アルミニウム	aluminium	Al	26.981 5384	0.000 0003
14	ケイ素	silicon	Si	[28.084, 28.086]	
15	リン	phosphorus	P	30.973 761 998	0.000 000 005
16	硫黄	sulfur	S	[32.059, 32.076]	
17	塩素	chlorine	Cl	[35.446, 35.457]	m
18	アルゴン	argon	Ar	[39.792, 39.963]	
19	カリウム	potassium	K	39.0983	0.0001
20	カルシウム	calcium	Ca	40.078	0.004
21	スカンジウム	scandium	Sc	44.955 907	0.000 004
22	チタン	titanium	Ti	47.867	0.001
23	バナジウム	vanadium	V	50.9415	0.0001
24	クロム	chromium	Cr	51.9961	0.0006
25	マンガン	manganese	Mn	54.938 043	0.000 002
26	鉄	iron	Fe	55.845	0.002
27	コバルト	cobalt	Co	58.933 194	0.000 003
28	ニッケル	nickel	Ni	58.6934	0.0004
29	銅	copper	Cu	63.546	0.003
30	亜鉛	zinc	Zn	65.38	0.02
31	ガリウム	gallium	Ga	69.723	0.001
32	ゲルマニウム	germanium	Ge	72.630	0.008
33	ヒ素	arsenic	As	74.921 595	0.000 006
34	セレン	selenium	Se	78.971	0.008
35	臭素	bromine	Br	[79.901, 79.907]	
36	クリプトン	krypton	Kr	83.798	0.002
37	ルビジウム	rubidium	Rb	85.4678	0.0003
38	ストロンチウム	strontium	Sr	87.62	0.01
39	イットリウム	yttrium	Y	88.905 838	0.000 002
40	ジルコニウム	zirconium	Zr	91.224	0.002

41	ニオブ	niobium	Nb	92.906 37	0.000 01	
42	モリブデン	molybdenum	Mo	95.95	0.01	g
43	テクネチウム	technetium*	Tc			
44	ルテニウム	ruthenium	Ru	101.07	0.02	g
45	ロジウム	rhodium	Rh	102.905 49	0.000 02	
46	パラジウム	palladium	Pd	106.42	0.01	g
47	銀	silver	Ag	107.8682	0.0002	g
48	カドミウム	cadmium	Cd	112.414	0.004	g
49	インジウム	indium	In	114.818	0.001	
50	スズ	tin	Sn	118.710	0.007	g
51	アンチモン	antimony	Sb	121.760	0.001	g
52	テルル	tellurium	Te	127.60	0.03	g
53	ヨウ素	iodine	I	126.904 47	0.000 03	
54	キセノン	xenon	Xe	131.293	0.006	g m
55	セシウム	caesium	Cs	132.905 451 96	0.000 000 06	
56	バリウム	barium	Ba	137.327	0.007	
57	ランタン	lanthanum	La	138.905 47	0.000 07	g
58	セリウム	cerium	Ce	140.116	0.001	g
59	プラセオジウム	praseodymium	Pr	140.907 66	0.000 01	
60	ネオジウム	neodymium	Nd	144.242	0.003	g
61	プロメチウム	promethium*	Pm			
62	サマリウム	samarium	Sm	150.36	0.02	g
63	ユウロビウム	europium	Eu	151.964	0.001	g
64	ガドリニウム	gadolinium	Gd	157.25	0.03	g
65	テルビウム	terbium	Tb	158.925 354	0.000 007	
66	ジスプロシウム	dysprosium	Dy	162.500	0.001	g
67	ホルミウム	holmium	Ho	164.930 329	0.000 005	
68	エルビウム	erbium	Er	167.259	0.003	g
69	ツリウム	thulium	Tm	168.934 219	0.000 005	
70	イッテルビウム	ytterbium	Yb	173.045	0.010	g
71	ルテチウム	lutetium	Lu	174.9668	0.0001	g
72	ハフニウム	hafnium	Hf	178.486	0.006	g
73	タンタル	tantalum	Ta	180.947 88	0.000 02	
74	タングステン	tungsten	W	183.84	0.01	
75	レニウム	rhenium	Re	186.207	0.001	
76	オスミウム	osmium	Os	190.23	0.03	g
77	イリジウム	iridium	Ir	192.217	0.002	
78	白金	platinum	Pt	195.084	0.009	
79	金	gold	Au	196.966 570	0.000 004	
80	水銀	mercury	Hg	200.592	0.003	
81	タリウム	thallium	Tl	[204.382, 204.385]		
82	鉛	lead	Pb	[206.14, 207.94]		
83	ビスマス	bismuth*	Bi	208.980 40	0.000 01	
84	ポロニウム	polonium*	Po			
85	アスタチン	astatine*	At			
86	ラドン	radon*	Rn			
87	フランシウム	francium*	Fr			
88	ラジウム	radium*	Ra			
89	アクチニウム	actinium*	Ac			
90	トリウム	thorium*	Th	232.0377	0.0004	g
91	プロトアクチウム	protactinium*	Pa	231.035 88	0.000 01	
92	ウラン	uranium*	U	238.028 91	0.000 03	g m
93	ネプツニウム	neptunium*	Np			
94	プルトニウム	plutonium*	Pu			
95	アメリシウム	americium*	Am			
96	キュリウム	curium*	Cm			
97	バーケリウム	berkelium*	Bk			
98	カリホルニウム	californium*	Cf			
99	アインスタイニウム	einsteinium*	Es			
100	フェルミウム	fermium*	Fm			
101	メンデレビウム	mendelevium*	Md			
102	ノーベリウム	nobelium*	No			
103	ローレンシウム	lawrencium*	Lr			
104	ラザホージウム	rutherfordium*	Rf			
105	ドブニウム	dubnium*	Db			
106	シーボーギウム	seaborgium*	Sg			
107	ボーリウム	bohrium*	Bh			
108	ハッシウム	hassium*	Hs			
109	マイトネリウム	meitnerium*	Mt			
110	ダームスタチウム	darmstadtium*	Ds			

111	レントゲニウム	roentgenium*	Rg
112	コペルニシウム	copernicium*	Cn
113	ニホニウム	nihonium*	Nh
114	フレロビウム	flerovium*	Fl
115	モスコビウム	moscovium*	Mc
116	リバモリウム	livermorium*	Lv
117	テネシン	tennessine*	Ts
118	オガネソン	oganesson*	Og

- * : 安定同位体がなく放射性同位体だけがある元素。ただし、Bi, Th, Pa, Uの4元素は例外で、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。
- ‡ : $A_r(E)$ とその不確かさは、通常物質に与えられたもので、測定の不確かさや原子量が適用可能な天然での変動から評価されている。通常物質中の原子量は、本表で示された最小値と最大値の範囲に高い確度で収まっている。もし $A_r(E)$ の不確かさが、測定可能な原子量の変動を示す目的には大きすぎる場合、個々の試料の測定によって得られる $A_r(E)$ の不確かさはより小さくなることもある。
- g : 当該元素の同位体組成が通常物質が示す変動幅を越えるような地質学的なあるいは生物学的な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。
- 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。表中の原子量および不確かさは通常物質に適用されるものとする。
- * : Element has no stable isotope, only radioactive isotopes. For four elements (Bi, Th, Pa, and U) a standard atomic weight is tabulated because these elements have a characteristic terrestrial isotopic composition; for the other 34 elements a standard atomic weight cannot be determined.
- ‡ : $A_r(E)$ values and their uncertainties are given for normal materials and include evaluations of measurement uncertainty as well as natural variations in atomic weight where applicable. The atomic weight of a normal material is expected to lie within the lower and upper endpoints of the standard atomic weight with great certitude. If the uncertainty in $A_r(E)$ is considered too large for a user's purpose for an element with measurable variations in atomic weight, a value of $A_r(E)$ with a lower uncertainty might be obtained by measurement of an individual specimen.
- g : Geological and biological materials 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 materials and that given in the table may exceed the stated uncertainty.
- m : Modified isotopic compositions may be found in commercially available material because the material has been subjected to some 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 standard atomic weight being given; the tabulated value and uncertainty should be applicable to normal material.

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、ただし、¹²Cは核及び電子が基底状態にあ
4 る中性原子である。))
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

元素名	元素 記号	原子 番号	原子量	脚注
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
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
ユウロピウム	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		

#: 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。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。
- 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。

©2010 日本化学会 原子量委員会

12

13

1 **Standard Atomic Weights 2010**

2 (Scaled to $A_r(^{12}\text{C})=12$, where ^{12}C is a neutral atom in its
3 nuclear and electronic ground state)

4 The atomic weights of many elements are not invariant but
5 depend on the origin and treatment of the material. The
6 standard values of $A_r(\text{E})$ and the uncertainties (in
7 parentheses, following the last significant figure to which
8 they are attributed) apply to elements of natural terrestrial
9 origin. The footnotes to this table elaborate the types of
10 variation which may occur for individual elements and
11 which may be larger than the listed uncertainties of values
12 of $A_r(\text{E})$. Names of elements with atomic number 112 to 118
13 are provisional.

Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes
Hydrogen	H	1	1.00794 (7)	g m r
Helium	He	2	4.002602 (2)	g r
Lithium	Li	3	[6.941 (2)] [†]	g m r
Beryllium	Be	4	9.012182 (3)	
Boron	B	5	10.811 (7)	g m r
Carbon	C	6	12.0107 (8)	g r
Nitrogen	N	7	14.0067 (2)	g r
Oxygen	O	8	15.9994 (3)	g r
Fluorine	F	9	18.9984032 (5)	
Neon	Ne	10	20.1797 (6)	g m
Sodium	Na	11	22.98976928 (2)	
Magnesium	Mg	12	24.3050 (6)	
Aluminium	Al	13	26.9815386 (8)	
Silicon	Si	14	28.0855 (3)	r
Phosphorus	P	15	30.973762 (2)	
Sulfur	S	16	32.065 (5)	g r
Chlorine	Cl	17	35.453 (2)	g m r
Argon	Ar	18	39.948 (1)	g r
Potassium	K	19	39.0983 (1)	
Calcium	Ca	20	40.078 (4)	g
Scandium	Sc	21	44.955912 (6)	
Titanium	Ti	22	47.867 (1)	
Vanadium	V	23	50.9415 (1)	
Chromium	Cr	24	51.9961 (6)	
Manganese	Mn	25	54.938045 (5)	
Iron	Fe	26	55.845 (2)	
Cobalt	Co	27	58.933195 (5)	
Nickel	Ni	28	58.6934 (4)	r
Copper	Cu	29	63.546 (3)	r
Zinc	Zn	30	65.38 (2)	r
Gallium	Ga	31	69.723 (1)	
Germanium	Ge	32	72.64 (1)	
Arsenic	As	33	74.92160 (2)	
Selenium	Se	34	78.96 (3)	r
Bromine	Br	35	79.904 (1)	
Krypton	Kr	36	83.798 (2)	g m
Rubidium	Rb	37	85.4678 (3)	g
Strontium	Sr	38	87.62 (1)	g r
Yttrium	Y	39	88.90585 (2)	
Zirconium	Zr	40	91.224 (2)	g
Niobium	Nb	41	92.90638 (2)	
Molybdenum	Mo	42	95.96 (2)	g r
Technetium*	Tc	43		
Ruthenium	Ru	44	101.07 (2)	g
Rhodium	Rh	45	102.90550 (2)	
Palladium	Pd	46	106.42 (1)	g
Silver	Ag	47	107.8682 (2)	g

Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes
Cadmium	Cd	48	112.411 (8)	g
Indium	In	49	114.818 (3)	
Tin	Sn	50	118.710 (7)	g
Antimony	Sb	51	121.760 (1)	g
Tellurium	Te	52	127.60 (3)	g
Iodine	I	53	126.90447 (3)	
Xenon	Xe	54	131.293 (6)	g m
Caesium (Cesium)	Cs	55	132.9054519 (2)	
Barium	Ba	56	137.327 (7)	
Lanthanum	La	57	138.90547 (7)	g
Cerium	Ce	58	140.116 (1)	g
Praseodymium	Pr	59	140.90765 (2)	
Neodymium	Nd	60	144.242 (3)	g
Promethium*	Pm	61		
Samarium	Sm	62	150.36 (2)	g
Europium	Eu	63	151.964 (1)	g
Gadolinium	Gd	64	157.25 (3)	g
Terbium	Tb	65	158.92535 (2)	
Dysprosium	Dy	66	162.500 (1)	g
Holmium	Ho	67	164.93032 (2)	
Erbium	Er	68	167.259 (3)	g
Thulium	Tm	69	168.93421 (2)	
Ytterbium	Yb	70	173.054 (5)	g
Lutetium	Lu	71	174.9668 (1)	g
Hafnium	Hf	72	178.49 (2)	
Tantalum	Ta	73	180.94788 (2)	
Tungsten	W	74	183.84 (1)	
Rhenium	Re	75	186.207 (1)	
Osmium	Os	76	190.23 (3)	g
Iridium	Ir	77	192.217 (3)	
Platinum	Pt	78	195.084 (9)	
Gold	Au	79	196.966569 (4)	
Mercury	Hg	80	200.59 (2)	
Thallium	Tl	81	204.3833 (2)	
Lead	Pb	82	207.2 (1)	g r
Bismuth*	Bi	83	208.98040 (1)	
Polonium*	Po	84		
Astatine*	At	85		
Radon*	Rn	86		
Francium*	Fr	87		
Radium*	Ra	88		
Actinium*	Ac	89		
Thorium*	Th	90	232.03806 (2)	g
Protactinium*	Pa	91	231.03588 (2)	
Uranium*	U	92	238.02891 (3)	g m
Neptunium*	Np	93		
Plutonium*	Pu	94		
Americium*	Am	95		
Curium*	Cm	96		
Berkelium*	Bk	97		
Californium*	Cf	98		
Einsteinium*	Es	99		
Fermium*	Fm	100		
Mendelevium*	Md	101		
Nobelium*	No	102		
Lawrencium*	Lr	103		
Rutherfordium*	Rf	104		
Dubnium*	Db	105		
Seaborgium*	Sg	106		
Bohrium*	Bh	107		
Hassium*	Hs	108		
Meitnerium*	Mt	109		
Darmstadtium*	Ds	110		
Roentgenium	Rg	111		
Copernicium*	Cn	112		
Ununtrium*	Uut	113		
Ununquadium*	Uuq	114		

Name	Symbol	Atomic Number	Atomic Weight	Footnotes
Ununpentium*	Uup	115		
Ununhexium*	Uuh	116		
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.