

る投与計画、での実施が求められる。さらに、臨床投与量の範囲内でウイルス/ベクター排出の投与量依存性の影響を評価することを考慮するのもよい。臨床での投与経路に加え、全身性投与における排出プロファイルを調べるために静脈内 (IV) 投与を行うことも考えられるが、静脈内投与は暴露に関して最悪のケースとは限らない。例えば、頭蓋内投与でウイルスの感染・増殖が局所でおこる場合、局所での活性が排出プロファイルに影響する可能性があるが、これは静脈内投与では反映されない。従って、静脈内投与を排出の評価の規定値として用いる場合には、その妥当性を示す必要がある。

#### C.1.4 サンプルの頻度と試験期間

ウイルス/ベクター投与後のサンプリング頻度の決定に、野生型株の既知の生物学的特性を利用することができる。一般に、投与後最初の数日間は、一過性の排出プロファイルを検出するために、より高い頻度でサンプルを採取することが適切である。排泄物・分泌物の量が限られることから、サンプルの数と頻度は現実性を考慮して決定すべきである。単回投与後の排出プロファイルをまず調べ、そのデータを複数回投与でのサンプリング頻度の決定に用いることができる。

体内分布試験の結果はウイルス/ベクターの組織中での持続性評価に有用と考えられる。ウイルス/ベクターが腎臓、肺、血中など特定の組織で長期間持続する場合、排出の分析期間は数値の低下が認められる同様のタイムコースで実施することが望ましい。生体内分布期間より長く排出が持続する場合、排出を検出する適切な期間での試験の実施が必要である。増殖性ウイルス/ベクターの場合、増殖を示唆する第2のピークの検出に十分な試験期間をとることが重要である。複数の連続する試料が陰性となれば、排出試験を終了してよいと考えられる。排出試験には感度の高い定量的アッセイ法を

用いること、またアッセイ効率は低濃度のウイルス/ベクターを十分正確に測定できることが重要である。

潜伏感染、再活性化するウイルス/ベクター製品（細菌を含む）では、動物モデルで人と同様に潜伏感染や再活性化を見ることは難しい。

また、免疫応答はウイルス/ベクターを血中から除去し排出の期間を短縮化する可能性があるため、データの解釈で考慮する必要がある。

現在実施されている細菌療法には、各治療サイクルの後で抗生物質投与により細菌感染のクリアランスが行われるというものがある。これは非臨床試験で評価すべきであり、短期間（2,3ヶ月まで）の効果は動物モデルで容易に評価可能と考えられる。抗生物質治療を繰り返すことによる選択圧力は、投与した細菌の「遺伝的ドリフト」を誘導し、生物学的特性や排出パターンの変化を導く可能性があると考えられる。

#### C.1.5 サンプルの採取

採取するサンプルは、ウイルス/ベクターの特性、投与経路及び動物種、生体内分布プロファイルを考慮して決定すべきである。最も一般的に採取されるサンプルの例は尿と糞便であるが、ほかに口腔スワブ（ぬぐい液）、鼻腔スワブ、唾液、気管支洗浄液などのサンプルを含めることもできる。

定量的で適格性が確認された分析試験を実施するためには、採取するサンプルの種類と採取量を考慮することが重要である。尿のように、分泌物・排泄物の種類によっては十分量のサンプルを採取することが困難な場合、十分なサンプル量を得るために同一量を同時に投与された複数の動物から得られるサンプルをプールすることが選択肢のひとつと考えられる。投与群あたりで必要となるサンプルと採取の間隔、サンプル数は、分析の一貫性、信頼性が得られるに十分なものであることが必要である。また、適切なサンプルの取扱と保存も重要である。

### C.1.6 非臨床データの解釈と伝播試験

非臨床の排出試験で得られたデータは、特に臨床での排出試験で採取すべきサンプルの種類やサンプリング頻度、試験期間の設定に有用である。もしも非臨床試験で排出が検出され、感染性試験で増殖能が確認された場合、伝播の可能性が動物実験により示される可能性がある。臨床試験でのヒトからヒトへの伝播の可能性を予測する上で、同居感染試験の実施が有用なこともあるが、人と動物では排出されたウイルス/ベクターの伝播の経路が異なることに注意すべきである。一度排出が確認されたら、伝播に関する適切な結論を得るために、臨床での伝播の可能性を臨床で綿密にモニターすることが必要であろう。

### C.2 臨床における排出試験

臨床での排出試験を実施するには、試験の実施時期、試験計画、ウイルス/ベクターの生物特性とウイルス/ベクターの伝播の可能性と結果など、考慮すべき原則が多々ある。

現在使用されているウイルス/ベクターのほとんどは非増殖性あるいは制限増殖性であり、由来する野生型ウイルスの感染によっておこるウイルス血症と比較して、排出は短期間と考えられ、また、投与経路によっては、野生型とは異なる排出プロファイルを示すことが予測される。野生型株について知られている感染経路に関する情報が、排出試験のデータの解釈と伝播の可能性の推定に役立つと考えられる。

前述の非臨床での考慮事項、すなわち投与経路、観察された排出の期間、採取すべきサンプルの種類と頻度などは、臨床での排出試験を計画するうえでも当てはまる。臨床での排出試験を計画する際に考慮すべき主要な要素としては、親ウイルス/ベクターの既知の生物学的特性、製品の増殖能、投与量、投与経路及び患者集団

が挙げられる。

ウイルス/ベクターの投与経路と投与量は排出パターンに影響する。例えば、静脈内投与は同じウイルス/ベクター製品の局所投与と比べて、より広範囲に拡散し、排出の可能性も高まる。採取すべきサンプルの種類にも影響する可能性がある。ウイルス/ベクターの高用量の投与も組織・臓器での分布や排出のタイミングに影響する可能性がある。臨床試験に登録される患者集団とその免疫状態も、ウイルス/ベクターの排出期間を決定する際に考慮すべきであろう。

ウイルス/ベクターの排出試験は可能であればより早い時期に実施すべきであろう。伝播のリスクが高く、公衆衛生に影響する可能性のあるウイルス/ベクターの場合、排出試験は初期の臨床試験で実施すべきである。公衆衛生上の懸念が低い場合には、臨床投与量が確定した後（用量増加試験終了後）に排出試験を開始するのでも良い場合もあるかもしれない。

排出に関する十分なデータが第一相試験において得られた場合、第二相試験での排出試験の省略が妥当な場合もある。第二相試験で排出試験を追加実施する必要性に影響する要素としては、投与経路や投与計画が同じかどうか、収集したデータの質と一貫性、収集したデータが患者の排出パターンを予測しうる信頼性があるかどうかなどが考えられる。代表的な排出プロファイルが得られるように適切な患者数での試験を計画することが必要である。排出試験は独立して実施する必要はなく、本来の臨床研究プロトコールに入れることができる。考慮すべき重要な点として、患者のサンプルの採取と試験における品質管理プログラムがある。例えば、患者のサンプルは汚染が最小限となるように採取し、サンプルの分解が最小となるように一定の期間内にアッセイするか、試験を後で実施する場合にはサンプルを即座に凍結保存することが必要である。

### C.2.1 サンプルの採取頻度と期間

非臨床及び類似の臨床試験から得られたデータは、サンプリングの期間と頻度を定めるのに役立つ。採取頻度は試験が良く管理され、データが一定である限り、非臨床試験をベースに考えればよいであろう。サンプリング頻度は非臨床と同様、一過性の排出を検出するには、投与直後の数日はより高頻度のサンプル採取を行う必要がある。採取頻度の一例として、1日目、3日目、7日目、以後28-30日目までは週に一度、さらにその後はより低頻度で収集するという方法がある。サンプリング頻度はウイルス/ベクターの増殖能にも依存し、増殖性の場合、サンプルの採取期間は投与後に起こりうる2回目の排出ピークの検出を考慮する必要がある。

サンプリングの期間と頻度は患者集団や臨床適用、併用する治療法、患者の免疫状態にも影響を受ける可能性がある。ウイルス/ベクターに対する免疫応答は排出プロファイルを変え、強力な免疫応答はウイルス/ベクターのクリアランスを早め、結果的にウイルス/ベクターの排出期間および排出量を減らす可能性がある。遺伝的に改変されたウイルス/ベクターに対する免疫応答は、野生型とは異なる可能性があることに注意が必要である。

増殖性ウイルスの場合、免疫不全患者は免疫機能が保たれている患者とはウイルスクリアランスパターンが異なり、2回目の感染ピークが免疫力のある患者よりも顕著になることが考えられるので、サンプリングのタイミングと排出期間の再評価が必要であろう。免疫不全患者や免疫抑制剤の使用がウイルス/ベクターの排出に与える影響についても考慮すべきである。腫瘍溶解性ウイルスの多くは、排出を長期化させる可能性がある免疫抑制効果を持つ化学療法剤と共に投与されている。

サンプリングは連続する3回のデータがア

ッセイの検出限界(LOD)以下になるまで継続すべきであろう。ウイルス/ベクターの量が検出限界以下にならない場合でも、継続して低下傾向を示す場合には、少なくとも連続する3回のデータポイントでプラトーであることを示すまで採取を継続すべきであろう。

ウイルス/ベクターの複数回投与が必要な臨床試験では、サンプル採取の時期は単回投与よりも長期間となる。同じウイルス/ベクターの単回投与により得られた排出データが複数回投与でのサンプル採取の目安となる。

ウイルス/ベクターの種類によっては、排出試験の終了後に再活性化を示す臨床的兆候が認められたり、長期間にわたり低レベルの排出が持続することもありうる。このような場合、被験者のサンプリングの再開を考慮すべきである。一例として、がん治療における細菌の投与では、患者で細菌の再活性化または低レベル排出が認められる可能性がある。他の例として、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスは、再活性化されるまで潜伏感染する生物学的特性を持つウイルスをベースにしたものである。

### C.2.2 サンプルの採取

非臨床試験で収集されたデータは臨床で採取すべきサンプルの決定に役立つであろう。上述のように、最も一般的に採取されるサンプルは尿、糞便、唾液であるが、ウイルス/ベクターの特性と臨床試験での投与経路に依存し、追加のサンプルを含めることができる。例えば、頭頸部がんの腫瘍内投与では、鼻咽頭洗浄液・ぬぐい液の採取も考慮する必要があるかもしれない。また、ウイルス/ベクターを皮内又は皮下に投与する場合、投与部位を拭ったものを排出の確認用サンプルとして採取することもある。ウイルスの既知の感染経路が鼻エアロゾルを介する場合、鼻腔スワブをサンプルとして採取することが必要であろう。

腫瘍溶解性ウイルスの多くは、主な投与経路

は腫瘍内であり、その後、腫瘍切除を行う。ウイルス投与後に外科手術を行う場合、ウイルスの増殖と周辺組織への拡散の有無をバイオプシーにより確認することが有用である。バイオプシーの結果から、患者でのウイルスの拡散と感染のリスクおよび第三者への伝播の可能性に関する有用な情報を得られる可能性がある。

適切な分析試験を実施するためには十分量の試料を採取すべきであり、可能であれば必要に応じて再試験を実施できるだけの量を得る必要がある。サンプルの質としては、交差汚染がなく、試験期間中安定なことが必要であろう。

血液サンプルの qPCR による分析は、血液中にウイルス/ベクターが存在する可能性（例えば、手術時や開放創があるとき）を評価したいときに有用な情報が得られると考えられる。

### C.2.3 臨床での排出試験データの解釈

臨床での排出試験データの評価と排出されたウイルス/ベクターの伝播のリスク評価に際して考慮すべき重要な要素のひとつは、排出物の同定と特性解析である。特に、インタクトなウイルス/ベクターと、分解あるいは非感染性のものを区別できない分析法を用いた場合、得られたデータからは伝播のリスクはわからないため、定量 PCR などの分析法は感染性試験と組み合わせることが望ましい。定量 PCR で検出された排出物の量が感染性試験の検出限界以下の場合、試験の感度の制約から、感染性試験を行わないかもしれないが、インタクトなウイルス/ベクターと非感染性あるいは分解物を区別できない試験のみを実施する場合、排出物は感染性があると見なすべきであろう。

伝播のリスクを評価するうえで、ウイルス/ベクターがどのように排出されるのかを明らかにすべきであり、野生型株の自然感染の経路を考慮する必要がある。例えば、エアロゾルを介して飛散するウイルスでは、唾液や鼻咽頭ぬぐい液中に排出が認められた場合、他の経路

(尿中等)からの排出と比較して、伝播の可能性はより高いと考えられる。また、排出量と期間も考慮すべきであり、増殖性ウイルス/ベクターは、患者体内に長期間持続し、量も増えて結果的に伝播の可能性が高まる。

非病原性株に由来するウイルス/ベクターは病原性株に由来するものと比べて排出時の懸念は低いかもしれないが、増殖性や弱毒化の程度などの他の生物学的特性にも依存する。ウイルス/ベクターに導入遺伝子が組み込まれている場合には、発現される導入遺伝子産物の安全性プロファイルや導入遺伝子がウイルス/ベクターの表現型の特徴に及ぼす影響も考慮すべきである。

非増殖性ウイルスは第三者への伝播のリスクは増殖性ウイルスより低い、製造工程で組換えが起こり、わずかな量の増殖性ウイルス (RCV) が生じる可能性があり、このようにして出現した RCV は、野生型親株と同様の健康への懸念、伝播の可能性がある。最終的には、安全性情報は臨床試験から得ることが必要となる。

## C.3 伝播

投与後、患者から排出が観察されたとしても、直ちに伝播が起こることを意味するものではないので、臨床プロトコールには伝播の評価を含めるべきである。データにより導かれた伝播の可能性とその結果に関するリスク評価が理論的であり入手可能な場合、第三者への有害事象の有無にかかわらず、実施すべきである。これらの知見に基づいて、企業は臨床試験及び製造承認後の伝播の評価の必要性や評価の省略を正当化できると考えられる。

### C.3.1 ウイルス/ベクターの伝播の評価の原則

以下、ウイルス/ベクターの伝播の可能性の評価と、伝播が起こったときの第三者への結果の評価で考慮すべき要素について述べる。

感染性のあるウイルス/ベクターの排出量と

排出期間を評価すべきである。この情報は、伝播の可能性がウイルス/ベクターの由来する親株の感染に必要な既知の感染価と相関する可能性があるのので有用である。また、伝播が最も起こりやすい時期、たとえば投与直後（医療従事者への伝播）なのかあるいは投与から遅れて出るのか（家族や病院内の他の患者、一般人への伝播）ということを考慮すべきである。この評価は臨床での排出ピークと相関し、ウイルス/ベクターの増殖性にも依存すると考えられる。

ウイルス/ベクターの生物学的特性も考慮すべきであり、最も重要なのは排出物の増殖性である。排出物が感染性であっても、必ずしも第三者で増殖することを意味するものではなく、増殖しない場合でも伝播の可能性はある。第三者への伝播リスクを考慮すると、一般市民での野生型・親株に対する既存の免疫力に関する情報が有用であり、その株に対する免疫が広範に認められれば伝播リスクは一般に低くなり、製品は排出状況に関わらず安全と見なされる可能性がある。一方、患者が免疫力を持たない、あるいは免疫力が低下した人と接触する可能性について常に注意すべきであろう。

### C.3.2 臨床における伝播の評価

臨床試験に参加した患者で排出が観察され、排出の量と期間から第三者への伝播とその結果が起こり得る可能性がある場合、リスクアセスメントを実施すべき、あるいは伝播が公衆衛生に与える影響に関する研究を実施すべきである。これは既存の臨床プロトコルの枠内で実施できるかもしれないが、市販後の場合、臨床試験の枠組みで医薬品による伝播の可能性に関する全体像を描くことはできないと考えられるので、リスク管理計画の一環としてモニタリングの継続が不可欠であろう。

ウイルス/ベクターが増殖性の場合や患者の排出データが第三者への伝播に著しい懸念を示すような場合、伝播のリスクが最大となる医

療従事者、ホームケア提供者、家族などのモニタリングが必要であろう。伝播による感染の兆候を明らかにすることが重要であり、これは野生型の親ウイルス/ベクターの感染の兆候や治療用遺伝子からの発現産物の生物活性とも関連する可能性がある。

伝播を示唆する何らかの兆候が見られた場合、モニタリングは健康状態に関する問診などの非侵襲的な方法でも行えるが、適切な調査を実施すべきである。このようなモニタリングは、ワクシニアの伝播・増殖による皮膚病変のように、伝播による感染で明らかな臨床症状が期待される場合に最も有効であるが、多くの場合、モニタリングにはウイルスに対する抗体反応や、治療用タンパク質やバイレミアの証拠を調べるための血液のサンプリングを含めるべきである。また、ウイルス/ベクターの排出を評価するサンプルの採取も考慮すべきである。この場合、望ましいサンプルは、本来の臨床試験での排出に関する知見に依存し、ウイルス/細菌/ベクターの検出に適したアッセイ（qPCRや感染性試験）を実施すべきである。

### C.3.2 伝播のリスクと結果の解釈

伝播の程度を評価できる利用可能な臨床データ、伝播の可能性に関する理論的リスク評価及び公衆衛生に関する想定される影響に基づいて、以下の点について結論を出すべきである。

- a) 投与後、ウイルス/ベクターの大量の排出が観察されるか
- b) ウイルス/ベクターは容易に第三者に感染するか
- c) 感染により第三者に健康影響が生じるか
- d) 製品の投与により公衆衛生上のリスクが生じるか（第三者への伝播）

評価する患者数や密接な接触者の数が少ない場合、伝播が起こらないことを確実に示すことは困難かもしれない。この場合、販売承認時に、製品のファーマコビジランスとリスク管理

プログラム(安全性監視市販後調査)の一部として、伝播に関するリスク評価計画を取り込むことが必要であろう。伝播は観察されても健康影響が最小限という場合も、上記と同様のアプローチ、すなわち伝播に関する市販後の評価が必要であろう。さらに、患者への情報文書には、投与後の伝播を最小限に抑えるためにとるべき手段の詳細に関するアドバイスを入れるべきである。

#### D. 結論

遺伝子治療用医薬品の規制に関する国際調和と推進のための基盤的研究の一環として、今年度は遺伝子治療用ベクターや腫瘍溶解性ウイルス製品を投与した患者の排泄物からのウイルスやベクターの排出に関する基本的な考え方に関する ICH 見解を基に、今後、排出と伝播のリスク評価に国際調和ガイドラインに盛り込むべき要件として、特に非臨床試験及び臨床試験での排出試験のあり方と伝播のリスク評価の観点から考察した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ken Nishimura, Masayuki Sano, Manami Ohtaka, Birei Furuta, Yoko Umemura, Yoshiro Nakajima, Yuzuru Ikehara, Toshihiro Kobayashi, Hiroaki Segawa, Satoko Takayasu, Hideyuki Sato, Kaori Motomura, Eriko Uchida, Toshie Kanayasu-Toyoda, Makoto Asashima, Hiromitsu Nakauchi, Teruhide Yamaguchi and Mahito Nakanishi: Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming, *J. Biol. Chem.*, 286, 4760–4771 (2011)
  - 2) 小木 美恵子、石丸 幸大、西脇 基晃、宮脇 英明、内田 恵理子、得永 嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、信学技報 US2010-97, 31-34 (2011)
  - 3) 奥田晴宏、川崎ナナ、内田恵理子、山本美智子、宮田直樹: 薬の名前 ステムを知られば薬がわかる 第 50 回、*Pharm Tech Japan*, 26(10), 1927-1936 (2010)
- ##### 2. 学会発表
- 1) 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博: カルシウム結合蛋白質 S100A8 による HL-60 細胞の増殖抑制、第 11 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム、2010 年 6 月、東京
  - 2) 内田恵理子、古田美玲、鈴木和博、佐藤功栄、岩田明子、山口照英: 抗体医薬品のウイルス安全性確保のためのウイルス除去カラムの開発、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
  - 3) 古田美玲、内田恵理子、豊田淑江、中西真人、西村健、大高真奈美、山口照英: 持続発現型センダイウイルスベクターの CGD 遺伝子治療への応用、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
  - 4) 押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、山口照英、鈴木和博: カルシウム結合タンパク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球様分化において増殖・分化に重要な働きをする (その 3)、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月、神戸
  - 5) 小木美恵子、石丸幸大、西脇基晃、宮脇 英明、内田恵理子、得永嘉昭: 遺伝子導入用インパルス応力波素子開発のための実験的検討、電子情報通信学会超音波研究会、

2011年1月、京都

- 6) 小木 美恵子、西脇 基晃、會澤 康治、  
内田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用  
インパルス応力波の創発に関する基礎研  
究、日本音響学会 2011 年春季研究発表会、  
2011 年 3 月、東京
- 7) 會澤 康治、西脇 基晃、小木 美恵子、内  
田 恵理子、得永 嘉昭：遺伝子導入用レー  
ザ誘起インパルス応力波発生素子に関す  
る研究、第 58 回応用物理学関係連合講演  
会、2011 年 3 月、横浜
- 8) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：  
造血支持能を持つフィーダー細胞膜タン  
パク質の機能解析、第 10 回日本再生医療  
学会総会、2011 年 3 月、東京
- 9) 内田恵理子、岡田義昭、水澤左衛子、柚木  
幹広、辻川宗男、皆木隆男、稲田耕一、小  
西久郎、五十嵐正志、鈴木光、嘉悦洋、下  
瀬克郎、萩原克郎、安江博、生田和良、鈴  
木和博、山口照英：E 型肝炎ウイルスの核  
酸増幅検査（NAT）評価用標準パネルの  
樹立、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3  
月、静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当なし

## 医薬品一般試験法の国際調和を促進するための研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所薬品部長  
協力研究者 加藤くみ子 国立医薬品食品研究所薬品部室長  
協力研究者 大島裕希 国立医薬品食品衛生研究所

### 要 旨

PDG(日米欧三薬局方調和検討会議)において調和されたとされ、さらに ICH-Q4B において三極規制当局によって相互受け入れのための検討が終了しつつある 4つの製剤試験（注射剤の不溶性微粒子試験法、製剤均一性試験法、崩壊試験法、溶出試験法）について、日局、USP、EP の取り込み状況を再確認した。その結果、試験法については国際調和が大きく進捗したものの、各局とも規制上の運用が長年行われて来た試験法であり、様々な製品への適用という点では、依然として相違が大きいことが確認された。今後さらなる努力が必要と考えられる。

#### A. 研究目的

医薬品の承認申請の際に規制当局に提出すべきデータや審査に必要な資料の要件に関する国際調和は ICH 等の国際調和活動によって進捗している。医薬品の品質関連分野においても、申請に必要な資料等に関する基本的な要件は国際調和されてきた。しかし、品質特性の解析あるいは品質管理に用いられる試験法については、ICH の場では扱われていない。この点については ICH 品質ガイドラインでは、ICH-Q6A 規格および試験法ガイドラインの中に、主要な品質試験法については局方一般試験法の国際調和に委ねる旨のステートメントが記されているのみである

日米欧の局方の国際調和は従来 PDG 日米欧三薬局方調和検討会議の場で行われてきており、現在のところ、調和対象は一般試験法と医薬品添加物各条である。一般試験法については、

上記 ICH-Q6A に具体的に調和すべき試験として上げられた製剤試験を中心とした試験について調和が進捗している。さらに、ICH では Q4B が開始され、PDG で調和された試験法について、三極の規制当局が受け入れ可能であるか、さらに可能な場合は受け入れ条件についての確認を国際調和活動として行っている。

しかしながら、現在までに PDG で調和を終え、さらに Q4B において三極の規制当局で受け入れ条件の確認がほぼ終了している試験法についても、長年それぞれの極で運用されてきた歴史があるために、試験法が国際調和されたとされているものの、非調和部分も含み、また各局方への取り込みの過程で問題が生じているケースもある。

そこで、本分担研究では国際調和されたとされている薬局方製剤試験の中でも、医薬品の品質管理に適用されるケースの多い、(1)注射剤



の不溶性微粒子試験法、(2)製剤均一性試験法、(3)崩壊試験法、(4)溶出試験法 について、現在の日米欧三薬局方の試験法における記載を比較し、相違部分について考察した。

## B. 研究方法

日本薬局方については日局 15 および 3 月 24 日告示された日局 16、欧州薬局方は 6.7、米国薬局方は USP34-NF29 について、注射剤の不溶性微粒子試験、製剤均一性試験、崩壊試験、溶出製試験について比較を行い、相違点を整理した。

## C. 研究結果

### (C-1) 注射剤の不溶性微粒子試験法

日局と USP との相違点 (資料 1, 資料 2 のマーキングを参照)

- (1) USP においては特に筋肉注射や皮下注射による注射剤は不溶性微粒子試験が必要との記載がある。
- (2) USP では方法 1 (光遮断粒子計数法) のキャリブレーションは 10~25 $\mu$ m の既知サイズの球形粒子を用いて行う (USP 校正用粒子) と記されているのみである。一方日局は独自の方法 (JIS 法) を詳細に記載している。
- (3) 方法 1 の判定: 100mL の注射剤は USP は判定法 B, 一方日局は判定法 A を採用している。

日局と EP との相違点 (資料 1, 資料 3 のマーキングを参照)

- (1) 方法 1 のキャリブレーション: 10~25 $\mu$ m の既知サイズの球形粒子を用いて行うのみ記されている。一方日局は独自の方法を詳細に規定している。
- (2) 方法 1 の判定: 100mL の注射剤は EP は判定法 B, 一方日局は判定法 A を採用。

日局は方法 1 (光遮蔽粒子計数法) のキャリブレーション法について JIS に従った方法を採用している。一方 USP と EP はキャリブレーションについては詳細な記載は行わずに、校正用球状粒子を用いるとしているが USP は独自の標準粒子を準備している。日局については、既に JIS 法は改訂されており、日局キャリブレーション法も改訂が必要という指摘がされている。

100mL 用量の注射剤についての判定が日局と USP と EP とは異なっているが、日局の限度値の方がより厳しい判定である。

注射剤の不溶性微粒子試験については、

- (1) 現在設定されている限度値の合理性は明確ではなく、一方現在市場にある製品に混入している粒子数ははるかに少ないという指摘がある。また安全性の観点ではより小さい粒径の粒子についても配慮すべきとの指摘もある。しかし、変更するとすると、限度値を厳しくとった場合の影響など、広範囲にわたる製品に関する市場調査が必要と考えられる。
- (2) 方法 2 の判定に用いられる限度値は、微粒子試験用水の粒子数の限度値 (方法 1 で測定) より小さいという矛盾があり、適切な改正が必要という指摘がある。しかし両者は計数の方法が違い、通常方法 1 の方が計数は多くなるので、数値だけで比較することはできない。

### (C-2) 製剤均一性試験法

日局と USP との相違点 (資料 4, 資料 5 のマーキングを参照)

- (1) 適用対象について日局は「錠剤、カプセル剤、散剤または顆粒剤の分包品、アンプル入りの注射剤等」と適用対象を例示しているが、USP は特段に指定していない。一方両者とも適用しない製剤として外用の皮膚適用製剤である懸濁剤、乳剤、ゲル剤をあ

げている。ただし日局における適用対象の特定が局方間に相違を生んでいるとは考えられない。

- (2) 両局方とも 25mg/25%の閾値に達しなかった場合でも、製造工程のバリデーション及び製剤開発のデータから最終製剤の有効成分の濃度の相対標準偏差(RSD)が2%以下であることが示された場合には、質量偏差試験を適用できるとしている。ただし、USPはその条件として「含量均一性試験を実施すれば、その判定基準を満たすこと」と追加的な一文が付記されている。その後、上記 2%RSD除外ルールについては、FDAは米国規制当局として認めないとの指摘があり、今後このルールを削除する方針がUSPから明らかにされている。

日局とEPとの相違点 (資料4、資料6のマーケティングを参照)

- (1) 適用対象について日局は「錠剤、カプセル剤、散剤または顆粒剤の分包品、アンプル入りの注射剤等」と適用対象を例示しているが、EPは適用対象を特段に指定していない。一方両者とも適用しない製剤として外用の皮膚適用製剤である懸濁剤、乳剤、ゲル剤をあげている。またEPには総合ビタミン剤あるいは微量元素製剤については、製剤均一性試験の対象としないとの一文が挿入されている。
- (2) 両局方とも 25mg/25%の閾値に達しなかった場合でも、製造工程のバリデーション及び製剤開発のデータから最終製剤の有効成分の濃度の相対標準偏差(RSD)が2%以下であることが示された場合には、質量偏差試験を適用できるとしている。日局ではこの 2%RSD 除外ルールの適用製剤を硬カプセル、素錠又はフィルムコーティング錠としているが、EPは適用の特定はなく、すべての製剤でこのルールの適用が可能とな

っている。

2%RSD 除外ルールについては、米国は認めず、一方欧州ではこのルールを広く活用しようという方向にある。これは国際調和試験法の国際調和の過程において、質量偏差試験の適用条件を厳しくする 25mg/25%ルールをEPが受け入れるにあたって、2%除外ルールをあわせて採用することを条件としたことが影響していることを覗わせる。一方USPはGMP上の検証事項である2%RSDルールを公的基準書の各条で適用することは事実上不可能であること等を理由として、今後USPからは削除する方針を表明した。以上の方針の違いは、各局方が医薬品規制体制の中で役割が異なることと関係していることによるとも思われ、局方の完全な国際調和の困難さを象徴する問題といえる。

なお適用対象とする医薬品の記述については、各局方における製剤の定義の違い、局方が適用される医薬品の違いとも関係していると考えられる。

### (C-3) 崩壊試験法

日局とUSPとの相違点 (資料7、資料8のマーケティングを参照)

- (1) 日局は適用対象として錠剤、カプセル剤以外に、顆粒剤、シロップ用剤、丸剤が含まれる。顆粒剤、シロップ用剤を適用対象とするため、独自に補助筒および補助筒を用いた操作法の記述がある。
- (2) USPではバツカル錠、舌下錠について独自の操作法の記述がある。また軟カプセル剤と硬カプセル剤についても独立した操作法が記載されている。
- (3) 腸溶錠の第一液での崩壊時間に違いがある (USPは1時間、日局は2時間)。

日局とEPとの相違点 (資料7、資料9のマーケティングを参照)

- (1) 日局では崩壊試験装置は一種類であるが、EP では 18mm 以上の長さの錠剤あるいはカプセル剤を試験するために、大きな径の管が組み込まれている装置が TEST B として規定されている。
- (2) EP では日局に記載されている腸溶錠について操作法の記載はない。

以上のように、標準的サイズの装置および錠剤やカプセル剤に関する操作はほぼ調和されているものの、顆粒剤、シロップ用剤は日局独自の装置および操作法、バッカル錠、舌下錠の操作は USP 独自の操作法、大型の錠剤、カプセル剤は EP 独自の装置および操作法がそれぞれ設定されている。

#### (C-4) 溶出試験法

日局と USP との相違点 (資料 10、資料 11 のマーキングを参照)

- (1) 日局では溶出試験法を「著しい生物学的非同等を防ぐ試験法」として位置づけている。
- (2) USP ではゼラチンカプセルあるいはゼラチンコート錠剤では、pH6.8 以下の溶出液では精製ペプシン(750,000/1000mL)の添加を、pH6.8 以上の溶出液ではパンクレアチニン(1750USPunit/1000mL)の添加が認められている。
- (3) 回転バスケット法では日局のベッセルの容量は 1L のみ認められているが、USP は 2L あるいは 4L も認められている。
- (4) USP で認められている往復シリンダ法は日局では採用されていない。
- (5) 装置の較正は、USP は回転バスケット法、パドル法、往復シリンダ法用に用意されているが、日局は特にない。
- (6) 回転バスケット法およびパドル法による即放錠の試験で USP では Pooled Sample 法が認められているが、日局には記載はない。
- (7) 腸溶性製剤は日局では酸性と中性の試験液

での溶出試験を別に行うこととなっているが、USP では酸性試験液に引き続き中性領域の緩衝液に代えて溶出を測定することとなっている。

- (8) フロースルーセル法による腸溶性製剤の試験は USP では回転バスケット法やパドル法と同様に実施することとされているが、日局では試験法の設定はない。
- (9) 結果の判定において、日局は国際調和試験法の採用以前からの判定法を判定法 2 として採用しているが、USP は判定法 1 (Q 値による方法) のみである。

日局と EP との相違点 (資料 10、資料 12 のマーキングを参照)

- (1) 日局では溶出試験を「著しい生物学的非同等を防ぐ方法」として位置づけている。
- (2) EP で認められている往復シリンダ法は日局では認められていない。
- (3) 腸溶性製剤は日局では酸性と中性の試験液での溶出試験を別に行うこととなっているが、EP では酸性試験液に引き続き中性領域の緩衝液に代えて溶出を測定する。
- (4) 結果の判定において、日局は国際調和試験法の採用以前からの方法を判定法 2 として採用しているが、EP は Q 値による方法のみである。
- (5) EP では溶出試験法ガイダンスが追加的に記載されており、試験条件、溶出試験液、装置の検証、溶出試験規格に関する解説がまとめられている。

溶出試験においては、(1)往復シリンダ法は日局で認められていない、(2)判定法 2 は日局独自である、という大きな非調和部分がある。さらに判定法 1 (Q 値法) についても、日局は統計的に不合理な判定法であり、また GMP 上の担保が前提となっている方法と考えており、推奨していない。

## D. 考察

注射剤の不溶性微粒子試験法については、方法1(光遮蔽粒子計数法)のキャリブレーションに日局とEP, USPとの間に違いがあるが、方法論に基本的な違いはない。しかし、この試験については限度値についての合理性に疑問の聲がでており、今後その見直しの提案がなされる可能性がある。しかしながら、一般用医薬品までも関係する日局の見直しについては、国内的にも十分な調査が必要と考えられる。

製剤均一性試験法については、国際調和試験法が作成される過程において、折衷策として設定された2%RSD除外の規定が、米国、欧州においてそれぞれ逆方向に反対の姿勢が表面化し、現実的には不調和が顕在化している。また、適用対象とする製剤の範囲については、改正の提案が引き続きされるものと考えられる。さらに製剤均一性試験の判定法に関する統計的合理性については、引き続き問題提起がされるものと予想される。

崩壊試験法については、基本的な装置については調和試験法となったものの、引き続き個別の製剤の取り扱いについては、独自の装置、操作法の設定は引き続き続くことが予想される。

溶出試験法については、試験装置については日局が往復シリンダ法を採用していない点を除いて、調和されているといえる。しかし、日局は、溶出試験を「著しい生物学的非同等性を防ぐ」試験法と位置づけていること、判定法1(Q値法)を推奨していない点など、実質的な調和にはなっていない。

## E. 結論

検討対象とした各試験法については、試験装置や基本的な操作法については国際調和が大きく進捗していることが確認された。しかし一方で、各局とも規制上の運用が長年行われて来た試験法であり、製品群への実際の適用という

点では、依然として相違が大きいことが確認された。今後さらなる調和に向けた努力、戦略が必要と思われる。

## F. 参考資料

資料1. 日局 注射剤の不溶性微粒子試験法 (6.07)

資料2. USP PARTICULATE MATTER IN INJECTIONS<788>

資料3. EP PARTICULATE CONTAMINATION: SUB-VISIBLE PARTICLES (2.9.19)

資料4. 日局 製剤均一性試験法 (6.02)

資料5. USP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS <905>

資料6. EP: UNIFORMITY OF DOSAGE UNITS (2.9.40)

資料7. 日局 崩壊試験法 (6.09)

資料8. USP DISINTEGRATION <701>

資料9. EP DISINTEGRATION OF TABLETS AND CAPSULES (2.9.1)

資料10. 日局 溶出試験法 (6.10)

資料11. USP DISSOLUTION <711>

資料12. EP DISSOLUTION TEST FOR SOLID DOSAGE FORMS (2.9.3)

## G 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kadoya, S., Fujii, K., Izutsu, K., Yonemochi, E., Terada, K., Yomota, C., Kawanishi, T.: Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols, *Int J Pharm*, **389**, 107-113, (2010)
- 2) Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Tada, M., Kobayashi, T., Kanayasu-Toyoda, T., Kawanishi, T., Yamaguchi, T.: Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and

Fc-fusion proteins to human neonatal FcR, *J Immunol.*, **184**, 1968-76 (2010)

- 3) H.Shibata, C.Saito, C.Yomota, T.Kawanishi, Ammonium ion level in serum affects doxorubicin release from liposomes. *Pharmazie*, **651**, 251-253 (2010)
- 4) K. Izutsu, K. Fujii, C. Katori, C. Yomota, T. Kawanishi, Y. Yoshihashi, E. Yonemochi, K. Terada, Effects of solute miscibility on the micro- and macroscopic structural integrity of freeze-dried solids, *J. Pharm. Sci.* **99**, 4710-4719 (2010)
- 5) Sakai-Kato, K., Saito, E., Ishikura, K., Kawanishi, T.: Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B AnalytTechnol Biomed Life Sci*,**878**, 1466-1470 (2010)
- 6) Izutsu, K. I., Yomota, C., Kawanishi, T., Stabilization of liposomes in frozen solutions through control of osmotic flow and internal solution freezing by trehalose., *J Pharm Sci*(in press)
- 7) Miyazaki, T., Aso, Y., Yoshioka, S., Kawanishi, T., Differences in crystallization rate of nitrendipine enantiomers in amorphous solid dispersions with HPMC and HPMCP., *In J.Pharm*, **407**, 111-118 (2011)
- 8)川西 徹: バイオ後続品の開発状況とその評価、*ジェネリック研究*, **4**, 5-18 (2010)
- 9) 川西 徹: 製剤総則の改正、*薬局* **62**, 2598-2605 (2011)
- 10) 川西 徹: 製剤試験法、*薬局* **62**, 2654-2657 (2011)

## 2. 学会発表

なし

て操作する。

各注射筒から得られる採取容量は表示された1回の投与量以上である。

### 3. カートリッジ剤又は充てん済みシリンジ剤

表示量が、10mL以上の場合は1個、3mLを超え10mL未満の場合は3個、3mL以下の場合は5個をとり、付属の注射針、押し子、注射筒などがある場合にはそれらを装着し、各容器の全内容物を、注射針の中が空にならないようにして、ゆっくりと一定速度で押し子を押しながら質量既知の乾いたピーカーへ排出する。内容物の質量(g)を密度で除して容量(mL)を求める。個々の製剤の採取容量は表示量以上である。

### 4. 輸液剤

容器1個をとり、測定しようとする容量が40%以上となる乾燥したメスシリンダー中に全内容物を排出し、容量を測定する。製剤の採取容量は表示量以上である。

## 6.06 注射剤の不溶性異物検査法

注射剤の不溶性異物検査法は、注射剤中の不溶性異物の有無を調べる検査法である。

### 1. 第1法

溶液である注射剤及び用時溶解して用いる注射剤の溶剤はこの方法による。

容器の外部を清浄にし、白色光源の直下、約1000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するとき、澄明で、たやすく検出される不溶性異物を認めてはならない。ただし、プラスチック製水性注射剤容器を用いた注射剤にあつては、上部及び下部に白色光源を用いて8000~10000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するものとする。

### 2. 第2法

用時溶解して用いる注射剤はこの方法による。

容器の外部を清浄にし、異物が混入しないよう十分に注意して添付された溶解液又は注射用水を用いて溶解し、白色光源の直下、約1000lxの明るさの位置で、肉眼で観察するとき、澄明で、明らかに認められる不溶性異物を含んではならない。

## 6.07 注射剤の不溶性微粒子試験法

本試験法は、三薬局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

なお、三薬局方で調和されていない部分は「<sup>◆</sup>」で囲むことにより示す。

注射剤(輸液剤を含む)の不溶性微粒子とは、これら製剤中に意図することなく混入した、気泡ではない容易に動く外来性、不溶性の微粒子である。

不溶性微粒子を測定する方法は2種あり、第1法(光遮蔽粒子計数法)又は第2法(顕微鏡粒子計数法)で試験する。第1法での試験を優先するが、場合によってはまず第1法で試験し、次に第2法で試験する必要がある。すべての注射剤が両法で試験できるとは限らず、透明性が低い若しくは粘性の高い乳剤、コロイド、リポソーム、又はセンサー内で気泡を生じる注射剤など、

第1法で試験できない場合は第2法で試験する。注射剤の粘度が高く試験に支障をきたす場合は、必要に応じて適当な液で希釈し、粘度を下げた試験する。

本試験は一部のサンプルを対象として行われる抜取試験であるため、母集団の微粒子数を正しく推定するには、統計学的に適切なサンプリング計画の下で試験が行われなければならない。

### 1. 第1法 光遮蔽粒子計数法

#### 1.1. 装置

微粒子の粒径及び各粒径の粒子数を自動的に測定できる光遮蔽原理に基づいた装置を用いる。<sup>◆</sup>校正、試料容量精度、試料流量及び計数精度の検証を少なくとも1年1回以上行うことが必要である。<sup>◆</sup>

#### 1.1.1. <sup>◆</sup>校正

校正用粒子は、少なくとも粒径が5 $\mu$ m、10 $\mu$ m及び25 $\mu$ mの真球状のポリスチレン系の単分散粒子(PSL粒子)を用いて粒径感度測定を行う。PSL粒子は、国内又は国際的な長さのトレーサビリティを持ち、不確かさが3%以内とする。校正用粒子は微粒子試験用水に分散させる。

#### 1.1.1.1. 手動法

装置自身を用い、閾値設定チャンネルを少なくとも3チャンネル用いて、ウィンドー移動式ハーフカウント法で粒子感度の測定を行う。ウィンドーは測定粒径の $\pm 20\%$ とする。指定の粒径の粒子感度測定終了後、粒子感度測定点から製造会社の指定する方法により粒径応答曲線を作成し、装置の5 $\mu$ m、10 $\mu$ m及び25 $\mu$ mの閾値を求める。

#### 1.1.1.2. 電気法

多チャンネル波高分析器を用い、手動法と同じウィンドー移動式ハーフカウント法で粒子感度の測定を行い、製造会社の指定する方法により粒子感度測定点より粒径応答曲線を作成し、装置の5 $\mu$ m、10 $\mu$ m及び25 $\mu$ mの閾値を求める。この場合、製造会社又はユーザーは、手動法と同じ結果が得られることを検証しなければならない。

#### 1.1.1.3. 自動法

装置の粒径応答曲線は、装置の製造会社が供給するソフトウェア又はユーザーが作成したソフトウェアを用いて求めてもよいが、製造会社又はユーザーは、手動法と同じ結果が得られることを検証しなければならない。

#### 1.1.2. 試料容量精度

試料容量精度は、試験液10mLを測定し、試験液の減少を質量法で測定した場合に測定容量の5%以内とする。

#### 1.1.3. 試料流量

センサーに導入する試料の流量は、測定容量と測定時間から算出し、製造会社の指定流量の範囲であることを確認する。

#### 1.1.4. 計数精度

微粒子検出センサーの計数率及び粒径分解能は、同一型式のセンサーであっても部品精度、組立精度により個々のセンサーによって変わる可能性がある。また、閾値設定精度も確認する必要があるため、計数参照標準溶液(10 $\mu$ m PSL粒子、1000個/mL $\pm 10\%$ 、CV値5%以下)を用いて、粒径分解能、計数率及び閾値設定精度を試験する。なお、測定中は試料の濃度を均一にするためかき混ぜる。

#### 1.1.4.1. 粒径分解能

次のいずれかの方法を用いて測定し、試験粒径と総計数の16%及び84%を計数する閾値粒径との差が10%以内であるこ

と。ただし、電気法及び自動法は手動法と同じ結果が得られることを検証しなければならない。

- (i) 装置の計数値から作成したヒストグラムの広がりを求める手動法
- (ii) 装置の応答信号を多チャンネル波高分析器を用いて分級し、そのヒストグラムの広がりを求める電気法
- (iii) 製造会社又はユーザーが作成したソフトウェアを用いて試験粒子の応答信号のヒストグラムの広がりを求める自動法

#### 1.1.4.2. 計数率

5 $\mu$ m以上の計数値から1mL当たり763~1155個であること。

#### 1.1.4.3. 閾値設定精度

5 $\mu$ m以上の計数値の50%を計数する閾値粒径が試験粒子の平均粒径の $\pm 5\%$ 以内であること。

### 1.2. 一般注意事項

試験は外部から微粒子が混入しない条件下、できればクリーンキャビネット中で行う。メンブランフィルター以外のろ過器及びガラス器具は、加温した洗剤液で十分に洗浄した後、水でよくすすいで洗剤が残らないようにする。また、使用直前に微粒子試験用水でろ過器の内外を上から下へ洗い流す。試験液の一部を、測定用容器に移すときには気泡が入らないように特に注意する。ガラス器具は清潔か、微粒子試験用水の微粒子数は規定内であるかなど、5mLの微粒子試験用水を用いて下記の操作を行い、試験環境が適切かどうかを検査する。測定は5回行い、10 $\mu$ m以上の微粒子数が25mL中25個を超える場合は、試験環境は適切でない判断する。この場合、試験環境が適切となるまで、微粒子試験用水を再測定すると共に、ガラス器具及びろ過器の洗浄を繰り返す。

### 1.3. 操作法

容器を20回連続して、ゆっくり上下を反転させ内容物を混和する。容器に封がしてある場合は注意して刺がす。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。容器は2分間放置するか、超音波を照射するなど適切な方法により、内部溶液の気泡を除く。

25mL以上の注射剤は個々の容器について試験する。25mL未満の注射剤は10個以上の容器の内容物を集め、清潔な容器にまとめて入れ、25mL以上となるようにする。適当と判断できれば、微粒子試験用水で希釈し、25mLとしてもよい。微粒子試験用水が適当でない場合、微粒子について微粒子試験用水と同等の他の適当な溶剤を用いることができる。

粉末注射剤の場合、微粒子試験用水に溶解する。微粒子試験用水が適当でない場合、微粒子について微粒子試験用水と同等の他の適当な溶剤を用いることができる。

試料数は統計的に適切な数とする。25mL以上の注射剤については、適切なサンプリング計画に従って10容器以下とすることができる。

試験液を5mL以上ずつ4画分採取し、10 $\mu$ m以上及び25 $\mu$ m以上の微粒子数を計測する。最初の画分の計測値は棄却し、残りの計測値から試験液の平均微粒子数を計算する。

### 1.4. 判定

平均微粒子数が下記に規定する値のときは適合とする。規定する値を超えたときは、第2法で試験する。

A：表示量が100mL以上 $\blacklozenge$ の注射剤

1mL当たり10 $\mu$ m以上のもの25個以下、25 $\mu$ m以上のもの3個以下。

B：表示量が100mL未満の注射剤

容器当たり10 $\mu$ m以上のもの6000個以下、25 $\mu$ m以上のもの600個以下。

## 2. 第2法 顕微鏡粒子計数法

### 2.1. 装置

双眼顕微鏡、微粒子捕集用ろ過器及びメンブランフィルターを用いる。

顕微鏡は、対物測微計で検定した接眼測微計、メンブランフィルターを保持し、ろ過部位すべてにわたって動かすことのできる可動ステージ及び照明装置を備えたもので、100 $\pm$ 10倍に調節する。接眼測微計は円形直径目盛り付きレンズ(図6.07-1)で、十字線で四分円に分けられた円視野目盛り領域(GFOV)と呼ばれる大円、100倍の倍率で直径10 $\mu$ m及び25 $\mu$ mの透明及び黒色の参照円、及び10 $\mu$ m刻みの直線目盛りからなる。国内又は国際的な規格機関によって保証されたステージ測微計を用いて検定するとき、直線目盛りの相対誤差は $\pm 2\%$ 以内である。

照明装置は、二つの照明器を備えており、一つは顕微鏡内の上部からの視野照射、他は外部からの焦点可動補助照明器で10~20°斜角照射ができる。

微粒子捕集用ろ過器は、ガラス又は試験に支障をきたさない材質で製したフィルターホルダーとメンブランフィルターから構成され、吸引装置を備えている。メンブランフィルターは、適切なサイズの黒色又は灰色でかつ格子付き又は格子付きでないもので、孔径は1.0 $\mu$ m以下である。

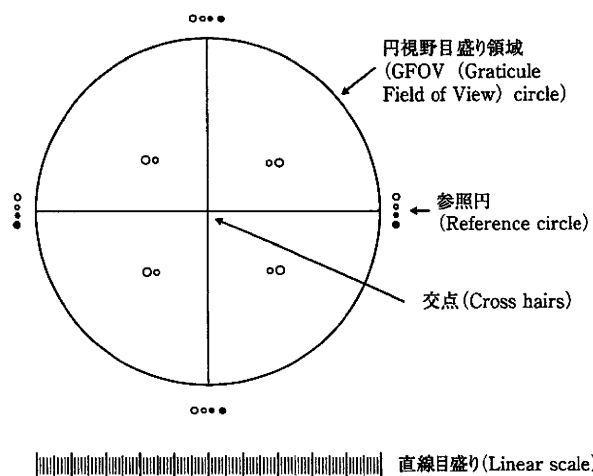


図6.07-1 円形直径目盛り

### 2.2. 一般注意事項

試験は外部から微粒子が混入しない条件下、できればクリーンキャビネット中で行う。

ガラス器具及びメンブランフィルター以外のろ過器は、加温した洗剤液で十分に洗浄した後、水でよくすすいで洗剤が残らないようにする。また、使用直前に微粒子試験用水でメンブランフィルター及びろ過器の内外を上から下へ洗い流す。

ガラス器具やメンブランフィルターは清潔か、微粒子試験用水の微粒子数は規定内であるかなどについて、50mLの微粒子試験用水を用いて下記の操作を行い、試験環境が適切であるかどうかを検査する。メンブランフィルターのろ過部分にある10 $\mu$ m以上の微粒子数が20個を超える場合、又は25 $\mu$ m以上の微粒子数が5個を超える場合は、試験環境は適切でない判断する。この場合、試験環境が適切となるまで、微粒子試験用水

を再測定すると共に、ガラス器具及びろ過器の洗浄を繰り返す。

### 2.3. 操作法

容器を20回連続して、ゆっくり上下を反転させ内容物を混和する。容器に封がしてある場合は注意して剥がす。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。

25mL以上の注射剤は個々の容器について試験する。25mL未満の注射剤は10個以上の容器の内容物を集め、清潔な容器に移す。適当と判断できれば、微粒子試験用水で希釈し、25mLとしてもよい。微粒子試験用水が適当でない場合、微粒子について微粒子試験用水と同等の他の適当な溶剤を用いることができる。

粉末注射剤の場合、微粒子試験用水に溶解する。微粒子試験用水が適当でない場合、微粒子について微粒子試験用水と同等の他の適当な溶剤を用いることができる。

試料数は統計的に適切な数とする。25mL以上の注射剤については、適切なサンプリング計画に従って10容器以下とすることができる。

フィルターホルダーにメンブランフィルターを取り付け、ホルダー内部を数mLの微粒子試験用水で濡らす。複数の容器から集めた試験液又は1容器中の試験液を、必要ならば漏斗に徐々に注いで、吸引ろ過する。ろ過後、微粒子試験用水を噴射し、フィルターホルダーの内壁を洗い込む。メンブランフィルターの表面に水分がなくなるまで吸引を行う。このフィルターをペトリ皿に移し、覆いをわずかに開けてフィルターを風乾する。風乾後、ペトリ皿を顕微鏡のステージ上に置き、反射光下、メンブランフィルター上にある10 $\mu$ m以上及び25 $\mu$ m以上の微粒子を計数する。フィルターの一視野の微粒子を計数し、計算によりフィルター上の全微粒子数を求めてもよい。試験製剤の平均微粒子数を算出する。

円形直径目盛りを用いて微粒子の大きさを決める過程では、各微粒子の形状を円形とみなし、10 $\mu$ m及び25 $\mu$ mの参照円と比較して行うが、その際、視野目盛り領域内の微粒子を移動させたり、参照円と重ねてはならない。白色及び透明な微粒子の大きさは、透明な円の内径を用いて測定し、暗色粒子の大きさは、黒の参照円の外径を用いて測定する。

顕微鏡粒子計数法では無定形、半固形、又はメンブランフィルター上の汚れ若しくは変色したように見える形状が不明瞭なものについては、大きさや数が測定されない。これらの物質は表面の凹凸がほとんどなく、ゼラチン状又はフィルム様の外観を呈している。そのような物質の微粒子数の測定には、第1法が役立つ。

### 2.4. 判定

平均微粒子数が下記に規定する値のときは適合とする。

A：表示量が100mL<sup>◆</sup>以上の注射剤

1mL当たり10 $\mu$ m以上のもの12個以下、25 $\mu$ m以上のもの2個以下。

B：表示量が100mL未満の注射剤

容器当たり10 $\mu$ m以上のもの3000個以下、25 $\mu$ m以上のもの300個以下。

### ◆3. 試薬

微粒子試験用水：孔径0.45 $\mu$ m以下のメンブランフィルターを通した水で、自動微粒子測定装置を用いて測定した不溶性微粒子数は、10mL当たり10 $\mu$ m以上のもの5個以下、25 $\mu$ m以上

のもの2個以下である。◆

## 6.08 点眼剤の不溶性微粒子試験法

点眼剤の不溶性微粒子試験法は、点眼剤中の不溶性微粒子の大きさ及び数を試験する方法である。

### 1. 装置

測定装置には、顕微鏡、不溶性微粒子捕集用ろ過装置及び測定用メンブランフィルターを用いる。

- (i) 顕微鏡：顕微鏡には対物測微計で検定した接眼測微計、可動ステージ及び照明装置を備え、倍率は100倍に調整する。
- (ii) 不溶性微粒子捕集用ろ過器：不溶性微粒子捕集用ろ過器は、ガラス又は試験に支障をきたさない材質で製したフィルターホルダーとクリップからなり、直径25mm又は13mmの測定用メンブランフィルターを取り付けて、減圧で使用できるろ過器である。

(iii) 測定用メンブランフィルター：測定用メンブランフィルターは、白色、直径25mm又は13mm、孔径10 $\mu$ m以下、一辺約3mmの格子付きで、あらかじめ試験するとき、フィルター上に25 $\mu$ m以上の微粒子を認めないものを用いる。必要ならば微粒子試験用水を用いて洗浄する。

### 2. 試薬

(i) 微粒子試験用水：用時、孔径0.45 $\mu$ m以下のメンブランフィルターを用いてろ過して製した水で、10 $\mu$ m以上の不溶性微粒子数は、100mL当たり10個以下である。

### 3. 操作法

#### 3.1. 水性点眼剤

操作は、塵埃の少ない清浄な設備又は装置内で注意して行う。フィルターホルダーに測定用メンブランフィルターを取り付け、クリップで固定し、フィルターホルダーの内側を微粒子試験用水で洗浄した後、微粒子試験用水200mLを1分間20～30mLの速度で吸引ろ過する。メンブランフィルター上から水がなくなるまで吸引し、メンブランフィルターを取り出し、平底ペトリ皿に入れ、ふたをずらして50℃以下で十分に乾燥する。乾燥後、ペトリ皿を顕微鏡のステージに置き、照明装置を用いて落射し、メンブランフィルターの格子を可動ステージの座標軸に合わせ、不溶性微粒子を最も見やすいように調節した後、可動ステージを移動させながら、有効ろ過面上の150 $\mu$ m以上の微粒子数を測定し、その個数が1個以下であることを確かめる。微粒子の大きさは最長径とする。

次に別のメンブランフィルターをフィルターホルダーに取り付け、クリップで固定し、フィルター内部を微粒子試験用水数mLで潤す。試料は容器の外部を清浄にし、数回倒立するようにして穏やかに振り混ぜた後、キャップを開け、ノズル部分の外部を清浄にした後、あらかじめ微粒子試験用水でよく洗浄したメスシリンダーに入れる。この操作を繰り返し、試験用溶液25mLを調製する。これをフィルター内壁に沿うようにして徐々に注ぎ、常にフィルター上に試料を保つよう穏やかに吸引する。粘稠な試料は、あらかじめ微粒子試験用水又は適当な希釈用溶液で適当に薄めて同様にろ過する。メンブランフィルター上の試料が少量になったとき、微粒子試験用水又は適当な希釈用溶液30mLでフィルターホルダーの内壁を洗うように加え



## 〈 788 〉 PARTICULATE MATTER IN INJECTIONS

This general chapter is harmonized with the corresponding texts of the *European Pharmacopoeia* and/or the *Japanese Pharmacopoeia*. These pharmacopoeias have undertaken not to make any unilateral change to this harmonized chapter. Portions of the present general chapter text that are national USP text, and therefore not part of the harmonized text, are marked with symbols (◆) to specify this fact.

Particulate matter in injections and parenteral infusions consists of extraneous mobile undissolved particles, other than gas bubbles, unintentionally present in the solutions.

◆ As stated in *Injections* 〈 1 〉, solutions for injection administered by the intramuscular or subcutaneous route must meet the requirements of *Particulate Matter in Injections* 〈 788 〉.

(Official August 1, 2011)

*Particulate Matter in Injections* 〈 788 〉 *Particulate Matter in Injections* 〈 788 〉 *Particulate Matter in Injections* 〈 788 〉

◆ For the determination of particulate matter, two procedures, *Method 1 (Light Obscuration Particle Count Test)* and *Method 2 (Microscopic Particle Count Test)*, are specified hereinafter. When examining injections and parenteral infusions for subvisible particles, *Method 1* is preferably applied. However, it may be necessary to test some preparations by the *Light Obscuration Particle Count Test* followed by the *Microscopic Particle Count Test* to reach a conclusion on conformance to the requirements.

Not all parenteral preparations can be examined for subvisible particles by one or both of these methods. When *Method 1* is not applicable, e.g., in the case of preparations having reduced clarity or increased viscosity, the test should be carried out according to *Method 2*. Emulsions, colloids, and liposomal preparations are examples. Similarly, products that produce air or gas bubbles when drawn into the sensor may also require microscopic particle count testing. If the viscosity of the preparation to be tested is sufficiently high so as to preclude its examination by either test method, a quantitative dilution with an appropriate diluent may be made to decrease viscosity, as necessary, to allow the analysis to be performed.

The results obtained in examining a discrete unit or group of units for particulate matter cannot be extrapolated with certainty to other units that remain untested. Thus, statistically sound sampling plans must be developed if valid inferences are to be drawn from observed data to characterize the level of particulate matter in a large group of units.

### METHOD 1 LIGHT OBSCURATION PARTICLE COUNT TEST

Use a suitable apparatus based on the principle of light blockage that allows for an automatic determination of the size of particles and the number of particles according to size. The definition for *particle-free water* is provided in *Reagent Specifications* under *Reagents, Indicators, and Solutions*.

The apparatus is calibrated using dispersions of spherical particles of known sizes between 10 µm and 25 µm. These standard particles are dispersed in *particle-free water*. Care must be taken to avoid

aggregation of particles during dispersion. ◆ System suitability can be verified by using the *USP Particle Count RS*.

### General Precautions

The test is carried out under conditions limiting particulate matter, preferably in a laminar flow cabinet. Very carefully wash the glassware and filtration equipment used, except for the membrane filters, with a warm detergent solution, and rinse with abundant amounts of water to remove all traces of detergent. Immediately before use, rinse the equipment from top to bottom, outside and then inside, with *particle-free water*.

Take care not to introduce air bubbles into the preparation to be examined, especially when fractions of the preparation are being transferred to the container in which the determination is to be carried out.

In order to check that the environment is suitable for the test, that the glassware is properly cleaned, and that the water to be used is particle-free, the following test is carried out: determine the particulate matter in 5 samples of *particle-free water*, each of 5 mL, according to the method described below. If the number of particles of 10  $\mu\text{m}$  or greater size exceeds 25 for the combined 25 mL, the precautions taken for the test are not sufficient. The preparatory steps must be repeated until the environment, glassware, and water are suitable for the test.

### Method

Mix the contents of the sample by slowly inverting the container 20 times successively. If necessary, cautiously remove the sealing closure. Clean the outer surfaces of the container opening using a jet of *particle-free water* and remove the closure, avoiding any contamination of the contents. Eliminate gas bubbles by appropriate measures such as allowing to stand for 2 minutes or sonicating.

For large-volume parenterals, single units are tested. For small-volume parenterals less than 25 mL in volume, the contents of 10 or more units are combined in a cleaned container to obtain a volume of not less than 25 mL; the test solution may be prepared by mixing the contents of a suitable number of vials and diluting to 25 mL with *particle-free water* or with an appropriate particle-free solvent when *particle-free water* is not suitable. Small-volume parenterals having a volume of 25 mL or more may be tested individually.

Powders for parenteral use are reconstituted with *particle-free water* or with an appropriate particle-free solvent when *particle-free water* is not suitable.

The number of test specimens must be adequate to provide a statistically sound assessment. For large-volume parenterals or for small-volume parenterals having a volume of 25 mL or more, fewer than 10 units may be tested, using an appropriate sampling plan.

Remove four portions, not less than 5 mL each, and count the number of particles equal to or greater than 10  $\mu\text{m}$  and 25  $\mu\text{m}$ . Disregard the result obtained for the first portion, and calculate the mean number of particles for the preparation to be examined.

### Evaluation

For preparations supplied in containers with a nominal volume of more than 100 mL, apply the criteria of *Test 1.A*.

For preparations supplied in containers with a nominal volume of less than 100 mL, apply the criteria of *Test 1.B*.

For preparations supplied in containers with a nominal volume of 100 mL, apply the criteria of *Test 1.B*. [NOTE—*Test 1.A* is used in the *Japanese Pharmacopeia*.]

If the average number of particles exceeds the limits, test the preparation by the *Microscopic Particle Count Test*.

**Test 1.A** (Solutions for parenteral infusion or solutions for injection supplied in containers with a nominal content of more than 100 mL)—The preparation complies with the test if the average number of particles present in the units tested does not exceed 25 per mL equal to or greater than 10  $\mu\text{m}$  and does not exceed 3 per mL equal to or greater than 25  $\mu\text{m}$ .

**Test 1.B** (Solutions for parenteral infusion or solutions for injection supplied in containers with a nominal content of less than 100 mL)—The preparation complies with the test if the average number of particles present in the units tested does not exceed 6000 per container equal to or greater than 10  $\mu\text{m}$  and does not exceed 600 per container equal to or greater than 25  $\mu\text{m}$ .

## METHOD 2 MICROSCOPIC PARTICLE COUNT TEST

Use a suitable binocular microscope, a filter assembly for retaining particulate matter, and a membrane filter for examination.

The microscope is adjusted to  $100 \pm 10$  magnifications and is equipped with an ocular micrometer calibrated with an objective micrometer, a mechanical stage capable of holding and traversing the entire filtration area of the membrane filter, and two suitable illuminators to provide episcopic illumination in addition to oblique illumination.

The ocular micrometer is a circular diameter graticule (see *Figure 1*)

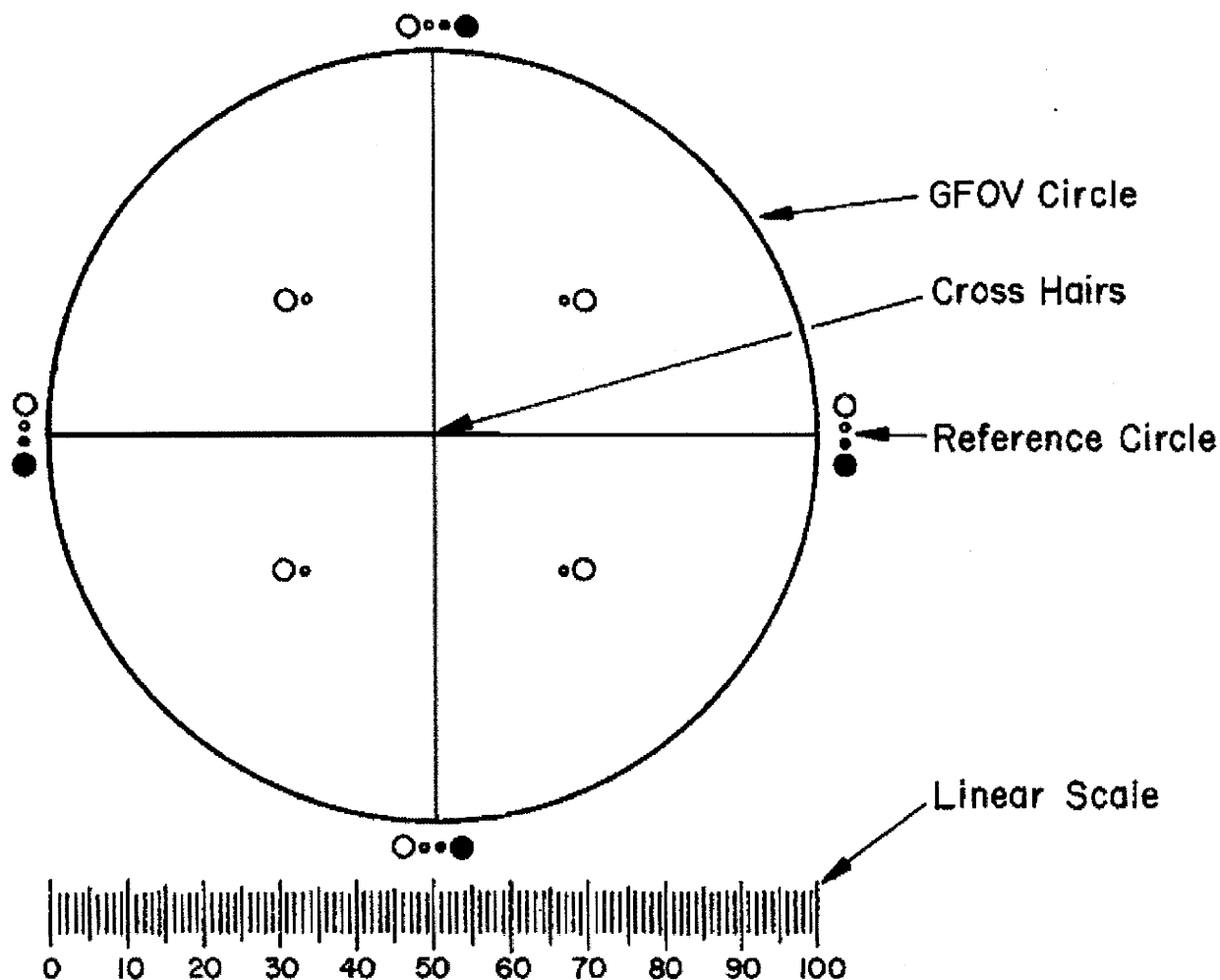


Fig. 1. Circular diameter graticule. The large circle divided by crosshairs into quadrants is designated the graticule field of view (GFOV). Transparent and black circles having 10- $\mu\text{m}$  and 25- $\mu\text{m}$  diameters

at 100× are provided as comparison scales for particle sizing.

and consists of a large circle divided by crosshairs into quadrants, transparent and black reference circles 10 µm and 25 µm in diameter at 100 magnifications, and a linear scale graduated in 10-µm increments. It is calibrated using a stage micrometer that is certified by either a domestic or international standard institution. A relative error of the linear scale of the graticule within ±2% is acceptable. The large circle is designated the graticule field of view (GFOV).

Two illuminators are required. One is an episcopic brightfield illuminator internal to the microscope, the other is an external, focusable auxiliary illuminator that can be adjusted to give reflected oblique illumination at an angle of 10° to 20°.

The filter assembly for retaining particulate matter consists of a filter holder made of glass or other suitable material, and is equipped with a vacuum source and a suitable membrane filter.

The membrane filter is of suitable size, black or dark gray in color, nongridded or gridded, and 1.0 µm or finer in nominal pore size.

### General Precautions

The test is carried out under conditions limiting particulate matter, preferably in a laminar flow cabinet.

Very carefully wash the glassware and filter assembly used, except for the membrane filter, with a warm detergent solution, and rinse with abundant amounts of water to remove all traces of detergent. Immediately before use, rinse both sides of the membrane filter and the equipment from top to bottom, outside and then inside, with *particle-free water*.

In order to check that the environment is suitable for the test, that the glassware and the membrane filter are properly cleaned, and that the water to be used is particle-free, the following test is carried out: determine the particulate matter of a 50-mL volume of *particle-free water* according to the method described below. If more than 20 particles 10 µm or larger in size or if more than 5 particles 25 µm or larger in size are present within the filtration area, the precautions taken for the test are not sufficient. The preparatory steps must be repeated until the environment, glassware, membrane filter, and water are suitable for the test.

### Method

Mix the contents of the samples by slowly inverting the container 20 times successively. If necessary, cautiously remove the sealing closure. Clean the outer surfaces of the container opening using a jet of *particle-free water* and remove the closure, avoiding any contamination of the contents.

For large-volume parenterals, single units are tested. For small-volume parenterals less than 25 mL in volume, the contents of 10 or more units are combined in a cleaned container; the test solution may be prepared by mixing the contents of a suitable number of vials and diluting to 25 mL with *particle-free water* or with an appropriate particle-free solvent when *particle-free water* is not suitable. Small-volume parenterals having a volume of 25 mL or more may be tested individually.

Powders for parenteral use are constituted with *particle-free water* or with an appropriate particle-free solvent when *particle-free water* is not suitable.

The number of test specimens must be adequate to provide a statistically sound assessment. For large-volume parenterals or for small-volume parenterals having a volume of 25 mL or more, fewer than 10 units may be tested, using an appropriate sampling plan.

Wet the inside of the filter holder fitted with the membrane filter with several mL of *particle-free water*. Transfer to the filtration funnel the total volume of a solution pool or of a single unit, and apply a vacuum. If needed, add stepwise a portion of the solution until the entire volume is filtered. After the