

キャリアーのベース部の膨張等の変形が発生し、試験における操作性を低下させた。試験遂行上、キャリアー上の汚染菌除去は必要であるが、その手段にはいくつかの方法が考えられる。今回採用したような浸漬を行うのも方法の一つではあるが、変形等が発生すると操作性が低下することもあり、例えば浸漬時間を短くする、消毒剤を使用して繰り返し拭き取る等、材質に応じた清浄化方法を採用する必要がある。

b. キャリアーからの消毒剤の漏れ

硬質表面キャリアー法を採用する際、キャリアー上に消毒剤を添加するが、消毒剤の表面張力によって、キャリアーからこぼれてしまうケースが認められた。キャリアーのサイズ5 cm × 5 cm に対して、本共同実験で採用した消毒剤添加量は1 mLである。「1 mL」はキャリアー全体に消毒剤を行き渡らすのに十分な量であり、またエタノール等の揮発性の高い消毒剤を一定時間作用させてもキャリアー上に残存する量として採用したが、消毒剤を添加した後にキャリアーの操作を行うと、キャリアーからこぼれる事象が発生した。消毒剤の添加量は事前に最適化が必要で、作用時間を通じて残存している量、試験菌懸濁液の回収が可能な量といった条件を基に設定することになる。また、試験に使用する安全キャビネットの風量や消毒剤の添加量が少量過ぎるとキャリアー表面全体に行き渡らなくなる等を考慮し、事前に各材質のキャリアーを用いた模擬操作を実施して最適化することが望まれる。

c. 試験菌の回収操作法

本共同実験では、消毒剤作用後にキャリアー表面上の消毒剤の一部をマイクロピペットで回収し、回収液で中和させた後、カンテン平板混釈法により、消毒剤中の菌数を計測した。本共同実験に限定したことなく、試験を実施するには共通して回収操作に対する訓練が必要である。今回採用した方法は、多検体処理には有用な方法であるが、その一方で試験菌が懸濁された消毒剤の一部を回収するため、試験菌の分散状態の影響を受けやすく、その結果、データをバラつかせたことも想定された。0.3%過酸化水素に対する結果の項でも述べたが、回収操作の内容は結果に影響する。ただし、操作法を繰り返し、習熟することにより、データは安定化するので、どのような回収操作を採用する際にも事前に訓練を十分に行う必要がある。なお、共同実験参加企業から寄せられた回収方法の別案としては、コンタクトプレートをキャリアーに接触させ、広範囲の試験菌を回収する方法、キャリアーを回収液に浸漬し、その回収液をメンブランフィルター法でろ過する方法が提示された。

D. 考 察

カプトガニ血球成分を利用することによる資源の枯渇、生態系への影響および環境保護の問題を解決するため、新しい学問および技術、すなわち組換え技術を用い、局方エンドトキシン測定用試薬の開発に取り組んだ。

まず組換え試薬の原料となる3つの酵素因子を組換えタンパク質として作製する際に、ウイルス法と安定発現細胞法という、2

つの異なる方法を検討した。培養時間の経過に伴い、生産した組換え酵素因子が、前者では分解を受け、後者では安定に存在することがわかった。分解を受けた因子の活性を確認すると、Etに依存しない活性化がみられ、組換え試薬としては使用できない性能であった（データ示さず）。安定発現細胞から得られた3つの酵素因子でカスケード反応を再構成すると、30分という短い測定時間で、天然カプトガニ由来のライセート試薬と同等に低Et濃度を測定できた。よって、安定発現細胞から得られたこれらの原料を用いて製品の形状である凍結乾燥製剤を作製し、組換え試薬がEt測定に必要なかつ十分な性能を有していることを検証した。

分析法バリデーションに記載される分析性能パラメータについて、①日本薬局方、②生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン、③既存試薬の性能を基にした基準を考慮して設定された判定基準への適合性を検証した。直線性については、日本薬局方の基準である0.980よりはるかに大きい相関係数を示した。また、真度についても回収率は73~104%の範囲に入り、日本薬局方の基準である50~200%より理論値に近く、高い性能を示した。併行精度、室内再現精度および室間再現精度、また定量限界（反応時間法）については、生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン記載された要求基準に適合した。また、特異性も既存試薬と同等であったことから、組換え試薬は今回検討した条件においてEt測定に必要な基本性能を有していることを確認した。

組換え試薬とライセート試薬との同等性の検証について、2.(1)に示した試験条件で

注射剤の反応干渉と各種EtのUSPRSEに対する相対活性を指標に評価した。

反応干渉因子試験において組換え試薬は反応時間法と反応速度法でNIDが大きく異なるものが認められた。その一例として、反応時間法におけるアルベカシン硫酸塩注射液のNIDは閾値を0.015Absとした30分測定では10,000倍であり、MVDである5,000倍を超えた。しかし解析条件を変更することで、NIDは反応速度法のそれと同じく4倍となった。このように一部の注射剤は反応速度法と反応時間法でNIDが異なったが、それら注射剤に適した解析条件を設定することでNIDは両解析法で概ね同等となった。

各種EtのUSPRSEに対する相対活性は測定原理とデータ解析法が同じである表I-3の組み合わせA（比色法、反応速度法）および組み合わせE（比色法、反応時間法）において、高い相関を示し、それらの回帰直線は1と有意差がない傾きを示した。その反面、測定原理は同じであるがデータ解析法が反応速度法と反応時間法とで異なる組み合わせBおよびDにおいては、各種EtのUSPRSEに対する相対活性から得られた回帰式の傾きの95%信頼区間は1を含まなかった（表I-7）。データ解析法が同じであるが測定原理が異なるライセート試薬どうしの組み合わせであるI（比色法と比濁法、いずれも反応時間法）でも回帰式の傾きの95%信頼区間に1を含まなかった（表I-7）。よって、試薬性能を厳密に比較する際には、測定原理と解析法を揃えることが重要である。

組換え試薬はライセート試薬と同様にEt規格値が設定され、入手可能であった注射

剤全てを測定可能であった。また、各種 Et の USPRSE に対する相対活性は組換え試薬とライセート試薬で同等であったことから、組換え試薬はライセート試薬と同等の性能を有していることを確認した。

日本薬局方では「ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその検量線の信頼性を確認しなければならない」とされている。試薬のロット間差は医薬品の安定した品質管理に影響を及ぼすと考えられる。組換え試薬の原料は培養細胞により生産されるため、試薬のロット間差は天然の原料を用いた試薬と比較して小さくなるものと推察される。原料ロットを変えて、連続して製造した 3 ロットの組換え試薬は、分析法バリデーションによる評価において、各種基準に全て適合した。これは高品質な製品を恒常的に生産可能であることを示唆している。組換え試薬が日本薬局方に記載されるためには、製品の品質がロット毎に一定であることが必要である。今後、組換え試薬のロット間差をライセート試薬と比較することで明らかにしていく予定である。

蛍光活性染色法 (CFDA-DAPI 二重染色法) では生菌の指標を酵素活性 (エステラーゼ活性) としているのに対し、従来の培養法では増殖能力を生理活性の指標としているため明確な対比は難しいと考えられる。しかしながら、蛍光活性染色による細菌数の測定法は、迅速かつ高精度に生菌数が測定でき、特に色素などの抗菌性のある物質や軟膏基剤などの嫌気状態になる物質においても特別な操作を必要とせず、高精度に生菌数が測定できるため有効な方法である。蛍光染色法を用いるにあたり、実測値データを積み重ねることにより、非無菌製剤の

生菌数の基準となる菌数値を見出すことができると思う。

「無菌医薬品製造区域の環境モニタリング」「滅菌及び滅菌指標体」はともに無菌医薬品製造技術の変化に合ったものに改正してゆく必要がある。今回の改定案においてはいくつかの新しい概念と技術の取り入れを達成しており、また使いやすくなりやすいものと考えられる。

硬質表面キャリアー法による消毒剤の有効性評価は、実際に行われる消毒の状態を可能な限りシミュレートした方法で、材質、微生物、消毒剤の三者の相互作用を確認する際に有用であり、医薬品製造施設等で日常的に実施する消毒プログラムを策定するための基礎データを取得する際に有効な方法である。本共同実験で得られた結果は、消毒剤濃度は低濃度、作用時間も短時間で試験菌が生残しやすいと想定される試験条件を採用したものであり、採用する消毒剤濃度や作用時間が異なれば、試験菌に対する効果も異なった結果が得られるのは容易に想像することができる。各企業において、消毒プログラムの策定を目的として硬質表面キャリアー法を実施する場合は、本書の情報を参考にすることで効率的な実施が可能になるものであると思う。また、得られた結果を基に製造施設等の衛生管理の一環として、消毒プログラムを SOP にて標準化することになるため、消毒剤濃度や作用時間は実際の使用条件をよく考慮して、評価を行う必要がある。

アルキルジアミノエチルグリシン塩酸塩に対する消毒効果の項で述べたように、試験菌の準備方法が試験結果に影響する

場合があることも判明したが、常に一定の状態の菌を準備することが、微生物試験においては難しく「菌の状態は変わるもの」という認識を持って評価することも必要である。また硬質表面キャリア法で得られた結果は、消毒プログラムを策定するためのものであり、実際の製造室の状態を完全に保証するものではない。環境には対数増殖期や定常期の微生物、また多種のストレスにより損傷している微生物等、多種が存在していることが予測される。これらは日常的に実施している環境モニタリングで検出されるが、そこで検出された菌の特徴等も考慮しながら消毒剤を最適な条件で使用し、その継続的な有効性は環境モニタリングの結果等との組み合わせで評価することが有用である。

これら医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法の新規導入・改良作業および指針の作成はグローバル化している医薬品業界にとっては国際調和を伴った医薬品の安全性向上に必須の要件であり、より安全な無菌医薬品の供給を可能にするものであることから、国民の保健・医療・福祉の向上に大いに貢献するものである。

E. 結 論

医薬品の微生物学的品質確保のための高度試験法の新規導入のため、1. 遺伝子組換え体を用いた新規エンドトキシン測定用試薬の開発、2. 細菌数迅速測定法のバリデーションにかかる基盤データの構築、3. 無菌医薬品品質確保のための製造と管理の技術に関する研究、の3研究を行った。

組換え因子を使い Et 定量反応の再構成に成功し、組換え試薬を作製した。組換え試薬は、分析法バリデーションに記載の全ての分析能パラメータにおいて判定基準に適合したことから、Et の測定に必要な基本性能を有していることが検証できた。また、組換え試薬は第十六改正日本薬局方の医薬品各条に Et 規格値が記載され、入手可能であった注射剤全ての測定が可能であった。さらに、組換え試薬の各種 Et の USPRSE に対する相対活性はライセート試薬のそれと良く相関した。これらのことから組換え試薬はライセート試薬と同等の性能を有しており、組換え技術を用いて作製した原料で調製した組換え試薬はカプトガニ由来の原料から調製されたライセート試薬と同様、日本薬局方のエンドトキシン試験に使用可能であると言える。

非無菌医薬品の微生物管理における生菌数迅速測定プロトコールの作成のために、代表的な非無菌製剤原料への細菌数迅速測定法の適用を検討し、プロトコールを作成した。また、検討を行った各前処理条件を用いて、非無菌製剤原料の生菌数を蛍光活性染色法により測定し、従来の培養法により得られた生菌数と比較することにより、蛍光活性染色法の有用性を確認した。

国内の無菌医薬品製造において必要な情報の再整理を、最新の情報を取り入れ、PIC/S との整合性もよく考慮して 2 編の参考情報の改定案を作成した。

日本薬局方 参考情報「微生物殺滅法」の改訂案に消毒剤の有効性を評価する方法として掲載される予定の「硬質表面キャリア法」が実用可能であることを確認するために製薬関連企業 15 社にて共同実験を

実施し、「硬質表面キャリアー法」は実用可能な方法であることが確認できた。また本書において、実施時における懸念事項も紹介し、注意点も含めた対応策を明確にしたことで、更に各社における実施を容易にする材料となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muroi M., Shima K., Igarashi M., Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of laboratory-derived antibiotic-resistant bacteria. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1841-1845 (2012)
- 2) 室井正志、杉浦友香、廣野泰亮、棚元憲一：エンドトキシン試験法の代替法の開発に関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、**44**, 177-182 (2013)
- 3) 杉浦友香、廣野泰亮、室井正志、棚元憲一：分析法バリデーションによる光散乱エンドトキシン測定法の評価、日本防菌防黴学会誌、**41**, 187-196 (2013)
- 4) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yan-Yan Hu, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: A ten years (2000-2009) surveillance of resistant *Enterobacteriaceae* in Zhejiang Province, China. *Microb. Ecol. Health Dis.*, **23**, 11609-11618 (2012)
- 5) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Kitaguchi, Masao Nasu.: Selective enumeration of viable *Enterobacteriaceae* and active *Pseudomonas* spp. in milk within 7 h by multicolor fluorescence in situ hybridization following microcolony formation. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 746-750 (2012)
- 6) Rong Zhang, Tomoaki Ichijo, Yong-Lu Huang, Jia-Chang Cai, Hong-Wei Zhou, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu, Gong-Xiang Chen.: High prevalence of qnr and aac(6)-Ib-cr genes in both water-borne environmental bacteria and clinical isolates of *Citrobacter freundii* in China. *Microbes Environ.*, **27**, 158-163 (2012)
- 7) Nobuyasu Yamaguchi, Akiko Sakotani, Tomoaki Ichijo, Takehiko Kenzaka, Katsuji Tani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects. *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1187-1190 (2012)
- 8) Nobuyasu Yamaguchi, Tomoaki Ichijo, Akiko Sakotani, Takashi Baba, Masao Nasu.: Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Scientific Reports*, **2**, 525-510 (2012)
- 9) Takashi Baba, Naoko Inoue, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu.: Rapid enumeration of active *Legionella pneumophila* in freshwater environments by the microcolony method combined

- with direct fluorescent antibody staining. *Microbes Environ.*, **27**, 324-326 (2012)
- 10) Kitajima T., Muroi M., Yamashita N., and Tanamoto K.: Toll-like receptors required for *Dermatophagoides farinae* to activate NF- κ B. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 74-80 (2014)
- 11) Shah N., de Oca M.M., Jover-Cobos M., Tanamoto K., Muroi M., Sugiyama K., Davies N.A., Mookerjee R.P., Dhar D.K., Jalan R.: Role of Toll-like receptor-4 in mediating multi-organ dysfunction in acetaminophen induced acute liver failure in mice. *Liver Transpl.*, **19**, 751-761 (2013)
- 12) Ogura N., Muroi M., Sugiura Y. and Tanamoto K.: Lipid IVA incompletely activates MyD88-independent Toll-like receptor 4 signaling in mouse macrophage cell lines. *Pathogens and Disease*, **67**, 199-205 (2013)
- 13) Nobuyasu Yamaguchi, Takahiro Nishiguchi, Fuangfa Utrarachkij, Orasa Suthienkul, Masao Nasu.: 16S ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis of abundant bacteria in river, canal and potable water in Bangkok, Thailand. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 872-876 (2013)
- 14) Tomoaki Ichijo, Hatsuki Hieda, Rie Ishihara, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu.: Bacterial monitoring with adhesive sheet in the International Space Station-“Kibo”, the Japanese Experiment Module. *Microbes Environ.*, **28**: 264-268 (2013)
- 15) Nobuyasu Yamaguchi, Syuhei Matsukawa, Yoko Shintome, Tomoaki Ichijo, Masao Nasu.: Microchip-based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for on-site analysis of bacterial communities in freshwater. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**: 1305-1309 (2013)
- 16) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu.: Distribution and respiratory activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers in Japan. *PLOS ONE*, **9**: e110554 (2014)
- 17) N. Yamaguchi, J. Park, M. Kodama, T. Ichijo, T. Baba, M. Nasu.: Change in the airborne bacterial community in outdoor environments following Asian dust events. *Microbes Environ.*, **29**: 82-88 (2014)
- 18) Muroi M. and Tanamoto K.: Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages. *Toxicol. Lett.*, in press
2. 学会発表
- 1) 小倉紀彦、杉浦由香、室井正志、棚元憲一：Lipid A 類縁体による Toll-like receptor 4 の MyD88 依存的・非依存的経路の活性化比較、日本薬学会第 133 年会 (2013, 3)
- 2) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：グルタルアルデヒドを用いた蛍光活性染色法による生菌数の迅速測定、第 24 回微生物シンポジウム (2012, 9)
- 3) 山口 進康、藤本 開、那須 正夫：蛍光活性染色による生菌数の迅速測定

- における蛍光増強法の検討、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2012, 12)
- 4) 佐野 彩香、山口 進康、川井 真好：蛍光染色を用いた細菌数測定法の多様な医薬品への応用、日本薬学会第 133 年会 (2013, 3)
 - 5) 杉浦 友香、高橋 晴也、室井 正志、棚元 憲一：IRAK-1 による TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 構造領域の検討、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
 - 6) 北島孝明、石黒希、室井正志、山下直美、棚元憲一：コナヒョウヒダニ抽出物による NF- κ B の活性化に關与する Toll-like receptor の同定、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
 - 7) 佐野 彩香、藤尾 実穂、更家 信、山口 進康、川井 真好：蛍光染色による細菌数測定法の医薬品原料への適用、第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2013, 10)
 - 8) 藤尾 実穂、佐野 彩香、更家 信、山口 進康、川井 真好：蛍光染色を用いた細菌数迅速測定法の固形医薬品原料への適用、日本薬学会第 134 年会 (2014, 3)
 - 9) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. On-site and real-time monitoring for bacterial cells in freshwater with microfluidic system. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 10) T. Ichijo, Y. Izumi, S. Nakamoto, N. Yamaguchi, M. Nasu. Abundance and physiological activity of Mycobacteria in household water of healthy volunteers. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 11) M. Kawai, J. Yamagishi. Resistance mechanisms of Triclosan in Staphylococci. American Society for Microbiology 114th General meeting, May 17-20, 2014 (Boston, MA, USA)
 - 12) 川井真好, 更家信, 山岸純一. ブドウ球菌属のトリクロサン抵抗性メカニズム. 第 62 回日本化学療法学会総会 2014 年 6 月 18 日 - 20 日 (福岡)
 - 13) N. Yamaguchi, Y. Fujii, T. Tanizawa, F. Banno, M. Nasu. Real-time and on-site monitoring of bacterial cells in aquatic environments by portable microfluidic system. 15th International Symposium on Microbial Ecology, August 24-29, 2014 (Seoul, Korea)
 - 14) 更家信, 山口進康, 川井真好. 蛍光染色による油状基剤からの生菌の迅速検出. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014 年 10 月 11 日 (京都)
 - 15) 小林宥吾, 更家信, 山岸純一, 川井真好. コアグラマーゼ陰性ブドウ球菌属のトリクロサン抵抗性メカニズム. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25 - 28 日 (神戸)
 - 16) 室井 正志、棚元 憲一：Ziram は亜鉛および酸化作用依存的にマクロファージにおける pro-caspase-1 と NLRP3 蛋白を分解する、日本薬学会第 135 年会 (2015, 3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 杉山圭一、棚元憲一、室井正志：新規ペプチド、これを用いたエンドトキシ

ン由来疾患治療剤およびこの治療剤の探索方法 平成24年7月27日 特許

測定試料に含まれるエンドトキシン

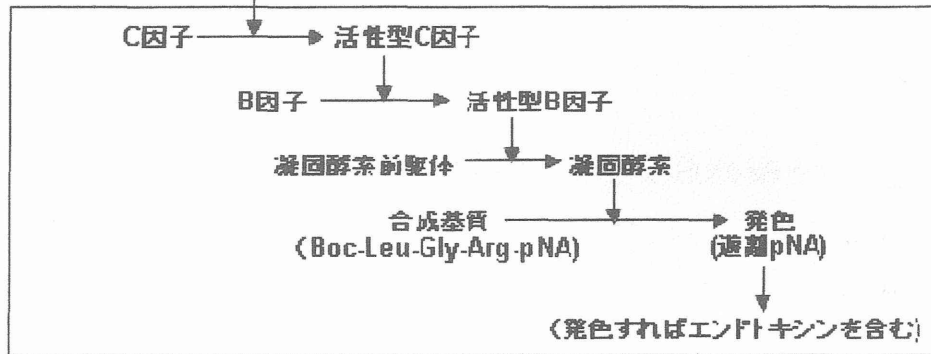


図 I-1 Et 測定において、ライセート試薬内で起こる反応を模式的に示す。測定試料に含まれる Et が C 因子を活性化し、活性化 C 因子は B 因子を、活性化 B 因子は凝固酵素前駆体を順次切断、活性化し、最終的には発色合成基質である Boc-Leu-Gly-Arg-pNA が切断され、遊離の pNA が発色する。

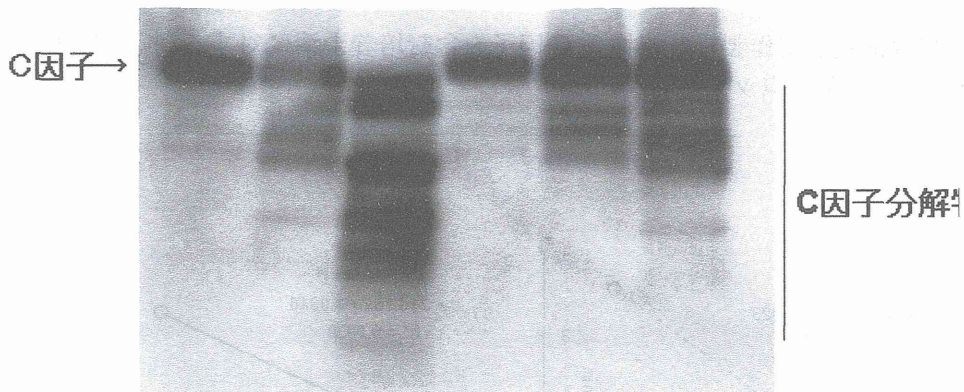


図 I-2 ウイルス法で作製した組換え C 因子を含む培養上清に対する、抗 C 因子特異的抗体によるウエスタンブロッティング。

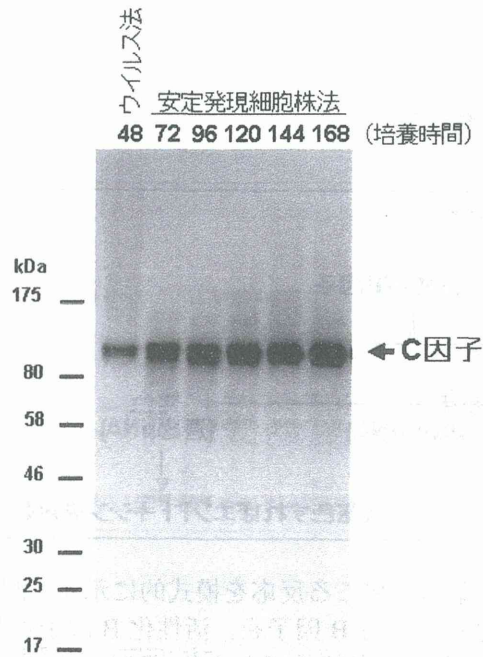


図 I-3 安定発現細胞法で作製した組換え C 因子を含む培養上清に対する、抗 C 因子特異的抗体によるウエスタンブロットティング。

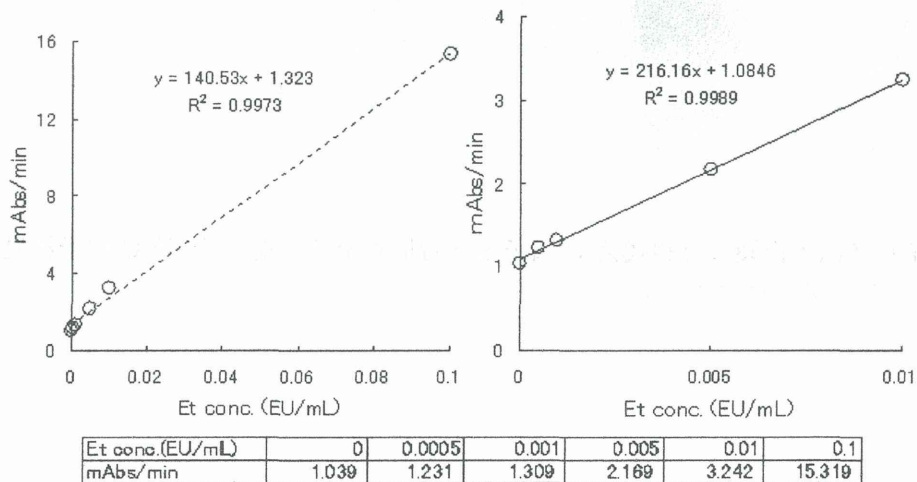


図 I-4 安定発現細胞法で作製した組換え試薬による Et に対する用量反応性。左：Et 濃度 0-0.1 EU/mL、右：Et 濃度 0-0.01 EU/mL の範囲での結果をそれぞれプロットした。吸光度変化率 (mAbs/min) は 2 回測定の平均値であらわした。

表 I-1 組換え試薬のロットと原料ロット

組換え試薬 ロット	主原料ロット*		
	C 因子	B 因子	凝固酵素前駆体
#1	C1	B1	P1
#2	C2	B2	P2
#3	C3	B3	P3

3 種のプロテアーゼ前駆体の組換え酵素は全て異なる（独立した）ロットを用いた。

表 I-2 分析能パラメータと測定法、結果の解析法および判定基準

分析能パラメータ	評価方法		判定基準
① 直線性	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の回帰直線における各 Et 濃度と吸光度変化率を xy プロットし、相関係数を求める。	r ≥ 0.980 ^{a)}
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の回帰直線における各 Et 濃度と吸光度の閾値への到達時間 (Onset time) の対数値を xy プロットし、相関係数を求める。	
② 真度 (回収率)	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率を算出する	50 - 200 % ^{a)}
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 回収率を算出する。	
③ 精度			
③-1 併行精度	反応速度法	0.00625 - 0.1 EU/mL (2 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値を算出し、その CV を求める	CV 反応速度法 @ 0.00625 EU/mL ≤ 20% ^{b)} @ 0.0125 - 0.1 EU/mL ≤ 15% ^{b)} 反応時間法 @ 0.005 EU/mL ≤ 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL ≤ 15% ^{b)}
	反応時間法	0.005 - 50 EU/mL (10 倍希釈列) の各 Et 濃度における Et 測定値を算出し、その CV を求める	
③-2 室内再現精度	併行精度検討で用いた各 Et 濃度における Et 測定値の平均値を算出し、それら合計 12 測定で得られた Et 測定値の CV の 90%信頼区間を求める。		CV 反応速度法 @ 0.00625 EU/mL ≤ 20% ^{b)} @ 0.0125 - 0.1 EU/mL ≤ 15% ^{b)} 反応時間法 @ 0.005 EU/mL ≤ 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL ≤ 15% ^{b)}
③-3 室間再現精度 反応時間法 のみ	2 施設で得られた各 Et 濃度における Et 測定値の平均値を算出し、それら合計 18 測定で得られた Et 測定値を対数変換し、その CV の 90%信頼区間を求める。		CV @ 0.005 EU/mL ≤ 20% ^{b)} @ 0.05 - 50 EU/mL ≤ 15% ^{b)}

		2施設（因子1）および5つのEt濃度（因子2）の組み合わせから、繰り返しのある2元配置の分散分析を行う。	2つの施設で得られた測定値の分散に5%の水準で有意差が無いこと。
④	範囲	分析法の直線性、真度および精度が判定基準を満たす測定範囲を求める。	分析能パラメータ1,2および3-1の全てが判定基準を満たすこと b)。
⑤	定量限界 （下限） LOQ	反応速度法	ブランクの吸光度変化率の標準偏差を10倍し、定量限界付近の検量線の傾きで除する。合計9回の測定で得られた結果の95%信頼区間を求める。
		反応時間法	定量限界（0.005 EU/mL）における真度および精度を評価する。
			なし
			分析能パラメータ2および3-1における0.005EU/mLの真度が理論値の±20%以内、精度が20%以下であること
⑥	特異性 （BGとの反応性） 反応速度法のみ	BGを5μg/mLとなるように添加または添加しない0.0125・0.1 EU/mL（2倍希釈列）の直線の回帰式を比較する。	BG添加および無添加条件下で回帰分析を行い、5%危険率で切片が0を含みかつ傾きが1を含むこと c)。

a) 日本薬局方エンドトキシン試験法予備試験

b) 生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン

c) 既存試薬の性能を参考に設定

表 I-3 試験に使用した試薬および測定条件

No.	名称	測定原理・ 解析法	測定時間 (分)	閾値	標準品濃度 (EU/mL)	測定波長	測定機
1	組換え試薬	比色法・ 反応速度法 ¹⁾	30	/	0.00625 – 0.1 (2 倍希釈)	2 波長 主波長: 405nm 参照波長: 492nm	ウェルリーダー (生化学工業)
2	ライセート試薬1						
3	組換え試薬	比色法・ 反応時間法 ²⁾	30	0.015 Abs	0.005 – 50 (10 倍希釈)	1 波長 405nm	ELx808IU (Biotek)
			60 ⁴⁾	0.150 Abs			
4	ライセート試薬2		最大 100	0.2 Abs			
5	ライセート試薬3	比濁法・ 反応時間法 ³⁾	60	94.9 %	0.0078 – 0.125 (2 倍希釈)		

1) 測定時間内における吸光度の変化を指標とする。

2) 吸光度が測定を開始してから設定した閾値に到達するまでの時間を指標とする。

3) 透過光量比を計測し測定を開始してから設定した閾値に達するまでの時間を指標とする。

4) 一部の注射剤測定において 60 分測定を実施した。

表 I-4 試験に使用した Et

No.	名称	溶解液	最大測定濃度 (ng/mL)				
			反応速度法 (2 倍希釈)		反応時間法 (10 倍希釈)		L3 (2 倍希釈)
			組換え 試薬	L1	組換え 試薬	L2	
1	JPRSE (<i>Escherichia coli</i> UKTB)	注射 用水	0.0110		5.5556		0.0189
2	<i>E. coli</i> O55:B5		0.0050		2.5000		0.0500
3	<i>E. coli</i> O111:B4		0.0100		20.0000		0.0500
4	<i>E. coli</i> O127:B8		0.0300		10.0000		0.0500
5	<i>E. coli</i> O128:B12		0.0300		10.0000		0.0500
6	<i>E. coli</i> J5		0.0400		10.0000		0.0500
7	<i>E. coli</i> F583 Rd 2	TEA	0.0025		0.2000		0.0100
8	<i>Shigera flexneri</i>	注射 用水	0.0200		2.0000		0.0500
9	<i>Salmonella enterica</i>		0.0200		2.0000		0.0500
10	<i>S. minnesota</i> R595 Re	TEA	0.0025		0.2000		0.0050
11	<i>S. typhimurium</i>		0.0025		0.5000		0.0100
12	<i>S. typhosa</i>		0.0100		2.0000		0.0500
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	注射 用水	0.0019		0.0020		0.0031

ライセート試薬を L と表記する。

USPRSE の検量範囲に入った濃度 (3 点以上) のデータを用い、平行線定量法で解析した。

表 I-5-1 各分析能パラメータにおける結果および判定

分析能パラメータ	結果				判定
	反応速度法 (JPRSE)		反応時間法 (USPRSE)		
① 直線性 (相関係数; 絶対値)	0.00625 - 0.1 EU/mL 0.999 - 1.000		0.005 - 50 EU/mL 1.000		適合
② 真度 (回収率)	EU/mL	最小・最大 (%)	EU/mL	最小・最大 (%)	適合
	0.00625	72.7 - 99.4	0.005	94.7 - 103.6	
	0.0125	94.2 - 101.3	0.05	91.6 - 103.1	
	0.025	100.0 - 105.4	0.5	99.1 - 108.2	
	0.05	100.3 - 105.4	5	100.1 - 109.4	
0.1	98.5 - 99.8	50	92.4 - 99.3		
③ 精度					
③-1 併行精度 (CV)	EU/mL	最小・最大 (%)	EU/mL	最小・最大 (%)	適合
	0.00625	3.1 - 11.0	0.005	5.9 - 15.7	
	0.0125	1.4 - 7.2	0.05	5.7 - 14.9	
	0.025	1.5 - 6.5	0.5	6.4 - 11.4	
	0.05	1.4 - 5.4	5	3.3 - 14.8	
0.1	0.6 - 4.3	50	3.1 - 14.2		
③-2 室内再現精度 (CV)	EU/mL	90%信頼区間 下限・上限(%)	EU/mL	90%信頼区間 下限・上限(%)	適合
	0.00625	7.3 - 15.2	0.005	0.3 - 0.7	
	0.0125	1.4 - 2.9	0.05	0.7 - 1.5	
	0.025	1.2 - 2.5	0.5	2.8 - 5.8	
	0.05	1.3 - 2.6	5	1.1 - 2.3	
0.1	0.3 - 0.7	50	0.4 - 0.8		
3-3 室間再現精度 (CV)	実施せず。		EU/mL	90%信頼区間 下限・上限(%)	適合
			0.005	0.6 - 1.0	
			0.05	1.1 - 1.9	
			0.5	4.1 - 7.3	
			5	0.9 - 1.7	
50	0.5 - 0.9				
④ 範囲	0.00625 - 0.1 EU/mL		0.005 - 50 EU/mL		適合
⑤ 定量限界 (下限)	95%信頼区間 下限・上限(%) 0.0008 - 0.0016 EU/mL		@ 0.005 EU/mL 真度: 95 - 104 % 併行精度: 6 - 16 %		反応 時間法 適合
⑥ 特異性 (BG との反応性) 反応速度法のみ	回帰分析結果 (95%信頼区間) 切片: -0.133 - 0.126 傾き: 0.991 - 1.029		/		適合

表 I-5-2 各分析能パラメータにおける結果および判定 (反応速度法・Et 測定値と 95%信頼区間)

	定量値 (EU/mL)	SD (EU/mL)	95%信頼区間 下限・上限(%)
ブランク	0.00011	0.00009	-0.0001 - 0.0003
0.00125 EU/mL	0.00129	0.00005	0.00119 - 0.00138

表 1-6-1 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
1	アシクロビル注射液	25 mg/mL	0.5 EU/mg	2	8	4	8	8	
				2000	2500	2000	2500	1600	
2	アスコルビン酸注射液	100 mg/mL	0.15 EU/mg	4	2	4	8	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
3	注射用アズトレオナム	333 mg/mL	0.10 EU/mg(力価)	32	64	16	128	32	
				5333	6667	5333	6667	4267	
4	アトロピン硫酸塩注射液	0.5 mg/mL	75 EU/mg	1	1	1	4	1	
				6000	7500	6000	7500	4800	
5	アミカシン硫酸塩注射液	100 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	16	2	64	4	
				8000	10000	8000	10000	6400	
6	注射用アミカシン硫酸塩	50 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	16	1	64	2	
				4000	5000	4000	5000	3200	
7	アミノフィリン注射液	25 mg/mL	0.6 EU/mg	16	16	8	4	8	
				2400	3000	2400	3000	1920	
8	注射用アムホテリシン B	4.2 mg/mL	3.0 EU/mg(力価)	8	8*	4	32	64	
				2000	2500	2000	2500	1600	
9	L-アルギニン塩酸塩注射液	100 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	8	8	4	16	4	
				80	100	80	100	64	
10	アルプロスタジル注射液	0.005 mg/mL	10 EU/mL	8	256	16	1	256	
				1600	2000	1600	2000	1280	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-2 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
11	アルベカシン硫酸塩注射液	50 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	4	4*	2	32	2	
				4000	5000	4000	5000	3200	
12	アレンドロン酸ナトリウム注射液	2.5 mg/mL	119 EU/mg	2	2	2	16	8	
				47600	59500	47600	59500	38080	
13	注射用アンピシリンナトリウム	250 mg/mL	0.075 EU/mg(力価)	8	32*	8	16	32	
				3000	3750	3000	3750	2400	
14	イオタラム酸ナトリウム注射液	66.8 %	3.4 EU/mL	32	64	16	32	32	
				544	680	544	680	435	
15	イセパマイシン硫酸塩注射液	200 mg/mL	0.50 EU/mg(力価)	16	32	4	128	8	
				16000	20000	16000	20000	12800	
16	イソニアジド注射液	50 mg/mL	0.50 EU/mg	4	4	4	4	4	
				4000	5000	4000	5000	3200	
17	イダルビシン塩酸塩		8.9 EU/mg(力価)						入手不可
18	注射用イダルビシン塩酸塩	1 mg/mL	8.9 EU/mg(力価)	128	512	128	16	8	
				1424	1780	1424	1780	1139	
19	注射用イミペネム・シラスタチンナトリウム	25 mg/mL	0.25 EU/mg(力価)	8	16	1	4	16	
				1000	1250	1000	1250	800	
20	インジゴカルミン注射液	4 mg/mL	7.5 EU/mg	4	16	4	16	32	
				4800	6000	4800	6000	3840	

* 60 分測定、閾値 0.15Abs

表 I-6-3 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
21	ヒトインスリン (遺伝子組換え)	100 単位/mL	0.8 EU/インスリン単位	4	2	2	8	2	
				12800	16000	12800	16000	10240	
22	エドロホニウム塩化物注射液	1 mg/mL	15 EU/mg	8	8	4	8	4	
				2400	3000	2400	3000	1920	
23	エフェドリン塩酸塩注射液	40 mg/mL	7.5 EU/mg	8	40	4	8	8	
				48000	60000	48000	60000	38400	
24	メチルエルゴメトリンマレイン酸塩注射液	0.2 mg/mL	1500 EU/mg	1	2	1	32	1	
				48000	60000	48000	60000	38400	
25	塩化カルシウム注射液	55.5 mg/mL	0.30 EU/mg	32	32	32	32	16	
				2664	3330	2664	3330	2131	
26	10%塩化ナトリウム注射液	10 %	3.6 EU/mL	2	2	4	16	2	
				576	720	576	720	461	
27	オキシトシン注射液	1 単位/mL	10 EU/単位	2	16	2	8	2	
				1600	2000	1600	2000	1280	
28	注射用オザグレルナトリウム	10 mg/mL	3.7 EU/mg	1	1	2	2	4	
				5920	7400	5920	7400	4736	
29	果糖注射液	20 %	0.5 EU/mL	4	4	2	4	2	
				80	100	80	100	64	
30	キシリトール注射液	5 %	0.50 EU/mL	1	1	1	1	1	
				80	100	80	100	64	

表 I-6-4 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
31	輸血用クエン酸ナトリウム注射液	100 mg/mL	5.6 EU/mL	1	1	4	64	4	
				896	1120	896	1120	717	
32	クリンダマイシンリン酸エステル注射液	150 mg/mL	0.1 EU/mg(力価)	128	64	16	32	32	
				2400	3000	2400	3000	1920	
33	クロルフェニラミンマレイン酸塩注射液	2 mg/mL	8.8 EU/mg	2	4	2	8	4	
				2816	3520	2816	3520	2253	
34	シアノコバラミン注射液	1000 μg/mL	0.30 EU/μg	2	2	1	4	2	
				48000	60000	48000	60000	38400	
35	ジゴキシン注射液	0.25 mg/mL	200 EU/mg	16	32	16	8	32	
				8000	10000	8000	10000	6400	
36	ジモルホラミン注射液	15 mg/mL	5.0 EU/mg ^{a)}	16	64	16	16	8	
				12000	15000	12000	15000	9600	
37	注射用水	-----	0.25 EU/mL						入手不可
38	注射用水(容器入り)	-----	0.25 EU/mL	1	1	1	1	1	
				-----	-----	-----	-----	-----	
39	スキサメトニウム塩化物注射液	22 mg/mL	2.0 EU/mg	1	2	1	8	1	
				7040	8800	7040	8800	5632	
40	注射用スキサメトニウム塩化物	100 mg/mL	1.5 EU/mg	8	8	4	16	8	
				24000	30000	24000	30000	19200	

a) 0.15w/v%に希釈して試験をおこなう。

表 I-6-5 医薬品各条に Et 規格値が記載される注射剤の NID

ID	注射剤の名称	原液の濃度	Et 規格値	NID (上段) / MVD (下段)					備考
				組換え試薬		ライセート試薬			
				反応速度法	反応時間法	1	2	3	
41	注射用ストレプトマイシン硫酸塩	333 mg/mL	0.10 EU/mg	32	128	8	1024	16	
				5333	6667	5333	6667	4267	
42	血清性腺刺激ホルモン		0.1 EU/単位						入手不可
43	注射用血清性腺刺激ホルモン	200 単位/mL	0.1 EU/単位	16 ^{b)}	1	16 ^{b)}	1	16 ^{b)}	
				3200	4000	3200	4000	2520	
44	ヒト下垂体性性腺刺激ホルモン	75 単位/mL	0.66 EU/卵胞刺激ホルモン単位 ^{a)}	16 ^{b)}	2	4 ^{b)}	1	4 ^{b)}	
				7920	9900	7920	9900	6336	
45	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン		0.03 EU/単位						入手不可
46	注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン	200 mg/mL	0.03 EU/単位	1	1	1	1	1	
				960	1200	960	1200	768	
47	生理食塩水	----- -----	0.50 EU/mL	1	1	1	2	1	
				80	100	80	100	64	
48	セファゾリンナトリウム水和物		0.10 EU/mg(力価)						入手不可
49	注射用セファゾリンナトリウム	333 mg/mL	0.05 EU/mg(力価)	32	64	32	16	32	
				2667	3333	2667	3333	2133	
50	セフェピム塩酸塩水和物		0.04 EU/mg(力価)						入手不可

* 60分測定、閾値 0.15Abs

a) Et 試験用水 1mL 当たり 75 卵胞刺激ホルモン単位を溶かし、試験を行うとき

b) サンプルが Et 汚染されていたため、検量範囲内測定が可能となるまで希釈 (実際の NID より大きい) : 後日、データを入替