

- Environmental Mutagen Society (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat. Res.* 698 (2010) 24–29.
- [28] I. Chier, C. Melcion, A. Cordier, Lack of predictivity of bone marrow micronucleus test versus testis micronucleus test: comparison with four carcinogens, *Mutat. Res.* 292 (1993) 105–111.
- [29] J.E. Yendle, H. Tinwell, B.M. Elliott, J. Ashby, The genetic toxicity of time: importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays, *Mutat. Res.* 375 (1997) 125–136.
- [30] J.C. Kennelly, M.P. Lane, J.A. Barker, G. Barber, H. Tinwell, J.E. Gallagher, B. Pool-Zobel, P. Schmezer, J. Ashby, Genotoxic activity of 1-chloromethylpyrene in stomach epithelium in vivo: insensitivity of the stomach scintillation UDS assay, *Carcinogenesis* 14 (1993) 637–643.
- [31] L. Shimamé-Moré, Smokeless tobacco extracts mutate human cells, *Carcinogenesis* 12 (1991) 927–930.
- [32] E.H. Vock, A.R. Wolfe, T. Meehan, Trans- and cis-DNA adduct concentration in epidermis from mouse and rat skin treated ex vivo with benzo[a]pyrene diol epoxide and its corresponding chlorohydrins, *Mutat. Res.* 478 (2001) 199–206.
- [33] G. Talaska, M. Jaeger, R. Reilman, T. Collins, D. Warshawsky, Chronic, topical exposure to benzo[a]pyrene induces relatively high steady-state levels of DNA adducts in target tissues and alters kinetics of adduct loss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 7789–7793.
- [34] K. Brown, A. Buchmann, A. Balmain, Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 538–542.
- [35] K.L. Platt, S. Aderhold, K. Kulpe, M. Fickler, Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions, *Mutat. Res.* 650 (2008) 96–103.
- [36] M. Vrzoc, M.L. Petras, Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens, *Mutat. Res.* 381 (1997) 31–40.
- [37] D. Kirkland, G. Speit, Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo, *Mutat. Res.* 654 (2008) 114–132.
- [38] E. Lorge, V. Gervais, N. Becourt-Lhote, C. Maisonneuve, J.L. Delongas, N. Claude, Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part IV: a strategy in genotoxicity testing in drug development: some examples, *Toxicol. Sci.* 98 (2007) 39–42.
- [39] T. Mensing, P. Welge, B. Voss, L.M. Fels, H.H. Fricke, T. Bruning, M. Wilhelm, Renal toxicity after chronic inhalation exposure of rats to trichloroethylene, *Toxicol. Lett.* 128 (2002) 243–247.
- [40] G. Scasvellati-Sforzolini, R. Pasquini, M. Moretti, M. Villarini, C. Fatigoni, P. Dolara, S. Monarca, G. Caderni, F. Kuchenmeister, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, In vivo studies on genotoxicity of pure and commercial linuron, *Mutat. Res.* 390 (1997) 207–221.
- [41] A. Rothfuss, M. O'Donovan, M. De Boeck, D. Brauit, A. Czich, L. Custer, S. Hornada, U. Plappert-Helbig, M. Hayashi, J. Howe, A.R. Kraynak, B.J. van der Leede, M. Nakajima, C. Priestley, V. Thybaud, K. Saigo, S. Sawant, J. Shi, R. Storer, M. Struwe, E. Vock, S. Galloway, Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutat. Res.* 702 (2010) 40–69.
- [42] K. Sekihashi, T. Sasaki, A. Yamamoto, K. Kawamura, T. Ikka, S. Tsuda, Y.F. Sasaki, A comparison of intraperitoneal and oral gavage administration in comet assay in mouse eight organs, *Mutat. Res.* 493 (2001) 39–54.

平成22年度「日本薬局方の試験法に関する研究」
研究報告^{*5}輸液用ゴム栓試験法の見直し研究（第4報[†]）

—ゴム栓試験法：細胞毒性試験における試料溶液の調製方法に関する検討—

柘植 英哉^{*1}, 大内 正^{*1}, 森 充生^{*1}, 下田 耕三^{*1}, 大庭 澄明^{*1}, 青木 光夫^{*2}, 林 美則^{*2}, 五島 隆志^{*2},
山影 康次^{*3}, 渡辺 美香^{*3}, 田中 憲穂^{*3}, 小島 肇^{*4}, 四方田 千佳子^{*4}

1. 緒言

日本薬局方（日局）一般試験法 7.03 輸液用ゴム栓試験法¹⁾は、第十改正（1981年）以来、その内容の改定が行われていなかった。その間、欧州薬局方（EP）²⁾及び米国薬局方（USP）³⁾が改定され、両者の試験項目、試験方法及び規格値がほぼ同一となり、これらと日局輸液用ゴム栓試験法との乖離が課題となっている。

このような状況下、社団法人東京医薬品工業協会（東薬工）及び大阪医薬品協会（大薬協）では、両協会の加盟会社並びにゴム栓メーカーへのアンケート方式によるゴム栓試験法に関する実態調査を行うと共に、ゴム栓試験法の変遷を調査比較し、それらの結果を第1報⁴⁾として報告した。

また、第2報⁵⁾においては、三薬局方による実測値比較を目的として、理化学試験を中心に注射剤に使用される国内外製の市販ゴム栓を対象とした日局16及びEP（6th Edition）による試験を実施し、三薬局方の規格及び試験方法の項目ごとの詳細な比較結果並びにアンケート結果⁶⁾を踏まえ、日局の輸液用ゴム栓試験法の国際調

和を考慮した見直しを検討するに当たっての論点を整理し報告した。

更に、第3報⁶⁾では、輸液用ゴム栓試験法における生物学的試験の見直しに関して、動物を用いる急性毒性試験、発熱性物質試験及び溶血性試験のうち、急性毒性試験法を細胞毒性試験法へ切り替えるため、ゴム栓の製造に用いられる可能性のある代表的な12種類の添加剤（加硫促進剤及び老化防止剤）について、細胞毒性試験（コロニー形成法）におけるIC₅₀値を求め、そのIC₅₀値以上の濃度に調製した添加剤溶液における急性毒性試験結果より両試験法の感度を比較評価した。その結果、評価したすべての添加剤において、細胞毒性試験法における検出感度は現行の急性毒性試験法における感度と同等以上であることが確認され、細胞毒性試験法のゴム栓試験法への適用の妥当性を示した。

本研究では、第3報に引き続いて細胞毒性試験に供する試料溶液の調製方法を検討することを主目的として、国内外に流通している代表的な注射用ゴム栓9製品について2種類の抽出方法（①日本薬局方の7.03輸液用ゴム栓試験法：急性毒性試験法で採用されている生理食塩

[†] 第1報：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 41(3), 221-239 (2010).

第2報：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42(2), 156-176 (2011).

第3報：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 42(3), 258-271 (2011).

^{*1} 社団法人東京医薬品工業協会局方委員会 東京都中央区日本橋本町3-4-1 (〒103-0023)

The Pharmaceutical Manufacturers' Association of Tokyo, 3-4-1 Nihonbashihon-cho, Chuo-ku, Tokyo 103-0023, Japan

^{*2} 大阪医薬品協会技術研究委員会 大阪市中央区伏見町2-4-6 (〒541-0044)

Osaka Pharmaceutical Manufacturers Association, 2-4-6 Fushimi-cho, Chuo-ku, Osaka 541-0044, Japan

^{*3} 財団法人食品薬品安全センター-秦野研究所 神奈川県秦野市落合729-5 (〒257-8523)

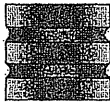
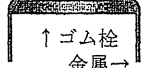


Hatano Research Institute, Food and Drug Safty Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

^{*4} 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^{*5} 本研究は、平成22年度財団法人日本公定書協会の「日本薬局方の試験法に関する研究」により行ったものである。

Table 1 試験対象とした注射用ゴム栓の材質、外観及び形状概寸⁵⁾

No.	ゴム栓（材質）	形状・外観	側面図	サイズ／質量／表面積	抽出割合毎の抽出媒体量
1	ゴム栓 （ブチル）			直 径：19 mm 厚 み：7 mm 質 量：1.10 g 表面積：9.15 cm ²	6 cm ² /mL： 1.53 mL 0.1 g/mL： 11.0 mL
2	ゴム栓 （塩素化ブチル）			直 径：19 mm 厚 み：7 mm 質 量：1.27 g 表面積：9.15 cm ²	6 cm ² /mL： 1.53 mL 0.1 g/mL： 12.7 mL
3	ガスケット （臭素化ブチル）			直 径：7.5 mm 厚 み：6 mm 質 量：0.31 g 表面積：2.10 cm ²	6 cm ² /mL： 0.35 mL 0.1 g/mL： 3.5 mL
4	セプタム （臭素化ブチル）			直 径：8 mm 厚 み：1.5 mm （金属部：5 mm） 質 量：0.09 g 表面積：1.24 cm ²	6 cm ² /mL： 0.21 mL 0.1 g/mL： 9.0 mL
5	ゴム栓 （イソプレン）			直 径：22 mm 厚 み：9 mm 質 量：2.70 g 表面積：19.07 cm ²	6 cm ² /mL： 3.28 mL 0.1 g/mL： 27.0 mL
6	ゴム栓 （ブチル）	No.1 と同様の形状		直 径：19 mm 厚 み：7 mm 質 量：1.32 g 表面積：9.35 cm ²	6 cm ² /mL： 1.56 mL 0.1 g/mL： 13.2 mL
7	ゴムディスク （イソプレン）			直 径：24 mm 厚 み：7 mm 質 量：2.29 g 表面積：17.40 cm ²	6 cm ² /mL： 2.9 mL 0.1 g/mL： 22.9 mL
8	ゴムディスク （イソプレン）			直 径：29 mm 厚 み：5 mm 質 量：3.44 g 表面積：18.40 cm ²	6 cm ² /mL： 3.07 mL 0.1 g/mL： 34.4 mL
9	ゴム栓 （ブチル）	No.1 と同様の形状		直 径：19 mm 厚 み：8 mm 質 量：1.79 g 表面積：9.86 cm ²	6 cm ² /mL： 1.64 mL 0.1 g/mL： 17.9 mL

原則、同一ロットを試験に用いたがサイズの小さい検体については採取量が多くなることから、複数ロットを混合して試験に用いた。

ゴム栓 No. 4 は、金属部分を取り除いた後、試験に用いた。

抽出割合は、表面積を基準（6 cm²に対し 1 mL）に試験を実施したが、質量を基準（0.1 g に対し 1 mL）とした場合に 1 個あたりに加える抽出媒体量も参考に記載した。

液による抽出法、及び②日局 16 の 7.02 プラスチック製医薬品容器試験法：細胞毒性試験法（コロニー形成法）で採用されている培地抽出法）による細胞毒性試験を実施し、抽出液及び抽出条件の比較検討を行うとともに、9 種類の注射用ゴム栓の細胞毒性作用の有無について評価した。

2. 材料及び方法

2.1 被験物質

国内外に流通している 9 種類の注射用ゴム栓を被験物質とし、121°C、20 分間高圧蒸気滅菌した後、試験に用いた。使用したゴム栓の形状、表面積及び質量等の詳細を Table 1 に示した。

2.2 対照材料及び対照物質

陰性対照材料として、高密度ポリエチレンフィルム（ロット番号：C-042, (財)食品薬品安全センター）を、また被験物質の毒性の程度を知るため、中程度の細胞毒性作用を示す陽性対照材料A（基準値：7%未満）として0.1% zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) 含有ポリウレタンフィルム（ロット番号：A-081K, (財)食品薬品安全センター）を、弱い細胞毒性作用を示す陽性対照材料B（基準値：80%未満）として0.25% zinc dibutyl-dithiocarbamate (ZDBC) 含有ポリウレタンフィルム（ロット番号：B-103, (財)食品薬品安全センター）を使用した。いずれも約2×15 mmの細切品を秤量後にEOG滅菌（40°C, 6時間）して用いた。

更に、細胞の感度及び実験条件の精度を確認するための陽性対照物質として、陽性対照材料B中に含まれているZDBC（ロット番号：PEQ5135, 和光純薬工業㈱）を用いた。陽性対照物質は、ジメチルスルホキシド（DMSO, ロット番号：KWH5335, 和光純薬工業㈱）に溶解して希釈した。

2.3 細胞毒性試験

2.3.1 細胞

チャイニーズハムスター肺由来のV79細胞（以下、V79細胞と示す）はヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより入手した後、凍結保存（マイコプラズマ陰性）し、その細胞を解凍して試験に用いた。培養はウシ胎児血清〔ロット番号：7G0031, CCB (SAFC Biosciences)〕を10 vol%含むEagle's MEM培地（MEM10培地）を用い、CO₂インキュベーター（CO₂濃度5%, 37°C）内で培養した。ただし、培地抽出液を用いた細胞毒性試験においては、ウシ胎児血清（5 vol%）及びピルビン酸ナトリウム（1 mmol/L）を含むEagle's MEM培地（M05培地）を用いた。試験には6ウェルプレート（ウェル直径：35 mm）を用いた。1用量当たり3ウェル用いた。

2.3.2 生理食塩液抽出液を用いる細胞毒性試験

高圧蒸気滅菌（121°C, 20分間）した各被験物質30 cm²以上に対して、6 cm²/mLの割合になるよう日局生理食塩液（以下、生食と記す）を加えた。高密度ポリエチレンフィルム、0.1% ZDEC含有ポリウレタンフィルム、及び0.25% ZDBC含有ポリウレタンフィルムについては、それぞれ0.1 g/mLの割合になるよう生食を加えた。それぞれを高圧蒸気滅菌器（121°C, 60分間）で抽出したものを生食抽出原液（100%）とした。

これらの生食抽出原液を生食で希釈し、濃度の異なる

試験液（被験物質：25, 50, 75, 100%, 陰性対照材料：25, 50, 75, 100%, 陽性対照材料A：20, 40, 50, 60, 80, 100%及び陽性対照材料B：20, 40, 50, 60, 80, 100%）を調製した。

V79細胞を0.25%トリプシンを用いて単離した後、細胞濃度10³個/mLの懸濁液とし、この細胞懸濁液0.1 mL（100細胞）を2 mLのM05培地が入っている6ウェルプレートに分注した。翌日、ウェル内の培地を除き、新鮮なM05培地（陰性対照）1.8 mLと交換した後、希釈した試験液又は生食（陰性対照）をそれぞれ0.2 mL加えて、6日間培養した（最終濃度、被験物質：2.5, 5.0, 7.5, 10%, 陰性対照材料：2.5, 5.0, 7.5, 10%, 陽性対照材料A：2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10%及び陽性対照材料B：2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10%）。

培養後、培地を除き、メタノールで固定し、10 vol%ギムザ液で染色した。ウェル当りのコロニー数を多目的高速画像解析装置（Model No.: PCA-11, システムサイエンス）で計測し、陰性対照（新鮮なM05培地100%）と比較して各処理群の相対コロニー形成率（陰性対照のコロニー数の平均値を100%とし、各濃度でのコロニー数の平均値を百分率で示した数）を算出し、IC₅₀値（コロニー形成を50%阻害する濃度）を求めた。また、播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数の平均値から、陰性対照群でのコロニー形成能（形成されたコロニー数/100）を算出した。

2.3.3 培地抽出液を用いる細胞毒性試験

高圧蒸気滅菌（121°C, 20分間）した各被験物質120 cm²以上に対して、6 cm²/mLの割合になるようM05培地を加えた。高密度ポリエチレンフィルム、0.1% ZDEC含有ポリウレタンフィルム、及び0.25% ZDEC含有ポリウレタンフィルムについては、それぞれ0.1 g/mLの割合になるようM05培地を加えた。それぞれをCO₂インキュベーター（CO₂濃度5%, 37°C）に24時間静置して抽出したものを培地抽出原液（100%）とした。

これらの培地抽出原液を新鮮なM05培地で希釈し、濃度の異なる試験液（被験物質：25, 50, 75, 100%, 陰性対照材料：25, 50, 75, 100%, 陽性対照材料A：0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0%及び陽性対照材料B：20, 40, 50, 60, 80, 100%）を調製した。

2.3.2と同様にV79細胞を播種した。翌日、ウェル内の培地を除き、各濃度の試験液又は新鮮なM05培地（陰性対照）2 mLと交換し、6日間培養した（最終濃度、被験物質：25, 50, 75, 100%, 陰性対照材料：25, 50, 75, 100%, 陽性対照材料A：0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0%及び陽性対照材料B：20, 40, 50, 60, 80, 100%）。

以下、2.3.2と同様の方法により、陰性対照（新鮮なM05培地100%）に対する各処理群の相対コロニー形成率を算出し、 IC_{50} 値を求めた。また、陰性対照群でのコロニー形成能を算出した。

2.3.4 陽性対照物質を用いた細胞毒性試験

2.3.2と同様にV79細胞を播種した。ただし、MEM10培地を用いた。翌日、各ウェルより培地を除き、新鮮なMEM10培地2 mLを加えた後、最終濃度（1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）の200倍になるように調製したZDBC溶液（高圧蒸気滅菌済ZDBC粉末及び未処理ZDBC粉末を使用）又はDMSO（陰性対照）を10 μL ずつ培地に添加し（溶媒濃度0.5 vol%）、6日間培養した。以下、2.3.2と同様の方法により、陰性対照（DMSO 0.5 vol%）に対する各処理群の相対コロニー形成率を算出し、 IC_{50} 値を求めた。

2.3.5 評価

対照材料及び陽性対照物質で得られた結果が、以下に記載した1)～4)の内容を満たしている場合に試験成立とした。

- 1) 陰性対照群でのコロニー形成能が良好（0.8以上）であること
- 2) 陰性対照材料の100%抽出液でのコロニー数が陰性対照群と同程度（相対コロニー形成率が80%以上）であること
- 3) 陽性対照物質（ZDBC）の IC_{50} 値が1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であること
- 4) 陽性対照材料Aの IC_{50} 値が7%未満、陽性対照材料Bの IC_{50} 値が80%未満であること

また、第十六改正日本薬局方（日局16）の一般試験法「7.02プラスチック製医薬品容器試験法」の基準に準拠し、被験物質の IC_{50} 値が90%以上であった場合を適合とした。

3. 結果

注射用ゴム栓9種について、生食抽出液及び培地抽出液を用いてコロニー形成法による細胞毒性試験を実施した。

その結果、生食抽出液ではゴム栓9種共に最高濃度である10%においても、コロニー形成阻害は認められなかった（Fig. 1, Table 2）。

一方、培地抽出液では、No.7 ゴムディスク（イソプレン）の抽出液において、50%以上の濃度でコロニーが形成されず IC_{50} 値は36%であり、「7.02プラスチック製

医薬品容器試験法」の基準で不適合となった。No.5 ゴム栓（イソプレン）の抽出液では75%以上の濃度でコロニーが小さかったが、コロニー形成率の低下は認められなかった。それ以外のゴム栓7種については、最高濃度である100%においても、コロニー形成阻害は認められなかった（Fig. 1, Table 3）。

陰性対照群でのコロニー形成能は0.82（培地抽出液）及び0.87（生食抽出液）であり良好であった。また、陰性対照材料はいずれの抽出液でも全ての濃度においてV79細胞のコロニー形成を阻害しなかった。

陽性対照材料Aの抽出液では、 IC_{50} 値0.79%（培地抽出）及び2.8%（生食抽出）であり、陽性対照材料Bの抽出液では、培地抽出液では IC_{50} 値67%であったが、10%を最高濃度とする生食抽出液では全ての濃度でコロニー形成阻害は認められなかった（Table 2, 3及びFig. 1）。また、陽性対照物質（高圧蒸気滅菌未処理及び処理ZDBC粉末）を用いて調製したZDBC溶液のV79細胞におけるコロニー形成試験の結果（ IC_{50} 値）は、それぞれ3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった（Table 4）。

4. 考察

ゴム栓の毒性評価は、ゴム栓に含まれる残留物を抽出溶媒中に溶出させ、その抽出液を用いて実施されるが、抽出条件によって試験結果が異なる可能性があることから、今回、日局16「7.03輸液用ゴム栓試験法」の急性毒性試験に適用されている生理食塩液による121°C、60分間の抽出液（生食抽出液）と、日局16「7.02プラスチック製医薬品容器試験法」で採用されている培地（ただしM05培地を使用）による37°C、24時間の抽出液（培地抽出液）の2種類の抽出方法を用いて細胞毒性試験を実施した。

その結果、10%を最高濃度とする生食抽出液ではいずれのゴム栓抽出液もコロニー形成阻害作用を示さなかったが、100%を最高濃度とする培地抽出液ではNo.7 ゴムディスク（イソプレン）の50%以上の濃度で細胞毒性が認められた。この結果は、培地抽出液では処理可能な濃度範囲が広いこと、ゴム栓からの細胞毒性作用のある添加剤等の抽出効率がよいことのいずれか又は両者によるものと考えられた。なお、生食抽出液において測定感度が低い原因として、抽出温度が高いことによる毒性物質の熱分解の可能性も考えられるが、少なくともゴム栓原料の一つで、陽性対照物質であるZDBCについては熱分解を示す結果は得られなかった。

上記の検討結果より、プラスチック製医薬品容器試験法において採用されている培地抽出法をゴム栓試験法に

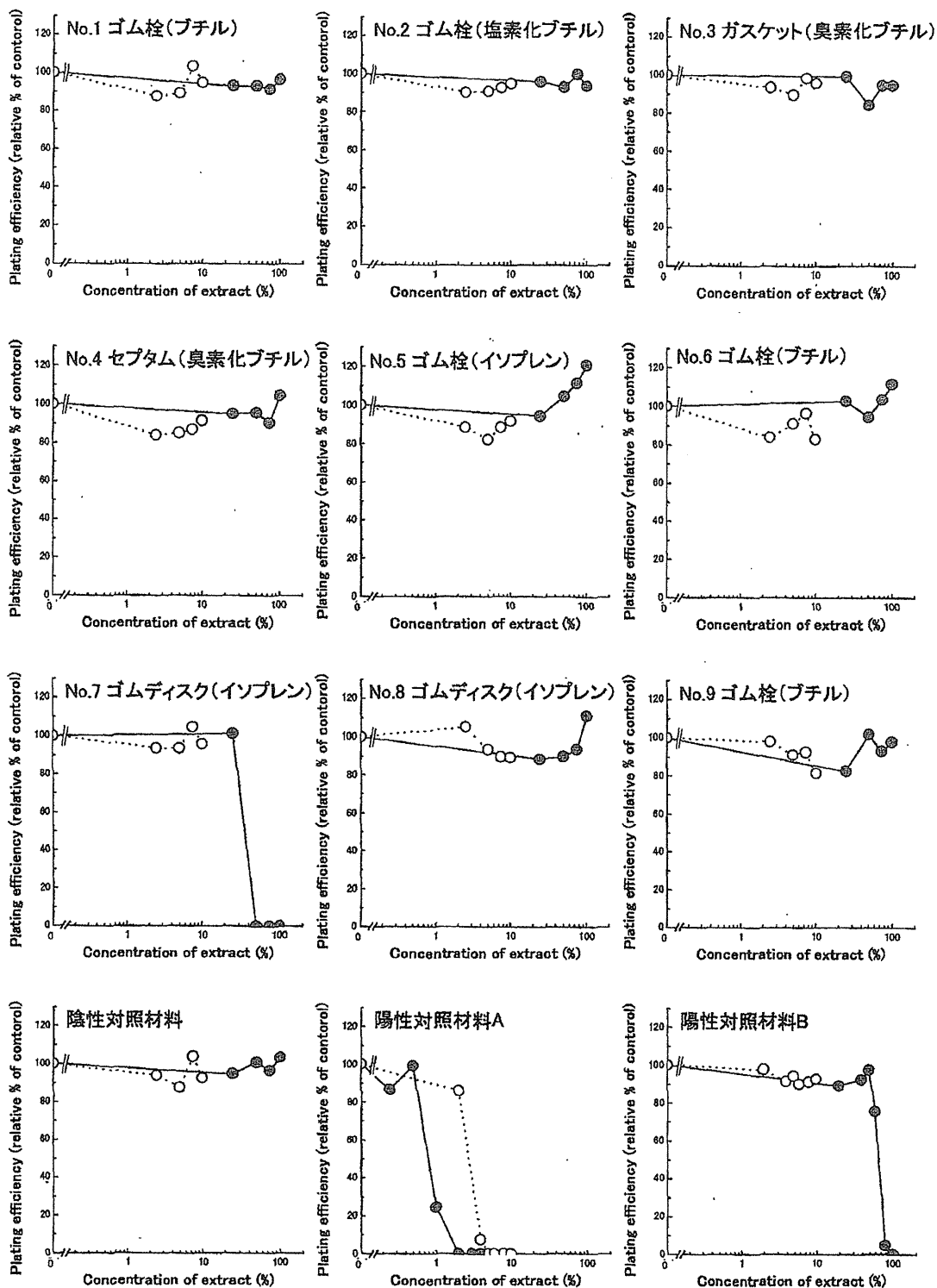


Fig.1 ゴム栓9種の抽出液（培地及び生理食塩液）のV79細胞におけるコロニー形成率に対する影響
 V79細胞をウェルに100個播種した翌日、種々の濃度のゴム栓9種の抽出液にて処理をして6日間培養を続けた後に、固定、染色してコロニー形成率を求めた。
 ●：培地抽出液，○：生理食塩液抽出液

Table 2 ゴム栓9種のV79細胞における生食抽出液を用いたコロニー形成試験結果

物質名	抽出液 濃度(%)	コロニー ^a /ウェル					相対コロニー 形成率(%)	IC ₅₀ (%)
		1	2	3	平均 ± S.D.			
生食 (陰性対照)	10 vol%	94	85	81	86.7 ± 6.7	100.0		
ゴム栓(ブチル) ^c No.1	2.5	77	86	65	76.0 ± 10.5	87.7		
	5.0	85	69	78	77.3 ± 8.0	89.2	— ^b	
	7.5	98	79	92	89.7 ± 9.7	103.5		
	10	80	77	89	82.0 ± 6.2	94.6		
ゴム栓(塩素化ブチル) ^c No.2	2.5	80	68	87	78.3 ± 9.6	90.3		
	5.0	83	80	73	78.7 ± 5.1	90.8	— ^b	
	7.5	71	79	91	80.3 ± 10.1	92.6		
	10	76	93	78	82.3 ± 9.3	94.9		
ガスカート(臭素化ブチル) ^c No.3	2.5	89	78	76	81.0 ± 7.0	93.4		
	5.0	83	77	73	77.7 ± 5.0	89.6	— ^b	
	7.5	87	84	85	85.3 ± 1.5	98.4		
	10	92	78	79	83.0 ± 7.8	95.7		
セプタム(臭素化ブチル) No.4	2.5	74	79	65	72.7 ± 7.1	83.9		
	5.0	68	75	78	73.7 ± 5.1	85.0	— ^b	
	7.5	75	74	77	75.3 ± 1.5	86.9		
	10	75	75	88	79.3 ± 7.5	91.5		
ゴム栓(イソブレン) No.5	2.5	74	81	75	76.7 ± 3.8	88.5		
	5.0	78	64	72	71.3 ± 7.0	82.2	— ^b	
	7.5	70	77	83	76.7 ± 6.5	88.5		
	10	86	65	88	79.7 ± 12.7	91.9		
ゴム栓(ブチル) No.6	2.5	74	82	62	72.7 ± 10.1	83.9		
	5.0	83	83	70	78.7 ± 7.5	90.8	— ^b	
	7.5	88	82	81	83.7 ± 3.8	96.5		
	10	64	73	78	71.7 ± 7.1	82.7		
ゴムディスク(イソブレン) No.7	2.5	73	79	92	81.3 ± 9.7	93.8		
	5.0	79	83	82	81.3 ± 2.1	93.8	— ^b	
	7.5	87	91	94	90.7 ± 3.5	104.6		
	10	77	82	90	83.0 ± 6.6	95.7		
ゴムディスク(イソブレン) No.8	2.5	92	94	87	91.0 ± 3.6	105.0		
	5.0	74	83	86	81.0 ± 6.2	93.4	— ^b	
	7.5	69	92	72	77.7 ± 12.5	89.6		
	10	79	75	78	77.3 ± 2.1	89.2		
ゴム栓(ブチル) No.9	2.5	82	85	88	85.0 ± 3.0	98.0		
	5.0	77	81	79	79.0 ± 2.0	91.1	— ^b	
	7.5	79	81	81	80.3 ± 1.2	92.6		
	10	74	73	65	70.7 ± 4.9	81.5		
高密度ポリエチレン フィルム (陰性対照材料)	2.5	78	87	79	81.3 ± 4.9	93.8		
	5.0	78	59	90	75.7 ± 15.6	87.3	— ^b	
	7.5	101	75	94	90.0 ± 13.5	103.8		
	10	83	83	74	80.0 ± 5.2	92.3		
0.1% ZDEC 含有 ポリウレタンフィルム (陽性対照材料 A)	2.0	78	69	77	74.7 ± 4.9	86.2		
	4.0	7	4	9	6.7 ± 2.5	7.7		
	5.0	0	0	0	0 ± 0	0.0	2.8	
	6.0	0	0	0	0 ± 0	0.0		
	8.0	0	0	0	0 ± 0	0.0		
0.25% ZDBC 含有 ポリウレタンフィルム (陽性対照材料 B)	2.0	83	92	79	84.7 ± 6.7	97.7		
	4.0	75	90	73	79.3 ± 9.3	91.5		
	5.0	86	87	72	81.7 ± 8.4	94.2	— ^b	
	6.0	83	74	77	78.0 ± 4.6	90.0		
	8.0	74	72	91	79.0 ± 10.4	91.1		
10	78	85	78	80.3 ± 4.0	92.6			

a: 多目的高速画像解析装置 (PCA-11) でのコロニー数計測は、測定するエリア、コロニーの大きさ、コロニー同士の密着度等の状態により設定された係数 (1.3) を乗じて得られた数値を、小数点第1位で四捨五入して整数で表記した。

b: 最高処理濃度においても IC₅₀ 値を求められるようなコロニー形成阻害はみられなかった。

c: コロニーに偏りがあったため PCA-11 での検出が不十分であったため、目視でカウントした。

Table 3 ゴム栓9種のV79細胞における培地抽出液を用いたコロニー形成試験結果

物質名	抽出液 濃度(%)	コロニー ^a /ウェル					相対コロニー 形成率(%)	IC ₅₀ (%)
		1	2	3	平均 ±	S.D.		
培地 (陰性対照)	0	79	83	85	82.3 ±	3.1	100.0	
ゴム栓(ブチル)	25	87	70	73	76.7 ±	9.1	93.2	
No.1	50	75	74	81	76.7 ±	3.8	93.2	— ^b
	75	81	68	77	75.3 ±	6.7	91.5	
	100	82	86	70	79.3 ±	8.3	96.4	
ゴム栓(塩素化ブチル)	25	75	81	81	79.0 ±	3.5	96.0	
No.2	50	72	72	86	76.7 ±	8.1	93.2	— ^b
	75	75	90	82	82.3 ±	7.5	100.0	
	100	79	72	81	77.3 ±	4.7	93.9	
ガasket(臭素化ブチル)	25	77	82	86	81.7 ±	4.5	99.3	
No.3	50	70	68	70	69.3 ±	1.2	84.2	— ^b
	75	70	91	73	78.0 ±	11.4	94.8	
	100	83	70	81	78.0 ±	7.0	94.8	
セプタム(臭素化ブチル)	25	83	73	79	78.3 ±	5.0	95.1	
No.4	50	90	78	68	78.7 ±	11.0	95.6	— ^b
	75	72	66	85	74.3 ±	9.7	90.3	
	100	70	96	92	86.0 ±	14.0	104.5	
ゴム栓(イソプレン)	25	79	73	81	77.7 ±	4.2	94.4	
No.5	50	86	86	87	86.3 ±	0.6	104.9	— ^b
	75 ^c	104	91	81	92.0 ±	11.5	111.8	
	100 ^c	109	91	99	99.7 ±	9.0	121.1	
ゴム栓(ブチル)	25	81	77	96	84.7 ±	10.0	102.9	
No.6	50	77	74	82	77.7 ±	4.0	94.4	— ^b
	75	92	79	85	85.3 ±	6.5	103.6	
	100	99	82	95	92.0 ±	8.9	111.8	
ゴムディスク(イソプレン)	25	73	86	91	83.3 ±	9.3	101.2	
No.7	50	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	36
	75	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	
	100	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	
ゴムディスク(イソプレン)	25	69	79	70	72.7 ±	5.5	88.3	
No.8	50	74	69	79	74.0 ±	5.0	89.9	— ^b
	75	74	85	72	77.0 ±	7.0	93.6	
	100	95	98	81	91.3 ±	9.1	110.9	
ゴム栓(ブチル)	25	66	66	72	68.0 ±	3.5	82.6	
No.9	50	86	87	78	83.7 ±	4.9	101.7	— ^b
	75	78	79	73	76.7 ±	3.2	93.2	
	100	82	61	99	80.7 ±	19.0	98.1	
高密度ポリエチレン フィルム (陰性対照材料)	25	82	69	83	78.0 ±	7.8	94.8	
	50	74	92	83	83.0 ±	9.0	100.9	— ^b
	75	73	82	83	79.3 ±	5.5	96.4	
	100	82	87	86	85.0 ±	2.6	103.3	
0.1% ZDEC 含有 ポリウレタンフィルム (陽性対照材料 A)	0.25	75	74	65	71.3 ±	5.5	86.6	
	0.50	70	87	88	81.7 ±	10.1	99.3	
	1.0	18	14	29	20.3 ±	7.8	24.7	0.79
	2.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	
	3.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	
	4.0	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	
0.25% ZDBC 含有 ポリウレタンフィルム (陽性対照材料 B)	20	73	81	66	73.3 ±	7.5	89.1	
	40	74	75	79	76.0 ±	2.6	92.3	
	50	78	78	85	80.3 ±	4.0	97.6	67
	60	69	59	59	62.3 ±	5.8	75.7	
	80	4	5	3	4.0 ±	1.0	4.9	
	100	0	0	0	0.0 ±	0.0	0.0	

a: 多目的高速画像解析装置 (PCA-11) でのコロニー数計測は、測定するエリア、コロニーの大きさ、コロニー同士の密着度等の状態により設定された係数 (1.3) を乗じて得られた数値を、小数点第1位で四捨五入して整数で表記した。

b: 最高処理濃度においても IC₅₀ 値を求められるようなコロニー形成阻害はみられなかった。

c: 濃度依存的にコロニーサイズが小さかった。

Table 4 陽性対照物質のV79細胞におけるコロニー形成試験の結果

物質名	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	コロニー ^a /ウェル					S.D.	相対コロニー 形成率(%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
		1	2	3	平均	±			
DMSO(陰性対照)	0.5vol%	82	85	85	84.0	± 1.7		100.0	
ZDBC(陽性対照物質) 未処理	1.0	99	101	79	93.0	± 12.2		110.7	
	2.0	65	92	66	74.3	± 15.3		88.5	
	3.0	55	59	53	55.7	± 3.1		66.3	3.3
	4.0	3	4	14	7.0	± 6.1		8.3	
	5.0	0	0	0	0.0	± 0.0		0.0	
ZDBC(陽性対照物質) 高圧蒸気滅菌 (121°C, 60分間)	1.0	91	86	91	89.3	± 2.9		106.3	
	2.0	96	105	65	88.7	± 21.0		105.6	
	3.0	57	47	56	53.3	± 5.5		63.5	3.2
	4.0	4	3	14	7.0	± 6.1		8.3	
	5.0	3	0	0	1.0	± 1.7		1.2	

a: 多目的高速画像解析装置 (PCA-11) でのコロニー数計測は、測定するエリア、コロニーの大きさ、コロニー同士の密着度等の状態により設定された係数 (1.3) を乗じて得られた数値を、小数点第1位で四捨五入して整数で表記した。

における試料溶液の調製方法として設定することは妥当であると考えられたが、今後更に検討を積み重ねていく必要がある。

今回、国内外で流通している9種類のゴム栓についてコロニー形成法による細胞毒性試験を実施したが、上述したようにNo.7 ゴムディスク (イソプレン) では50%以上の濃度で明らかな細胞毒性を示し、IC₅₀値は36%となった。また、それら9種類のゴム栓については、第2報⁵⁾で示したように日局16一般試験法7.03輸液用ゴム栓試験法の理化学試験についても実施している⁵⁾が、No.7 ゴムディスクは複数の項目の規格に適合しなかった。その結果をTable 5に再掲載した。No.7の検体については、鉛 (13 ppm, 規格値5 ppm以下)、溶出物試験：性状：色調・濁度 (白濁)、透過率 (430 nm: 88.5%及び650 nm: 94.3%, 規格値共に99.0%以上)、pH (pH 8.95, 規格値：空試験液pH 5.97との差1.0以下)、過マンガン酸カリウム還元性物質 (5.49 mL, 規格値：空試験液との消費量の差2.0 mL以下)、蒸発残留物 (3.4 mg, 規格値：2.0 mg以下)、紫外吸収スペクトル (0.32, 規格値：吸光度0.20以下)の試験において規格に適合しなかった。

そして、同試料は今回行った細胞毒性試験においてもプラスチック製医薬品容器試験法と同様の判定基準を適用した場合、培地抽出法では規格不適合という結果であった。国内ゴム栓メーカーへのアンケート結果 (第1報⁴⁾)によれば、イソプレンゴムには加硫促進剤としてチオウレア系及びジチオカルバメート系加硫促進剤が、老化防止剤としてフェノール系酸化防止剤や2,2'-メチレンビス (4-エチル-6-tert-ブチルフェノール) が、その他有機過酸化物質、ステアリン酸、ステアリン酸亜鉛、硫黄等が添加されている。また、No.7の検体の理化学試験

の実測値 (第2報⁵⁾)において規格内ではあるが亜鉛が検出されている。よって、No.7の検体において認められた細胞毒性作用はそれら添加剤により引き起こされた可能性が考えられるが、当該ゴム栓は現在海外で使用されているゴム栓であることから、他の異なる添加剤が使用されている可能性もある。今後、国内のみならず海外から輸入されたゴム栓あるいは注射剤についても、安全性の観点から注意を払っていく必要がある。

ところで、これまでに行った急性毒性試験と細胞毒性試験の感度比較の検討結果 (第3報⁶⁾)では、非常に強い細胞毒性を示す化合物を除き両者の検出感度には100倍又はそれ以上のマージンがあったことを考慮すると、No.7の検体について細胞毒性試験では不適合と判定されたものの、急性毒性試験では適合と判定される可能性がある。したがって、仮にNo.7の検体の急性毒性試験は適合という結果が得られた場合には、今回の検討結果はそのような不適当なゴム栓の市場への流通を細胞毒性試験により抑止することができることを示しており、注射剤の直接の容器として使用されるプラスチック製医薬品容器と同様の水準でゴム栓の安全性を担保することができると考えられた。

今後、理化学試験及び細胞毒性試験の結果から医療用・医薬品用ゴム栓として不適切であると考えられたNo.7のゴム栓が、日局16の急性毒性試験においても不適合という結果が得られるかどうか注目されることである。

5. 結論

細胞毒性試験に供する試料溶液の調製方法を検討することを目的として、注射用ゴム栓9種について2種類の

Table 5 日局による理化学的試験⁵⁾

試験項目	試験方法	規格値	ゴム栓									
			No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	
灰化試験												
カドミウム	日局	5 ppm 以下	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0.07 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)	2.5 ppm以下 (0 ppm)
鉛	日局	5 ppm 以下	2.0 ppm以下 (0.22 ppm)	2.0 ppm以下 (0.47 ppm)	2.0 ppm以下 (0.39 ppm)	2.0 ppm以下 (0.93 ppm)	2.0 ppm以下 (1.66 ppm)	2.0 ppm以下 (0.27 ppm)	13 ppm	2.0 ppm以下 (1.03 ppm)	2.0 ppm以下 (0.49 ppm)	
溶出物試験												
性状 (色調)	日局	無色	無色	無色	無色	無色	無色	無色	白濁のため色調不明	無色	無色	
	EP (比較液)	—	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)	白濁のため色調不明	無色(GY ₇ より濃くない)	無色(GY ₇ より濃くない)
性状 (濁度)	日局	澄明	澄明	澄明	澄明	澄明	澄明	澄明	白濁	澄明	澄明	澄明
	EP (標準液)	Type I : 標準懸濁液 II 以下 Type II : 標準懸濁液 III 以下	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIIと同等	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない	試験液の濁りはsuspension IIより濃くない
	濁度計 ²⁾	(ISO) Type I : 6 FTU 以下 Type II : 18 FTU 以下	3 FTU以下 (-0.015 FTU)	3 FTU以下 (0.007 FTU)	3 FTU以下 (0.409 FTU)	3 FTU以下 (0.830 FTU)	3 FTU以下 (0.034 FTU)	3 FTU以下 (0.006 FTU)	15 FTU	3 FTU以下 (0.017 FTU)	3 FTU以下 (0.018 FTU)	3 FTU以下 (0.018 FTU)
性状 (透過率)	日局	430 nm : 99.0 %以上	100.0 %	100.0 %	99.4 %	96.9 %	99.9 %	100.0 %	88.5 %	100.0 %	99.9 %	
		650 nm : 99.0 %以上	100.1 %	100.0 %	99.5 %	97.1 %	100.0 %	100.1 %	94.3 %	100.1 %	99.9 %	
泡立ち	日局	生じた泡は3分以内にほとんど消失	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず	泡立ちを認めず
pH	日局	空試験液との差は1.0以下	差0.5以下 (差0.02 ³⁾)	差0.5以下 (差0.12 ⁴⁾)	差0.5以下 (差0.40 ⁴⁾)	差1.0 ⁴⁾	差0.5以下 (差0.19 ⁴⁾)	差0.5以下 (差0.18 ⁴⁾)	差3.0 ⁴⁾	差0.5以下 (差0.01 ⁴⁾)	差0.5以下 (差0.22 ⁴⁾)	差0.5以下 (差0.22 ⁴⁾)
		実測値(空試験液 : 5.97)	5.95	6.09	6.37	6.97	6.16	6.15	8.95	5.98	6.19	
重金属	ICP-MS ⁵⁾	—	検出された元素なし	検出された元素なし	検出された元素なし	臭素	検出された元素なし	検出された元素なし	ホウ素, イオウ, カルシウム	検出された元素なし	検出された元素なし	検出された元素なし
亜鉛	日局	1 µg/mL 以下	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.5 µg/mL	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)	0.2 µg/mL以下 (0 µg/mL)
過マンガン酸カリウム還元性物質	日局 4時間以内	空試験液とのKMnO ₄ 消費量の差は2.0 mL 以下	差0.5 mL以下 (差0.45 mL)	差0.5 mL以下 (差0.06 mL)	差0.6 mL	差0.8 mL	差0.6 mL	差0.5 mL以下 (差0.07 mL)	差5.0 mL以上 (差5.49 mL)	差1.6 mL	差0.5 mL以下 (差0.17 mL)	差0.5 mL以下 (差0.17 mL)
蒸発残留物	日局	2.0 mg 以下	1.0 mg以下 (0.1 mg)	1.0 mg以下 (-0.1 mg)	1.0 mg以下 (0.4 mg)	1.6 mg	1.0 mg以下 (-0.4 mg)	1.0 mg以下 (-0.3 mg)	3.4 mg	1.0 mg以下 (-0.1 mg)	1.0 mg以下 (-0.4 mg)	1.0 mg以下 (-0.4 mg)
紫外吸収スペクトル	日局 5時間以内 220~360 nm	吸光度 0.20 以下	0.01以下 (0.0027 [220 nm])	0.01以下 (0.0020 [220 nm])	0.01以下 (0.0140 [220 nm])	0.04 [220 nm]	0.01以下 (0.0128 [220 nm])	0.01以下 (0.0004 [360 nm])	0.32 [220 nm]	0.04 [225 nm]	0.01以下 (0.0083 [220 nm])	0.01以下 (0.0083 [220 nm])
TOC ⁶⁾	TOC計	—	9.4 mg/L	0.7 mg/L	2.7 mg/L	4.7 mg/L	3.0 mg/L	1.2 mg/L	23 mg/L	4.2 mg/L	1.2 mg/L	1.2 mg/L
導電率(4時間以内) ^{7,8)}	導電率計	(ISO) Type I : 15 µS/cm 以下 Type II : 30 µS/cm 以下	1.4 µS/cm	1.1 µS/cm	2.6 µS/cm	8.9 µS/cm	1.9 µS/cm	1.3 µS/cm	27 µS/cm	1.5 µS/cm	1.6 µS/cm	1.6 µS/cm

()内は参考値

*1 孔径0.45 µmのフィルターでろ過した液は濁りがなく、無色であった。

*2 濁度 : 1 FTUは1 NTUと同等。

*3 試験液のpH < 空試験液のpH

*4 試験液のpH > 空試験液のpH

*5 濃度の目安として1~10 µg/mL検出された元素を記載。10 µg/mL以上検出された元素は無かった。

*6 空試験液は0.7 mg/Lであった。

*7 25℃における導電率を測定した。

*8 空試験液は0.93 µS/cmであった。

[白濁]は規格に不適合

抽出方法（生食抽出法及び培地抽出法）を用いて検討を行った。その結果、生食抽出液（最高濃度：10%）ではいずれのゴム栓抽出液もコロニー形成阻害作用を示さず、陽性対照材料 B においても細胞毒性は認められなかった。一方、培地抽出液では、No.7 ゴム栓では50%の培地抽出液において細胞毒性が認められ、また、陽性対照材料 A 及び B のいずれにおいても期待通りの細胞毒性が観察された。培地抽出液では試験系へ100%添加できること、抽出効率がよいことのいずれか、又は両者に起因し、期待通りの結果が得られたものと考えられた。

以上の結果より、プラスチック製医薬品容器試験法の細胞毒性試験に適用されている培地抽出液による抽出法は検出濃度域が広く、ゴム栓試験においてもより適した試料溶液の調製方法であることが示唆された。

文 献

- 1) 厚生労働省：第十六改正日本薬局方，2011，p127-128.
- 2) The European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care：European Pharmacopoeia 7.0，2011，p374-376.
- 3) The United States Pharmacopeial Convention：USP34-NF29，2011，p147-151.
- 4) 田邊豊重，高居邦弘，青木光夫，大久保恒夫，大内正，寺田三郎，柘植英哉，四方田千佳子：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，41(3)，221-239 (2010).
- 5) 田邊豊重，高居邦弘，青木光夫，大久保恒夫，大内正，寺田三郎，柘植英哉，辰巳治，関口道子，四方田千佳子：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，42(2)，156-176 (2011).
- 6) 柘植英哉，森充生，大庭澄明，大内正，寺田三郎，五島隆志，田邊豊重，山影康次，田中憲穂，渡辺美香，畔上二郎，大向英夫，小島 肇：医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，42(3)，258-271 (2011).

