

4.01 エンドトキシン試験法

次のように改める。

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。

エンドトキシン試験法は、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、グラム陰性菌由来のエンドトキシンを検出又は定量する方法である。本法には、エンドトキシンの作用による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測定法がある。光学測定法には、ライセート試液のゲル化過程における濁度変化を指標とする比濁法、及び合成基質の加水分解による発色を指標とする比色法がある。

エンドトキシン試験は、ゲル化法、比濁法又は比色法によって行う。ただし、その結果について疑義がある場合又は係争が生じた場合は、別に規定するもののほか、ゲル化法によって最終の判定を行う。

本法はエンドトキシンによる汚染を避けて行う。

1. 器具

試験に用いるすべてのガラス製及びその他の耐熱性器具は、有効とされている方法により乾熱処理を行う。通例、少なくとも 250℃で 30 分間の乾熱処理を行う。また、マルチウエルプレート及びマイクロピペット用チップなどのプラスチック製品を用いる場合は、エンドトキシンが検出されないこと及びエンドトキシン試験に対する干渉作用のないことが確認されたものを用いる。

2. 溶液の調製

2.1 エンドトキシン標準原液の調製

エンドトキシン標準原液はエンドトキシン標準品をエンドトキシン試験用水で溶解して調製する。なお、エンドトキシン単位は EU で示し、1 EU は 1 エンドトキシン国際単位 (IU) に等しい。

2.2 エンドトキシン標準溶液の調製

エンドトキシン標準溶液はエンドトキシン標準原液を十分に振り混ぜた後、エンドトキシン試験用水で希釈して調製する。エンドトキシン標準溶液は、エンドトキシンの容器への吸着を避けるため、できるだけ速やかに使用する。

2.3 試料溶液の調製

別に規定するもののほか、医薬品をエンドトキシン試験用水で溶解又は希釈し、試料溶液とする。ライセート試液と試料溶液の混液の pH が用いるライセート試薬に規定される pH 範囲になるように、試料溶液の pH の調整を必要とする場合もある。通例、試料溶液の pH は、6.0 ~ 8.0 の範囲にあればよい。pH の調整に用いる試液又は溶液はエンドトキシン試験用水を用いて調製し、エンドトキシンが検出されない容器に保存する。これらの試液又は溶液は、エンドトキシンが検出されないこと、及び反応干渉因子を含まないことが保証されたものでなければならない。

3. 最大有効希釈倍数の求め方

最大有効希釈倍数とは、試料溶液中に存在する反応干渉因子の影響を希釈により回避できるとき、許容される試料溶液の最大の希釈倍数である。

最大有効希釈倍数は、次の式によって求める。

最大有効希釈倍数 = (エンドトキシン規格値 × 試料溶液の濃度) / λ

エンドトキシン規格値：注射剤のエンドトキシン規格値は、投与量に基づいて規定されており、 K/M に等しい。ただし、 K は発熱を誘起するといわれる体重 1 kg 当たりのエンドトキシンの量 (EU/kg) であり、 M は体重 1 kg 当たり 1 回に投与される注射剤の最大量である。ただし注射剤が頻回あるいは持続的に投与される場合は、 M は 1 時間以内に投与される注射剤の最大総量とする。

試料溶液の濃度：試料溶液の濃度の単位は、エンドトキシン規格値が質量当たり (EU/mg) で規定されている場合は mg/mL、当量当たり (EU/mEq) で規定されている場合は mEq/mL、生物学的単位当たり (EU/単位) で規定されている場合は単位/mL、容量当たり (EU/mL) で規定されている場合は mL/mL である。

λ：ゲル化法の場合はライセート試薬の表示感度 (EU/mL) であり、比濁法又は比色法の場合は検量線の最小エンドトキシン濃度 (EU/mL) である。

47 **4. ゲル化法**

48 本法は、エンドトキシンの存在によるライセート試液の凝固反応に基づいて、エンドトキシンを検出又は定量する
49 方法である。

50 本法の精度と有効性を保証するために、予備試験（4.1）としてライセート試薬の表示感度確認試験（4.1.1）及び
51 反応干渉因子試験（4.1.2）を行う。

52 **4.1 予備試験**53 **4.1.1 ライセート試薬の表示感度確認試験**

54 ライセート試薬の表示感度とは、ライセート試薬に規定されている条件下でのライセート試液の凝固に必要な最小
55 エンドトキシン濃度である。ライセート試薬は各ロットにつき、使用する前にその表示感度をλを確認しなければなら
56 ない。

57 本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

58 ライセート試薬の表示感度の確認は、次の方法により行う。

59 エンドトキシン標準原液をエンドトキシン試験用水で希釈し、2λ、1λ、0.5λ及び0.25λの4種の濃度のエンドト
60 キシン標準溶液を調製する。

61 ライセート試液及びそれと等しい量、通例、0.1 mLのエンドトキシン標準溶液を試験管にとり、混和する。単回試
62 験用の凍結乾燥ライセート試薬を用いる場合は、その容器にエンドトキシン標準溶液を直接加え、ライセート試薬を
63 溶解する。

64 これらの試験管又は容器を通例、37±1℃に保ち、振動を避けて60±2分間静置した後、穏やかに約180°転倒し、
65 内容物を観察する。流出しない堅固なゲルが形成されているとき、陽性とする。ゲルを形成しないか、又は形成した
66 ゲルが流出するとき、陰性とする。

67 調製した4種の濃度のエンドトキシン標準溶液を用いて、この4種の液を一組とした試験を4回行う。

68 各回の試験において、濃度0.25λのエンドトキシン標準溶液がすべて陰性を示すとき、試験は有効である。試験が
69 有効でないときは、試験条件を整備して再試験を行う。

70 各回の試験において、陽性を示す最小エンドトキシン濃度をエンドポイント濃度とし、次の式によって4回の試験
71 の幾何平均エンドポイント濃度を求める。

72 幾何平均エンドポイント濃度 = $\text{antilog}(\Sigma e/f)$

73 Σe : 各回のエンドポイント濃度の対数 e の和

74 f : 試験の回数

75 求めた幾何平均エンドポイント濃度が0.5～2λの範囲にあるとき、ライセート試薬の表示感度は確認されたと判
76 定し、以下の試験にはその表示感度を用いる。

77 **4.1.2 反応干渉因子試験**

78 本試験は、試料溶液について、反応を促進又は阻害する因子の有無を調べる試験である。

79 表4.01-1に従い、A、B、C及びD液を調製し、A及びB液は4回、C及びD液は2回試験する。反応温度、反応
80 時間及びゲル化判定法は、4.1.1に従う。

81 B液及びC液の幾何平均エンドポイント濃度は、4.1.1の計算式を準用して求める。

82 本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

83 表 4.01-1

液	エンドトキシン濃度/ 被添加液	希釈液	希釈 倍数	エンドトキシン濃 度	試験の 回数
A ^{*1}	0/試料溶液	—	—	—	4
B ^{*2}	2λ/試料溶液	試料溶液	1	2λ	4
			2	1λ	
			4	0.5λ	
			8	0.25λ	
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン 試験用水	エンドトキシン 試験用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
			8	0.25λ	

D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2
-----------------	---------------	---	---	---	---

- 84 *1 陰性対照. 試料溶液のみ.
 85 *2 反応干渉因子試験のための, 標準エンドトキシンを添加した試料溶液.
 86 *3 ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液.
 87 *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

88 A 及び D 液の試験結果がすべて陰性で, C 液の試験結果によりライセート試薬の表示感度が確認されたとき, 反応
 89 干渉因子試験は有効とする.

90 B 液の試験結果において幾何平均エンドポイント濃度が 0.5 ~ 2λ の範囲にあるとき, 反応干渉因子は試料溶液に
 91 存在しないものと判定し, 試料溶液は反応干渉因子試験に適合とする. 幾何平均エンドポイント濃度がこの範囲にな
 92 いとき, 試料溶液は反応干渉作用を有する. 試料溶液に反応干渉作用が認められるとき, 最大有効希釈倍数を超えな
 93 い範囲で試料溶液を更に希釈し, 試験を行う. より高感度のライセート試薬を用いることにより, 試料の最大有効希
 94 釈倍数をより大きくすることができる. なお, 試料溶液から反応干渉作用を除くために, 試料溶液又は希釈した試料
 95 溶液につき, 適切な処理 (ろ過, 反応干渉因子の中和, 透析又は加熱処理など) を施すことができる. ただし, 処理
 96 によりエンドトキシンが損失しないことを保証するために, エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施す
 97 ことにより, 上記の試験に適合する結果が得られることを確認する.

98 4.2 限度試験法

99 本法は, 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
 100 薬の表示感度に基づいてゲル化反応により判定する方法である.

101 4.2.1 操作法

102 表 4.01-2 に従い, A, B, C 及び D 液を調製し, これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う. A 及び B 液の試
 103 料溶液は, 4.1.2 に適合する溶液を用いる.

104 反応温度, 反応時間及びゲル化判定は, 4.1.1 に準じる.

105

表 4.01-2

液	エンドトキシン濃度/被添加液	試験の回数
A ^{*1}	0/試料溶液	2
B ^{*2}	2λ/試料溶液	2
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン試験用水	2
D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	2

- 106 *1 限度試験のための試料溶液. 最大有効希釈倍数を超えない範囲で希
 107 釈することができる.
 108 *2 陽性対照. A 液と同倍数で希釈された試料溶液で, 終濃度 2λ とな
 109 るように標準エンドトキシンを添加したもの.
 110 *3 陽性対照. 濃度 2λ のエンドトキシン標準溶液.
 111 *4 陰性対照. エンドトキシン試験用水のみ.

112 4.2.2 判定

113 B 及び C 液の 2 回の試験結果がいずれも陽性で, D 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき, 試験は有効とする.

114 A 液の 2 回の試験結果がいずれも陰性のとき, 被検試料はエンドトキシン試験に適合とし, いずれも陽性のとき,
 115 不適とする.

116 A 液の 2 回の試験結果において, 1 回が陰性で他の 1 回が陽性のとき, この 2 回の試験を繰り返し行う. その 2 回
 117 の試験結果がいずれも陰性のとき, 被検試料はエンドトキシン試験に適合とする. 両方若しくは一方が陽性の場合
 118 は不適とする.

119 ただし, 陽性の結果が得られたいずれの場合でも, 試料溶液の希釈倍数が最大有効希釈倍数未満の場合, 最大有効
 120 希釈倍数あるいはそれを超えない希釈倍数で試験をやり直すことができる.

121 4.3 定量試験法

122 本法は, 被検試料のエンドトキシン濃度をゲル化反応のエンドポイントを求めることにより測定する方法である.

123 4.3.1 操作法

124 表 4.01-3 に従い、A、B、C 及び D 液を調製する。これらの 4 種の液を一組として試験を 2 回行う。A 及び B 液の
 125 試料溶液は、4.1.2 に適合する溶液を用いる。
 126 試験の操作条件は 4.1.1 に準じる。

127 4.3.2 エンドトキシン濃度の算出及び判定

128 2 回の試験のいずれの結果においても、D 液は陰性を、B 液は陽性を示し、C 液の幾何平均エンドポイント濃度が
 129 0.5 ~ 2λ の範囲にあるとき、試験は有効とする。

130 A 液の希釈系列において、陽性を示す最大の希釈倍数をエンドポイントとし、λ にエンドポイントにおける希釈倍
 131 数を乗じて得た値を試料溶液のエンドトキシン濃度とする。

132

表 4.01-3

液	エンドトキシン濃度/被添加液	希釈液	希釈倍数	エンドトキシン濃度	試験の回数
A ^{*1}	0/試料溶液	エンドトキシン試験用水	1	—	2
			2	—	
			4	—	
			8	—	
B ^{*2}	2λ/試料溶液	—	1	2λ	2
C ^{*3}	2λ/エンドトキシン試験用水	エンドトキシン試験用水	1	2λ	2
			2	1λ	
			4	0.5λ	
			8	0.25λ	
D ^{*4}	0/エンドトキシン試験用水	—	—	—	2

133 ^{*1} 定量試験のための試料溶液。段階希釈倍数は、最大有効希釈倍数を超えない範囲で適
 134 宜変更することができる。

135 ^{*2} 陽性対照。A 液の最小希釈倍数と同倍数で希釈された試料溶液に、終濃度 2λ となる
 136 ように標準エンドトキシンを添加したもの。

137 ^{*3} ライセート試薬の表示感度確認のためのエンドトキシン標準溶液。

138 ^{*4} 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。
 139

140 A 液の希釈系列の中に陽性を示すものがないとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は λ に A 液の最小希釈倍数を乗
 141 じた値未満とする。

142 A 液の希釈系列のすべてが陽性のとき、試料溶液のエンドトキシン濃度は、λ に A 液の最大希釈倍数を乗じた値以
 143 上とする。

144 試料溶液のエンドトキシン濃度から、被検試料のエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位)
 145 を算出する。

146 2 回の試験により被検試料について求めた 2 つのエンドトキシン濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/単位) の
 147 いずれもが、医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験に適合とす
 148 る。

149

150 5. 光学的定量法

151 5.1 比濁法

152 本法は、ライセート試液のゲル化に伴う濁度の変化を測定することにより、試料のエンドトキシン濃度を測定する
 153 方法である。エンドポイントー比濁法とカイネティックー比濁法がある。

154 エンドポイントー比濁法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における反応液の濁度との間の用量反応関係に
 155 基づく方法である。

156 カイネティックー比濁法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された濁度に達するのに要した時間又
 157 は濁度の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。

158 試験は、通例、37±1℃で行い、濁度は吸光度又は透過率で示される。

159 5.2 比色法

160 本法は、エンドトキシンの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
161 透過率で測定することにより、エンドトキシンを定量する方法である。エンドポイントー比色法とカイネティック
162 比色法がある。

163 エンドポイントー比色法は、エンドトキシン濃度と一定反応時間後における発色基の遊離量との間の用量反応関係
164 に基づく方法である。

165 カイネティック比色法は、エンドトキシン濃度と反応液があらかじめ設定された吸光度又は透過率に達するの
166 に要する時間又は発色の経時変化率との間の用量反応関係に基づく方法である。

167 試験は、通例、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で行う。

168 5.3 予備試験

169 比濁法又は比色法の精度と有効性を保証するために、検量線の信頼性確認試験 (5.3.1) 及び反応干渉因子試験
170 (5.3.2) を行う。

171 5.3.1 検量線の信頼性確認試験

172 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。

173 本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

174 用いるライセート試薬に規定されているエンドトキシンの濃度範囲で、少なくとも3種の濃度のエンドトキシン標
175 準溶液を調製し、これらの各濃度の溶液につき、3回以上測定して検量線を作成する。エンドトキシン標準溶液とラ
176 イセート試液の容量比、反応時間、反応温度、pHなどの操作条件は用いるライセート試薬の至適条件に従う。

177 検量線の濃度範囲を2桁より大きくするとき、1桁大きくするごとに用いるエンドトキシン標準溶液の濃度を1濃
178 度ずつ追加する。

179 作成した検量線の相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が 0.980 以上であるとき、検量線の信頼性は確認されたと判
180 定する。

181 検量線の信頼性が確認されなかったときは、試験条件を整備して再試験を行う。

182 5.3.2 反応干渉因子試験

183 表 4.01-4 に従い、A、B、C 及び D 液を調製して、試験を行う。ライセート試液の採取量、ライセート試液に対す
184 る試料溶液の容量比、反応時間などの操作条件は、用いるライセート試薬の至適条件に従う。

185 本試験は、試験結果に影響を及ぼす可能性が予想される試験条件の変更があるときにも行う。

186 表 4.01-4

液	エンドトキシン濃度	被添加液	試験管又は ウェルの数
A ^{*1}	0	試料溶液	2 以上
B ^{*2}	検量線の中点濃度 ^{*2}	試料溶液	2 以上
C ^{*3}	3 濃度以上	エンドトキシン試験用水	各濃度, 2 以上
D ^{*4}	0	エンドトキシン試験用水	2 以上

188 ^{*1} 試料溶液のみ (試料溶液のエンドトキシン濃度測定用)。最大有効希釈倍数
189 を超えない範囲で希釈することができる。

190 ^{*2} A 液と同倍数で希釈された試料溶液で、検量線の中点又は中点付近のエンド
191 トキシン濃度になるように標準エンドトキシンを添加したもの。

192 ^{*3} 5.3.1 で用いた各種濃度のエンドトキシン標準溶液 (検量線作成用)。

193 ^{*4} 陰性対照。エンドトキシン試験用水のみ。

194 本試験は次の2つの条件に適合するとき、有効である。

195 1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。

196 2. D 液の測定結果は、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの
197 検出限界未満である。

198 B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添加エンド
199 トキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算する。添加エンドトキシンの回収率が 50 ~ 200% の範囲にあ
200 るとき、反応干渉因子は試料溶液に存在しないと判定し、反応干渉因子試験に適合とする。

201 エンドトキシンの回収率が規定の範囲にないとき、試料溶液は反応干渉作用を有する。試料溶液に反応干渉作用が
202 認められるとき、最大有効希釈倍数を超えない範囲で試料溶液を更に希釈し、試験を行う。なお、試料溶液又は最大
203

204 有効希釈倍数を超えない範囲で希釈した試料溶液から反応干渉因子を除くために、適切な処理（ろ過、反応干渉因子
205 の中和、透析又は加熱処理など）を施すことができる。ただし、処理によりエンドトキシンが損失しないことを保証
206 するために、エンドトキシンを添加した試料溶液に当該の処理を施すことにより、上記の試験に適合する結果が得ら
207 れることを確認する。

208 5.4 定量

209 5.4.1 操作法

210 表 4.01-4 に示す A, B, C 及び D 液を調製し、5.3.2 に準じて操作する。

211 5.4.2 エンドトキシン濃度の算出

212 C 液で作成した検量線を用い、A 液の平均エンドトキシン濃度を算出する。

213 本試験は次のすべての条件に適合するとき、有効である。

214 1. C 液で作成した検量線の相関係数の絶対値は 0.980 以上である。

215 2. B 液で測定されたエンドトキシン濃度と A 液で測定されたエンドトキシン濃度の差に基づいて、B 液の添
216 加エンドトキシン濃度に対するエンドトキシンの回収率を計算するとき、その回収率は 50 ~ 200% の範囲にある。

217 3. D 液の結果が、ライセート試薬に設定されている空試験の限度値を超えないか、又はエンドトキシンの検
218 出限界未満である。

219 5.4.3 判定

220 A 液の平均エンドトキシン濃度に基づき、被検試料のエンドトキシンの濃度 (EU/mL, EU/mg, EU/mEq 又は EU/
221 単位) を求め、その値が医薬品各条に規定されたエンドトキシン規格を満たすとき、被検試料はエンドトキシン試験
222 に適合とする。
223