

# 日本薬局方注射剤の不溶性微粒子試験法 第2法 顕微鏡粒子計数法に関する検討\*<sup>3</sup>

柴田 寛子\*<sup>1, #</sup>, 原園 景\*<sup>1</sup>, 後藤 かの子\*<sup>2</sup>, 鳴瀬 諒子\*<sup>2</sup>, 石井 明子\*<sup>1</sup>

(受付: 令和3年1月4日, 受理: 令和3年3月15日)

Study on Membrane Microscope Method for the Determination of Insoluble Particulate Matter for Injections

Hiroko SHIBATA \*<sup>1, #</sup>, Akira HARAZONO \*<sup>1</sup>, Kanoko GOTO \*<sup>2</sup>, Ryoko NARUSE \*<sup>2</sup>  
and Akiko ISHII-WATABE \*<sup>1</sup>

## Summary

In this study, we evaluated how different types of membrane or illumination method could affect the measurement result of the Membrane Microscope method in the JP <6.07> Insoluble Particulate Matter Test for Injections. Our study reveals the points to consider in the determination of protein particles by using Membrane Microscope methods.

## Key words

Insoluble particulate matter, Membrane microscope method, protein aggregates

## 1. 緒言

本研究では、第十七改正日本薬局方 (JP17) 一般試験法<6.07>注射剤の不溶性微粒子試験法にて規定されている第2法顕微鏡粒子計数法 (顕微鏡法) に着目し、主にフィルターの種類と照射方法の違いが計測結果に及ぼす影響を評価した。また、第1法である光遮蔽法や、標準化が期待されているフローイメージング法によって測定される粒子数と顕微鏡法によって測定される粒子数の関係について考察した。本研究により、第2法でタンパク質に由来する不溶性微粒子を測定する際の留意点や問題点の一部を明らかにした。

## 2. 研究の背景

注射剤は通常、<6.07>注射剤の不溶性微粒子試験法 (以降、不溶性微粒子試験) で試験され、判定に適合したバッチが出荷される。具体的には、10  $\mu\text{m}$  以上及び25  $\mu\text{m}$  以上の不溶性微粒子の数が計測され、表示量が100 mL未満の注射剤の場合、平均微粒子数が、容器当たり10  $\mu\text{m}$  以上のもの6000個以下、25  $\mu\text{m}$  以上のもの600個以下のとき適合となる。測定対象となる不溶性微粒子は、「製剤中に意図することなく混入した、気泡ではなく容易に動く外来性、不溶性の微粒子」とあるが、実際には保存中に生じる凝集体などの内因性微粒子も計測されて

\*1 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 神奈川県川崎市川崎区殿町3-25-26 (〒210-9501)

National Institute of Health Sciences, 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki, Kanagawa 210-9501, Japan

\*2 独立行政法人医薬品医療機器総合機構再生医療製品等審査部 東京都千代田区霞が関3-3-2 (〒100-0013)

Pharmaceuticals and medical Devices Agency, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

\*3 本研究は令和元年度一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団の「日本薬局方の試験法等に関する研究」により行ったものである。

# 責任著者 Corresponding author

いると考えられる。試験方法には、第1法として光遮蔽粒子計数法（以降、光遮蔽法）、第2法として顕微鏡粒子計数法（以降、顕微鏡法）が採用されている。光遮蔽法は小容量で試験できる、混和した場合に個々の微粒子計測数の総和になる等の理由でUSP21（1985年）から採用され、JPでは第十三改正（1996年）から採用されている<sup>1,2)</sup>。光遮蔽法が優先されるが、透明性の低い製剤（コロイドやエマルジョン、リポソームなど）やセンサー内で気泡を生じる注射剤など光遮蔽法で試験できない場合は顕微鏡法で試験される。また光遮蔽法では非混合性の液滴（シリコンオイルなど）やタンパク質やペプチド製剤におけるゲル状物質も計測されるが、顕微鏡法では微粒子をメンブランフィルターに集めて計測するため固形の微粒子しか観察されないという違いがあるといわれている<sup>1,2)</sup>。実際に、〈6.07〉本文中においても、「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」と明記されている。

以上の背景から、ほとんどの注射剤では光遮蔽法によって試験されていると考えられるが、光遮蔽法がJPに収載される前に承認された製品や、光遮蔽法での試験が難しい製品は、非晶形や半固形の粒子が含まれていても、顕微鏡法で試験される場合が想定される。JP14においては、第1法光遮蔽法で試験できない場合として、「たん白質製剤などで第1法では規格値を超える場合」とあり、タンパク質医薬品注射剤のうちJP15に完全に移行する前（平成19年3月）までに申請した製品については、顕微鏡法を採用している可能性もある。JP17では顕微鏡法が規定された各条が五つあり、三つは油性注射剤、一つは青色の水溶性注射剤、一つは水性注射剤の院内製剤である。顕微鏡法は特殊な装置を必要とせず、送液ルートもないため、油性注射剤や色のついた注射剤の試験も可能であり、光遮蔽法より汎用性が高い試験方法といえる。

しかしながら、タンパク質に由来する凝集体及び不溶性微粒子（タンパク質微粒子）が含まれると考えられる医薬品について、国立医薬品食品衛生研究

所において顕微鏡法による測定を試みたところ、メンブランフィルター上で汚れや変色したように見える形状が不明瞭な粒子が大量に含まれ、装置や操作上の要因によって試験結果に差が生じる可能性が示唆された。具体的には、反射光下で観察する落射型か透過光下で観察する透過型かの違いや、フィルターの種類（材質や色）、試験実施者の違いなどが挙げられる。また、光遮蔽法は装置の校正方法が明確に規定されているのに対し、顕微鏡法では試験環境を確認する方法は規定されているものの、構築した試験方法が適切であるか確認するための方法が規定されていない。第2法顕微鏡による不溶性微粒子試験法は25年以上前に収載された試験であるためか、どのような要因・パラメータが試験結果に影響するのか、整理された技術情報が入手できないため、新たに試験系を立ち上げるのが困難な状況にある。

一方、フローイメージング（Flow Imaging：FI）法は、液を流しながら溶液中に分散した微粒子を撮影し、その画像を解析することで粒子径分布を測定する方法である。ポリスチレン標準粒子で校正された光遮蔽法では、タンパク質微粒子のように屈折率の低い粒子は検出されないか、実際の粒子径よりも小さい粒子として検出されることが知られており、FI法はバイオ医薬品に含まれるタンパク質微粒子を測定する有用な第3の方法として期待されている。そのため、光遮蔽法とFI法については、測定結果を比較した報告は数多く存在している。しかし、光遮蔽法と顕微鏡法及びFI法と顕微鏡法について測定結果を比較した報告は少なく、三つの方法の特徴を整理しておくことは、不溶性微粒子試験法の今後のあり方を考える上で非常に有益と考えられる。

本研究では、顕微鏡法について、試験結果に影響し得る装置や操作法上の要因として主に光の照射方法（落射型と透過型）と測定用メンブランフィルターの種類（材質と色）に着目し、観察画像や計測結果に与える影響を評価した。また、光遮蔽法とFI法による計測結果と比較し、関連性について考察を試みた。

### 3. 方法

#### 3.1 装置及び材料

- ・顕微鏡システム：Inverted microscope BX53M (Olympus), 接眼レンズ×10 (マイクロメーター入り), 対物レンズ×10, フレキシブルライト (LG-LSLED, Olympus)
- ・カメラシステム：カメラヘッド：DP22-CU, 接続キット：DP2-SAL
- ・フローイメージング法：フローイメージング粒子解析装置 FlowCAM8100 (Fluid imaging technologies)
- ・光遮蔽法：光遮蔽型自動微粒子測定装置 KL-04A (リオン)
- ・測定用メンブランフィルター：セルロース混合エステル (白色) (親水性,  $0.8\ \mu\text{m}$ , 13 mm, 白色, 格子入, MF-Millipore), セルロース混合エステル (黒色) (親水性,  $0.8\ \mu\text{m}$ , 13 mm, 黒色, 格子入, MF-Millipore), ポリカーボネート (白色) (親水性,  $0.8\ \mu\text{m}$ , 13 mm, 白色, Isopore), ポリカーボネート (黒色) (親水性,  $0.4\ \mu\text{m}$ , 13 mm, 黒色, Isopore)
- ・注射用水：日本薬局方 注射用水 大塚蒸留水 (1000 mL)
- ・減圧ろ過用フィルターホルダー：KGS-04 ADVANTEC (ガラスタイプ)
- ・計数標準粒子：COUNT-CAL Count Precision Size Standards #CC10PK ( $10.00 \pm 0.08\ \mu\text{m}$ , 3000 particles/mL  $\pm 10\%$ ), #CC25PK ( $24.61\ \mu\text{m} \pm 0.22\ \mu\text{m}$ , 3000 particles/mL  $\pm 10\%$ )
- ・1% w/v HPMC 水溶液：HPMC (Alfa Aesar, 44779) 5.0 g を MilliQ 水 500 mL に溶解し,  $0.22\ \mu\text{m}$  フィルターでろ過後, 使用するまで  $4^\circ\text{C}$  で保存。

#### 3.2 測定試料の調製

2種類のタンパク質微粒子のモデル試料 (以下モデル凝集体試料) NPAS90 及び NPAS70 は以下のように調製した<sup>3)</sup>。静注用免疫グロブリン製剤であるサングロポール点滴静注用 (2.5 g/50 mL) を MilliQ 水で2倍希釈し, NPAS90 は  $90^\circ\text{C}$  2000 rpm 1分, NPAS70 は  $70^\circ\text{C}$  2000 rpm 2分加熱振とうした試料を MilliQ 水で50倍希釈した。Wave shaker 12 rpm でそれぞれ2時間以上振とうした後, 1% w/v HPMC 水溶液で希釈したものを  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

測定時は, 室温で完全に融解した後, 気泡が生じないように穏やかに転倒混和にて攪拌し, 数分静置した後, 速やかに分析に使用した。

#### 3.3 顕微鏡法による粒子数の測定

測定は以下の手順で実施した。なお, 顕微鏡での観察以外の操作は, 安全キャビネット内で実施した。

試験環境の確認：ろ過器 (ファンネルとサポートスクリーン) を注射用水で洗浄後, 使用するメンブランフィルターを減圧ろ過用フィルターホルダーに設置した。注射用水 50 mL を通液し, メンブランフィルターをスライドガラスに乗せ, シャーレに入れて安全キャビネット内で乾燥した。スライドガラス上のメンブランフィルターを顕微鏡で観察する時,  $10\ \mu\text{m}$  以上の微粒子数が20個,  $25\ \mu\text{m}$  以上の微粒子数が5個を超えないことを確認した。

検体の観察：新しいメンブランフィルターをセットし, 各試料 1 mL をろ過し, 注射用水 5 mL で4回洗浄した後, 試験環境の確認と同様にメンブランフィルターを乾燥した。スライドガラスに乗せたメンブランフィルターを顕微鏡で観察した。引き続き他の試料を観察する場合は, ろ過器の洗浄に戻って同様の操作を繰り返した。

不溶性微粒子の計数：不溶性微粒子の計数は, 目視による計数と撮影した画像をもとにした計数の両方を実施した。なお, 微粒子の大きさは最長径とした。目視による計数では, ミクロメーターの円視野目盛領域の内側に観察された粒子数を異なる4視野計数し, その1視野当たりの平均値から計算により有効ろ過面積上の全微粒子数を算出した。画像をもとにした計数では, 同様に異なる4視野を撮影した画像を打ち出し, 画像データに表示したスケールを基に微粒子を計数し, その平均値から計算により有効ろ過面積上の全微粒子数を算出した。計算式を以下に示した。具体的には, 目視による計数では1視野当たりの平均値の16.56倍, 画像をもとにした計数では1視野当たりの平均値の8.64倍することで, 1 mL あたりの微粒子数を求めた。なおポリスチレン計数標準粒子を使って目視データ上と画像データ上のスケールに明確な差がないことを確認した。

1 mL 当たりの微粒子数 = 平均微粒子数 (個/視野又は画面)  $\times$  有効ろ過面積 ( $\text{mm}^2$ ) / 1 視野又は画面

面積 (mm<sup>2</sup>)

## 4. 結果及び考察

光の照射方法(落射型と透過型)とメンブランフィルターの種類(材質と色)について、観察画像や計数結果に与える影響を評価するため、各組合せでポリスチレン計数標準粒子とモデル凝集体試料の計数を試みた。Table 1とTable 2にポリスチレン計数標準粒子の計数結果、Table 3とTable 4に2種類のモデル凝集体試料の計数結果を示した。モデル凝集体試料については、不溶性微粒子試験で判定対象となる10 μm以上及び25 μm以上の不溶性微粒子数を計測した。また、Fig. 1~5にメンブランフィルター4種類について代表的な観察画像を示した。

### 4.1 光の照射方法

観察時の光の照射方法について、JP15から第2法顕微鏡法では「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稼働補助照明器で10~20°斜角照明ができる」とあり、落射型が推奨されているが、JP14までは特に規定されていなかった。そこで、これら照射方法の違いが観察画像や計数結果に与える影響の評価を試みた。ポリスチレン計数標準粒子を観察したところ、25 μmの標準粒子では両方の照射方法で観察可能であったが、10 μmの標準粒子では透過型での観察が難しくポリカーボネート(黒色)以外は検出不能であった(Table 1, 2)。また、モデル凝集体試料を観察したところ、透過型ではいずれのフィルターでも粒子の観察ができなかった。したがって、照射方法については現在のJPに記載のとおり、落射型を用いることが適切と考えられた。

### 4.2 メンブランフィルターの材質及び色

測定に用いるメンブランフィルターについて、JP15から第2法顕微鏡法では「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 μm

Table 1 ポリスチレン計数標準粒子の目視による計数結果

試料	照射方法		落射				透過			
	フィルター種類	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	
計数標準粒子 10 μm	平均値*	1900.3	2529.6	3303.8	2889.8	N.D.	N.D.	N.D.	3146.5	
	標準偏差*	964.9	1313.9	351.2	326.3	N.D.	N.D.	N.D.	353.9	
計数標準粒子 25 μm	平均値*	2550.3	2691.1	2326.8	2989.2	2451.0	1974.8	2496.5	2956.1	
	標準偏差*	783.0	473.4	258.5	467.7	860.0	371.4	395.9	1131.1	

\*異なる4視野で、マイクロメーターの円視野目盛領域の内側に観察された粒子数を計数し、平均値と標準偏差を算出した。

MCE-W: セルロース混合エステル(白色), MCE-B: セルロース混合エステル(黒色), PC-W: ポリカーボネート(白色), PC-B: ポリカーボネート(黒色)

N.D.: 検出不能

Table 2 ポリスチレン計数標準粒子の画像に基づく計数結果

試料	照射方法		落射				透過			
	フィルター種類	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	
計数標準粒子 10 μm	平均値*	1904.0	1940.8	3164.0	2956.5	N.D.	N.D.	N.D.	2813.9	
	標準偏差*	238.9	830.0	156.1	85.9	N.D.	N.D.	N.D.	287.7	
計数標準粒子 25 μm	平均値*	2040.2	2418.4	2273.6	2418.4	2018.6	1538.8	2126.6	2407.6	
	標準偏差*	649.7	413.2	346.7	387.7	529.6	446.7	370.6	1010.9	

\*異なる4視野を撮影した画像を打ち出し、画像データに表示したスケールを基に微粒子を計数し、平均値と標準偏差を算出した。

MCE-W: セルロース混合エステル(白色), MCE-B: セルロース混合エステル(黒色), PC-W: ポリカーボネート(白色), PC-B: ポリカーボネート(黒色)

N.D.: 検出不能

Table 3 モデル凝集体試料の目視による計測結果（照射方法：落射型）

試料	フィルター種類	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	
NPAS 90	≥ 10 μm	平均値*	N.D.	N.D.	10722.9	11033.4
		標準偏差*	N.D.	N.D.	551.3	3038.1
	≥ 25 μm	平均値*	N.D.	N.D.	5113.1	4843.9
		標準偏差*	N.D.	N.D.	297.6	1592.0
NPAS 70	≥ 10 μm	平均値*	N.D.	N.D.	9356.7	19355.1
		標準偏差*	N.D.	N.D.	1646.4	3544.3
	≥ 25 μm	平均値*	N.D.	N.D.	2939.5	4285.0
		標準偏差*	N.D.	N.D.	456.0	273.6

\*異なる4視野で、マイクロメーターの円視野目盛領域の内側に観察された粒子数を計数し、平均値と標準偏差を算出した。

MCE-W: セルロース混合エステル（白色）、MCE-B: セルロース混合エステル（黒色）、PC-W: ポリカーボネート（白色）、PC-B: ポリカーボネート（黒色）

N.D.: 検出不能

Table 4 モデル凝集体試料の画像に基づく計測結果（照射方法：落射型）

試料	フィルター種類	MCE-W	MCE-B	PC-W	PC-B	
NPAS 90	≥ 10 μm	平均値*	N.D.	N.D.	9822.6	9660.5
		標準偏差*	N.D.	N.D.	1568.6	1882.3
	≥ 25 μm	平均値*	N.D.	N.D.	4754.6	5521.8
		標準偏差*	N.D.	N.D.	889.3	1237.9
NPAS 70	≥ 10 μm	平均値*	N.D.	N.D.	6732.1	9174.3
		標準偏差*	N.D.	N.D.	1625.5	796.5
	≥ 25 μm	平均値*	N.D.	N.D.	1739.8	2625.8
		標準偏差*	N.D.	N.D.	174.2	364.0

\*異なる4視野を撮影した画像を打ち出し、画像データに表示したスケールを基に微粒子を計数し、平均値と標準偏差を算出した。

MCE-W: セルロース混合エステル（白色）、MCE-B: セルロース混合エステル（黒色）、PC-W: ポリカーボネート（白色）、PC-B: ポリカーボネート（黒色）

N.D.: 検出不能

以下である」とあるが、JP14までは「白色、直径25mmあるいは直径13mm、孔径0.45又は0.5μm、一辺約3mmの格子付き」とあり、異なる色のメンブランフィルターが推奨されている。また、どちらもメンブランフィルターの材質については何も記載がないものの、粒子の観察に影響するものと考えられた。そこで、セルロース混合エステルの白色と黒色、ポリカーボネートの白色と黒色の、素材と色の異なる4種類のメンブランフィルターを比較した。

その結果、用いた試料によらず、フィルターの色については白色よりも黒色の方が、材質についてはポリカーボネートの方が、より多くの粒子が検出さ

れる傾向が認められた（Table 1~4）。更に、Fig. 3~5に示すように、モデル凝集体試料においては、落射型であっても、セルロース混合エステルでは粒子を観察することが非常に難しいことが判明した。一方で、ポリカーボネートではモデル凝集体試料に含まれるタンパク質粒子の形状を観察することが可能で、Fig. 6に示したFI法で撮影した粒子画像のように、NPAS90では黒い星型のような粒子、NPAS70では色の薄い繊維状の粒子が観察された。また、今回の検討に用いたポリスチレン計数標準粒子において期待される1mL当たりの計数値は2700~3300個であり、計数値が3000個に近いほど

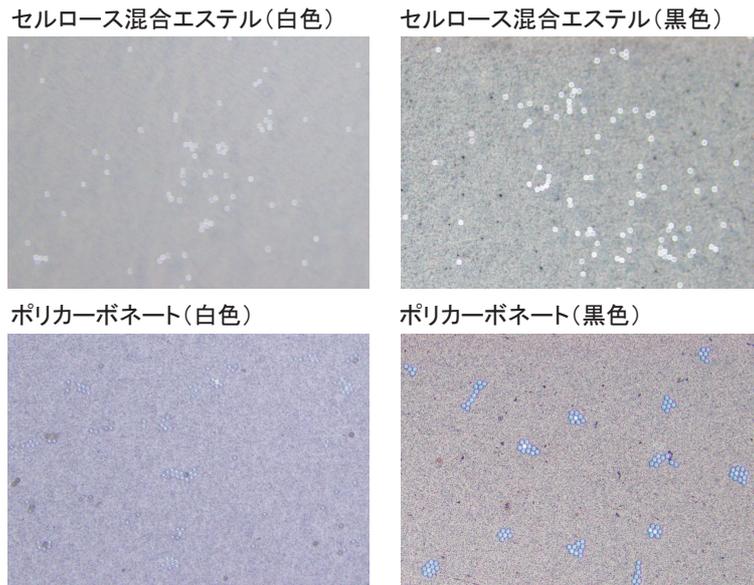


Fig. 1 10 $\mu$ mのポリスチレン計数標準粒子の観察画像（落射型）

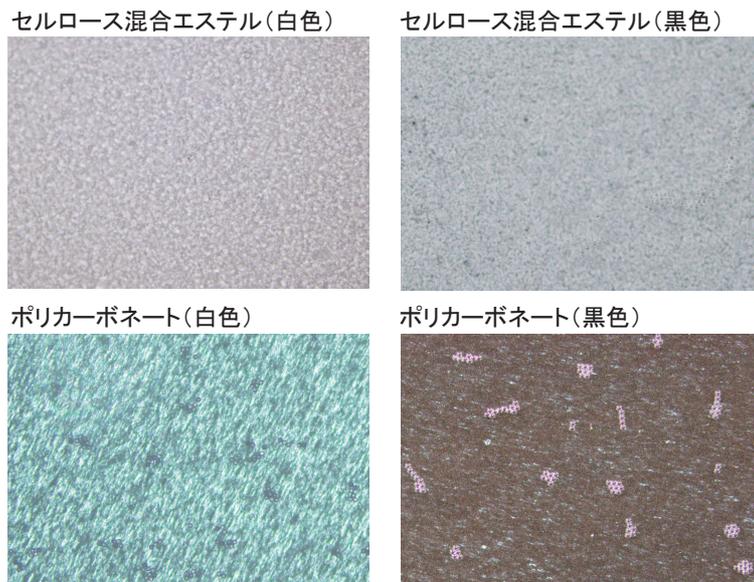


Fig. 2 10 $\mu$ mのポリスチレン計数標準粒子の観察画像（透過型）

適切な試験条件といえる。落射型において、ポリカーボネートフィルターは標準粒子10 $\mu$ m及び25 $\mu$ m共に3000個/mLに近い計測値が得られ、バラツキもセルロース混合エステルより小さく、今回検討した中では最適なフィルターと考えられた。セルロース混合エステルよりもポリカーボネートフィルターの方が、薄膜表面が平滑で孔径が均一であるため、粒子がフィルターに埋没することなく、照射した時のコントラストが出やすいため、不定形なタン

パク質粒子を観察できると考えられた。ただし、黒色のポリカーボネートについては、メンブランフィルターそのものに傷つきやすく、試験環境の確認には影響しないものの、フィルター上に多くの粒子が観察され、他のフィルターよりも取扱いに注意が必要と考えられた (Fig. 3)。

#### 4.3 試験の妥当性確認について

第2法顕微鏡法では基本的に試験実施者が顕微鏡

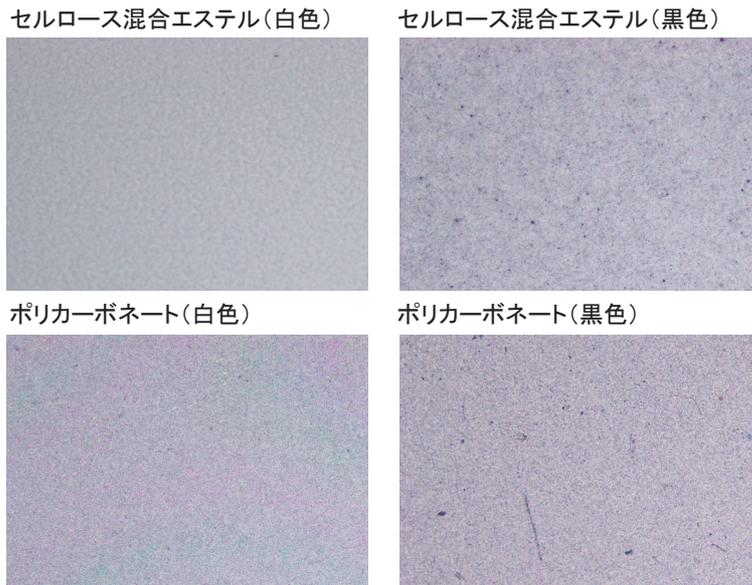


Fig. 3 注射用水を通液した各フィルターの観察画像（落射型）

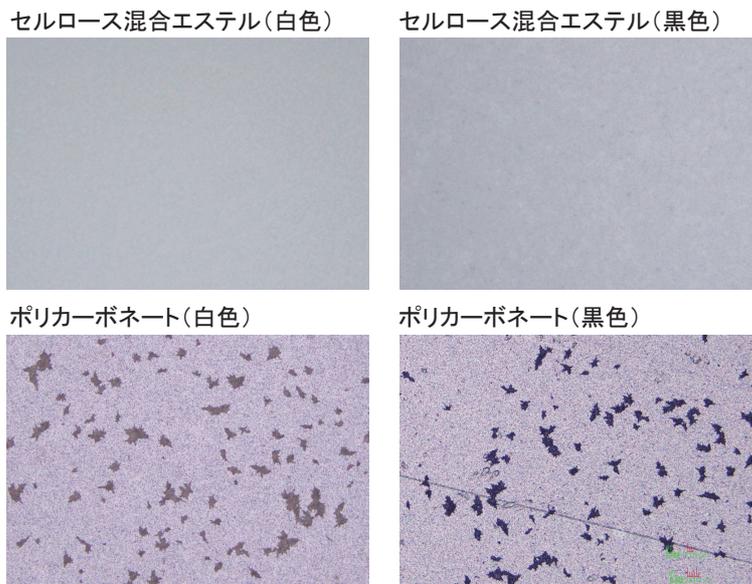


Fig. 4 モデル凝集体試料NPAS90の観察画像（落射型）

観察下において10  $\mu\text{m}$  以上及び25  $\mu\text{m}$  以上の微粒子数を計数し、報告値を算出し、その値を基に判定基準へ適合するかしらないか判断される。第1法光遮蔽法や他の理化学試験では生データや報告値を基に試験が適切に実施されたかどうかを第三者（試験責任者等）が確認することが可能であるが、顕微鏡法では第三者が試験実施の妥当性を確認することは難しい。そこで、今回の検討では、目視による計数に加えて、生データとして観察画像を保存し、画像デー

タを基に10  $\mu\text{m}$  以上及び25  $\mu\text{m}$  以上の微粒子の計数を試みた。その結果、目視と画像に基づく計数結果で大きな違いは認められず、数値に違いがあったとしても、バラツキの範囲内と考えられた。顕微鏡法においては、試験実施時に撮影した観察画像を試験記録として残し、第三者により試験の妥当性を確認できるようにしておくことが、試験データの信頼性の確保に有用と考えられた。ただし今回は粒子の濃度1点のみしか実施しておらず、粒子濃度の薄い試

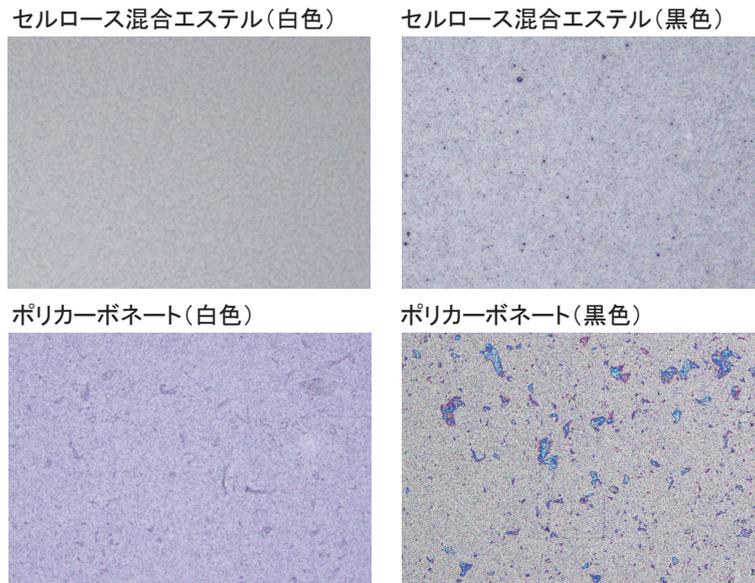


Fig. 5 モデル凝集体試料NPAS70の観察画像（落射型）

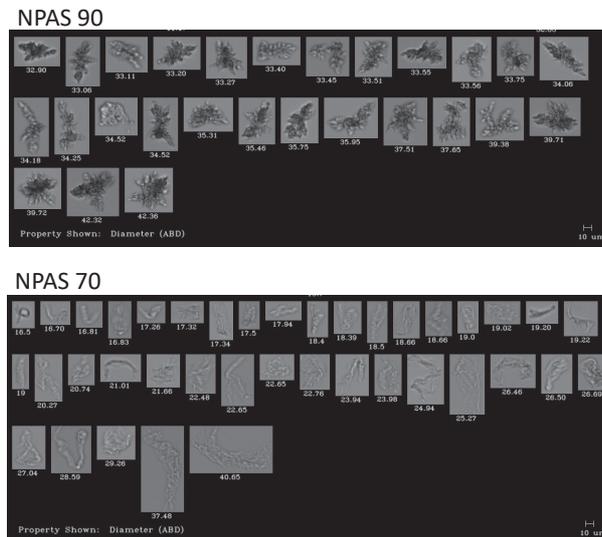


Fig. 6 FI法で撮影されたモデル凝集体試料NPAS90及びNPAS70に含まれる粒子画像

料では目視による計数と画像を基にした計数に違いのある可能性もあり，試験方法の手順を確立する際に大きな違いがないか確認する必要がある。

#### 4.4 第1法光遮蔽法及びFI法との比較

次に，モデル凝集体試料の顕微鏡法による計数結果について，第1法光遮蔽法及びFI法と比較した (Table 5)。これまで指摘されている通り，FI法は光遮蔽法よりも多くの粒子を検出することが確かめられた。顕微鏡法による計数結果は，NPAS90につ

いてはFI法とほぼ同様の結果であった (Table 3, 5, Fig. 4)。一方で，NPAS70については，FI法よりも顕微鏡法で10倍以上多くの粒子を検出している可能性が示された (Table 3, 5, Fig. 5)。この要因の一つとして，定義径の違いが考えられた。粒子径の測定には様々な定義径が用いられ，光遮蔽法ではJISで円相当径，すなわち粒子の投影面積と等しい面積をもつ円の直径で表すことが決められている。FI法では円相当径の他，球相当径 (ESD: equivalent spherical diameter, フェレー径を5度間隔で36回測

Table 5 第1法光遮蔽法及びFI法によるモデル凝集体試料の計測結果

試料		光遮蔽法		FI法**		
		円相当径	円相当径	球相当径	最長径	
NPAS 90	≥ 10 μm	平均値*	4490.6	11375.3	11790.7	10301.3
		標準偏差*	531.7	346.2	282.3	71.1
	≥ 25 μm	平均値*	144.4	2339.0	4281.0	5144.5
		標準偏差*	20.8	138.0	86.7	56.6
NPAS 70	≥ 10 μm	平均値*	157.8	911.3	2135.7	4291.7
		標準偏差*	92.4	57.7	237.6	332.1
	≥ 25 μm	平均値*	131.1	37.0	260.3	524.1
		標準偏差*	93.0	15.6	24.4	159.1

\*3回測定 of 平均値及び標準偏差を示した。

\*\*FI法：フローイメージング法。

定した値の平均) や他のパラメータで表すことができる。そこでFI法で測定された粒子ごとのパラメータについて、顕微鏡法で使用した最長径で粒子を計数したところ、NPAS90では球相当径での計数値と大きく変わらないのに対し、NPAS70では計数値がおよそ2倍程度多くなることが確かめられた。その他の要因については、今後、詳細な検討が必要である。

顕微鏡法についてはこれまで、タンパク質微粒子の検出には不向きであると考えられてきた。実際にUSP<1788.2>Membrane microscope method for the Determination of Subvisible Particulate matter<sup>4)</sup>には、タンパク質微粒子はメンブランフィルター上で変形可能でコントラストが低いため、検出するのが難しく、その上メンブランフィルターを通り抜ける可能性があることから、顕微鏡法はタンパク質医薬品注射剤に関しては外因性微粒子の分析に最適で、混入の原因究明に有用であると記載されている。今回の検討から、測定用メンブランフィルターの種類など試験条件を最適化することで、内因性のタンパク質微粒子の測定も可能であることが示された。実際に、顕微鏡法の自動化装置も既に開発され、ヒトによる主観的な視認と計数に対して、客観的な真度及び精度が得られる可能性があり、1788.2においても“Automated approaches”として留意事項が言及されている。FI法よりも少量の試料で測定でき、多検体について短時間で試験を実施することができ

るため、今後、広く普及する可能性がある。

一方で本研究の検討から、測定用メンブランフィルターの種類によっては、タンパク質微粒子を観察することが極めて困難であることが示された。JPには第1法光遮蔽法による試験ができない例として、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が挙げられている。バイオ医薬品において、添加剤やプレフィルドシリンジに由来する微量の油滴が不溶性微粒子として計数されてしまう等、第1法では正確な試験が困難なケースが稀に認められる。当該ケースにおいて、第2法顕微鏡法による試験での設定が求められる。その際、適切なメンブランフィルターを用いない場合、測定されるべき粒子が正確に測定されない可能性があるため、FI法など原理の異なる方法により、第2法顕微鏡法で構築した試験方法の妥当性を確認することが必須と考えられた。

## 5. まとめ

顕微鏡法による不溶性微粒子の計数、特に、バイオ医薬品に含まれるタンパク質微粒子の計数において、光の照射方法や測定用メンブランフィルターの種類が大きく影響することが判明した。一方で、適切な試験条件下では、タンパク質微粒子の形状を観察することが可能で、光遮蔽法よりも多くの粒子を

検出可能であることが示された.

文 献

- 1) JPTI 日本薬局方技術情報<1998>.
- 2) JPTI 日本薬局方技術情報<2011>.
- 3) Kiyoshi, m.; Shibata, H.; Harazono, A. *et al.* Collaborative

- Study For Analysis Of Subvisible Particles Using Flow Imaging And Light Obscuration: Experiences In Japanese Biopharmaceutical Consortium. *J Pharm Sci.* 2018, **108** (2), p.832-841.
- 4) USP PF, <1788.2> membrane microscope method for the Determination of Subvisible Particulate matter.