

最 終 報 告 書

『薬用 NS ジェルの白癬菌 (*T. rubrum*) に対する薬剤感受性試験』

試験番号 H-25027

2025 年 5 月 16 日

群馬県渋川市有馬 1967-11

株式会社 SRD 生物センター

<信頼性保証書>

試験名称：薬用 NS ジェルの白癬菌 (*T. rubrum*) に対する薬剤感受性試験

試験番号：H-25027

調査内容	実施日	運営管理者への報告日	試験責任者への報告日
試験計画書	2025 年 4 月 2 日	2025 年 4 月 2 日	2025 年 4 月 2 日
試験計画書の変更書 (1)	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日
被験物質の調製、処理	2025 年 4 月 3 日	2025 年 4 月 7 日	2025 年 4 月 7 日
※被験物質の分析 (投与終了後)、投与液の濃度分析、投与液の安定性分析 (72 時間)	2025 年 4 月 4 日	2025 年 4 月 7 日	2025 年 4 月 7 日
MIC の測定	2025 年 4 月 7 日	2025 年 4 月 7 日	2025 年 4 月 7 日
MFC の測定	2025 年 4 月 14 日	2025 年 4 月 15 日	2025 年 4 月 15 日
生 データ	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日
最終報告書			
(草案)	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日	2025 年 5 月 14 日
(再調査)	2025 年 5 月 16 日	2025 年 5 月 16 日	2025 年 5 月 16 日
(最終)	2025 年 5 月 16 日	2025 年 5 月 16 日	2025 年 5 月 16 日

上記の調査から、本試験は GLP、試験計画書及び株式会社 SRD 生物センターの定めた標準操作手順書に従って実施され、本最終報告書の試験方法には当該試験で使用方法、手順が忠実に記載されており、試験成績には当該試験実施過程において得られた生データが正確に反映されていることを確認しました。なお、※印で示した調査内容については試験場所で実施された試験をオンラインで調査しました。

2025 年 5 月 16 日

株式会社 SRD 生物センター

信頼性保証部門責任者



(信頼性保証部門責任者代行)

陳述書

試験名称：薬用 NS ジェルの白癬菌 (*T. rubrum*) に対する薬剤感受性試験

試験番号：H-25027

上記試験は、厚生労働省の「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」（平成 9 年 3 月 26 日厚生省令第 21 号）を遵守して実施した。

本試験はここに述べられた方法で行われ、本最終報告書は試験実施で得られた生データを正確に反映したものである。

なお、本被験物質の実験期間中における安定性については、被験物質中の有効成分量を高速液体クロマトグラフで測定することにより確認した。

その結果、本実験開始前及び投与終了時の被験物質 100 g 中の有効成分量はいずれも試験規格値を満たしたことから、本被験物質は本実験期間中安定であったと判断した。

試験責任者

株式会社 SRD 生物センター

2025 年 5 月 16 日

氏名



目次

	頁
信頼性保証書	2
陳述書	3
I. 要約	5
II. 試験の概要	5
III. 材料及び方法	7
IV. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態 及び試験計画書に従わなかったこと	15
V. 結果及び考察	15
VI. 試験関係資料の保存	15
別表 1 Alamar Blue 含有試験培地の光学濃度及び発育阻害率	16
別表 2 NR 抽出液の光学濃度及び NR 取込み阻害率	17
別表 3 薬用 NS ジェルの MIC 及び MFC	18
添付資料 1 測定計画書	19
添付資料 2 分析で使用した試薬、機器及びカラム	28
添付資料 3-1 被験物質の分析証明書	29
添付資料 3-2 被験物質の安定性分析（投与終了時）	30
添付資料 4 投与液の濃度分析	31
添付資料 5-1 投与液の安定性分析（0 時間）	32
添付資料 5-2 投与液の安定性分析（72 時間）	33
添付資料 6 試験委託者から提供された被験物質情報	34

I. 要約

薬用 NS ジェルの白癬菌 (*T. rubrum*) に対する薬剤感受性を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) 及び最小殺真菌濃度 (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) を測定することにより評価した。

RPMI1640 培地で 25、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 及び 0.1 w/v% に希釈した被験物質を白癬菌に処理し、「皮膚糸状菌の薬剤感受性試験法—MIC と MFC の測定—(古賀、Med. Mycol. J. Vol. 55J, 2014)」及び「ルリコナゾールの白癬菌に対する *in vitro* 抗真菌活性—MIC 及び MFC の同時測定による既存外用抗真菌薬との比較(前田ら、Med. Mycol. J. Vol. 57J, 2016)」の方法に従って MIC 及び MFC を求めた。その結果、MIC は 0.8 w/v%、MFC は 3.1 w/v% であった。

以上の結果から、本試験条件下において薬用 NS ジェルは白癬菌に対して抗真菌活性を示すと判断された。

II. 試験の概要

薬用 NS ジェルの白癬菌 (*T. rubrum*) に対する薬剤感受性を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) 及び最小殺真菌濃度 (Minimum Fungicidal Concentration; MFC) を測定することにより評価する。なお、本被験物質は既に指定医薬部外品として承認申請済みであり、医薬品としての申請予定はない。

1. 遵守する GLP

厚生労働省の「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」(平成 9 年 3 月 26 日厚生省令第 21 号)

2. 準拠する試験法

皮膚糸状菌の薬剤感受性試験法—MIC と MFC の測定—(古賀、Med. Mycol. J. Vol. 55J, 2014) 及びルリコナゾールの白癬菌に対する *in vitro* 抗真菌活性—MIC 及び MFC の同時測定による既存外用抗真菌薬との比較 (前田ら、Med. Mycol. J. Vol. 57J, 2016)

3. 試験委託責任者

名称	日本ゼトック株式会社
所在地	東京都新宿区西新宿 1 丁目 26 番 2 号 新宿野村ビル 12F

4. 試験委託者

名称 株式会社北の達人コーポレーション
所在地 北海道札幌市中央区北一条西一丁目 6 番地
さっぽろ創世スクエア 25 階

5. 試験受託者

名称 株式会社 SRD 生物センター
所在地 東京都中央区八丁堀 3-4-8

6. 試験施設

名称 株式会社 SRD 生物センター 渋川ラボラトリー
所在地 群馬県渋川市有馬 1967-11

7. 試験場所

名称 日本ゼトック株式会社
所在地 神奈川県相模原市緑区大山町 1 番 5 号

8. 試験関係者

(1) 試験施設

試験責任者 [REDACTED]
所属 株式会社 SRD 生物センター 試験部
所在地 群馬県渋川市有馬 1967-11
試験従事者 [REDACTED]

(2) 試験場所

試験主任者 [REDACTED]
所属 日本ゼトック株式会社 第 1 開発研究部
所在地 神奈川県相模原市緑区大山町 1 番 5 号
分析従事者 [REDACTED]

9. 試験スケジュール

試験開始日	2025 年 4 月 1 日
実験開始日	2025 年 4 月 1 日
実験終了日	2025 年 4 月 14 日
最終報告書草案提出日	2025 年 4 月 30 日

最終報告書作成日

2025 年 5 月 16 日

試験終了日

2025 年 5 月 16 日

Ⅲ．材料及び方法

1. 被験物質の特性^{注 1)}

(1) 名称 薬用 NS ジェル

(2) 有効成分の名称及び濃度

ベンザルコニウム塩化物 0.05%

(3) その他の成分（濃度）

精製水、エタノール、濃グリセリン、軽質流動パラフィン、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテル、カルボキシビニルポリマー、パラオキシ安息香酸メチル、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、モノステアリン酸グリセリン、パルミチン酸セチル、ミツロウ、パラオキシ安息香酸エチル、水酸化カリウム、オリブ油、ベヘニルアルコール、水素添加大豆リン脂質、エデト酸ナトリウム水和物、香料（99.95%）

(4) Lot No. J03GB

(5) pH 6.6

(6) 溶解性 水及びジメチルスルホキシドに溶解

(7) 外観 白色の乳液

(8) 保存条件 室温（実測値^{注 2)}：17～26℃）

(9) 提供量 4 本

(10) 製造年月日 2024 年 7 月 24 日

(11) 有効期限 2027 年 7 月 24 日

(12) 同一性（GLP）

提供された情報と被験物質の容器に記載された情報及び被験物質の外観（白色の乳液）から同一であることを目視で確認した。

(13) 安定性（GLP）

実験期間中の被験物質の安定性は、試験場所が測定した。投与終了後に試験施設から送付された被験物質中の有効成分（ベンザルコニウム塩化物）の濃度を高速液体クロマトグラフで測定し、実

^{注 1)}：被験物質の特性情報は試験委託者から入手（添付資料6）

^{注 2)}：温度収集期間は、試験施設の被験物質受領日から実験開始日まで。

験開始前後の有効成分の濃度を比較した。分析方法及び許容基準は、試験場所が作成した測定計画書（添付資料 1 及び 2）に従った。その結果、被験物質 100 g 中の有効成分の量が実験開始前で 0.0506 g、投与終了後で 0.0509 g であり、いずれも試験規格（0.045～0.055 g/100 g）を満たしたことから、被験物質の安定性が確認された（添付資料 3-1 及び 3-2）（GLP）

(14) 提供者

名称 株式会社北の達人コーポレーション
所在地 東京都中央区銀座 4-12-15 歌舞伎座タワー17 階

(15) 実験終了後の取扱い

実験終了後、廃棄した。

2. 試薬

- (1) サブローデキストロース寒天粉末培地 (SDA 粉末培地; Lot No. 4017038、Becton, Dickinson and Company)
- (2) RPMI1640 (L-グルタミン含有、炭酸塩及びフェノールレッド不含、Lot No. 0000361897、Sigma-Aldrich, Co.)
- (3) 3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS ; Lot No. AF115、同仁化学研究所)
- (4) Alamar Blue (Lot No. 2994056、Thermo Fisher Scientific, Inc.)
- (5) ニュートラルレッド溶液 (0.33%、NR 溶液 ; Lot No. RNB6578、Sigma-Aldrich, Co.)
- (6) ダルベッコ PBS (-) (DPBS ; Lot No. 3043216、Thermo Fisher Scientific, Inc.)
- (7) Tween80 (Lot No. U1123362475、MP Biomedicals, Inc.)
- (8) 生理食塩液 (日本薬局方、Lot No. 21102D、扶桑薬品工業株式会社)
- (9) 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Lot No. KSE1032、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (10) 塩化カルシウム (試薬特級、Lot No. CKE3595、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (11) ホルムアルデヒド液 (和光一級、Lot No. CKG1386、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (12) 無水エタノール (日本薬局方、Lot No. 2531303、今津薬品工業株式会社)
- (13) 酢酸 (試薬特級、Lot No. DLF3025、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (14) 注射用水 (日本薬局方、Lot No. 40601D、扶桑薬品工業株式会社)

3. 培地及び試薬の調製

(1) 培地

① SDA 斜面培地

超純水 1L に対して SDA 粉末培地 65 g を加えて加熱溶解後、試験管に溶解した培地を 5~7 mL 分注し、シリコン栓又はスクリュウキャップで蓋をした後、試験管立てに立てた状態で 121℃、15 分間湿熱滅菌した。湿熱滅菌後、試験管立てに立てた状態で全体を傾けて放置して固化させた。

② 試験培地

RPMI1640 粉末培地 10.4 g を超純水 1 L に溶解させ、0.165 mol/L MOPS で pH7.0 に調製後、孔径 0.2 μm のろ過フィルターでろ過滅菌した。

③ Alamar Blue 含有試験培地

試験培地に Alamar Blue を 20 v/v% となるよう添加した。

(2) 試薬

① 希釈液

生理食塩液に Tween80 を 0.1 v/v% となるよう添加後、孔径 0.45 μm のろ過フィルターでろ過滅菌した。

② 50 $\mu\text{g/mL}$ NR 溶液

NR 溶液を DPBS で 66 倍希釈した。

③ 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液

次亜塩素酸ナトリウム溶液を蒸留水で 5 倍希釈した。

④ 固定液

超純水 90 mL に対して塩化カルシウムを 1 g 溶解した後、ホルムアルデヒド液を 10 mL 加えた。

⑤ 抽出液

注射用水、無水エタノール及び酢酸を 49 : 50 : 1 の容量比で混合した。

4. 菌株

(1) 菌株

Trichophyton rubrum (NBRC 9185)

(2) 選択理由

ルリコナゾールの白癬菌に対する *in vitro* 抗真菌活性—MIC 及び MFC の同時測定による既存外用抗真菌薬との比較 (前田ら、Med. Mycol. J. Vol. 57J, 2016) で使用されていることから、NBRC9185 株とした。

(3) 入手先

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター

5. 使用機器

- (1) オートクレーブ、型式：HA-300MII、株式会社平山製作所
- (2) 電子天秤、型式：BP210D、ザルトリウス株式会社
- (3) インキュベーター、型式：MIR-253、三洋電機メディカシステム株式会社
- (4) 微分干渉型生物顕微鏡、型式：BHS-323N、株式会社オリンパス
- (5) マイクロプレートリーダー、型式：サンライズレインボー サーモ RC-R、テカンジャパン株式会社

6. 試験濃度

(1) 最高濃度及び選択理由

調製可能な最高濃度である 25 w/v%（調製濃度として 50 w/v%）を最高用量とした。

(2) 試験濃度及び選択理由

試験委託者の要望により、25、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 及び 0.1 w/v% の 8 濃度を選択した。

7. 被験物質の調製

(1) 溶媒及び選択理由

試験委託者の情報から本被験物質は水に可溶であるとされている。事前に、本被験物質の同一品（ロット違い）を用いて水への溶解性を確認したところ、50 w/v% 被験物質溶液の調製が可能であった。また、水に対する安定性を目視で確認した結果、発熱、発泡、着色（変色）は認められなかったため安定と判断し、試験に用いる溶媒として水系溶媒の試験培地を選択した。

(2) 被験物質の調製方法

調製は用時調製とした。

被験物質を 10 g（実測値：10.0008 g）秤量し、乳鉢で少量の溶媒と混合して 20 mL 容のメスフラスコに回収した。これを数回繰り返した後、溶媒を加えてメスアップし、転倒混和して最高濃度の原液（50 w/v%）を調製した。これを公比 2 で段階希釈して各濃度の被験物質液の原液を調製した。投与に用いる被験物質液の原液濃度は、50、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4 及び 0.2 w/v% とし、これらを投与液とした。

薬剤処理後、速やかに投与液を廃棄した。

(3) 投与液の輸送

試験施設で調製した最高濃度の投与液（50 w/v%）について、調製後、速やかに投与液の一部を採取し、室温条件下で試験場所に輸送した。

(4) 投与液の濃度分析

投与液の濃度は、試験場所が確認した。試験施設から送付された投与液の一部の有効成分濃度を投与液の調製翌日に高速液体クロマトグラフで測定した。投与液の分析方法及び許容基準は、試験場所が作成した「測定計画書」（添付資料 1 及び 2）に従った。なお、被験物質濃度が 20%より低い濃度では有効成分濃度が本分析法の定量限界を下回り、分析値の信頼性の確保が困難であることから、濃度分析の対象を最高濃度の投与液（50 w/v%）の 1 濃度のみとした。

分析の結果、投与液 100 g 中の有効成分の量が 0.0251 g であり、試験規格（0.0225～0.0275 g/100g）を満たした（添付資料 4）。

(5) 投与液の安定性

投与液の安定性は、試験場所が確認した。試験場所で本試験計画書に記載された被験物質の調製方法と同様に調製された投与液のうち最高濃度の投与液（50 w/v%）について、調製直後（0 時間）及び室温条件下で約 72 時間保存後、高速液体クロマトグラフで投与液中の有効成分濃度を測定し、0 及び 72 時間保存後の分析結果と比較して安定性を確認した。なお、測定方法及び許容基準は、試験場所が作成した「測定計画書」（添付資料 1 及び 2）に従った。その結果、投与液 100 g 中の有効成分の量が 0 時間では 0.0255 g、72 時間では 0.0253 g であり、いずれも試験規格（0.0225～0.0275 g/100 g）を満たしたことから、投与液の安定性が確認された（添付資料 5-1 及び 5-2）。

また、有効成分濃度の測定が出来ない投与液濃度については、0 及び約 72 時間保存後に発泡、発熱、変色などの変化がなかったことを目視で確認した。

投与液の安定性確認終了後、速やかに投与液を廃棄した。

8. 試験方法

(1) 群構成

陰性対照区、試験区及び発育対照区の 3 群構成とし（表 1）、各群 4 連で試験を行った。

表 1 群構成

群名	菌接種の有無	薬剤（被験物質）処理 の有無
陰性対照区	×	×
試験区	○	○
発育対照区	○	×

○：有 ×：無

(2) プレーットの識別

油性ペンで 24 ウェルプレート（以下、プレートという）の側面にプレート No. を示すローマ数字を、蓋にウェル No. を示す 1 からの通し番号をそれぞれ記入した。

(3) 菌株の準備

復元後 2 世代目の菌株を SDA 斜面培地に接種し、27℃で 13 日間培養した。

(4) 接種菌液の調整及び薬剤処理

① 接種菌液の調整

十分に発育させた菌株の SDA 斜面培地に希釈液を添加し、分生子を浮遊させた後、滅菌ガーゼ（2 枚重ね）で濾過して寒天と菌塊を除いた。濾液中の分生子を Thoma 型血球計算盤で計数し、希釈液を用いて分生子濃度を 4.8×10^6 conidia/mL に調整後、Alamar Blue 含有試験培地で 10 倍希釈したものを接種菌液とした。

② 薬剤（被験物質）処理

1) 陰性対照区

- i) トランズウェルをプレートに設置した。
- ii) 試験培地を各ウェル内に 0.42 mL、トランズウェル内に 0.30 mL ずつ添加した。
- iii) Alamar Blue 含有試験培地を各ウェル内に 0.42 mL、トランズウェル内に 0.30 mL ずつ加えた。

2) 試験区

- i) トランズウェルをプレートに設置した。
- ii) 各濃度の投与液を各ウェル内に 0.42 mL、トランズウェル内に 0.30 mL ずつ添加した。
- iii) Alamar Blue 含有試験培地を各ウェル内に 0.42 mL ずつ添加した。

- iv) 接種菌液をトランズウェル内のみに 0.30 mL ずつ加えた（最終菌量： 1.0×10^5 conidia/mL）。

3) 発育測定区

- i) トランズウェルをプレートに設置した。
- ii) 試験培地を各ウェル内に 0.42 mL、トランズウェル内に 0.30 mL ずつ添加した。
- iii) Alamar Blue 含有試験培地を各ウェル内に 0.42 mL ずつ添加した。
- iv) 接種菌液をトランズウェル内のみに 0.30 mL ずつ加えた（最終菌量： 1.0×10^5 conidia/mL）。

③ 後培養

薬剤処理後、27℃で4日間、発育対照区の培地の色調が青色からピンク色への変化が目視で認められるまで培養した。

(5) MIC の測定

- ① 後培養終了後、プレートのウェル内の Alamar Blue 含有試験培地をそれぞれ 0.2 mL 採取し、96 ウェルプレートへ移した。
- ② マイクロプレートリーダーで Alamar Blue 含有試験培地の光学濃度（OD 値）を測定波長 570 nm、対照波長 595 nm で測定した。
- ③ 試験区及び発育対照区の各測定値から陰性対照区の平均測定値を差引いて補正し、4 連の平均値求め、これを代表値とした。

$$\text{補正值} = \text{測定値} - \text{陰性対照区の平均測定値}$$

- ④ 次式を基に発育阻害率を算出し、発育対照区の菌の発育を 80%以上阻害する最小薬剤濃度を MIC とした。

$$\text{発育阻害率 (\%)} = \left\{ (\text{発育対照区の代表値} - \text{各被験物質液の代表値}) / \text{発育対照区の代表値} \right\} \times 100$$

(6) MFC の測定

MIC 測定後 7 日間培養し、MFC を測定した。

① NR 染色

1) 生菌処理区

- i) 新たなプレートのウェル内に 50 µg/mL NR 溶液を 0.6 mL ずつ添加した。
- ii) 培養終了したプレートのウェルから各群 2 個ずつトランズウェルを取

り出し、トランズウェル内を DPBS 1.5 mL で 2 回洗浄した。

iii) 洗浄後、i)のプレートにトランズウェルを移した。

iv) 移したトランズウェル内に 50 µg/mL NR 溶液を 0.4 mL 添加した後、27℃で 1 時間静置して NR 染色した。

2) 死菌処理区

i) 新たなプレートのウェル内に 1w/v%次亜塩素酸ナトリウムを 0.8 mL ずつ添加した。

ii) 生菌処理区に使用しなかった残りのトランズウェル（各群 2 個）を取り出し、トランズウェル内を DPBS 1.5 mL で 2 回洗浄した。

iii) 洗浄後、i)のプレートにトランズウェルを移した。

iv) 移したトランズウェル内に 1 %次亜塩素酸ナトリウム溶液を 0.4 mL 添加した後、室温で 1 時間静置した。

v) 静置後、トランズウェル内を DPBS 1.5 mL で 2 回洗浄した。

vi) 新たなプレートのウェル内に 50 µg/mL NR 溶液を 0.6 mL ずつ添加した。

vii) 洗浄したトランズウェルをvi)のプレートに移し、トランズウェル内に 50 µg/mL NR 溶液を 0.4 mL 添加した後、27℃で 1 時間静置して NR 染色した。

② 固定及び抽出

1) 生菌処理及び死菌処理したトランズウェル内を DPBS 1.5 mL で 2 回洗浄した。

2) 洗浄後、トランズウェル内に固定液を 0.2 mL 添加して室温で 1 分程度静置して菌体を固定した。

3) 固定後、トランズウェル内を注射用水 1.5 mL で 2 回洗浄した。

4) 洗浄後、トランズウェル内に抽出液を 0.2 mL 添加し、プレートシェーカーで 10 分間攪拌して菌体に取り込まれた NR を抽出した。

③ 測定及び MFC の算出

1) 各群の NR 抽出液を 100 µL ずつ 96 ウェルプレートに移した。

2) マイクロプレートリーダーで NR 抽出液の OD 値を測定波長 540 nm で測定した。

3) 各群について、各測定値から死菌処理区の平均測定値を差引いた値を NR 取込み量とし、2 連の平均値を求め、これを代表値とした。

4) 次式を基に NR 取込み阻害率を算出し、発育対照区の NR 取込み量を 98% 以上阻害する最小薬剤濃度を MFC とした。

$$\text{NR 取込み阻害率 (\%)} = \{ (\text{発育対照区の代表値} - \text{各被験物質液の代表値}) / \text{発育対照区の代表値} \} \times 100$$

9. 統計学的解析

結果の判定には統計学的解析は行わなかった。

IV. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態及び試験計画書に従わなかったこと

1. 予見することができなかった事態及び試験計画書に従わなかったこと

試験計画書では、本試験で使用する双眼実体顕微鏡と記載していたが、本試験では微分干渉型生物顕微鏡を使用した。

2. 試験の信頼性に及ぼした影響

試験計画書の記載ミスであり、該当操作に適した GLP 機器として管理された機器を選択したことから、試験の信頼性に影響を及ぼす疑いは無いと判断した。

V. 結果及び考察

被験物質 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.1、6.3 及び 25 w/v% の濃度で白癬菌に処理した結果、発育阻害率は濃度の低い順に 52.2、55.2、55.9、93.3、100.0、100.0、100.0 及び 100.0% (別表 1)、NR 取込み阻害率は同様に -20.7、1.2、1.9、19.5、44.3、99.5、99.0 及び 99.3% であったことから (別表 2)、MIC は 0.8 w/v%、MFC は 3.1 w/v% であった (別表 3)。

以上の結果から、本試験条件下において薬用 NS ジェルは白癬菌に対して抗真菌活性を示すと判断された。

VI. 試験関係資料の保存

1. 保存期間

試験終了後 5 年間 (ただし、その後の保存の要否及び期間については試験委託者と協議の上、決定する)

2. 保存物及び保存場所

試験計画書 (原本)、試験に関する記録文書、試験実施によって得られた生データ類、最終報告書 (原本)、資料類：株式会社 SRD 生物センターの資料保存施設

別表1

Alamar Blue含有試験培地の光学濃度及び発育阻害率

連No.	陰性 対照区	発育対照区	試験区															
			被験物質濃度 (w/v%)															
			0.1		0.2		0.4		0.8		1.6		3.1		6.3		25	
	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值	測定値	補正值		
1	0.000	1.579	1.579	0.565	0.551	0.493	0.107	0.107	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
2	0.000	0.782	0.782	0.440	0.251	0.367	0.123	0.123	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
3	0.000	0.688	0.688	0.329	0.437	0.411	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
4	0.000	1.131	1.131	0.662	0.632	0.572	0.048	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
平均 (代表値)	0.000	—	1.045	—	0.468	—	0.461	—	0.070	—	0.000	—	0.000	—	0.000	—		
標準偏差	0.000	—	0.404	—	0.165	—	0.091	—	0.056	—	0.000	—	0.000	—	0.000	—		
発育阻害率(%)			52.2	55.2	55.9	93.3	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0							

OD値(測定値)が負となった場合は、0とした。

補正值 = 測定値 - 陰性対照区の平均測定値

発育阻害率 (%) = {(発育対照区の代表値 - 各被験物質液の代表値) / 発育対照区の代表値} × 100

別表2

NR抽出液の光学濃度及びNR取込み阻害率

処 理	連No.	陰性対照区	発育対照区	試験区																	
				被験物質濃度 (w/v%)																	
				0.1		0.2		0.4		0.8		1.6		3.1		6.3		25			
測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量	測定値	NR取込み量				
生菌処理	1	0.052	-0.008	0.514	0.462	0.586	0.533	0.505	0.445	0.485	0.428	0.415	0.365	0.261	0.216	0.046	0.002	0.052	0.006	0.050	0.004
	2	0.054	-0.006	0.420	0.368	0.522	0.469	0.434	0.374	0.443	0.386	0.352	0.302	0.291	0.246	0.045	0.001	0.048	0.002	0.047	0.001
	平均 (代表値)	—	-0.007	—	0.415	—	0.501	—	0.410	—	0.407	—	0.334	—	0.231	—	0.002	—	0.004	—	0.003
	標準偏差	—	0.001	—	0.066	—	0.045	—	0.050	—	0.030	—	0.045	—	0.021	—	0.001	—	0.003	—	0.002
	1	0.069	—	0.056	—	0.052	—	0.062	—	0.062	—	0.055	—	0.045	—	0.046	—	0.048	—	0.049	—
死菌処理	2	0.051	—	0.048	—	0.054	—	0.058	—	0.052	—	0.044	—	0.044	—	0.042	—	0.044	—	0.043	—
	平均	0.060	—	0.052	—	0.053	—	0.060	—	0.057	—	0.050	—	0.045	—	0.044	—	0.046	—	0.046	—
	NR取込み阻害率(%)	101.7	—	—	—	-20.7	1.2	1.9	19.5	44.3	99.5	99.0	99.3								

NR: ニュートラルレッド

NR取込み量=測定値-死菌処理区の平均測定値

NR取込み阻害率(%) = { (発育対照区の代表値) / 発育対照区の代表値 } × 100

別表3

薬用NSジェルのMIC及びMFC

項目	MIC	MFC
薬用NSジェル	0.8 w/v%	3.1 w/v%

MIC: 最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration)

MFC: 最小殺真菌濃度 (Minimum Fungicidal Concentration)

測定計画書

測定計画書

作成 日:2025 年 3 月 19 日

担当 部 門:第 1 開発研究部

作成 者: [REDACTED]

作成 者: [REDACTED]

題名:被験物質、及び投与液中のベンザルコニウム塩化物の安定性試験

コメント:

添付資料 1

測定計画書

1. 概要・目的

被験物質、及び投与液に配合されたベンザルコニウム塩化物の安定性を担保することを目的とする。

2. 実施項目

(1) 定量試験

被験物質、及び投与液について、ベンザルコニウム塩化物の定量試験を実施し、定量値を算出する。被験物質、及び投与液については、以下を示す。

被験物質:薬用 NS ジェル本品

投与液:薬用 NS ジェル本品を RPMI1640 培地にて 50%濃度に希釈したもの

3. 試験計画及び担当者

試験計画(スケジュール)

契約

被験物質送付・受領

試験前施設調査①

安定性確認用の投与液調整・送付・ゼットク受領

・投与液の安定性確認(開始時)

投与液の安定性確認(開始時)に対する調査②

投与液の安定性確認(終了時)

投与液の安定性確認(終了時)に対する調査⑤

試験実施

投与液の濃度分析

被験物質の安定性確認

投与液の濃度分析時に対する調査③

被験物質の安定性確認に対する調査④

※③④に関しては、濃度分析と安定性確認が同時期に実施できるなら、

③④も同日に実施

担当者:



4. 定量試験法

(1) 試験方法

別紙:被験物質におけるベンザルコニウム塩化物の定量試験法に記載

別紙:投与液におけるベンザルコニウム塩化物の定量試験法に記載

(2) 実施方法

測定計画書

(ア) 測定手順(被験物質)

本品約 2g を天秤(メラー・トレド株式会社)にて精密に量り、移動相 10mL を加えて分散した後、50mL メスフラスコに移す。容器は移動相 10mL ずつで 2 回洗い、洗液は 50mL メスフラスコに合わせた後、これに移動相を加えて正確に 50mL とする。この液をろ過(ポアサイズ 0.45 μ m のメンブランフィルター)し、ろ液を試料溶液とする。試料溶液は 3 回調製する。

別に定量用ベンザルコニウム塩化物(注 1)約 50mg を精密に量り、水に溶かして正確に 50mL とする。この液 4mL を 20mL メスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に 20mL とする。この液 5mL を 50mL メスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に 50mL とし、この液を標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液 30 μ L ずつを正確にとり、定量試験法の試験条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のベンザルコニウムのピーク面積を測定し、定量値を求める。

本品 100g 中のベンザルコニウム塩化物(C₂₂H₄₀ClN:354.01)の量(g)

$$= WS \times AT / AS \times 100 / WT \times 0.00002$$

ただし、

WS: 定量用ベンザルコニウム塩化物の秤取量(mg)

WT: 本品の秤取量(g)

AS: 標準溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

AT: 試料溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

試験条件

使用機器: 液体クロマトグラフ(株式会社島津製作所)

検出器: 紫外吸光光度計(測定波長: 220nm)

カラム: 内径 4.6mm, 長さ 250mm のステンレス管にスルホン酸基を導入した 5 μ m の液体クロマトグラフィー用シリカゲルが充填されたもの

カラム温度: 40℃付近の一定温度

移動相: 過塩素酸ナトリウム溶液(注 2) / 蒸留水混液(17:3)

流量: ベンザルコニウムの保持時間が約 10 分になるように調整する。

システム適合性

システムの性能: 標準溶液 30 μ L につき、上記の条件で操作するとき、ベンザルコニウムのシンメトリー係数は 2.0 以下、理論段数は 2000 段以上である。

システムの再現性: 標準溶液 30 μ L につき、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、ベンザルコニウムのピーク面積の相対標準偏差は 2.0% 以下である。

試薬及び試液等

(注 1) 定量用ベンザルコニウム塩化物

日局適合品で、含量 99.0% 以上のものを用いる。

測定計画書

(注2) 過塩素酸ナトリウム溶液

過塩素酸ナトリウム一水和物(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)5.62gにメタノール(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)を加えて1000mLとする。

備考

本規格及び試験方法は、別に規定するもののほか、日局の通則及び一般試験法を準用する。

(イ) 測定手順(投与液)

本品約2gを天秤(メラー・トレド株式会社)にて精密に量り、移動相10mLを加えて分散した後、50mLメスフラスコに移す。容器は移動相10mLずつで2回洗い、洗液は50mLメスフラスコに合わせた後、これに移動相を加えて正確に50mLとする。この液をろ過(ポアサイズ0.45 μ mのメンブランフィルター)し、ろ液を試料溶液とする。試料溶液は3回調製する。

別に定量用ベンザルコニウム塩化物(注1)約50mgを精密に量り、水に溶かして正確に50mLとする。この液2mLを20mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に20mLとする。この液5mLを50mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に50mLとし、この液を標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液30 μ Lずつを正確にとり、定量試験法の試験条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のベンザルコニウムのピーク面積を測定し、定量値を求める。

本品100g中のベンザルコニウム塩化物($C_{22}H_{40}ClN$:354.01)の量(g)

$$= WS \times AT / AS \times 100 / WT \times 0.00001$$

ただし、

WS: 定量用ベンザルコニウム塩化物の秤取量(mg)

WT: 本品の秤取量(g)

AS: 標準溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

AT: 試料溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

試験条件

使用機器: 液体クロマトグラフ(株式会社島津製作所)

検出器: 紫外吸光光度計(測定波長: 220nm)

カラム: 内径4.6mm, 長さ250mmのステンレス管にスルホン酸基を導入した5 μ mの液体クロマトグラフィー用シリカゲルが充填されたもの

カラム温度: 40℃付近の一定温度

移動相: 過塩素酸ナトリウム溶液(注2)/蒸留水混液(17:3)

流量: ベンザルコニウムの保持時間が約10分になるように調整する。

システム適合性

測定計画書

システムの性能:標準溶液30 μ Lにつき, 上記の条件で操作するとき, ベンザルコニウムのシンメトリー係数は2.0以下, 理論段数は2000段以上である.

システムの再現性:標準溶液30 μ Lにつき, 上記の条件で試験を6回繰り返すとき, ベンザルコニウムのピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下である.

試薬及び試液等

(注1) 定量用ベンザルコニウム塩化物

日局適合品で, 含量99.0%以上のものを用いる.

(注2) 過塩素酸ナトリウム溶液

過塩素酸ナトリウム一水和物(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)5.62gにメタノール(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)を加えて1000mLとする.

備考

本規格及び試験方法は, 別に規定するもののほか, 日局の通則及び一般試験法を準用する.

(ウ) 評価方法

定量値の平均値、標準偏差、相対標準偏差(%)を求める。

(エ) 評価基準

定量値の平均値 理論値 $\pm$ 10%以内

相対標準偏差 2.0%以下

5. 基準を逸脱した場合の処置方法

判定基準を逸脱した場合及び製品試験に於いて、規格外の結果が得られた場合はこれらの結果を、直ちにSRD 生物センター様、並びに岩瀬コスファ様に報告し、その原因を究明し、改善した後、再試験を実施すること。

以上

測定計画書

[別紙:被験物質におけるベンザルコニウム塩化物の定量試験法]

本品約2gを天秤(メラー・トレド株式会社)にて精密に量り、移動相10mLを加えて分散した後、50mLメスフラスコに移す。容器は移動相10mLずつで2回洗い、洗液は50mLメスフラスコに合わせた後、これに移動相を加えて正確に50mLとする。この液をろ過(ポアサイズ0.45 μ mのメンブランフィルター)し、ろ液を試料溶液とする。

別に定量用ベンザルコニウム塩化物(注1)約50mgを精密に量り、水に溶かして正確に50mLとする。この液4mLを20mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に20mLとする。この液5mLを50mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に50mLとし、この液を標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液30 μ Lずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のベンザルコニウムのピーク面積AT及びASを測定する。

本品100g中のベンザルコニウム塩化物($C_{22}H_{40}ClN$:354.01)の量(g)

$$= WS \times AT / AS \times 100 / WT \times 0.00002$$

ただし、

WS: 定量用ベンザルコニウム塩化物の秤取量(mg)

WT: 本品の秤取量(g)

AS: 標準溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

AT: 試料溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

試験条件

使用機器: 液体クロマトグラフ(株式会社島津製作所)

検出器: 紫外吸光光度計(測定波長: 220nm)

カラム: 内径4.6mm、長さ250mmのステンレス管にスルホン酸基を導入した5 μ mの液体クロマトグラフィー用シリカゲルが充填されたもの

カラム温度: 40℃付近の一定温度

移動相: 過塩素酸ナトリウム溶液(注2)/蒸留水混液(17:3)

流量: ベンザルコニウムの保持時間が約10分になるように調整する。

システム適合性

システムの性能: 標準溶液30 μ Lにつき、上記の条件で操作するとき、ベンザルコニウムのシンメトリ係数は2.0以下、理論段数は2000段以上である。

システムの再現性: 標準溶液30 μ Lにつき、上記の条件で試験を6回繰り返すとき、ベンザルコニウムのピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下である。

試薬及び試液等

(注1) 定量用ベンザルコニウム塩化物

日局適合品で、含量99.0%以上のものを用いる。

(注2) 過塩素酸ナトリウム溶液

添付資料 1

測定計画書

過塩素酸ナトリウム一水和物(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)5.62gにメタノール(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)を加えて1000mLとする。

備考

本規格及び試験方法は、別に規定するもののほか、日局の通則及び一般試験法を準用する。

測定計画書

[別紙:投与液におけるベンザルコニウム塩化物の定量試験法]

本品約2gを天秤(メラー・トレド株式会社)にて精密に量り、移動相10mLを加えて分散した後、50mLメスフラスコに移す。容器は移動相10mLずつで2回洗い、洗液は50mLメスフラスコに合わせた後、これに移動相を加えて正確に50mLとする。この液をろ過(ポアサイズ0.45 μ mのメンブランフィルター)し、ろ液を試料溶液とする。

別に定量用ベンザルコニウム塩化物(注1)約50mgを精密に量り、水に溶かして正確に50mLとする。この液2mLを20mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に20mLとする。この液5mLを50mLメスフラスコに正確に量り、移動相を加えて正確に50mLとし、この液を標準溶液とする。

試料溶液及び標準溶液30 μ Lずつを正確にとり、次の条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、それぞれの液のベンザルコニウムのピーク面積AT及びASを測定する。

本品100g中のベンザルコニウム塩化物($C_{22}H_{40}ClN$:354.01)の量(g)

$$= WS \times AT / AS \times 100 / WT \times 0.00001$$

ただし、

WS: 定量用ベンザルコニウム塩化物の秤取量(mg)

WT: 本品の秤取量(g)

AS: 標準溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

AT: 試料溶液のクロマトグラムにおけるベンザルコニウムのピーク面積

試験条件

使用機器: 液体クロマトグラフ(株式会社島津製作所)

検出器: 紫外吸光光度計(測定波長: 220nm)

カラム: 内径4.6mm、長さ250mmのステンレス管にスルホン酸基を導入した5 μ mの液体クロマトグラフィー用シリカゲルが充填されたもの

カラム温度: 40℃付近の一定温度

移動相: 過塩素酸ナトリウム溶液(注2)/蒸留水混液(17:3)

流量: ベンザルコニウムの保持時間が約10分になるように調整する。

システム適合性

システムの性能: 標準溶液30 μ Lにつき、上記の条件で操作するとき、ベンザルコニウムのシンメトリ係数は2.0以下、理論段数は2000段以上である。

システムの再現性: 標準溶液30 μ Lにつき、上記の条件で試験を6回繰り返すとき、ベンザルコニウムのピーク面積の相対標準偏差は2.0%以下である。

試薬及び試液等

(注1) 定量用ベンザルコニウム塩化物

日局適合品で、含量99.0%以上のものを用いる。

(注2) 過塩素酸ナトリウム溶液

添付資料 1

過塩素酸ナトリウム一水和物(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)5.62gにメタノール(富士フイルム和光純薬株式会社 特級)を加えて1000mLとする。

備考

本規格及び試験方法は、別に規定するもののほか、日局の通則及び一般試験法を準用する。

添付資料 2

分析で使⽤した試薬、機器及びカラム

1. 試薬

- (1) 定量⽤ベンザルコニウム塩化物(⽇本薬局⽅、Lot No. 40363C、⽇油株式会社)
- (2) 過塩素酸ナトリウム⽔和物(試薬特級、Lot No. KSN7979、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (3) メタノール(HPLC⽤、Lot No. KSF6287、富士フイルム和光純薬株式会社)
- (4) 3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS; Lot No. WQ160、同仁化学研究所)
- (5) RPMI1640 (Lot No. 0000361897、Sigma-Aldrich, Co.)

2. 使⽤機器

- (1) 分析天秤、型式:XS105及びML304T100、メトラー株式会社
- (2) 高速液体クロマトグラフ、型式:LC-20A、島津株式会社

3. 使⽤カラム

- (1) CAPCELL PAK SCX VG80 5 μ m 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm (Lot No. HQAD02994、⼤阪ソーダ株式会社)

被験物質の分析証明書

試験 No.H-25027

株式会社 SRD 生物センター御中

2025 年 4 月 2 日

分析証明書

日本ゼトック株式会社 第 1 開発研究部

下記の通り分析結果についてお知らせいたします。

名称：薬用 NS ジェル

Lot No：J03GB

試験日：2024/07/02

本品 100g 中のベンザルコニウム 塩化物の量 (g)	試験規格 (g/100g)	判定
0.0506	0.045～0.055	適合

試験責任者
 2025.4.2

以上

確認
2025-4-21

被験物質の安定性分析（投与終了時）

試験 No.H-25027

株式会社 SRD 生物センター御中

2025 年 4 月 8 日

実施試験結果

日本ゼトック株式会社 第 1 開発研究部

下記の通り実施試験結果についてお知らせいたします。

名称：薬用 NS ジェル

Lot No：J03GB 被験物質の安定性確認

試験日：2025/04/04

本品 100g 中のベンザルコニウム 塩化物の量 (g)	試験規格 (g/100g)	判定
0.0509	0.045～0.055	適合

試験責任者
 2025.4.8

以上

監
2025.4.21

添付資料 4

投与液の濃度分析

試験 No.H-25027

株式会社 SRD 生物センター御中

2025 年 4 月 8 日

実施試験結果

日本ゼトック株式会社 第 1 開発研究部

下記の通り実施試験結果についてお知らせいたします。

名称：50%希釈した薬用 NS ジェル

Lot No：J03GB 投与液の濃度分析

試験日：2025/04/04

本品 100g 中のベンザルコニウム 塩化物の量 (g)	試験規格 (g/100g)	判定
0.0251	0.0225～0.0275	適合

試験責任者
 2025.4.8

以上

確認
2025 4-21 

投与液の安定性分析 (0 時間)

試験 No.H-25027

株式会社 SRD 生物センター御中

2025 年 4 月 8 日

実施試験結果

日本ゼトック株式会社 第1 開発研究部



下記の通り実施試験結果についてお知らせいたします。

名称：50%希釈した薬用 NS ジェル

Lot No：J03GB 投与液の安定性確認 0 時間

試験日：2025/04/01

本品 100g 中のベンザルコニウム 塩化物の量 (g)	試験規格 (g/100g)	判定
0.0255	0.0225～0.0275	適合

試験責任者



2025.4.8

以上

確認
2025.4.21

投与液の安定性分析（72 時間）

試験 No.H-25027

株式会社 SRD 生物センター御中

2025 年 4 月 8 日

実施試験結果

日本ゼトック株式会社 第 1 開発研究部



下記の通り実施試験結果についてお知らせいたします。

名称：50%希釈した薬用 NS ジェル
Lot No：J03GB 投与液の安定性確認 72 時間
試験日：2025/04/04

本品 100g 中のベンザルコニウム 塩化物の量 (g)	試験規格 (g/100g)	判定
0.0253	0.0225～0.0275	適合

試験責任者
 2025.4.8

以上

確認 2025.4.21 

試験委託者から提供された被験物質情報

H-25027
4-TSC-001/別紙 2-1
版数：5 版

記入日 2025 年 4 月 3 日

記入者 日本ゼトック株式会社
第1開発研究部

試験で用いる名称	薬用 NS ジェル (英文字表記：)		
組 成 (合計 100%となるよう記載してください)	有効成分 (カタカナ)	ベンザルコニウム塩化物 (0.05%) ベンザルコニウムエンカブツ	
	その他の成分	精製水、エタノール、濃グリセリン、軽質流動パラフィン、グリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテル、カルボキシビニルポリマー、パラオキシ安息香酸メチル、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビット、モノステアリン酸グリセリン、パルミチン酸セチル、ミツロウ、パラオキシ安息香酸エチル、水酸化カリウム、オリブ油、ベヘニルアルコール、水素添加大豆リン脂質、エデト酸ナトリウム水和物、香料 (99.95%)	
Lot No.	J03GB		
外観・色調	白色の乳液	pH	6.6
製造年月日	2024 年 7 月 24 日	有効期限	2027 年 7 月 24 日
保存条件 (該当する箇所を○で囲んで下さい)	室温・冷蔵・冷凍(℃)・遮光・気密・窒素置換・その他()		
提供量	4 本	残余物質の取扱い	返却・廃棄
溶媒に対する溶解性及び安定性 (該当する箇所を○で囲んで下さい)	溶媒	溶解度	
	水	安定性	
	DMSO	安定・不安定・不明	
	その他 ()	安定・不安定・不明	
有効成分の単体／類似品の毒性情報	経口毒性 LD50(ラット): 240mg/kg、経皮毒性 LD50 (ラット): 1.56g/kg 皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性、特定標的臓器毒性 (単回ばく露、反復ばく露)		
危険情報	■無 □不明 □有 ()		
取扱い注意事項	目に入らないように注意してください。		
申請の予定	□無 □不明 ■有 (指定医薬部外品で申請済み)		

<被験物質情報 (製剤) >

原本コピー

<提供者>
社名：株式会社北の達人コーポレーション
所属：
担当者：
住所：東京都中央区銀座四丁目 12 番 15 号
歌舞伎座タワー17 階
連絡先：050-2018-0760

<返却先>
貴社名：
所属：
担当者：
住所：
連絡先：

備考：

2025.4.7