

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

研究報告書

研究課題名：

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究

課題番号： H10-医薬-040

主任研究者： 棚元憲一（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者： 石橋無味雄（国立医薬品食品衛生研究所）

谷本剛（国立医薬品食品衛生研究所）

厚生大臣 宮下創平 殿

住所 〒215-9001 川崎市麻生区三浦寺 923-2-113
 申請者 氏名 棚元 憲一 (所屬施設 国立医薬品食品衛生研究所)

平成10年度厚生科学研究費補助金 (医薬安全総合 研究事業) に係わる研究事業を完成したので次の通り報告する。

研究課題名 (課題番号) : 新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究 (H10-医薬-040)

国庫補助金精算所要額 : 金 3,000,000円也

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版及びこれを入力したフロッピーディスク (別添1のとおり)
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書 (別添2のとおり)
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書 (別添3のとおり)
4. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
Journal of Bacteriology, 180, 3891-3899, Chemical structure of lipid A isolated from <u>Flavobacterium meningosepticum</u> lipopolysaccharide.	1998	American Society for Microbiology	Kato, H., T. Iida, Y. Haishima, A. Tanaka, & K. Tanamoto.
Prog. Clin. Biol. Res. 397, 269-280, Production of nontoxic lipid A by chemical modification and its antagonistic effect on LPS action	1998	Wiley-Liss Inc.	Tanamoto, K.
エンドトキシン研究 1 ; 基礎と臨床 pp143-148, 桂皮中に存在するエンドトキシン活性抑制物質の性状	1998	菜根出版	安住聡子、棚元憲一
日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法 pp44-62、エンドトキシンの除去と不活化	1998	日本規格協会	棚元憲一
日本薬局方フォーラム, 8, 4, 残留溶媒試験法	1998		石橋無味雄
日本薬局方フォーラム, 8, 96-98, 医薬品の残留溶媒ガイドライン, 残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例	1998		石橋無味雄
医薬品研究, 29, 725-729. ペオニフロリン標準品の新規設定	1998	日本公定書協会	齋藤博幸、岩田美保、北島文、谷本剛、岡田敏史、他11名
Anal. Chim. Acta, 365, 285-292. Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication.	1998	Elsevier	T. Tanimoto, K. Maekawa, S. Okada, C. Yabe-Nishimura
Diabetes Care 21 (6) 1014-1018. Influence of Interindividual Variability of Aldose Reductase Protein Content on Polyol-pathway Metabolites and Redox State in Erythrocytes	1998		Y. Hamada, C. Nishimura, N. Koh, F. Sakakibara, J. Nakamura, T. Tanimoto, N. Hotta
医薬品研究, 29(4) 290-298. メシル酸ジヒドロエルゴトキシニン標準品の新規設定	1998		谷本剛、田頭洋子、北島文、岡田敏史、他7名
医薬品研究, 29(4) 284-289. 日本薬局方L-トレオニンの薄層クロマトグラフ法による純度試験	1998		谷本剛、岡田敏史、他4名

5. 研究成果による特許権等の知的財産の取得状況
なし

別添 1

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要版

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝医薬安全総合研究事業

研究課題名＝新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究

国庫補助金精算所要額＝3,000,000

研究機関（年度）＝1998-2000

主任研究者＝棚元憲一（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者＝石橋無味雄（国立医薬品食品衛生研究所）、谷本剛（国立医薬品食品衛生研究所）

研究目的＝治験や基礎研究において有効性と安全性が確認され、医薬品として製造（輸入）承認された物質や最終製剤は、その有効性と安全性を確認した物質や最終製剤と同一の性状と品質をもつものを、医薬品として継続的に国民（患者等）に供給されなければならない。このため医薬品の性状と品質の確保を行う方法は極めて重要なことである。

この医薬品の性状と品質の確保は、二つの方法で行われている。一つは、中央薬事審議会における審議と、それにより決定される性状及び品質に関する規格によるものである。他の一つは、品質規格として設定されている「規格及び試験方法」が、実際に実施できる規格と試験方法であるか否かを、試料に対し、実際に試験を実施して確認する特別審査試験である。この特別審査試験は、医薬品製造（輸入）承認申請書の「規格及び試験方法」欄に記載された試験方法の適否について検討するもので、医薬品の有効性と安全性を担保する唯一手段である。それゆえ、試験方法は正確さや再現性に優れた方法でなければならない。しかし、近年の医薬品の製造には最先端かつ革新的な科学技術が用いられ、そのため高度で複雑な分析法や製剤試験が必要になっている。本研究はこれら先端技術応用医薬品等の評価技術を開発することを目的に、製剤機能試験法の開発、製剤中に含まれる不純物の分析技術の開発評価等を行い、医薬品の有効性及び安全性の確保をより確実にすることにより国民の福祉の増進に寄与しようとするものである。

平成10年度は1) 残留溶媒試験法の開発、2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討、3) バイオハイブリッド化技術によるタンパク性の新医薬品の品質評価と評価技術の確立を目的として以下の研究を行った。

研究方法＝1) 残留溶媒試験法の開発：米国薬局方(USP)及びヨーロッパ薬局方(EP)と調

和した試験法として、ガスクロマトグラフ法を用いた試験法を開発することとした。対象溶媒を、ICHにおいて定められた「医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒」、「残留量を規制すべき溶媒」の計 31 種とした。これらの一斉分析が可能なガスクロマトグラフ条件を決定した。2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討：化学合成活性型のリピドAとして *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516)、前駆体構造 (406)、部分サクシニル化リピドA類縁体、モノサッカライドリピドAを、また天然 LPS は菌体より定法で得た。リピドAの化学修飾体としてサクシニル化、アセチル化、脱O-アシル化リピドA類縁体を用いた。リムルス活性は定量的なリムルス測定試薬 (Endospecky; 生化学工業) を用い、合成基質から遊離する p-nitroaniline の発色により測定した。リムルス活性以外のエンドトキシン活性としてマウス (BALB/C) 腹腔マクロファージもしくは J774.1 細胞、ヒト由来 THP-1、及び U937 細胞から上清中に遊離される TNF- α 産生活性、ウサギを用いた発熱活性、マウス脾臓細胞のマイトジェン活性、D-galactosamine 感作によるマウス致死毒性のアクセイ系でエンドトキシン活性を測定した。3) バイオハイブリッド化技術で製されるタンパク性新医薬品の品質評価と評価技術の確立：バイオハイブリッド化技術を応用した改変タンパク質の製造例を文献的に調査し、医薬品として承認された事例についてその品質評価法を検証した。また、ジノスタチンスチマラマー (ZSS)、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) を例にして、それらのハイブリッド化により獲得される機能の評価法を実験的に検証した。

結果と考察 = 1) 残留溶媒試験法の開発：試料及び標準品 (基準物質) 採取量、試料溶液及び標準溶液の調製方法、ガスクロマトグラフへの注入量、内標準溶液の調製方法、ヘッドスペース試料導入装置の操作条件、ガスクロマトグラフの操作条件 (検出器、カラム、カラム温度、注入口温度、検出器温度、キャリアーガス、キャリアーガス流量、スプリット比等) 及びシステム適合性 (システムの性能及びシステムの再現性) 等を検討し、「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は薬局方案となり、日本薬局方フォーラムに掲載された。2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討：化学合成リピドA類縁体化合物中に、完全に無毒性であるにもかかわらず、強力なリムルス活性を示す物質が存在することを見出した。さらに天然 LPS の中に、リムルス反応は非常に弱い、ヒト細胞に強力な作用を示す物質が存在した。またリムルス活性をはじめ、マウスの系でも強力な活性を示すにもかかわらず、ヒト細胞に対してはまったく活性を示さない幾つかの化合物を見出した。以上の結果、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子と、リムルス反応のエンドトキシン認識分子であるカプトガニの凝固因子のエンドトキシン認識構造・認識機構に大きな差があることが明らかになり、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。3) バイオハイブリッド化技術によるタンパク性の新医薬品の品質評価と評価技術の確立：ハイブリッド化技術によるタンパク性医薬品の創製は、タンパク質の性状や機能の改変、改善を目的としたものであることから、その品質評価には従来とは異なった新たな視点の導入が必要となる。ジノスタチンスチマラマー (ZSS) の様な比較的分子量 (約 15kD) 物質は、ハイブリッド化部位も明確に同定されていることから、獲得した抗腫瘍活性の増強や腫瘍組織への集積性などの薬剤特性は分子

量サイズの確認、ハイブリッド化剤の導入比、ハイブリッド化部位の同定、タンパク質、クロモフォア、ハイブリッド化剤の構成比、などの構造的特性を厳格に規定し、試験できれば担保できると考えられる。しかし、PEG-tPAのような高分子物質で、導入されたハイブリッド化剤の分子数が多い場合には構造的特性の厳格な規格化や試験法の設定は困難で、生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要となると考えられる。

結論＝「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は薬局方案となり、日本薬局方フォーラムに掲載及び関係業界に内示された。リムルス試験がヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映しているかどうかの検証を行った結果、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子と、リムルス反応のエンドトキシン認識分子であるカプトガニの凝固因子のエンドトキシン認識構造・認識機構に大きな差があることを見出し、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。酵素やホルモンなどのタンパク質性医薬品の性状や機能を先端技術の応用で改変したハイブリッド化医薬品はその改変目的に応じて、新たに付与された性質あるいは機能を評価する必要があるため、そのための必要評価項目並びにそれらに対する可能な評価技術について調査した。また、血中動態の改善を目的としたハイブリッド化医薬品の品質評価法としての単離肝細胞培養系による試験法の有用性を検証した。

厚生科学研究補助金（医薬安全総合研究事業）
総括研究報告書

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究
主任研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所部長

研究要旨 新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究を行った。不純物試験法の開発に関する研究では残留溶媒に関する定性定量試験法を開発を検討し、ガスクロマトグラフ法により日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議(ICH)で定められた「医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒」、「残留量を規制すべき溶媒」計 31 溶媒の分離分析が可能な「残留溶媒試験法」を開発した。エンドトキシン試験法の信頼性の確認に関する研究においては、リムルス試験がヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映しているかどうかの検証を行った。その結果、完全に無毒性で、強力なリムルス活性を示す物質が存在すること、リムルス活性は弱いですが、ヒト細胞には強力な作用を示すもの、逆にリムルス活性、マウスの系に強力な活性を示すが、ヒト細胞に対してはまったく活性を示さない幾つかの化合物を見出した。以上の結果、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。ハイブリッド化医薬品の品質評価技術に関する研究では、ジノスタチンステマラマー(ZSS)と PEG 修飾組織プラスミノゲンアクチベーター(PEG-tPA)を例にしてその品質評価のあり方を検討し、構造的特性を厳格に規定できる場合は機能的な特性も担保できるが、PEG-tPA のように、そうでない場合は生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要であると考えられた。

分担研究者
石橋無味雄 国立医薬品食品衛生研究所
室長
谷本剛 国立医薬品食品衛生研究所
室長

A. 研究目的

治験や基礎研究において有効性と安全性が確認され、医薬品として製造（輸入）承認された物質や最終製剤は、その有効性と安全性を確認した物質や最終製剤と同一の性状と品質をもつものを、医薬品として継

続的に国民（患者等）に供給されなければならない。このため医薬品の性状と品質の確保を行う方法は極めて重要なことである。

この医薬品の性状と品質の確保は、二つの方法で行われている。その一つは、中央薬事審議会における審議と、審議により決定される性状及び品質に関する規格、すなわち、医薬品の「規格及び試験方法」によるものである。他の一つは、品質規格として設定されている「規格及び試験方法」が、実際に実施できる規格と試験方法であるか否かを、試料に対し、実際に試験を実施して確認する特別審査試験である。この特別

審査試験は、医薬品製造（輸入）承認申請書の「規格及び試験方法」欄に記載された試験方法の適否について検討するもので、その「規格及び試験方法」は、製造（輸入）承認され、治療の場に医薬品が届けられるとき、前述のようにその有効性と安全性を担保する唯一手段である。それゆえ、試験方法は正確さや再現性に優れた方法でなければならない。しかしながら、近年の医薬品の製造には、その合成方法や製剤化の過程において最先端かつ革新的な科学技術が用いられ、そのため高度で複雑な分析法や製剤試験が必要になっている。本研究はこれら先端技術応用医薬品等の評価技術を開発することを目的に、製剤機能試験法の開発、製剤中に含まれる不純物の分析技術（製造経路で残存、発生する不純物、分解不純物、エンドトキシン等）の開発評価等を行い、医薬品の有効性及び安全性の確保をより確実にすることにより国民の福祉の増進に寄与しようとするものである。

平成10年度は1) 日局一般試験法に記載する残留溶媒試験法の開発、2) リムルステストの擬陽性・擬陰性を基礎的に明らかにすることによるエンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討、並びに毒性、特にヒトに対する作用を的確に反映できる新規方法の開発、3) バイオハイブリッド化技術で製されるタンパク性の新医薬品に対する品質評価のあり方とその品質評価技術の確立を目的として以下の研究を行った。

B. 研究方法

1) 残留溶媒試験法の開発

米国薬局方 (USP) 及びヨーロッパ薬局方 (EP) と調和した試験法として、ガスクロマトグラフ法を用いた試験法を開発することとした。対象溶媒を、ICH において定められた「医薬品の製造において使用を避け

るべき溶媒」であるベンゼン等 5 種、「残留量を規制すべき溶媒」であるアセトニトリル等 26 種とした。これらの一斉分析が、可能なガスクロマトグラフ用カラム数種を選定し、直接注入法及びヘッドスペース注入法を用いる分析方法を検討し、操作条件を決定した。

2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討

化学合成リポド A の調製：化学合成活性型のリポド A として *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516)、前駆体構造 (406) は第一化学工業 (株) を用いた。一方、部分サクシニル化リポド A 類縁体、さらにはモノサクカライドリポド A は自ら化学合成を行った。

リポド A の化学修飾：サクシニル化リポド A 前駆体 (s406) は、リポド A 前駆体を無水ピリジン中で 無水コハク酸と共に懸濁し、密封容器中で 60 °C、3 時間の反応により得た。アセチル化は同様に試料を無水ピリジンと無水酢酸に溶解し、少量のジメチルアミノピリジン存在下で一夜放置した。脱 O-アシル化は同様に密封容器中で無水ヒドラジンに懸濁後 60 °C、30 分反応させた。

P. gingivalis リポド A の調製：*P. gingivalis* LPS は熱フェノール・水で抽出した。リポド A は LPS を 1% 酢酸で 100 °C、90 min 処理後、クロロフォルム/メタノール (1/1) で抽出し、Dowex 50 (+H)、及び Sephadex LH-20 (Pharmacia) で精製した。

リムルス活性：定量的なリムルス測定試薬 (Endospeccy; 生化学工業) を用いて、試料と同量のリムルス試薬を 37 °C、30 分反応後、合成基質から遊離する p-nitroaniline の発色により測定した。

リムルス活性以外のエンドトキシン活性：マウス (BALB/C) 腹腔マクロファージも

しくは J774.1 細胞、ヒト由来 THP-1、及び U937 細胞から上清中に遊離される TNF- α 産生活性、ウサギを用いた発熱活性、マウス脾臓細胞の [3 H]thymidine 取り込みによるマイトジェン活性、D-galactosamine 感作によるマウス致死毒性等のアッセイ系でエンドトキシン活性を測定した。

3) バイオハイブリッド化技術で製されるタンパク性新医薬品の品質評価と評価技術の確立

バイオハイブリッド化技術を応用した改変タンパク質の製造例を文献的に調査し、医薬品として承認された事例についてその品質評価法を検証した。また、組織プラスミノゲンアクチベーター (tPA) を例にしてハイブリッド化 tPA を作製し、獲得される機能の評価法を実験的に検証した。

tPA の PEG 修飾 : tPA に 50 倍量 (重量比) の PEG を加え、pH8.5、0~4 $^{\circ}$ C で約 5 時間反応させ、未反応の PEG を除去した後、PEG 修飾 tPA を P-セルロースイオン交換クロマトグラフィーで精製した。

tPA 活性の測定法 : 合成ペプチド D-イソロイシル-プロリル-アルギニン-p-ニトロアニリドを基質にした pH8.4、37 $^{\circ}$ C での反応、または desA-フィブリノーゲン存在下プラスミノゲンに対する作用を、生成したプラスミンによる合成ペプチド基質 D-バリル-ロイシル-リジン-p-ニトロアニリドに対する反応で、410nm の吸光度の増加を経時的に測定した。

PEG で修飾した tPA の生物学的安定性の検討 : ラット血漿に添加して、経時的に酵素活性の変動を測定した。また、 125 I で標識した tPA および PEG 修飾 tPA のラット血中動態を比較検討した。

tPA 及び PEG 修飾 tPA の肝細胞への取り込み : 単離ラット肝実質細胞をウシ血清アルブミンおよびグルコースを含む

Krebs-Henseleit 緩衝液に懸濁し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間プレインキュベイトした後、 125 I で標識した tPA および PEG 修飾 tPA を加え、一定時間後の放射活性の細胞内への取り込み量を測定した。

C. 研究結果

1) 残留溶媒試験法の開発 :

試料及び標準品 (基準物質) 採取量、試料溶液及び標準溶液の調製方法、ガスクロマトグラフへの注入量、内標準溶液の調製方法、ヘッドスペース試料導入装置の操作条件、ガスクロマトグラフの操作条件 (検出器、カラム、カラム温度、注入口温度、検出器温度、キャリアーガス、キャリアーガス流量、スプリット比等) 及びシステム適合性 (システムの性能及びシステムの再現性) 等を検討し、「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は、中央薬事審議会薬局方部会理化学試験法委員会に提案し、審議の結果、薬局方案となり日本薬局フォーラムに掲載された。

2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討 :

大腸菌、サルモネラ、緑膿菌、コマモナス テストステロニ等の天然由来エンドトキシン、さらに化学合成の大腸菌型、サルモネラ型のリピド A は、リムルス活性、及びその他のいずれのエンドトキシン活性測定系においても非常に強力な活性を示し、従ってこれらのエンドトキシンの検出は発熱性試験、リムルステストいずれによっても管理できることがわかった。しかし化学合成リピド A 類縁体の中の前駆体構造のアセチル化体や部分サクシニル化体、さらにはモノサッカライドリピド A 類縁体が完全に無毒性でまったくエンドトキシン活性を示さないにも係わらず、大腸菌型のリピド

Aと同等、あるいはそれに近い強力なリムルス活性を示した。

サクシニル化リピドA前駆体、アルカリ処理による脱アシル化大腸菌リピドA、モノサッカライドリピドA類縁体をアンタゴニストとして用い、ヒト及びマウスのマクロファージ系細胞からの TNF- α 産生誘導活性、マウスのB細胞マイトジェン活性といった細胞系に対するエンドトキシン作用とリムルス活性に対する抑制作用を検討したところ、いずれのアンタゴニストもヒト、マウスに係わらず細胞系に対するエンドトキシンの作用を強く抑制した。一方、これらのアンタゴニストはいずれもリムルス活性に対しては抑制を示さず、アゴニストに対して千倍量のアンタゴニストを加えてもまったく抑制しないことがわかった。

ヒト細胞としてマクロファージ系の細胞に分化させた THP-1、及び U937 細胞を用い、エンドトキシン刺激による TNF- α 産生誘導活性、及び転写因子 NF- κ B 活性化を指標として、リムルス活性との比較を行ったところ、種々のエンドトキシンの中で多くのものは両方の活性によい相関が得られたが、前項で示した化合物以外にも、リピドA前駆体、及び天然のサルモネラ由来のリピドAが強力なリムルス活性を示すにも係わらず、ヒト細胞に対してはまったく作用を示さないことが明らかになった。また歯周病原菌である *P. gingivalis* 由来のエンドトキシンは、リムルス反応は通常のサルモネラ LPS に比較して約百分の一であるにもかかわらず、ヒト細胞の活性化 (TNF- α 産生能) はサルモネラ LPS よりもむしろ強い活性を示した。

3) バイオハイブリッド化技術で製されるタンパク性新医薬品の品質評価と評価技術の確立

ハイブリッド化によってタンパク質が獲得した性状や機能は

(ア) 物理的、化学的、生物学的因子に対する安定性の向上

(イ) 免疫原性、抗体反応性などの免疫学的性質の消失または低減 (大腸菌由来 L-アスパラギナーゼやウシ小腸由来アデノシンデアミナーゼなど)

(ウ) 血中半減期の延長

(エ) 生理活性の増強 (インスリンやサブスタンス P)

(オ) 標的指向性の向上

等があり、医薬品化に際してのタンパク質固有の多くの難点はハイブリッド化技術で克服されると考えられる。現在医薬品として承認されたハイブリッド化タンパク質には PEG でハイブリッド化したアデノシンデアミナーゼ、ヘモグロビンやスチレン-マレイン酸共重合体でハイブリッド化したネオカルチノスタチン (一般名: ジノスタチンステマラマー) などがある。

ジノスタチンステマラマー (ZSS) を例にして、その品質評価法を考察した。ZSS のハイブリッド化部位はジノスタチンの抗腫瘍活性に必須でない N 末端のアラニン残基と 20 番目のリジン残基のアミノ基であり、ハイブリッド化で獲得した ZSS の特性は抗腫瘍活性、腫瘍組織への集積性、生体内安定性の増強及び向上である。この品質評価は

① 分子量サイズの確認

② ハイブリッド化剤の導入比

③ ハイブリッド化部位の同定

④ タンパク質、クロモフォア、ハイブリッド化剤の構成比

⑤ 薬理活性の強度

⑥ 組織集積性

がある。上記①②③④は生化学的分析法で対応できる。また⑤⑥の薬効に関する機能的特性は構造上の特性に依存するものであることから、①～④の構造的特性が厳格に規定できれば⑤⑥のような機能的特性は担

保される。一般にハイブリッド化タンパク質は高分子物質であり、構造的特性の厳格な規格化や試験法の設定が困難な場合には生物学的方法（本剤の場合、担癌培養細胞に対する細胞増殖抑制作用や担癌モデル動物における腫瘍組織への薬剤移行率等）による機能的特性の試験がその品質評価に必要となってくる。

次に、6分子の PEG が導入された PEG 修飾 tPA の生物学的安定性を検討した結果、合成ペプチド基質に対して未修飾 tPA の約 70 % の活性を保持し、プラスミノゲンに対しては約 25 % の活性を保持していた。PEG 修飾 tPA はセリンプロテアーゼ阻害剤であるジソプロピルフルオロホスフェイトに対して抵抗性を示した。また、PEG 修飾 tPA は tPA に比べラット血漿中での活性の安定性においても、生体内での消長速度においても優れていた。PEG 修飾 tPA の単離ラット肝実質細胞への取り込みを検討した結果、PEG 修飾 tPA は未修飾 tPA に比べて肝実質細胞への取り込みが有意に低く、PEG 修飾はタンパク質の肝細胞への取り込みを抑制することが示唆された。tPA の分子量が 72,000 と大きく、更に 6 分子の PEG が導入されているため、ハイブリッド化部位の同定が容易でない。このような場合にはハイブリッド化で獲得される機能的特性を構造面から規定することは困難であり、生物学的方法での品質評価を試みる必要がある。本研究で実施した単離細胞を用いた機能的特性評価法はその一つの方法論になると考えられる。

D. 考察

USP 及び EP との整合を考慮してガスクロマトグラフ法による残留溶媒試験法を開発し、別紙 1 に示した。この提案法は、現在、日本薬局方フォーラムに掲載及び関係業界等に内示し、広く意見を求めている。

問題がなければ、日局十三第二追補に記載されて、医薬品中の残留溶媒に関する公式な試験法として用いられるものである。

エンドトキシンの管理において、現在最も優れた方法と考えられているリムルス法は確かに感度としては最もよいものの、エンドトキシンを毒性物質という本質的な活性面から捉えるときに、幾つかの矛盾点、問題点があることが明らかになってきた。現在のところ幸いなことに天然の LPS では大きな矛盾点は見られない。しかし試験を行ったエンドトキシンはわずかで、天然に存在する菌種の数を考えると、自然界にはこのようなリムルス活性のみでは検出・測定することが不可能なヒトに対する毒性エンドトキシンが存在する可能性があることを念頭におく必要があると思われる。

ハイブリッド化技術によるタンパク性医薬品の創製は、(ア)物理的、化学的、生物学的因子に対する安定性の向上、(イ)免疫原性、抗体反応性などの免疫学的性質の消失、(ウ)血中半減期の延長、(エ)生理活性の増強、(オ)標的指向性の向上など、タンパク質の性状や機能の改変、改善を目的としたものであることから、その品質評価には従来とは異なった新たな視点の導入が必要となる。ジノスタチンスチマラマー (ZSS) の様な比較的分子量 (約 15kD) の物質は、ハイブリッド化部位も明確に同定されていることから、ハイブリッド化で獲得した抗腫瘍活性の増強や腫瘍組織への集積性などの薬剤特性は (ア)分子量サイズの確認、(イ)ハイブリッド化剤の導入比、(ウ)ハイブリッド化部位の同定、(エ)タンパク質、クロモフォア、ハイブリッド化剤の構成比、などの構造的特性を厳格に規定し、試験ができれば担保できると考えられる。しかし、PEG-tPA のような高分子物質で、導入されたハイブリッド化剤の分子数が多い場合には構造的特性の厳格な規格化や試験法の設

定は困難であるため、生物学的方法による機能的特性の試験がその品質評価に必要となると考えられる。

E. 結論

「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は、中央薬事審議会薬局方部会理化学試験法委員会に提案し、審議の結果、薬局方案となり日本薬局方フォーラムに掲載及び関係業界に内示された。

エンドトキシン試験法の信頼性の確認に関する研究においては、リムルス試験がヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映しているかどうかの検証を行った。その結果、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子と、リムルス反応のエンドトキシン認識分子であるカプトガニの凝固因子のエンドトキシン認識構造・認識機構に大きな差があることを見出し、リムルス反応のみでエンドトキシンの管理を行うことの危険性を示唆した。

酵素やホルモンなどのタンパク質性医薬品の性状や機能を先端技術の応用で改変したハイブリッド化医薬品は、その改変目的に応じて新たに付与された性質あるいは機能を評価する必要がある、そのための必要評価項目並びにそれらに対する可能な評価技術について調査した。また、血中動態の改善を目的としたハイブリッド化医薬品の品質評価法としての単離肝細胞培養系による試験法の有用性を検証した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kato, H., T. Iida, Y. Haishima, A. Tanaka, & K. Tanamoto. Chemical structure of lipid A isolated from Flavobacterium

meningosepticum lipopolysaccharide. J. Bacteriol. 180, 3891-3899, 1998

Tanamoto, K. Production of nontoxic lipid A by chemical modification and its antagonistic effect on LPS action. Prog. Clin. Biol. Res. 397, 269-280, 1998.

安住聡子、棚元憲一 桂皮中に存在するエンドトキシン活性抑制物質の性状 「エンドトキシン研究 1 ; 基礎と臨床」(近藤元治等編)、pp143-148、菜根出版、1998

棚元憲一、エンドトキシンの除去と不活化 「日本薬局方に準拠した滅菌法及び微生物殺滅法」(三瀬勝利等編)、pp44-62、日本規格協会、1998

Tanamoto, K. Induction of Prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. in: Bacterial Pathogenesis. (Selected Methods in enzymology) pp457-466, 1998

Tanamoto K. Induction of lethal shock and tolerance by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide in D-galactosamine sensitized C3H/HeJ mice. Infect. Immun. in press.

石橋無味雄 残留溶媒試験法、日本薬局方フォーラム、8、4(1999)

石橋無味雄 医薬品の残留溶媒ガイドライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例、日本薬局方フォーラム、8、96-98(1999)

齋藤博幸、岩田美保、北島 文、谷本剛、岡田敏史、他 11 名 : 国立医薬品食品衛生研究所ペオニフロリン標準品の新規設定. 医薬品研究, 1998, 29, 725-729.

T. Tanimoto, K. Maekawa, S. Okada, C. Yabe-Nishimura: Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. Anal. Chim. Acta, 1998, 365, 285-292.

Y. Hamada, C. Nishimura, N. Koh, F.

Sakakibara, J. Nakamura, T. Tanimoto, N. Hotta: Influence of Interindividual Variability of Aldose Reductase Protein Content on Polyol-pathway Metabolites and Redox State in Erythrocytes in Diabetic Patients. *Diabetes Care*, 1998, 21 (6) 1014-1018.

谷本剛, 田頭洋子, 北島文, 岡田敏史, 他7名: 国立医薬品食品衛生研究所メシル酸ジヒドロエルゴトキシニン標準品の新規設定. *医薬品研究*, 1998, 29(4) 290-298.

谷本 剛, 前川京子, 岡田 敏史, 渡辺典子, 陣ヶ尾政一, 目黒幸子: 日本薬局方L-トレオニンの薄層クロマトグラフ法による純度試験. *医薬品研究*, 1998, 29(4) 284-289.

2. 学会発表

細渕和成、棚元憲一: ディスポーザブル医療用具の非発熱性の確保に関する研究—放射線や化学薬剤を用いてのエンドトキシンの不活化—

日本医科器械学会 (1998.6)

Tanamoto K. and Azumi S. Lipid A forms which mediate the activation of C3H/HeJ mice.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998. 9)

Azumi S. and Tanamoto K. Protection of animals from endotoxemia by an inhibitor derived from cinnamon bark.

The 5th International Conference of the Endotoxin Society (1998. 9)

室井正志、安住聡子、棚元憲一: マクロファージのエンドトキシン応答における血清の影響と種差

第72回日本細菌学会総会 (1999.3)

棚元憲一、安住聡子: サルモネラ型リポドAはヒトマクロファージを活性化しない

第72回日本細菌学会総会 (1999.3)

H. Saito, T. Tanimoto, S. Okada, T. Handa: Role of Surface Structure in Apolipoprotein A-1 Binding to Lipid Bilayers and Emulsions. 39th International Conference on the Biochemistry of Lipids, Sep. 1998 (Davos)

谷本 剛, 前川京子, 岡田敏史, 久保江理, 赤木好男: 糖尿病合併症発症と赤血球アルドース還元酵素レベルとの関連. 日本薬学会第118年会, 1998, 3.

辻谷昌訓, 平田雅彦, 大桃善朗, 田中千秋, 谷本剛: オキサゾール環を有する新規アルドース還元酵素阻害剤の合成とその阻害活性. 日本薬学会第118年会, 1998, 3.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

新医薬品に用いる品質評価技術を高度化するための調査及び研究（10140301）
不純物試験法の開発に関する研究

分担研究者 石橋 無味雄 国立医薬品食品衛生研究所薬品部第三室長

研究要旨 平成 10 年度については、医薬品中に存在する不純物のうち、残留溶媒に関する定性定量試験法を開発することとした。これは、日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議(ICH)における合意により平成 12 年 4 月 1 日以降に承認申請される新医薬品に「医薬品の残留溶媒ガイドライン」が適用され、その原薬及び製剤に残留している溶媒について、「薬局方に収載され国際的に調和されている残留溶媒測定法により試験を行うべき」と規定されているにも係わらず、日本薬局方（日局）には「残留溶媒試験法」がなく、早急に残留溶媒試験法を日局に収載する必要が生じたためである。

残留溶媒試験法の開発には、ガスクロマトグラフ法を用いることとし、試験の対象溶媒は、ICH において定められた「医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒」であるベンゼン等 5 種、「残留量を規制すべき溶媒」であるアセトニトリル等 26 種とした。また米国薬局方及びヨーロッパ薬局方との整合が可能な方法を開発することとした。

検討した結果、ガスクロマトグラフ法を用い、上記 31 溶媒の分離分析が可能な「残留溶媒試験法」を開発し、中央薬事審議会薬局方部会理化学試験法委員会に提案し、審議の結果、薬局方案（日本薬局方フォーラム Vol.8 No.1 1999）とすることとされた。

A. 研究目的

日・米・EU 三極医薬品承認審査ハーモナイゼーション国際会議(ICH)における合意により平成 12 年 4 月 1 日以降に承認申請される新医薬品に「医薬品の残留溶媒ガイドライン」が適用され、その原薬及び製剤に残留している溶媒について、「薬局方に収載され国際的に調和されている残留溶媒測定法により試験を行うべき」と規定されている。しかし、日本薬局方（日局）には「残留溶媒試験法」がなく、早急に残留溶媒試験法を開発し、日局に収載する必要

が生じた。このため日局一般試験法に収載する残留溶媒試験法の開発を目的として本研究を行った。

B: 研究方法

医薬品中に残留する溶媒に関する試験は、平成 12 年 4 月 1 日以降に承認申請される新医薬品に義務付けられる。また ICH での合意により医薬品の承認審査に際しては、米国及びヨーロッパ諸国で実施された残留溶媒に関する試験結果を受け入れる必要がある。また ICH の合意では、

薬局方に収載され、かつ国際的に調和された残留溶媒測定法により試験を行うべきとされている。これらのことから米国薬局方(USP)及びヨーロッパ薬局方(EP)と調和した試験法を開発することとし、検討を行った。しかしながら USP において残留溶媒試験法は、EP と調和した試験法であるとされているにも係わらず、USP 残留溶媒試験法の一部として EP の残留溶媒試験法であるガスクロマトグラフ法を用いたヘッドスペース法が規定されているのが現状であり、試験法として調和されているとは言い難い状態にある。しかし、調和した試験法を開発することが絶対条件であり、この作業を重視して研究を行うこととした。このため、ガスクロマトグラフ法を用いた試験法を開発することとした。

次に試験の対象溶媒を、ICH において定められた「医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒」であるベンゼン等5種、「残留量を規制すべき溶媒」であるアセトニトリル等26種とした。これらを表1に示す。

これらの一斉分析が、可能なガスクロマトグラフ用カラム数種を選定し、直接注入法及びヘッドスペース注入法を用いる分析方法を検討し、操作条件を決定した。

C：研究結果

試料及び標準品（基準物質）採取量、試料溶液及び標準溶液の調製方法、ガスクロマトグラフへの注入量、内標準溶液の調製方法、ヘッドスペース試料導入装置の操作条件、ガスクロマトグラフの操作条件（検出器、カラム、カラム温度、注入口温度、検出器温度、キャリアーガス、キャリアーガス流量、スプリット比等）及びシステム適合性（システムの性能及びシステムの再現性）等を検討し、別紙1に示す「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイド

ライン、残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は、中央薬事審議会薬局方部会理化学試験法委員会に提案し、審議の結果、薬局方方案となり日本薬局方フォーラムに掲載された。

なお、本試験法の開発研究は、平成9年度厚生科学研究費補助金（薬物療法等有用性向上推進研究事業）日本薬局方の規格・試験方法の改正と国際調和に関する研究から引き続き行ったものである。

D：考察

ガスクロマトグラフ法による残留溶媒試験法を C 項の研究結果に示す項目について検討を行った。この結果に基づき日局一般試験法の通常の方法のように「残留溶媒試験法」のなかに試料溶液や標準溶液の調製法、操作条件及びシステム適合性を記載した試験法をはじめは開発した。しかし試験法の USP 及び EP との整合を考慮すると、この試験法では、それらとの整合に無理があった。そこで別紙1に示すような記載形式に試験法を改めることにより USP 及び EP との整合を行うこととした。

また開発した試験法は31溶媒の一斉分析を目的として試験法であるが、新医薬品の承認申請に際して要求されるのは、その医薬品の製造工程に用いた溶媒に関する情報であり、一斉分析は必ずしも必要でない。

したがって、使用した溶媒によっては、規定の試験法のカラム温度を上昇させるなどして分析時間を短縮すること等も可能な試験法であることが望ましい。この面からも試験法の表記は別紙1に示すようなものが望ましい。この提案法は、現在、日本薬局方フォーラムに掲載及び関係業界等に内示し、広く意見を求めている。問題がなければ、日局十三第二追補に収載されて、医薬品中の残留溶媒に関する公式な試験法として用いられるものである。

E：結論

別紙1に示す「残留溶媒試験法」及び「医薬品の残留溶媒ガイドライン，残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例」を開発した。開発した試験法は、中央薬事審議会薬局方部会理化学試験法委員会に提案し、審議の結果、薬局方案となり日本薬局方フォーラムに掲載及び関係業界に内示された。

F：研究発表

残留溶媒試験法，日本薬局方フォーラム，8，4(1999)

医薬品の残留溶媒ガイドライン，残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例，日本薬局方フォーラム，8，96-98(1999)

G：知的所有権の取得状況

なし。

表1 クラスI溶媒及びクラスII溶媒

クラスIの溶媒	限度値 ppm
ベンゼン	2
四塩化炭素	4
1,2-ジクロロエタン	5
1,1-ジクロロエテン	8
1,1,1-トリクロロエタン	1500
クラスIIの溶媒	
アセトニトリル	410
クロロベンゼン	360
クロロホルム	60
シクロヘキサン	3880
1,2-ジクロロエテン	1870
ジクロロメタン	600
1,2-ジメトキシエタン	100
N,N-ジメチルアセトアミド	1090
N,N-ジメチルホルムアミド	880
1,4-ジオキサン	380
2-エトキシエタノール	160
エチレングリコール	620
ホルムアミド	220
ヘキサン	290
メタノール	3000
2-メトキシエタノール	50
メチルブチルケトン	50
メチルシクロヘキサン	1180
N-メチルピロリドン	4840
ニトロメタン	50
ピリジン	200
スルホラン	160
テトラリン	100
トルエン	890
1,1,2-トリクロロエタン	80
キシレン	2170

* 60% m-キシレン, 14% p-キシレン, 9% o-キシレン及び17% エチルベンゼンの混合物

クラスI溶媒 : 医薬品の製造において使用を避けるべき溶媒

クラスII溶媒 : 医薬品中の残留量を規制すべき溶媒

(一般試験法)

残留溶媒試験法

残留溶媒試験法は、患者の安全のために「医薬品の残留溶媒ガイドライン」により勧告された残留溶媒の許容量を遵守するため、ガスクロマトグラフ法により薬品中に残留する有機溶媒の量を測定する方法である。

医薬品各条には、別に規定するもののほか、薬品中に残留する有機溶媒の限度を ppm で示す。また規格値は、別に規定するもののほか「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に示された許容量を超えてはならない。

装置、操作方法及び試験方法

試料溶液及び標準溶液を調製し、ガスクロマトグラフ法により試験を行う。

ただし、医薬品各条に試料及び標準品（基準物質）の採取量、試料溶液及び標準溶液の調製方法及びガスクロマトグラフへの注入量、ヘッドスペース装置の操作条件、ガスクロマトグラフの試験条件及びシステム適合性並びに計算式など試験に必要な事項を規定する。

(参考情報)

医薬品の残留溶媒ガイドライン，残留溶媒試験法及び医薬品各条記載例

1. 医薬品の残留溶媒ガイドライン

医薬品の残留溶媒ガイドライン（平成 10 年 3 月 30 日 医薬審第 307 号）を参照する。

2. 残留溶媒試験法

試験法

一般試験法に規定する残留溶媒試験法を用いる。

国際調和

ヨーロッパ薬局方 (EP) 及び米国薬局方 (USP) に収載されている残留溶媒試験法 (EP:Residual solvents USP:Organic volatile impurities) を用いて試験を行うことができる。ただし、医薬品各条の記載形式は、日本薬局方の定めにより行う。

3. 医薬品各条の記載例

残留溶媒を試験するときの医薬品各条における記載形式の代表例を示す。ただし、ここに示す例は、あくまで記載の代表例であり、日本薬局方原案作成要領に従って医薬品各条（案）を作成することが肝要である。

1. 試験項目名，試料及び標準品（基準物質）採取量，試料溶液及び標準溶液の調製方法，ガスクロマトグラフへの注入量，計算式及び内標準溶液の調製方法の記載例

残留溶媒(又は残留溶媒名) 本品約 0.200 g を精密に量り，内標準溶液 5 mL を正確に加えて溶かし，更に水を加えて正確に 20 mL とし，試料溶液とする。必要ならば，ろ過，又は遠心分離する。別にあらかじめ水 50 mL を入れた容器に，○○○基準物質（残留溶媒名） 0.10 g を精密に量り込み，水を加えて正確に 100 mL とする。この液 5 mL を正確にとり，水を加えて正確に 100 mL とする。この液 2 mL を正確にとり，内標準溶液 5 mL を正確に加え，更に水を加えて 20 mL とし，標準溶液とする。試料溶液及び標準溶液 1 μ L につき，次の条件でガスクロマトグラフ法（のヘッドスペース法）により試験を行

い、内標準物質のピーク面積に対する〇〇〇（被検物質）のピーク面積の比 Q_t 及び Q_s を求める。〇〇〇の量は ◎◎◎ ppm 以下である。

$$\text{被検残留溶媒の量 } (\mu\text{g}) = \text{〇〇〇基準物質の量 } (\mu\text{g}) \times \frac{Q_t}{Q_s}$$

内標準溶液 △△△の▲▲▲溶液 (1 → 1000)

2. ヘッドスペース試料導入装置の操作条件

ヘッドスペース装置の操作条件 (1)

バイアル内平衡温度	80 °C 付近の一定温度
バイアル内平衡時間	60 分間
注入ライン温度	85 °C 付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30 秒間
試料注入量	1.0 mL

ヘッドスペース装置の操作条件 (2)

バイアル内平衡温度	105 °C 付近の一定温度
バイアル内平衡時間	45 分間
注入ライン温度	110 °C 付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30 秒間
試料注入量	1.0 mL

ヘッドスペース装置の操作条件 (3)

バイアル内平衡温度	80 °C 付近の一定温度
バイアル内平衡時間	45 分間
注入ライン温度	105 °C 付近の一定温度
キャリアーガス	窒素
加圧時間	30 秒間
試料注入量	1.0 mL

3. ガスクロマトグラフの試験条件及びシステム適合性の記載例

試験条件には、通例、検出器、カラム、カラム温度、キャリアーガス、流量及び面積測定範囲、システム適合性には、通例、検出の確認、システムの性能及びシステムの再現性など試験に必要な事項を規定する。試験条件及びシステム適合性は、必要に応じて次のように記載する。

表記の方法 試験条件及びシステム適合性の表記方法を次に示す。

試験条件

検出器：「水素炎イオン化検出器」のように規定する。

カラム：「内径 0.3 mm，長さ 30 m のフュズドシリカ管の内面にガスクロマトグラフ用ポリエチレングリコール 20M を厚さ 0.25 μ m で被覆する。」のように，カラム内径× mm 及び長さ× m，カラム材質，固定相液体の名称，固定相の厚さ（× μ m）などを規定する。ただし，カラムの内径及び長さ、並びに固定相の厚さ又は粒径は，試験法設定根拠となるデータを得たときの数値を記載する。

カラム温度：「×℃付近の一定温度」又は「40℃を20分間，その後，毎分10℃で240℃まで昇温し，240℃を20分間保持する。」のように規定する。

キャリアーガス：「ヘリウム」のように規定する。

流量：「□□□の保持時間が約○分になるように調整する。」又は，「35 cm/秒」のように規定する。なお，流量は，試験方法の設定根拠となるデータを得たときの設定流量を記載する。

面積測定範囲：「空気ピークの後から□□□の保持時間の約×倍の範囲。」のように規定する。

システム適合性

検出の確認：「標準溶液 × mL を正確に量り，□□□を加えて正確に×× mL とする。この液 × μ L から得た□□□のピーク面積が，標準溶液の□□□のピーク面積の×～×%になることを確認する。」のように規定する。検出の確認は，純度試験において規格値を試料溶液の特定ピークのピーク面積が標準溶液の○○のピーク面積の×/×以下（<1）で判定する場合など，「システムの再現性」のみでは，試験システムの適合性の確認が不十分な場合に規定する。

システムの性能：「□□□× g 及び△△△× g を○○○× mL に溶かす。この液× μ L につき，上記の条件で操作するとき，□□□，△△△の順に流出し，その分離係数は×以上であり，□□□のピークの理論段数及びシンメトリー係数は，それぞれ×段以上，×以下である。」のように規定する。システムの性能は，全ての試験方法に規定する。通例，溶出順及び分離度，更に必要な場合（ピークが非対称である等の場合）には，シンメトリー係数を規定する。なお，溶出順及び分離度に代えて分離係数及び理論段数を規定してもよい。また，適当な分離対象物質がない場合には，被験成分の理論段数及びシンメトリー係数等で規定しても差し支えない。

システムの再現性：「システム適合性試験用溶液× μ L につき，上記の条件で試験を×回繰り返すとき，□□□のピーク面積の相対標準偏差は×%以下である。」のように規定する。システムの再現性は，定性的な試験以外の全ての場合に規定する。

試験条件及びシステム適合性の記載具体例

操作条件（1）