

厚生科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

平成 1 1 年度研究報告書

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日・米・EU 三極合意による「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」中の残留有機不純物レベルに適合するように日局の規格値レベルを精度よく定量できる試験方法に改訂した。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、エンドトキシンの活性中心であるリピドA作用の生物種特異性について検討を行った。エンドトキシン作用の種特異性の問題は、エンドトキシン疾患の治療法の開発、活性の生体利用、汚染エンドトキシンによる医薬品等評価において非常に重要な問題である。本研究では代表的な細菌であるサルモネラ型のリピドAがマウスとヒト間に於いて種特異性を示すことを見いだした。本研究の結果は、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は言うに及ばず、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子においてもヒトのそれとは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示しており、動物実験やリムルス試験によるエンドトキシン活性の安直な理解に警鐘を与えるものである。生物検定法の理化学的又は生化学的方法への代替による医薬品品質評価技術の高度化に関する研究では、動物を使用する生物検定法に比較して、特異抗体を用いる酵素免疫測定法等の生化学的試験法は医薬品、特に生物製品の品質評価において精度、感度、定量的評価、動物愛護などの観点からより優れた評価技術であることを、カリジノゲナーゼを例として検討した結果、今後の医薬品品質評価において適用を考慮するのに十分意義があるという結論を得た。

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

認めら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

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

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11年度は1) 国際調和に基づく残留有機不純物レベルの日局への適用、2) エンドトキシン作用の種特異性の問題を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) カリジノゲナーゼを例として生物検定法の理化学的又は生化学的方法への代替法による医薬品品質評価技術の高度化を目的として以下の研究を行った。

B. 研究方法

1) 不純物試験法の開発に関する研究

日局に規定されている液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の操作条件を検討し、「0.1%」規格値レベルの分析が行える分析システムの規定方法等について検討を加え、次に規格値濃度のピークの検出を担保する方法を検討し、研究の結果より日局医薬品各条の表記を改めることとした。

2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討

リピドAの調製：LPSは *Salmonella abortus equi*、*S. minnesota*、*S. typhimurium* LT2、*Escherichia coli* 03K2a2b:H2 の各菌種からフェノール／水法により抽出、精製した。リピドAはLPSを1%酢酸100℃、90分的水解後、沈殿物として得た。分析の結果、すべてのサルモネラリピドAは7個の脂肪酸を持つジグルコサミン構造を主要な構造体として持ち、さらに部分的にはそれより1個の脂肪酸が欠如した大腸菌型のリピドA構造体を持つことがわかった。

化学合成リピドA

化学合成活性型のリピドAとして *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516) を用いた。大腸菌、サルモネラのリピドAの唯一の構造の違いは還元末端側のグルコサミンの2位の3-ヒドロキシミリスチン酸の水酸基にパルミチン酸が結合しているかないかの1点である。

エンドトキシン活性測定

(1) TNF- α 産生活性：マウス (BALB/C) 腹腔マクロファージ、マウス由来 J774-1、人由来 THP-1、及び U937 細胞をそれぞれ至適時間エンドトキシンで刺激後、培養上清に遊離される TNF- α を測定した。産生 TNF- α は L929 細胞に対する毒性によって定量した。

(2) NF- κ B の活性化： エンドトキシンに

よる NF- κ B の活性化は I κ B- α の分解を Western blotting 法で測定することにより行った。細胞を cycloheximide 20 μ g/ml で 30 分処置した後、各種エンドトキシンで、刺激し、その後、蛋白分解酵素阻害薬で処理して粗細胞質画分を得た。得られた粗細胞質画分 (50 μ g 蛋白) を PVDF メンブランに転写し、1 次抗体、2 次抗体で処理して、ECL-system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により検出を行った。

(3) リムルス活性：定量的なりムルス測定試薬 (Endospecy; 生化学工業) を用いて、試料と同量のリムルス試薬を 37 $^{\circ}$ 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。

(4) アンタゴニスト活性測定：天然サルモネラリピド A、及び化学合成サルモネラ型リピド A によるヒト由来 THP-1 細胞からのエンドトキシンによる TNF- α 産生誘導活性、及び NF- κ B の活性化に対するアンタゴニスト活性を調べた。抑制率はアゴニスト単独と比較して算出した。

3) 生物検定法の理化学的又は生化学的方法への代替による医薬品品質評価技術の高度化

キニンの酵素免疫測定法を利用したキナーゼ試験法及びキニン遊離能試験法を確立し、その有用性について検証する。

(1) 試薬・試液

- ・緩衝液 A：2mg/mL ゼラチンを含む 0.04 mol/L リン酸塩緩衝液，pH 7.0
- ・緩衝液 B：2mg/mL ゼラチンを含む 0.55 mol/L トリス緩衝液，pH 8.0
- ・緩衝液 C：緩衝液 B/水/除たん白剤混液 (6：5：1)
- ・除たん白剤：20 w/v% トリクロロ酢酸
- ・抗体-1 溶液：ウサギ由来抗ブラジキニン抗体溶液
- ・抗体-2 結合ウェル：ヤギ由来抗ウサギ IgG 抗体を結合させたポリスチレン製

96 ウェルマイクロプレート

- ・標識抗原溶液：西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼで標識したブラジキニンの溶液
- ・洗浄液：0.05 w/v% ポリソルベート 80，0.03 w/v% トリトン X-405，0.15 mol/L 塩化ナトリウムを含む 0.005 mol/L リン酸塩緩衝液，pH 7.5
- ・基質溶液：0.065 vol % 過酸化水素(30)，0.87 mg/mL o-フェニレンジアミンを含む 0.1 mol/L リン酸水素二ナトリウム・クエン酸塩緩衝液，pH 6.1
- ・反応停止液：4.6 vol% 硫酸

(2) ブラジキニン酵素免疫測定法

マイクロプレートの抗体-2 結合ウェルに抗体-1 溶液を 100 μ L ずつ分注、1 時間静置後、抗体-1 溶液を除き、3 回洗浄液する。試料溶液用のウェルに緩衝液 A 50mL と希釈した試料溶液及び対照液 100mL を加え、室温で 1 時間静置する。次に標準抗原溶液 50mL を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置する。4 回洗浄液後、ウェルに基質溶液 100mL を加え、室温で遮光して静置する。正確に 30 分間反応させた後、反応停止液 100mL を加え、マイクロプレートミキサーで振り混ぜた後、波長 490nm における吸光度を測定する。標準溶液を用いて作成した検量線からブラジキニン量を求める。

C. 研究結果

1) 不純物試験法の開発に関する研究：

日局に規定されている液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「操作条件」を「試験条件」及び「システム適合性」として整備し、選定すべき分析システムの性能について明示する表記を開発した。

「試験条件」には「検出器」、「カラム」、「カラム温度」、「移動相」及び「流量」等分析システムの操作要件を設定することとした。また、「システム適合性」には「システムの性能」、「システムの再現性」及

び「検出の確認」等試験に用いる分析システムの基本要件を設定することとした。

これにより液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を用いた試験方法により分析目的物質を、規格値レベルの濃度において精度よく定量できる方法に改めることができた。このように日局における要求レベルを改めることにより、承認申請に際して、日局を準用することにより自動的にICHのガイドラインを遵守した「規格及び試験方法」が設定されることになった。

2) エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の検討：

(1) マウスおよびヒト M Φ細胞における TNF-α 産生誘導活性：3 種のサルモネラ菌 *Salmonella minnesota* (S type), *S. typhimurium* LT2, *S. abortus equi* 由来の LPS、リピド A の TNF-α 産生誘導活性を Balb/c マウスの腹腔マクロファージ、マウス J774-1 細胞でみた。TNF-α 量は培養上清の L929 細胞に対する細胞毒性を指標に測定した。これらマウス細胞ではサルモネラのリピド A はいずれも LPS より 1/10 程度活性が落ちるが、非常に強い活性をもつことが分かった。

同様のエンドトキシンによる TNF-α 産生活性を M Φ様細胞に分化させたヒトの THP-1, U937 細胞を用いて調べた。サルモネラ LPS はマウス細胞と同様に 10 ng/ml ～ 10 mg/ml の範囲で強い活性を示したのに対し、リピド A は 10 mg/ml で初めてわずかな活性が見られ、ヒト細胞ではサルモネラリピド A は LPS の 1/1000 以下の非常に微弱な活性しかないことが分かった。

化学合成リピド A を用いて同様に実験を行ったところ、マウス細胞ではサルモネラ型 516 は大腸菌型 506 より活性は若干落ちるものの、強い活性を示した。一方ヒト細胞で、506 はマウス細胞と同様に強い活性を持ち、1 ng/ml で TNF-α 産生を誘導

したのに対して、516 は 10 mg/ml の濃度においても全く産生誘導しなかった。

(2) マウスおよびヒト M Φ細胞における NF-κB 活性化：エンドトキシンがメディエートするマウスおよびヒト M Φ細胞の NF-κB の活性化についてサルモネラの LPS とリピド A を用いて検討を行った。NF-κB の活性化はエンドトキシン刺激後の細胞の細胞質画分を抽出し、IκB-α の分解を指標としてウエスタンブロット法で測定した。マウス J774-1 細胞では、LPS、リピド A はそれぞれ 1 ng, 10 ng/ml から IκB-α の分解を誘導した。ヒト THP-1 細胞において、LPS ではマウス細胞と同様に 1 ng/ml の濃度から IκB-α の分解が見られたが、リピド A は 1 mg/ml ではじめて弱い分解がみられた。

次に化学合成リピド A を用いた同様の実験では、マウス J774-1 細胞において、506, 516 はそれぞれ 1, 10 ng/ml から IκB-α の分解を誘導したが、ヒト THP-1 細胞では、506 がマウス細胞と同じ濃度から分解を誘導したのに対して、516 では 1000 ng/ml でも分解はみられなかった。

(3) リムルス活性：以上示したようにサルモネラリピド A が種特異性を示すことから、エンドトキシンの代表的な活性であるリムルス活性を確認した。その結果、サルモネラのリピド A はいずれも大腸菌型のものと同様のリムルス活性を示した。

(4) アンタゴニスト活性：ヒト細胞に対して不応答性のサルモネラ型リピド A と 516 は、不活性体であることが分かったため、それらのアンタゴニスト作用について検討を行った。アゴニストとして *E. coli* LPS を 10, 100 ng/ml 加え、同時にアンタゴニストとしてサルモネラリピド A もしくは 516 を、それぞれ 1 ～ 10000 ng/ml 加えて TNF-α 産生抑制を調べた。いずれのアゴニスト濃度においても、サルモネラリピド

Aまたは 516 は濃度に依存して TNF- α 産生が抑制された。アンタゴニストの量がアゴニストの同量もしくは 10 倍 からアンタゴニスト作用が見られ、100 倍になると 80%から 100% の強い抑制を示した。

I κ B- α の分解においても、アゴニストとして用いた 1 ng/ml の 506 単独の活性を 516 が用量依存的に抑制し、516 をアゴニストの 100 倍量を加えた時、完全に NF- κ B の活性化を抑制した。

3) 生物検定法の理化学的又は生化学的方法への代替による医薬品品質評価技術の高度化

1. ブラジキニン酵素免疫測定法の特異性と検出感度

用いた抗ブラジキニン抗体はブラジキニン(BK)、Lys-BK、Met-Lys-BK、T-kinin、Tyr-BK などのキニン類とは 100 %の交差性を示したが、BK の代謝物やカリジノゲナーゼ、キニノーゲンなどにはほとんど交差しなかった。また、推定された定量限界は 7.2 pg/well であった。

2. ELISA法によるキニナーゼ試験

キニナーゼ試験のための反応条件（反応温度、カリジノゲナーゼ濃度、ブラジキニン濃度及び反応時間）の検討結果に基づいて、ELISA 法によるキニナーゼ試験法を下記のように設定した。

純度試験キニナーゼ試験法

(i) ブラジキニン溶液：ブラジキニン適量を取り、2mg/mL ゼラチンを含む pH7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液に溶かし、その 1 mL 中にブラジキニン 0.200 μ g を含む溶液を調製する。

(ii) カリジノゲナーゼ溶液：本品の適量を精密に量り、2mg/mL ゼラチンを含む pH7.4 の 0.05mol/L リン酸塩緩衝液に溶かし、1 mL 中にカリジノゲナーゼ 1 単位を含む液を調

製する。

(iii) 操作法：ブラジキニン溶液の 0.5 mL を 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ Cで 5 分間加温し、あらかじめ 30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ Cで 5 分間保ったカリジノゲナーゼ溶液 0.5mL を加え、30 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ Cで正確に 2.5 分間反応させた後、20 %トリクロロ酢酸 0.2mL を加えて混和する。この液を 3 分間煮沸し、直ちに氷冷した後、4 $^{\circ}$ Cで毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離する。室温で 15 分間放置した後、上澄液 0.5mL を緩衝液 B 0.5mL に加えて試料溶液とする。試料溶液 0.1mL を緩衝液 C 0.9mL に加えて混和し、この液 0.2mL を緩衝液 C 0.6mL に加えて混和する。希釈した試料溶液につき、キニン測定法により試験し、1 ウェル当たりのブラジキニン量 B_r (pg) を測定する。別に 2mg/mL ゼラチンを含む pH7.4 の 0.05mol/L リン酸塩緩衝液 0.5mL について同様に試験し、1 ウェル当たりのブラジキニン量 B_s (pg) を測定する。

(iv)キニン測定法：抗体-2 結合ウェルに抗体-1 溶液 0.1mL を分注し、振り混ぜた後、室温で 1 時間静置する。抗体-1 溶液を除き、洗浄液 0.3mL を加えて除く。この操作を 3 回繰り返す。試料溶液用のウェルに緩衝液 A 50 μ L と希釈した試料溶液及び対照溶液 100 μ L を加え、振り混ぜた後、室温で 1 時間静置する。標準抗原溶液 50 μ L を加え、振り混ぜた後、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置する。反応液を除き、洗浄液 0.3mL を加えて除く。この操作を 4 回繰り返す。基質溶液 100 μ L を加え、室温で遮光して静置する。正確に 30 分間反応させた後、反応停止液 100 μ L を加え、振り混ぜた後、波長 490nm における吸光度を測定する。標準溶液を用いて作成した検量線から、ブラジキニン量を求める。

(v)判定：次式により R の値を求める。

$$R = B_r / B_s$$

ELISA法によるキニナーゼ試験法のバリデーション

上記のキニナーゼ試験法の分析法バリデーションを行ったところ、(1)併行精度、(2)室内再現精度（測定日間）、(3)室内再現精度（測定者間）、(4)室間再現精度、(5)直線性、測定範囲及び定量限界、いずれにおいても良好な結果が得られた。

3. ELISA法によるキニン遊離能試験

キニン遊離能試験のための反応条件（カリジノゲナーゼ濃度、キニノーゲン濃度及び反応時間）の検討結果に基づいて、ELISA法によるキニン遊離能試験法を下記のように設定した。

キニン遊離能試験法

(i)カリジノゲナーゼ溶液：本品の適量を精密に量り、pH8.0 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液に溶かし、その1mL 中にカリジノゲナーゼ 0.1 単位を含む液を調製する。

(ii)操作法：キニノーゲン試液 0.5mL を 30℃で 5 分間加温し、あらかじめ 30℃で 5 分間保ったカリジノゲナーゼ溶液 0.5mL を加え、30℃で正確に 2 分間反応させた後、20%トリクロロ酢酸 0.2mL を加えて混和する。この液を 3 分間煮沸し、直ちに氷冷した後、4℃で毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離する。室温で 15 分間放置した後、上澄液 0.5mL を緩衝液 B 0.5mL に加えて試料溶液とする。試料溶液 0.1mL を緩衝液 C 1.9mL に加えて混和する。希釈した試料溶液につき、キニナーゼ試験法を準用して操作し、1 ウェル当たりのキニン量 B (pg) を測定する。次式によりカリジノゲナーゼ 1 単位当たりのキニン遊離能を求める。

$$\begin{aligned} & \text{キニン遊離能 (ng BK eq./分/単位)} \\ & = B \times 4.8 \text{ (pg)} \end{aligned}$$

ELISA法によるキニナーゼ試験法のバリデ

ーション

上記のキニン遊離能試験法の分析法バリデーションを行ったところ、(1)併行精度、(2)室内再現精度（測定日間）、(3)室内再現精度（測定者間）、(4)室間再現精度、(5)直線性、測定範囲及び定量限界、いずれにおいても良好な結果が得られた。

D. 考察

新医薬品の製造（輸入）承認申請に際して提示される「規格及び試験方法」は、その新医薬品が承認され流通する際に有効性及び安全性を担保するものである。したがって「規格及び試験方法」は、医薬品の製造会社のみでなく、第三者機関において試験を実施しても、誤りのない結果得られるように設定されていなければならない。有機不純物について、ICH の合意による有機不純物レベルの分析が可能である液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法による試験方法を整備し、これに伴い日局の整備を行った。エンドトキシン試験法の正しい評価と改良法の研究では、代表的な菌であるサルモネラのリピド A が種特異性を示し、ヒト細胞において不活性体であるという、エンドトキシン管理にとっては極めて重要な発見をした。同様の種特異性はリピド A 前駆体構造（リピド IVa）でも知られている。しかしこの 2 つには大きな意味の違いがあり、前駆体は生合成の途中の中間体であって、この構造自体天然には存在しないものである。一方、サルモネラリピド A は実際天然に存在する主要な構造体であることから、この現象の意味は大きい。一方、大腸菌型のリピド A はヒトにもマウスにも同様に強力な作用を示す。この 2 つのリピド A の構造はわずかに一本の脂肪酸のみである。この側鎖 1 本の違いが、ヒト細胞では *E. coli* リピド A はアゴニストとして働くが、サルモネラリピド A はアンタ

ゴニストとして作用するという逆転現象を引き起こしている。すなわちヒト細胞はこのわずかな構造を認識してその応答を決定していることになる。この結果はエンドトキシンの構造活性相関研究に大きな警鐘を与える。すなわち、安直な動物実験、あるいはリムルス試験でエンドトキシンの活性を評価することの危険性を示していると言えよう。エンドトキシンをヒトの疾患の原因物質として捉える時、例えばそれが動物に対して無毒性であっても、あくまでもヒトの系でのエンドトキシン作用を調べる事が不可欠であると思われる。

カリジノゲナーゼ製剤の純度試験の1項目であるキニナーゼの混在量や性能試験としてのキニン遊離能は現在シロネズミの子宮を用いた *in vitro* 生物検定法で評価されているが、これらの試験の直接の分析対照物質はブラジキニン等のキニンであり、キニンの分析は現在の技術水準からすれば動物を使用し、精度の低い生物検定法による必要性はない。バイオテクノロジーの進歩によって特異的なモノクローナル抗体も容易に入手が可能になってきた現在、本研究で示したように、酵素免疫測定法の適用によって、目的とする品質評価項目が定量的に評価することが可能になる。この意味においても、酵素免疫測定法のような生化学的方法は生物検定法よりも優れた品質評価法であると考えられる。

E. 結論

有機不純物の定量を液体クロマトグラフ法又はガスクロマトグラフ法を用いて行うとき、「システム適合性」を設定することとし、この項に選定すべき分析システムの質を示すため「システムの性能」及び「システムの再現性」を設定した。また、必要な場合に、規格値濃度のピークの検出を担保するため「検出の確認」を設定すること

とした。

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、代表的な細菌であるサルモネラ型のリピドAがヒトとマウス間に於いて種特異性を示すことを見いだした。医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンは、現在リムルステストのみによって管理されようとしているが、本研究の結果は、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はいうに及ばず、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子においてもヒトのそれとは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示しており、動物実験やリムルス試験によるエンドトキシン活性の安直な理解に警鐘を与えるものである。

生物検定法の理化学的又は生化学的方法への代替による医薬品品質評価技術の高度化動物を使用する生物検定法に比較して、特異抗体を用いる酵素免疫測定法等の生化学的試験法は医薬品、特に生物製品の品質評価において精度、感度、定量的評価、動物愛護などの観点からより優れた評価技術であり、今後の医薬品品質評価において適用を考慮するのに十分意義のあるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Azumi S., & K. Tanamoto. Anti-endotoxin properties of cinnamon bark-derived compound and its effect on the endotoxin shock model. *J. Endotoxin Res.* 5, 109-117, 1999

2. Tanamoto K. Induction of lethal shock and tolerance by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in D-galactosamine-sensitized C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* 67, 3399-3402, 1999

3. Tanamoto K & Azumi S. Salmonella-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of LPS action on human line cells. *J. Immunol.* 164, 3149-3156, 2000

4. 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の各条表記について, 日本薬局方フォーラム, 8, 110-111(1999)

5. 谷本 剛、齋藤博幸、前川京子、北島 文、岩田美保、他9名：国立医薬品食品衛生研究所組織培養ウロキナーゼ標準品新規設定のための品質評価。医薬品研究, 30, 289-294, 1999.

6. H. Saito, A. Kawagishi, M. Tanaka, T. Tanimoto, S. Okada, H. Komatsu, T. Handa: Coalescence of Lipid Emulsions in Floating and Freez-Thawing Processes: Examination of the Coalescence Transition State Theory. *J. Colloid Interface Sci.*, **365**, 285-292, 1998.

7. S. Yoshioka, Y. Aso, S. Kojima, T. Tanimoto: Effect of Polymer Excipients on the Enzyme Activity of Lyophilized Bilirubin Oxidase and β -Galactosidase Formulations. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**(2), 283-285, 2000

晶体の糖白内障発症における生化学的・形態学的変化。日本薬学会第119年会, 1999, 3.

4. K. Maekawa, T. Tanimoto, S. Okada, T. Suzuki, T. Suzuki, C. Yabe-Nishimura: Effect of Hyperglycemic and Hyperosmotic Conditions on Aldose Reductase mRNA Expression in Cultured Rat Schwann Cells. US-Japan Aldose Reductase Workshop, Jan. 2000 (Kona, Hawaii)

2. 学会発表

1. 細渕和成、棚元憲一：デイ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 (1999.6)

2. 安住聡子、室井正志、棚元憲一：ヒトマクロファージのサルモネラ型リピド A 不応答性

第5回日本エンドトキシン研究会 (1999.11)

3. 谷本 剛, 前川京子, 岡田 敏史, 久保江理, 赤木好男：OLETF ラット水

厚生科学研究補助金（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
—エンドトキシン試験法の信頼性の確認に関する研究—

分担研究者 棚元憲一 国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部長

研究要旨 医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンは現在リムルステストのみによって管理されようとしているが、そのためにはリムルス試験が、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ことが保証されなければならない。エンドトキシン作用の種特異性の問題は、汚染エンドトキシンによる医薬品等評価においてはもちろん、エンドトキシン疾患の治療法の開発、活性の生体利用にとっても非常に重要な問題である。本研究では代表的な細菌であるサルモネラ型のリピドAが種特異性を示すことを見いだした。すなわちサルモネラ由来リピドA及びサルモネラ型化学合成リピドA(516)は、*Escherichia coli* LPS 及び大腸菌型化学合成リピドA(506)と同様強いリムルス活性及びマウス腹腔マクロファージ、及び J774-1 細胞の活性化を誘導した。しかし *E. coli* LPS 及び 506 がヒト細胞（THP-1, U937）に対してもマウス細胞に対するのと同様に強い活性を示したのに対して、サルモネラ由来リピドAは極めて微弱な活性しか示さず、516 はまったく活性を示さなかった。さらにヒト細胞に対して不活性な 516 は、506 の作用にアンタゴニストとして作用した。以上の結果、ヒトとマウス及び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。

A. 研究目的

医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンの汚染は重大な問題である。微生物と人類との共存関係は永久のものであり、従って細菌毒素に対する対策は近年の O157 の例を引くまでもなく不可欠である。エンドトキシンは現在リムルステスト（部分的には発熱性物質試験）によって管理されているが、この方法はエンドトキシンの種類によっては毒性との間に相関性が得られないことや、エンドトキシン以外のリムルス反応陽性物質の存在が明らかになりつつあること

から、医薬品等の安全性が脅かされる危機に晒されている。さらに近年の申請者等の研究からエンドトキシンの種特異性が大きな問題となっており、エンドトキシン疾患の治療法の開発や、本質的なエンドトキシン作用の理解、信頼のある有効性・安全性の評価のためにはヒトに対する真の作用を解明することが必要となっている。本研究ではエンドトキシンの種特異性を系統的に明らかにすると共に、申請者が開発してきた種特異性を示す種々の構造体を利用して、異なる動物種のマクロファージ活性化機構の解明を行うことにより、種特異性を

支配している機構を分子レベルで解明し、医薬品の有効性、安全性の正当な評価法の確立のための基礎的研究を行い、国民の福祉に資するものである。

B. 研究方法

リピドAの調製：LPSは *Salmonella abortus equi*、*S. minnesota*、*S. typhimurium* LT2、*Escherichia coli* 03K2a2b:H2 の各菌種からフェノール／水法により抽出、精製した。リピドAはLPSを1%酢酸100℃、90分的水解後、沈殿物として得た。得られたそれぞれのリピドAをガスクロマトグラフィ、及びマスマスペクトロメトリーで分析したところ、脂肪酸はTable 1に示すような組成を持ち、すべてのサルモネラリピドAは7個の脂肪酸を持つジグルコサミン構造を主要な構造体として持ち、さらに部分的にはそれより1個の脂肪酸が欠如した大腸菌型のリピドA構造体を持つことがわかった。

Table 1. リピドAの脂肪酸組成

Lipid A From	Amount of Fatty Acid (mol/4 mol β -OH C14:0)			
	C12:0	C14:0	β -OH C14:0	C16:0
<i>S. minnesota</i>	1.32	1.13	4	0.68
<i>S. abortus equi</i>	1.18	0.97	4	0.90
<i>S. typhimurium</i> LT2	0.89	1.24	4	0.62
<i>E. coli</i>	0.86	1.18	4	0

^a Fatty acid composition was analyzed by gas-liquid chromatography. Molar ratios of the fatty acids are expressed by assuming the number of 3-hydroxytetradecanoic acid molecules in each LPS to be 4.

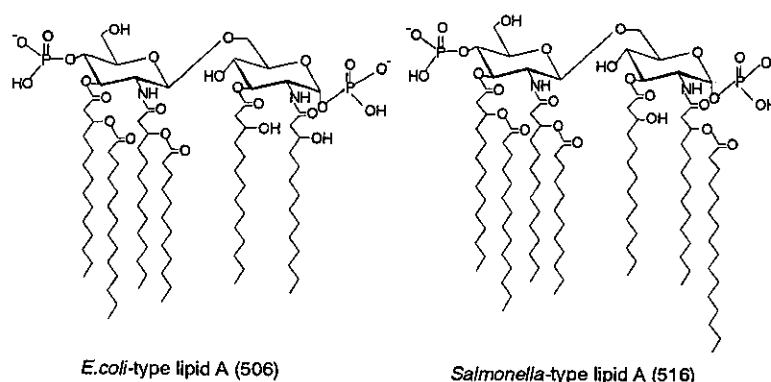


Fig. 1. 大腸菌、サルモネラ型リピドAの化学構造

化学合成リピドA

化学合成活性型のリピドAとして *E. coli* 型 (506)、*Salmonella* 型 (516) を用いた。化学構造は Fig. 1 に示した。大腸菌、サルモネラのリピドAはいずれもジグルコサミン構造と1、4'位にリン酸基を持つという基本骨格を持ち、それに脂肪酸がそれぞれ6個、7個結合した構造を持っている。すなわち唯一の構造の違いは還元末端側のグルコサミンの2位の3-ヒドロキシミリスチン酸の水酸基にパルミチン酸が結合しているかないかの1点である。上述のように本研究で以下に用いる天然のサルモネラリピドAは分析の結果、いずれも大部分が7個の脂肪酸を持つ構造体であることを確認している。

エンドトキシン活性測定

(1) TNF- α 産生活性：IMDM 培地中のマウス (BALB/C) 腹腔マクロファージ (2×10^6 cells/ml) に試料を加え、37℃、6時間

培養後上清中に遊離される TNF- α を測定した。マウス由来 J774-1 細胞 (1×10^5 cells/ml)、人由来 THP-1 (2×10^5 cells/ml)、及び U937 細胞 (1×10^5 cells/ml) は ウシ胎仔血清 (10%)、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 mg/ml) を添加した RPMI1640 培地で培養した。THP-1 細胞は 100 ng/ml の PMA と 0.1 mM 1,25-dihydroxy vitamin D₃ で、また、U937 細胞は 100 ng/ml の PMA で分化した細胞を実験に用いた。それぞれ 24 時間、及び 8 時間刺激後の培養上清に遊離される TNF- α を測定した。産生 TNF- α は L929 細胞に対する毒性によって定量した。

(2) NF- κ B の活性化：エンドトキシンによる NF- κ B の活性化は I κ B- α の分解を Western blotting 法で測定することにより行った。細胞 (J774-1: 2×10^6 /well、THP-1: 2×10^6 /well) を 6 穴プレートに播き、cycloheximide 20 μ g/ml で 30 分処置した後、各種エンドトキシンで、J774-1 細胞は 15 分、THP-1 細胞は 1 時間、刺激した。その後、蛋白分解酵素阻害薬 (0.1 μ g/ml、CompleteTM、EDTA-free、Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を加えた lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40、1 mM DTT) を細胞に加え、細胞をスクレイパーでかき取った後、氷上で 10 分間、時々攪拌しながらインキュベートし、遠心 (1000 g、5 分、4 $^{\circ}$ C) して上清を取り、これを粗細胞質画分とした。得られた粗細胞質画分 (50 μ g 蛋白) を SDS-PAGE に流し、セミドライ方式により PVDF メンブランに転写した。得られたメンブランを 5% non-fat milk を含む TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 30 分ブロッキング後、1 次抗体を加え 30 分インキュベートし、TBST で洗浄後、5% non-fat milk を含む TBST で希釈した 2 次

抗体溶液を加え、30 分インキュベートした。TBST で洗浄後、ECL-system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) により検出を行った。

(3) リムルス活性：定量的なリムルス測定試薬 (Endospecy; 生化学工業) を用いて、試料と同量のリムルス試薬を 37 $^{\circ}$ 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。

アンタゴニスト活性測定

天然サルモネラリピド A、及び化学合成サルモネラ型リピド A によるヒト由来 THP-1 細胞からのエンドトキシンによる TNF- α 産生誘導活性、及び NF- κ B の活性化に対するアンタゴニスト活性は、いずれもアゴニストをアッセイ系に加える直前にアンタゴニストを加えて抑制を調べた。抑制率はアゴニスト単独と比較して算出した。

C. 研究成結果

(1) マウスおよびヒト M Φ 細胞における TNF- α 産生誘導活性：3 種のサルモネラ菌 *Salmonella minnesota* (S type), *S. typhimurium* LT2, *S. abortus equi* 由来の LPS、リピド A の TNF- α 産生誘導活性を Balb/c マウスの腹腔マクロファージ、マウス J774-1 細胞でみた。TNF- α 量は培養上清の L929 細胞に対する細胞毒性を指標に測定した。これらマウス細胞ではサルモネラのリピド A はいずれも LPS より 1/10 程度活性が落ちるが、非常に強い活性をもつことが分かった (Fig. 2-A,B)。

同様のエンドトキシンによる TNF- α 産生活性を M Φ 様細胞に分化させたヒトの THP-1, U937 細胞を用いて調べた。サルモネラ LPS はマウス細胞と同様に 10 ng/ml $\sim$ 10 mg/ml の範囲で強い活性を示したのに対し、リピド A は 10 mg/ml で初めてわずかな活性が見られ、ヒト細胞ではサルモ

ネラリピドAはLPSの1/1000以下の非常に微弱な活性しかないことが分かった (Fig. 2-C,D)。

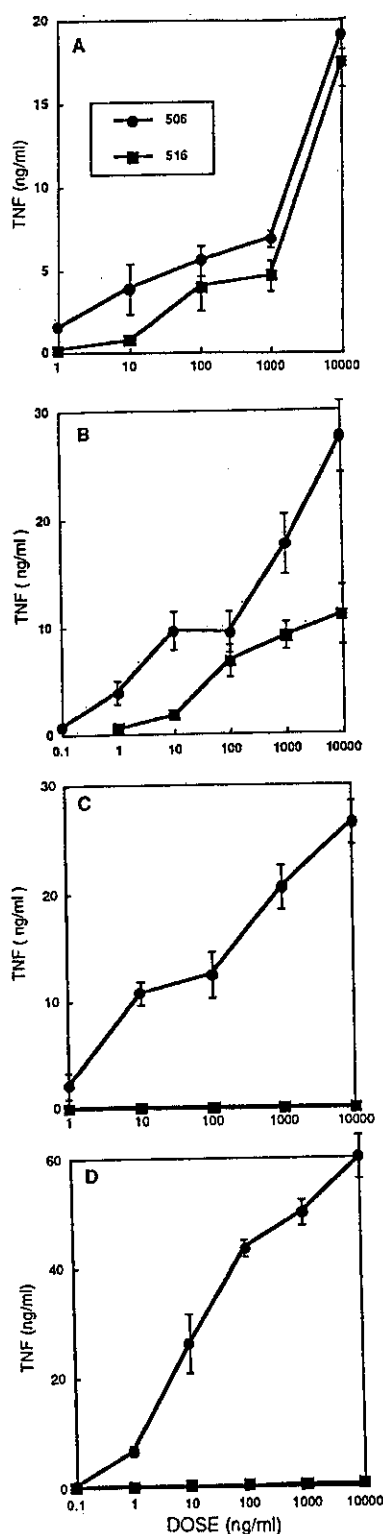


Fig. 2. サルモネラリピドAのTNF- α 産生活性
A,B; マウスJ774-1細胞、C,D; ヒトTHP-1細胞

化学合成リピドAを用いて同様に実験を行ったところ、マウス細胞ではサルモネラ型516は大腸菌型506より活性は若干落

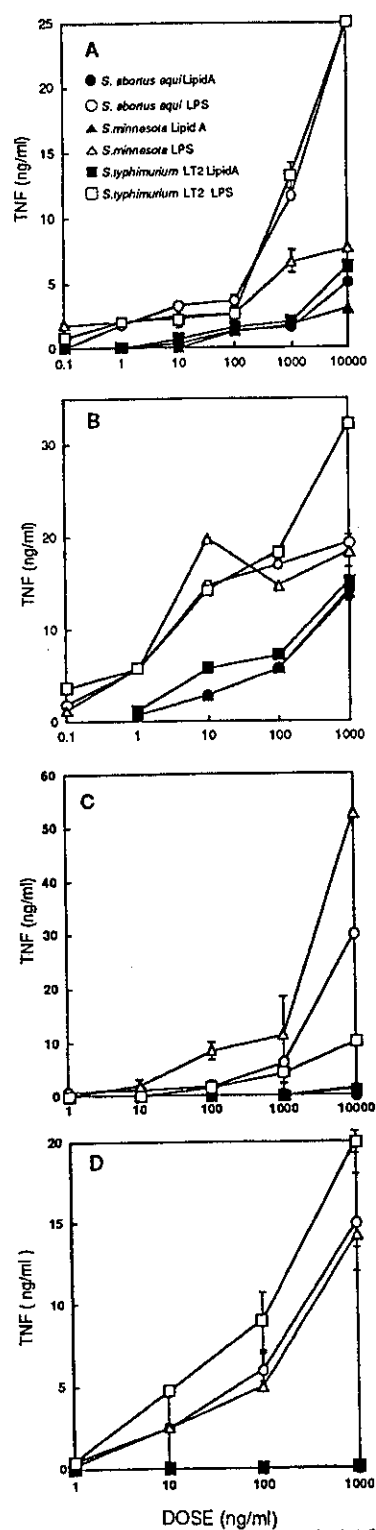


Fig. 3. 化学合成リピドAのTNF- α 産生活性
A; マウス腹腔、B; J774-、C; THP-1、D; ヒトU937細胞

ちるものの、強い活性を示した (Fig. 3-A,B)。一方ヒト細胞で、506 はマウス細胞と同様に強い活性を持ち、1 ng/ml で TNF- α 産生を誘導したのに対して、516 は 10 mg/ml の濃度においても全く産生誘導しなかった (Fig. 3-C,D)。

(2) マウスおよびヒト M Φ 細胞における NF- κ B 活性化：エンドトキシンがメディエートするマウスおよびヒト M Φ 細胞の NF- κ B の活性化についてサルモネラの LPS とリピド A を用いて検討を行った。NF- κ B の活性化はエンドトキシン刺激後の細胞の細胞質画分を抽出し、IkB- α の分解を指標としてウエスタンブロット法で測定した。マウス J774-1 細胞では、LPS、リピド A はそれぞれ 1 ng, 10 ng/ml から IkB- α の分解を誘導した (Fig. 4-A)。ヒト THP-1 細胞において、LPS ではマウス細胞と同様に 1 ng/ml の濃度から IkB- α の分解が見られたが、リピド A は 1 mg/ml ではじめて弱い分解がみられた (Fig. 4-C)。

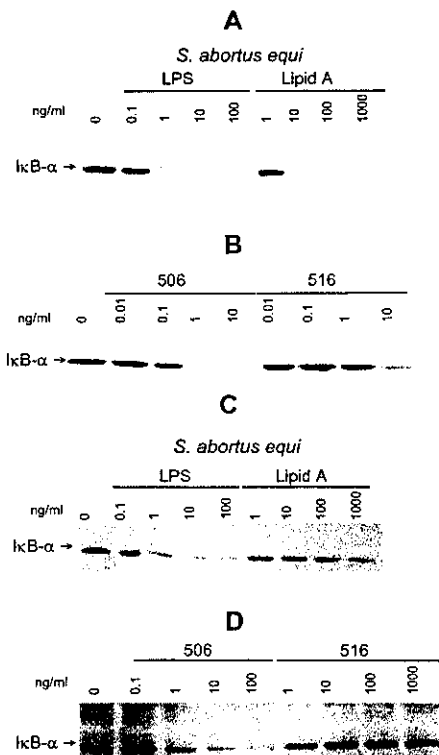


Fig. 4. サルモネラリピド A の NF- κ B の活性化 A,B; マウス J774-1 細胞、C,D; ヒト THP-1 細胞

次に化学合成リピド A を用いた同様の実験では、マウス J774-1 細胞において、506, 516 はそれぞれ 1, 10 ng/ml から IkB- α の分解を誘導したが (Fig. 4-B)、ヒト THP-1 細胞では、506 がマウス細胞と同じ濃度から分解を誘導したのに対して、516 では 1000 ng/ml でも分解はみられなかった (Fig. 4-D)。

(3) リムルス活性：以上示したようにサルモネラリピド A が種特異性を示すことから、エンドトキシンの代表的な活性であるリムルス活性を確認した。その結果、Fig. 5 に示すようにサルモネラのリピド A はいずれも大腸菌型のものと同等のリムルス活性を示した。

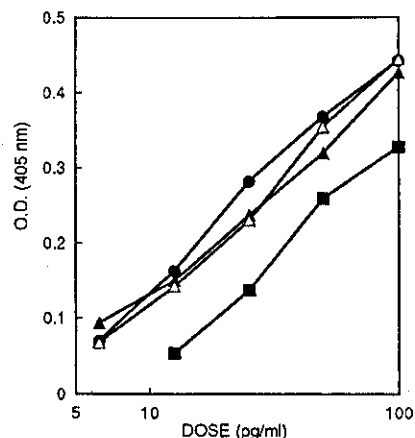


Fig. 5. サルモネラリピド A のリムルス活性

(4) アンタゴニスト活性：ヒト細胞に対して不応答性のサルモネラ型リピド A と 516 は、不活性体であることが分かったので、それらのアンタゴニスト作用について検討を行った。Fig. 6 は TNF- α 産生での結果を示す。アゴニストとして *E. coli* LPS を 10、100 ng/ml 加え、同時にアンタゴニストとしてサルモネラリピド A もしくは 516 を、それぞれ 1 ~ 10000 ng/ml 加えて TNF- α 産生抑制を調べた。いずれのアゴニスト濃度においても、サルモネラリピド A または 516 は濃度に依存して TNF- α 産生が抑制

された。アンタゴニストの量がアゴニストの同量もしくは10倍からアンタゴニスト作用が見られ、100倍になると80%から100%の強い抑制を示した。

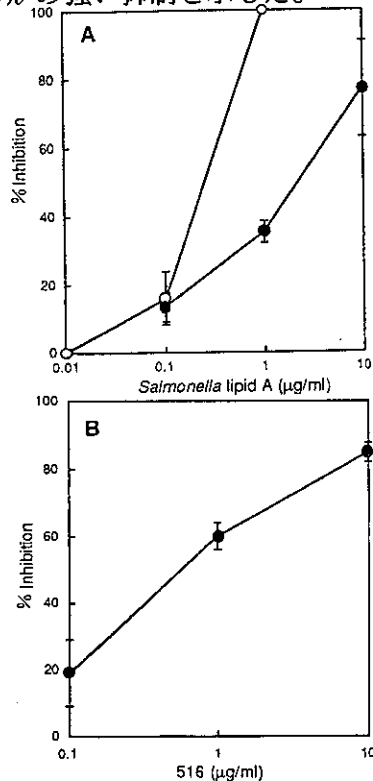


Fig. 6. サルモネラリピドAによる NF-κB の活性化抑制作用

IκB-α の分解においても、アゴニストとして用いた 1 ng/ml の 506 単独の活性を 516 が用量依存的に抑制し、516 をアゴニストの 100 倍量を加えた時、完全に NF-κB の活性化を抑制した (Fig. 7)。

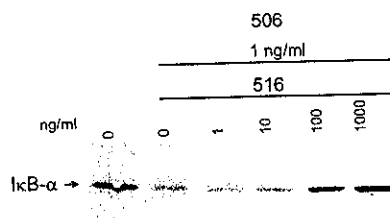


Fig. 7. サルモネラリピドAによる NF-κB の活性化抑制作用

D. 考察

本研究により、代表的な構造体であるサルモネラ型リピドAがヒト細胞において不活性体であることが明らかになった。一方、サルモネラ LPS はヒト細胞でも活性を有する。リムルス活性やマウス細胞においてはこの LPS とリピドAに活性差は認められない。このことは、ヒト細胞の活性化においてサルモネラの多糖部分が重要な役割を持っているということを示している。現在まで LPS の活性中心はリピドAだと考えられており、多糖部分がエンドトキシン活性を支配するという報告は今までなされていない。現段階では多糖部分の役割はまだ分からないが、本研究の結果は LPS の活性化機構がリピドAのみで語られてきた今までの認識とは違うことを示し、多糖部分が本質的な役割に加担するかもしれないとする本研究の知見は非常に興味深いものがある。

また本研究では、ヒトによるサルモネラリピドA構造の認識は、マウスやウサギと異なることが示された。同様の種特異性はリピドA前駆体構造 (リピド IVa) でも知られている。しかしこの2つには大きな意味の違いがあり、前駆体は生合成の途中の中間体であって、この構造自体天然には存在しないものである。一方、サルモネラリピドAは実際天然に存在する主要な構造体であることから、この現象の意味は大きい。

一方、大腸菌型のリピドAはヒトにもマウスにも同様に強力な作用を示す。この2つのリピドAの構造はわずかに一本の脂肪酸のみである。この側鎖1本の違いが、ヒト細胞では *E. coli* リピドAはアゴニストとして働くが、サルモネラリピドAはアンタゴニストとして作用するという逆転現象を引き起こしている。すなわちヒト細胞はこのわずかな構造を認識してその応答を決

定していることになる。最近、TLR2 や TLR4 が LPS の認識分子として働くとの報告があったことから、本報告には記載しなかったがこれらのリピド A の作用における TLR2 や TLR4 の関与を見たところ、TLR4/MD-2 複合体は *E. coli*、*Salmonella* のどちらのリピド A も認識するが、TLR2 は *E. coli* リピド A は認識するがサルモネラリピド A は認識しないことを発見した。このことは、リピド A の構造の違いにより、異なる受容体を利用する可能性を示唆している。TLR2 は、エンドトキシンに加え、ペプチドグリカンやリポテイコ酸といったグラム陽性菌の菌体成分をも認識することが知られ、さまざまな化合物をパターンとして認識するパターン認識受容体であると言われている。しかし本研究での結果は、TLR2 が脂肪酸 1 本の違いを厳密に区別する能力があることを示している。

本研究の結果はエンドトキシンの構造活性相関研究に大きな警鐘を与える。すなわち、安直な動物実験、あるいはリムルス試験でエンドトキシンの活性を評価することの危険性を示していると言えよう。エンドトキシンをヒトの疾患の原因物質として捉える時、例えばそれが動物に対して無毒性であっても、あくまでもヒトの系でのエンドトキシン作用を調べることが不可欠であると思われる。

最後に、サルモネラリピド A の様な種特異性を有する物質はエンドトキシンの作用機作の解明のため、さらには医薬品への道を切り開くための有力な手段となり得ると思われる。

E. 結論

エンドトキシン作用の種特異性の問題は、エンドトキシン疾患の治療法の開発、活性の生体利用、汚染エンドトキシンによる医薬品等評価において非常に重要な問題

である。本研究では代表的な細菌であるサルモネラ型のリピド A がマウスとヒト間に於いて種特異性を示すことを見いだした。医薬品・医療用具等において微量で強力な毒性を有する細菌毒素エンドトキシンは、現在リムルステストのみによって管理されようとしている。従ってこの原始生物の反応を利用したリムルス試験が本当にヒトに対するエンドトキシンの作用を的確に反映できるかどうかを明らかにする必要がある。本研究の結果は、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はいうに及ばず、高等動物の生体細胞上のエンドトキシンの認識分子においてもヒトのそれとは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示しており、動物実験やリムルス試験によるエンドトキシン活性の安直な理解に警鐘を与えるものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Azumi S., & K. Tanamoto. Anti-endotoxin properties of cinnamon bark-derived compound and its effect on the endotoxin shock model. J. Endotoxin Res. 5, 109-117, 1999

2. Tanamoto K. Induction of lethal shock and tolerance by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in D-galactosamine-sensitized C3H/HeJ mice. Infect. Immun. 67, 3399-3402, 1999

3. Tanamoto K & Azumi S. *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of LPS action on human line cells. J. Immunol. 164, 3149-3156, 2000

2. 学会発表

1. 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（1999.6）

2．安住聡子、室井正志、棚元憲一：ヒト
マクロファージのサルモネラ型リピド A
不応答性

第 5 回日本エンドトキシン研究会
（1999.11）

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（H10-医薬-040）
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 11 年度については、医薬品中に存在する不純物のうち、有機不純物の試験方法に関する研究を行うこととした。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、新たに承認申請される新医薬品に「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」が適用され、その原薬に残留している有機不純物について、「0.1%」レベルの定量試験が必要となったためである。承認申請において、これに対応するためには、日本薬局方(日局)における有機不純物に対する要求レベルを「0.1%」レベルに高めることが最も適切な方法と考えられるので、日局において「液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の各条表記」を新たに定めることにより、「0.1%」の規格値レベルの有機不純物を精度よく定量できる方法に試験方法を改めること、研究を行い、目的を達成することができた。

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新たに承認申請される新医薬品に「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」が適用され、その原薬に残留する有機不純物について、原薬換算で「0.1%」レベルの定量試験が必要となった。しかし、日本薬局方(日局)においては、通例、「1%」レベルの検出を行う薄層クロマトグラフ法又は液体クロマトグラフ法を用いた試験が設定されていて、新医薬品の承認申請に際しても日局に準じた方法が規定されている。そこで「0.1%」レベルの有機不純物を精度よく定量できる方法に日局の液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を整備し、新医薬品の申請に際し、これに準じた方法が

用いられるように改めることとした。すなわち、日局の医薬品各条において液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を用いる際に現在規定されている「操作条件」について検討を行い、これを「試験条件」と「システム適合性」に改め、分析システムに対する要求事項を「0.1%」レベルの有機不純物が精度よく定量できるように改善することを目的とした。また現規定の「検出感度」を「検出の確認」に改め、分析目的物質の規格値レベルの濃度のピークが確実に検出されていることを適切な方法で確認するように改めることを目的とした。

B: 研究方法

日局に規定されている液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の操作条件

を検討し、「0.1%」レベルの有機不純物が精度よく定量でき、かつ有機不純物の検出に信頼がもてる方法の日局医薬品各条の表記を開発することとした。

はじめに、規格値レベルの分析が行える分析システムの規定方法等について検討を加え、次に規格値濃度のピークの検出を担保する方法を検討し、研究の結果より日局医薬品各条の表記を改めることとした。

C：研究結果

日局に規定されている液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「操作条件」を「試験条件」及び「システム適合性」として整備し、選定すべき分析システムの性能について明示する表記を開発した。

「試験条件」には「検出器」、「カラム」、「カラム温度」、「移動相」及び「流量」等分析システムの操作要件を設定することとした。また、「システム適合性」には「システムの性能」、「システムの再現性」及び「検出の確認」等試験に用いる分析システムの基本要件を設定することとした。

これにより液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法を用いた試験方法により分析目的物質を、規格値レベルの濃度において精度よく定量できる方法に改めることができた。このように日局における要求レベルを改めることにより、承認申請に際して、日局を準用することにより自動的に ICH のガイドラインを遵守した「規格及び試験方法」が設定されることになった。

D：考察

新医薬品の製造（輸入）承認申請に際して提示される「規格及び試験方法」は、その新医薬品が承認され流通する際に有効性及び安全性を担保するものである。したがって「規格及び試験方法」は、医薬品の製造会社のみでなく、第三者機関において

試験を実施しても、誤りのない結果得られるように設定されていなければならない。

「規格及び試験方法」の一項目である有機不純物についての試験も同様である。

ICH の合意により「1%」レベルであった有機不純物に対する規制値が「0.1%」レベルで規制することに改められた。そこで「0.1%」レベルの分析が可能である液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法による試験方法を整備し、これに対応できる表記に改めた。表記方法は別紙に示す。

なお、新医薬品の製造（輸入）承認申請に際して日局の試験方法を準用することから日局の方法を改めることを第一目的に研究を行った。その結果、研究結果に示すような方法で目的を達成されることが明らかになった。

E：結論

有機不純物の定量を液体クロマトグラフ法又はガスクロマトグラフ法を用いて行うとき、「システム適合性」を設定することとし、この項に選定すべき分析システムの質を示すため「システムの性能」及び「システムの再現性」を設定した。また、必要な場合に、規格値濃度のピークの検出を担保するため「検出の確認」を設定することとした。

これらの項目の要求を満たす分析システムを「試験条件」の項に規定する条件により操作すれば、どこの実験室において試験を実施しても、精度よく試験を行える方法とすることができた。これにより医薬品の品質を確保するために適正かつ必要なレベルで有機不純物の試験が行えるようになった。

また「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」のうち、有機不純物（本年度研究）及び残留溶媒（昨

年度研究) について分析方法からの対応が可能となった。 残りは無機不純物に対する対応が残っており来年度研究においてこの問題についても解決を図りたい。

F：研究発表

液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の各条表記について，日本薬局方フォーラム，8，110-111(1999)

G：知的所有権の取得状況
なし。