

(別紙 1)

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・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9年4月1日以降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。しかし、新医薬品の製造承認申請に際して準用すべきとされている日本薬局方(日局)においては、通例、「1%」レベルの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るのみである。

そこで新薬の承認申請に対応すること、また、将来的に日局医薬品各条を ICH における有機不純物に関する合意水準に整備することを目的に本研究を行い、液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の表記を改めることとした。

研究は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」等に改め、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な方法に改める方向で行った。

この結果、承認申請される新医薬品の「規格及び試験方法」、また日局医薬品各条に対し、「液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の表記」を定めることにより、分析目的物質(有機不純物)を規格値レベルの濃度で精度よく定量できる方法に試験方法を改めることができた。

液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の表記

1. 表記法

1) 表記の変更箇所

従来の「操作条件」の記載事項を整理し、「試験条件」及び「システム適合性」の2項に分割して記載する。

「試験条件」の項には、液体クロマトグラフ及びガスクロマトグラフシステムの設定条件等を記載する。

「システム適合性」の項には、試験に用いるシステムが満たすべき要件とその判定基準を記載する。

2) 「試験条件」の項に記載する事項並びに記載内容及び表記法

「試験条件」の項には、下記の項目を記載する。

なお、「試験条件」の項に規定される項目のうち、一般試験法 液体クロマトグラフ法及びガスクロマトグラフ法の「注意」において、カラムの内径及び長さなど操作条件（試験条件）に規定する内容を変更して試験を行うことができると規定されている項についての数値は、試験実施時における参考としての数値を記載するものとし、通例、試験方法の設定根拠の作成に用いたシステムから得た数値を記載する。

- ①検出器：従前に同じ。（紫外吸光光度計（測定波長：296 nm））
- ②カラム：記載内容は従前に同じ。ただし、カラムの内径及び長さ、並びに充てん剤の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。（内径× mm，長さ× cm のステンレス管に× μ mの□□□を充てんする。）
- ③カラム温度：従前に同じ。（×℃付近の一定温度）
- ④移動相：従前に同じ。（△△／▲▲混液（×：×））
- ⑤流量：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「□□□の保持時間が約○分になるように調整する。」で記載する。ただし、グラジエント法等を用いるときは、データを得たときの設定流量をmL/minで記載する。
- ⑥検出確認：本項は、項目名を「検出感度」から「検出の確認」に改め、システム適合性欄に記載する。（試験条件から削除）
- ⑦面積測定範囲：従前に同じ。（溶媒ピークの後から□□□の保持時間の約×倍の範囲）

3) 「システム適合性」の項に記載する事項並びに記載内容及び表記法

- ①「検出の確認」、「システムの性能」及び「システムの再現性」について記載する。
- ②「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設定する。――案2
- ③「システムの性能」は、全ての場合に規定する。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。
- ④「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。記載法は従前に同じ。

2. 試験条件及びシステム適合性の記載例

1) 内標準法による純度試験（限度及び定量試験）及び定量法

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：× nm）

カラム：内径× mm，長さ× cm のステンレス管に× μ mの□□□を充てんする。

カラム温度：×℃付近の一定温度

移動相：△△／▲▲混液（×：×）

流量：□□□の保持時間が約○分になるように調整する。

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 × μL 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。

システムの性能：標準溶液×μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□、内標準物質の順に溶出し、その分離度は×以上である。（注）

システムの再現性：標準溶液×μLにつき、上記の条件で試験を×回繰り返すとき、内標準物質のピーク面積に対する□□□のピーク面積の比の相対標準偏差は×%以下である。

注：「システムの性能」に関する他の記載例

1) 溶出順、分離度及びシンメトリー係数を規定する場合

□□□×g及び△△△×gを○○○×mLに溶かす。この液×μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□、△△△の順に溶出し、その分離度は×以上であり、□□□のピークのシンメトリー係数は×以下である。

2) 溶出順、分離係数、理論段数及びシンメトリー係数を規定する場合

□□□×g及び△△△×gを○○○×mLに溶かす。この液×μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□、△△△の順に溶出し、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。

3) 適当な分離対象物質がないため理論段数及びシンメトリー係数を規定する場合

□□□×gを○○○×mLに溶かす。この液×μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□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。

2) 絶対検量線法による定量法

試験条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：× nm）

カラム：内径× mm、長さ× cm のステンレス管に×μmの□□□を充てんする。

カラム温度：×℃付近の一定温度

移動相：△△／▲▲混液（×：×）

流量：×mL/min □□□の保持時間が約○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：□□□×g及び△△△×gを○○○×mLに溶かす。この液 × μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□、△△△の順に溶出し、その分離度は×以上である。

システムの再現性：標準溶液×μL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。

3) 純度試験(絶対検量線法、試料溶液の希釈液を標準溶液として用いる純度試験を含む。限度及び定量試験を含む)

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：× nm)

カラム：内径× mm，長さ× cm のステンレス管に× μmの□□□を充てんする。

カラム温度：×℃付近の一定温度

移動相：△△／▲▲混液(×：×)

流量：□□□の保持時間が約○分になるように調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後から□□□の保持時間の約×倍の範囲

システム適合性

「検出の確認」を規定する必要がある場合に、自動積分法では、

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 × μL 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。

記録計を用いる方法では、

検出の確認：標準溶液× μL から得た□□□のピーク高さが記録計フルスケールの×～×%になることを確認する。

のように記載する。

システムの性能：□□□× g 及び△△△× g を○○○× mL に溶かす。この液× μLにつき，上記の条件で操作するとき，□□□，△△△の順に溶出し，その分離度は×以上である。

システムの再現性：標準溶液× μL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。

4) 面積百分率法による純度試験

試験条件

検出器：紫外吸光光度計(測定波長：× nm)

カラム：内径× mm，長さ× cm のステンレス管に× μmの□□□を充てんする。

カラム温度：×℃付近の一定温度

移動相：△△／▲▲混液(×：×)

流量：□□□の保持時間が約○分になるように調整する。

面積測定範囲：溶媒ピークの後から□□□の保持時間の約×倍の範囲

システム適合性

検出の確認：試料溶液× mL を正確に量り，○○○を加えて正確に× mL とし，システム適合性試験用溶液とする。システム適合性試験用溶液 × mL を正確に量り，□□□を加えて正確に×× mL とする。この液 × μL から得た□□□のピーク面積が，システム適合性試験用溶液の□□□のピーク面積の×～×%になることを確認する。

システムの性能：□□□×g 及び△△△×g を○○○×mL に溶かす。この液×μLにつき、上記の条件で操作するとき、□□□、△△△の順に溶出し、その分離度は×以上である。

システムの再現性：システム適合性試験用溶液×μL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。

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研究
－ 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 －

分担研究者 谷本 剛 国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所薬品試験部第二室長

研究要旨 ホルモン、酵素、サイトカインなどの生物薬品の機能特性や定量などの品質評価の有力な一つの指標として生物活性がある。この生物活性の評価には動物を使用した *in vivo* 及び *in vitro* 生物検定法を利用することが少なくない。しかし生物検定法にはその測定精度や操作性、更には動物愛護の観点から多くの難点が指摘されている。生物検定法で品質評価されている医薬品の中には、現在の分析技術水準からみて理化学的又は生化学的試験法で本来の目的が達せられると思われるものも多く、理化学的又は生化学的試験法等の実施が可能になれば生物検定法で指摘されているような難点・短所の一部は克服され、品質評価技術の向上に大きく資するものと期待される。本研究では、カリジノゲナーゼを例として、純度試験としてのキニナーゼ試験及び性能試験としてのキニン遊離能試験に適用されている生物検定法の代替法としての生化学的試験法、すなわち酵素免疫測定法 (ELISA) を利用した試験法について検討し、その有用性について考察した。

分担研究者 谷本 剛
国立医薬品食品衛生
研究所 大阪支所
薬品試験部第二室長

A. 研究目的

ホルモン、酵素、サイトカインなどの生物薬品においてはその品質試験に動物を使用した *in vivo* 及び *in vitro* バイオアッセイを利用することが少なくない。

生物薬品の多くはタンパク質を化学的本質とするものであり、それが持つ生物活性に薬効を期待するものである。しかし、生物薬品を *mass* としてみた場合、その一次的化学構造と生物作用との間に必ずしも相関があるわけではない。そのため、質量で生物薬品の量的評価を行うことは本来極めて困難なことであり、従来から、その量は質量ではなく、生物体に及ぼす作用力としての力価 (*potency*)

で表されてきた。また、生物薬品ではその機能特性を品質評価の有力な一つの指標にすることが多いが、この場合にも生物に対する反応性を試験する方法が多用される。したがって、タンパク性物質等の医薬品としての開発、更にはその後の品質評価においてはもっぱら生物への感受性を利用した生物検定法 (*Bioassay*) が用いられている。

このような生物検定法はその測定精度や操作性、更には動物愛護の観点から多くの難点が指摘されている。生物検定法で品質評価されている医薬品の中には、現在の分析技術水準からみて理化学的又は生化学的試験法で本来の目的が達せられると思われるものも多く、もし理化学的又は生化学的試験法等の実施が可能になれば生物検定法で指摘されているような難点・短所の一部は克服され、品質評価技術の向上に大きく資するものと期待される。

本研究では、一例としてカリジノゲナーゼの純度試験としてのキニナーゼ試験

及び性能試験としてのキニン遊離能試験の生物検定法から生化学的試験法、すなわち酵素免疫測定法 (ELISA) を利用した試験法について検討することとした。

キニナーゼ試験はカリジノゲナーゼに含まれるキニン分解酵素の混在量を基質ブラジキニン (BK) に対する分解能で評価する規格試験である。また、カリジノゲナーゼは生理的基質であるキニノーゲンに作用してキニンを遊離させる酵素であるので、カリジノゲナーゼの性能試験としてキニノーゲンからのキニン遊離能を評価するキニン遊離能試験が重要な規格項目として設定されている。両試験とも直接の測定対象は BK であり、カリジノゲナーゼを作用させた後の BK 量の変化あるいはキニノーゲンから遊離したキニン量は従来からシロネズミの摘出子宮筋の収縮による *in vitro* 生物検定法によって測定されている。一方、著者らはすでにキニンの一種である BK の競合的酵素免疫測定法を確立している。そこで、カリジノゲナーゼのこれらの品質試験に BK 酵素免疫測定法 (ELISA) を応用し、その試験法の確立と有用性について検討した。

B. 研究方法

キニンの酵素免疫測定法を利用したキニ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

- ・カリジノゲナーゼ (三和化学研究所製)
- ・ウシ血漿由来低分子キニノーゲン (生化学工業製)
- ・ブラジキニン (ペプチド研究所製)
- ・ゼラチン (BIORAD 製)
- ・ブラジキニン標準溶液: 100 ng/mL のブラジキニン溶液
- ・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 mL ずつ分注し、マイクロプレートミキサーで振り混ぜた後、室温で 1 時間静置する。抗体-1 溶液を除き、洗浄液をウェルに 300 mL ずつ加えて除く。この操作を 3 回繰り返す。洗浄液をよく除いた後、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、マイクロプレートミキサーで振り混ぜた後、室温で 1 時間静置する。次に標準抗原溶液 50mL を加え、マイクロプレートミキサーで振り混ぜた後、4 °C で一晩静置する。反応液を除き、洗浄液をウェルに 300mL ずつ加えて除く。この操作を 4 回繰り返す。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. ブラジキニン酵素免疫測定法の特異性と検出感度

本研究で用いた抗ブラジキニン抗体の各種キニン類及びキニン関連物質に対する交差反応性を調べた (Table 1)。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。この結果より、本研究で用いる ELISA 法はキニンに極めて特異性の高い方法であるといえる。また、この ELISA 法の検量線を Fig. 1 に示すが、これから推定された定量限界は 7.2 pg/well であった。

Table 1. 抗ブラジキニン抗体の交差性

化合物	交差性 (%)
Bradykinin (BK)	100
Lys-BK	100
Met-Lys-BK	100
T-Kinin	100
Tyr-BK	100
[Hyp ³]-BK	79
Des-Arg ¹ -BK	45
(1-8)-BK	0.2
(1-7)-BK	<0.1
Des-Arg ⁹ -[Leu ⁸]-BK	<0.1
(1-6)-BK	<0.1
(1-5)-BK	<0.1
BK-Potentiator B	<0.1
BK-Potentiator C	<0.1
LMW-Kininogen	<0.1
Kallidinogenase	<0.1

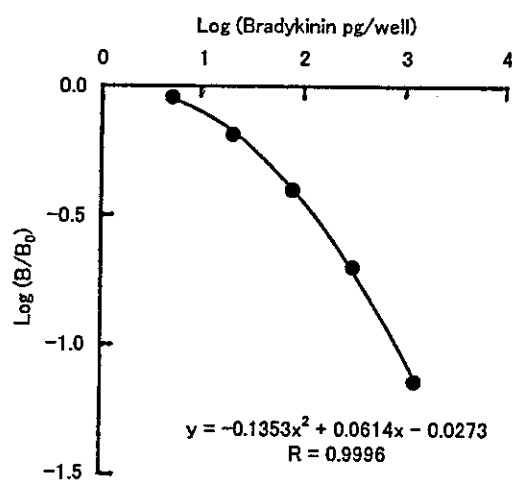


図 1 ブラジキニンEIAの検量線

2. ELISA法によるキナーゼ試験

2. 1. キ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

(1) 反応温度

1 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液 0.5mL に BK 溶液 (200ng/mL) 0.5mL を加え、25、28、30、32 及び 37 °C で 2.5 分間反応した後、残存 BK 量を ELISA 法で測定した。BK 分解率への温度の影響を Fig. 2 に示した。25 ~ 37 °C において、BK 分解率は温度依存的に変動し、1 °C 当たりの分解率の変化量は 0.5 % であった。

従来のキナーゼ試験の反応温度は 32 °C であるが、32 °C と 30 °C の BK 分解率の差は 1 % であることから、ELISA 法

において反応時間を 30 °C に変更しても測定結果に大きな影響を与えないものと考えられた。

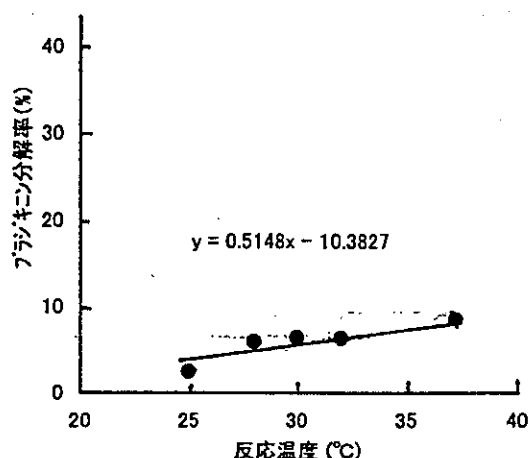


Fig. 2. 反応温度の影響

(2) 試料 (カリジノゲナーゼ) 濃度

2mg/mL ゼラチンを含む pH 7.4 の 0.05mol/L リン酸塩緩衝液で 0.5、1、2、3、4 及び 6 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液を調製し、30 °C で 2.5 分間反応した後、残存 BK 量を ELISA 法で測定した。BK 分解率への試料濃度の影響を Fig. 3 に示した。ブラジキニン分解率はカリジノゲナーゼ濃度、すなわちカリジノゲナーゼに含まれるキナーゼの量に比例して増加した。

基質の約 10 % が分解される試験条件を目安に試験法を設定することで、精度が確保され、かつ適切な規格範囲が設定されると判断し、試験条件設定のための基準とした。ブラジキニン分解率 10 % を目安にすると、カリジノゲナーゼ濃度が 1 単位/mL のとき、分解率は 9 % であったことから、カリジノゲナーゼ溶液の濃度は 1 単位/mL とすることにした。

(3) ブラジキニン濃度

2mg/mL ゼラチンを含む pH 7.4 の 0.05mol/L リン酸塩緩衝液で 50、100、200、400、800 ng/mL のブラジキニン溶液を調製し、1 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液を加えて、30 °C で 2.5 分間反応した後、残存 BK 量を ELISA 法で測定した。BK 分解率へのブラジキニン濃度の影響を Fig. 4 に示した。

ブラジキニン分解量はブラジキニン濃

度に比例して増加し、検討したブラジキニン濃度範囲では分解反応は一次式に従うことが明らかとなった。

ブラジキニン分解率 10 %、すなわちブラジキニン分解量 8 ng BK/min /単位を目安にブラジキニン濃度を設定すると、ブラジキニン濃度が 200 ng/mL のとき、10 ng BK/min /単位であった。

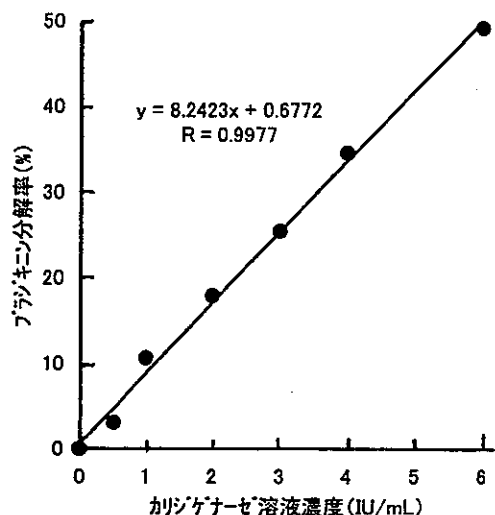


Fig. 3. カリジノゲナーゼ濃度の影響

して、30 °Cで反応した後、残存 BK 量を ELISA 法で測定した。BK 分解率への反応時間の影響を Fig. 5 に示した。

ブラジキニン分解率は反応時間に比例して増加し、ブラジキニン分解率 10 %を目安として反応時間を設定すると、反応時間が 2.5 分間のとき、ブラジキニン分解率は 10 %であった。

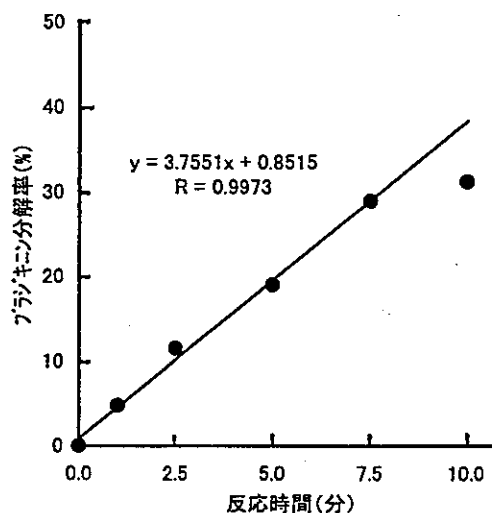


Fig. 5. 反応時間の影響

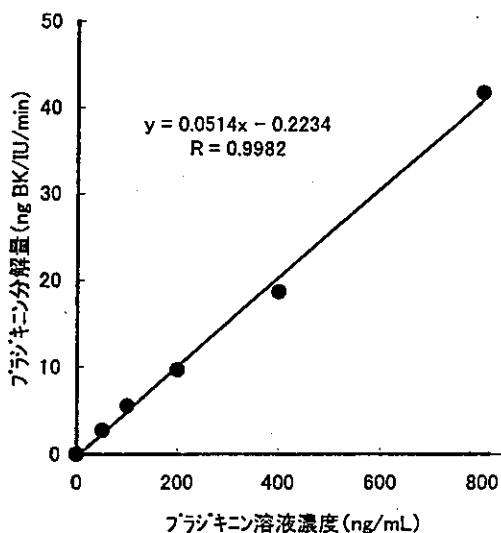


Fig. 4. ブラジキニン濃度の影響

(4) 反応時間

2 mg/mL ゼラチンを含む pH 7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液で調製した 200 ng/mL のブラジキニン溶液及び 1 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液を用いて、反応時間を 0、1、2.5、5、7.5 及び 10 分間と

2. 2. キニナーゼ試験法

上記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 0.200μg 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±0.5 °C で 5 分間加温し、あらかじめ 30±0.5 °C で 5 分間保ったカリジノゲナーゼ溶液 0.5mL を加え、30±0.5 °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 °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℃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。

$$R = \frac{B_r}{B_s}$$

2. 3. 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、次のように良好な結果が得られた。

(1)併行精度

同時に測定した 6 回のデータから、 R の平均値は 0.91、標準偏差(SD)は 0.04、変動係数(CV)は 4.6 %、SD の 90 %信頼区間は 0.028 ~ 0.088 であり、併行精度は良好であった。

(2)室内再現精度 (測定日間)

測定日を変えて 5 日間にそれぞれ 6 回測定したデータから、 R の平均値は 0.91、SD は 0.03、CV は 3.6 %、SD の 90 %信頼

区間は 0.027 ~ 0.042 であり、室内再現精度 (測定日間) は良好であった。

(3)室内再現精度 (測定者間)

3 人の異なる測定者がそれぞれ 6 回測定したデータから、 R の平均値は 0.93、SD は 0.03、CV は 2.7 %、SD の 90 %信頼区間は 0.020 ~ 0.035 であり、室内再現精度 (測定者間) は良好であった。

(4)室間再現精度

3 施設における異なる測定者がそれぞれ 6 回測定したデータから、 R の平均値は 0.91、SD は 0.04、CV は 3.9 %、SD の 90 %信頼区間は 0.028 ~ 0.049 であり、室間再現精度は良好であった。

(5)直線性、測定範囲及び定量限界

1 分間当たり 1 ng のブラジキニンを分解するキニナーゼ量を 1 単位と定義したとき、カリジノゲナーゼ 1 単位中に 8 単位のキニナーゼを含有するものを用いて検討した。

2 mg/mL ゼラチンを含む pH7.4 の 0.05 mol/L リン酸塩緩衝液でキニナーゼ量が 4、6、8 及び 12 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液を調製し、それぞれ同時に 3 回測定した。

4 ~ 12 単位/mL の濃度範囲で直線回帰分析を行った結果、相関係数は 0.9967、 y 切片は 0.9971、回帰直線の傾きは -0.0101、残差平方和は 0.00005 となり、キニナーゼ濃度と R 値の間には良好な直線性が成立していた。

定量限界は ICH ガイドラインに従って次式によって求めた。

$$\text{定量限界} = 10 \sigma / S$$

(ただし、 σ はレスポンスの標準偏差、 S は検量線の傾き。)

標準偏差 σ は 0.0054、 S は 0.0101 となり、定量限界は 5.4 単位/mL と推定された。

3. ELISA法によるキニン遊離能試験

3. 1. 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

(1)カリジノゲナーゼ濃度

pH8.0 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液で 0.25、0.5、0.1、0.2 及び 0.4 単位/mL のカリジノゲナーゼ溶液を調製し、この液 0.5mL にキニノーゲン溶液 (1mg BK eq./mL) 0.5mL を加え、30℃で 2 分間反応した後、生成したキニン量を ELISA 法で測定した。キニン遊離量とカリジノゲ

ナーゼ濃度の関係を Fig. 6 に示した。カリジノゲナーゼ濃度 0.4 単位/mL まで、キニン遊離量はカリジノゲナーゼ濃度に比例して増加した。

測定法の精度及び操作性から、基質であるキニノーゲンの分解率が 20 % 以下、すなわちキニン遊離量が 200ng/mL 以下となるようにカリジノゲナーゼ濃度を設定することが妥当と考えられ、カリジノゲナーゼ濃度は 0.1 単位/mL が適当と判断した。

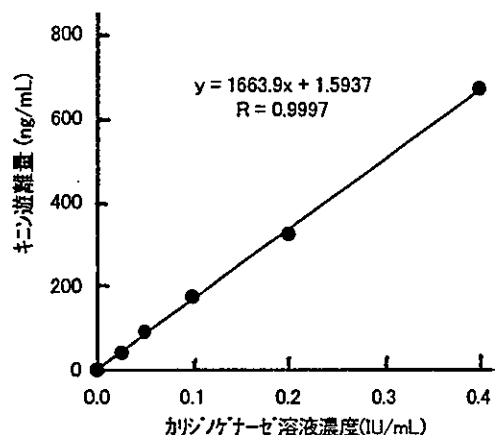


Fig. 6. カリジノゲナーゼ濃度の影響

(2)キニノーゲン濃度

pH8.0 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液で 0.25、0.5、1、2 及び 4 mg BK eq./mL のキニノーゲン溶液を調製し、この液 0.5 mL にカリジノゲナーゼ溶液 (0.1 単位/mL) 0.5 mL を加え、30℃で 2 分間反応した後、生成したキニン量を ELISA 法で測定した。キニン遊離量とキニノーゲン濃度との関係を Fig. 7 に示した。キニン遊離量はキニノーゲン濃度に依存して増加したが、4 mg BK eq./mL でも飽和遊離量に達しなかった。

一般に酵素活性は飽和量の基質を用いて測定することが原則とされているが、飽和量のキニノーゲンを使用することは経済性から考えて实际的ではなく、測定法の他の条件を規定することによって精度を確保することは可能と考えられ、キニノーゲン濃度は 1 mg BK eq./mL とするのが妥当と考えられた。

(3)反応時間

pH8.0 の 0.02mol/L リン酸塩緩衝液で調製した 1 mg BK eq./mL のキニノーゲン溶液 0.5mL に 0.1 単位/mL のカリジノゲナー

ゼ溶液 0.5 mL を加え、30℃で 0、1、2、3 及び 4 分間反応した後、生成したキニン量を ELISA 法で測定した。キニン遊離量と反応時間との関係を Fig. 8 に示した。キニン遊離量は少なくとも 4 分間まで反応時間に比例して増加し、1 分間当たりのキニンの増加量は約 60ng であった。

キニノーゲンの分解率が 20 % 以下、すなわちキニン遊離量が 200ng/mL 以下を目安に、かつ操作性を考慮して、反応時間は 2 分間とするのが妥当と考えられた。

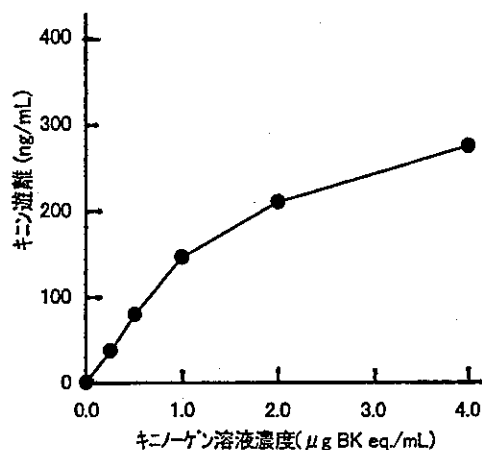


Fig. 7. キニノーゲン濃度の影響

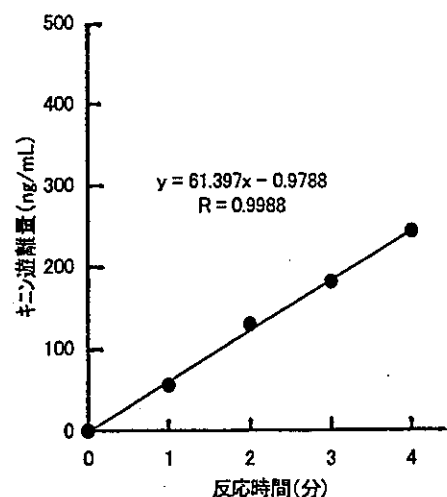


Fig. 8. 反応時間の影響

3. 2. キニン遊離能試験法

上記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0.5 mL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。

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

3. 3. 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、次のように良好な結果が得られた。

(1)併行精度

同時に6回測定したデータから、キニン遊離能(ng BK eq./min/単位)の平均値は722、SDは49、CVは6.8%、SDの90%信頼区間は33～103であり、併行精度は良好であった。

(2)室内再現精度(測定日間)

測定日を変えて、それぞれ6回測定したデータから、キニン遊離能の平均値は691、SDは71、CVは10.3%、SDの90%信頼区間は54～97であり、室内再現精度(測定日間)は良好であった。

(3)室内再現精度(測定者間)

3人の異なる測定者がそれぞれ6回測定したデータから、キニン遊離能の平均値は680、SDは74、CVは10.8%、SDの90%信頼区間は58～103であり、室内再現精度(測定者間)は良好であった。

(4)室間再現精度

3施設において異なる測定者がそれぞれ6回測定したデータから、キニン遊離

能の平均値は681、SDは54、CVは8.0%、SDの90%信頼区間は43～76であり、室間再現精度は良好であった。

(5)直線性、測定範囲及び定量限界

pH8.0の0.02mol/Lリン酸塩緩衝液で0.01、0.02、0.04、0.08、0.1及び0.12単位/mLのカリジノゲナーゼ溶液を調製し、キニン遊離能を測定した。測定は各濃度について同時に3回行った。

0.01～0.12単位/mLの濃度範囲で直線回帰分析を行った結果(Fig. 9)、相関係数は0.9994、 y 切片は-5.630、回帰直線の傾きは1661.9、残差平方和は32.26となった。

試験に用いるカリジノゲナーゼ濃度(0.1単位/mL)の80～120%の上下限に相当する0.08及び0.12単位/mLの測定値のCVは3.8%、4.0%と良好であった。すなわち、0.08～0.12単位/mLの範囲において良好な直線性と精度が示された。

定量限界はICHガイドラインに従って次式によって求めた。

$$\text{定量限界} = 10 \sigma / S$$

(ただし、 σ はレスポンスの標準偏差、 S は検量線の傾き。)

標準偏差 σ は3.16、 S は1661.9となり、定量限界は0.02単位/mLと推定された。

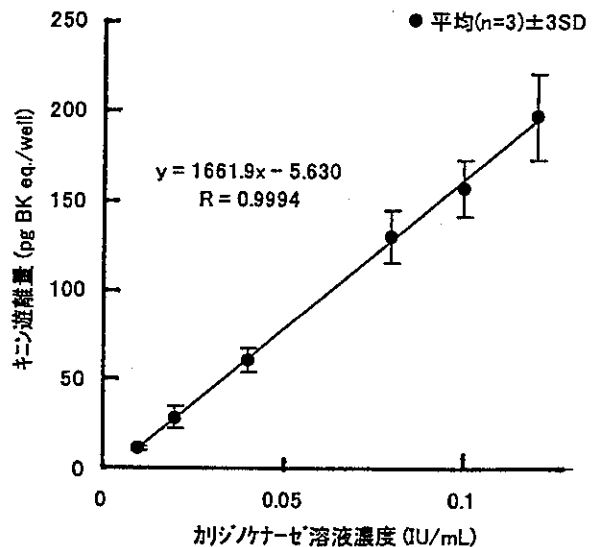


Fig. 9. キニン遊離能試験の直線性、測定範囲及び定量限界

D. 考 察

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。しかも、再現性が低いために1濃度の標準溶液との比較による定性的限度試験によって試験が行われている。これらの試験で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とも言える。

かつては特異抗体の作成や入手が困難であったことから免疫化学的方法を医薬品の品質評価試験に適用することは容易なことではなかった。しかし、今や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ている。本研究で示したように、特異抗体を用いた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

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、特に生物薬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. 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，1999，30，289-294.

2. 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.*, 1998, 365, 285-292.

3. 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.*, 2000, 48(2), 283-285.

2. 学会発表

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

2. 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)