

**Viruses** In the present study, we used the model viruses that have been used for viral clearance study as recommended in the international harmonized guidelines.<sup>13)</sup> Sindbis virus and porcine parvovirus (strain 90HS) (PPV) were kindly donated by Dr. Kohase (National Institute of Infectious Diseases). Poliovirus (strain Sabin) was kindly donated by Dr. Koga (JCR Co., Japan). The supernatants of Vero cells infected with either poliovirus or Sindbis virus were used as the virus samples. The supernatant of ESK cells infected with porcine parvovirus was used as the PPV sample. In order to remove the cell-debris from the collected virus suspension, each virus suspension was centrifuged at 3000 rpm for 10 min. After removing the cell-debris, the resulting stock viruses were aliquoted and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The monkey cytomegalovirus (ATCC VR-677) derived from the supernatant of MRC-5 cells infected by the virus was obtained from ATCC.

**Sulfonated Magnetic Beads** Sulfonated-magnetic beads were prepared as follows; 10 g of IMMUTEX-Mag (JSR Corp. Tokyo, Japan) were dispersed in 100 g of water containing 0.2 g of sodium dodecylsulfate. To the dispersion obtained, 3 g of methyl methacrylate and 3 g of 2-acrylamide-2-methylpropane sulfonic acid sodium salt were added, and the mixture was heated to  $80^{\circ}\text{C}$ , and thereafter 0.2 g of perbutyl-O (NOF Corp. Tokyo, Japan) was added to carry out seed-polymerization for 5 h. After the reaction was completed, the beads were washed with distilled water and then with phosphate-buffered saline (PBS) to obtain SO-magnetic beads.

**Viral Concentration Using Sulfonate-Magnetic Beads** The essential adsorption procedure for each virus was as follows; 1 or 10 ml of each virus supernatant was incubated both with various concentrations of divalent cations and 100  $\mu\text{l}$  SO-magnetic beads for 10 min at room temperature, and then the complex of virus and magnetic beads was trapped by a magnetic field (Magnetic Trapper<sup>TM</sup>, Toyobo Co., Japan; Dynal MOC-1<sup>TM</sup>, Dynal AS., Oslo), after which the medium was aspirated. The trapped virus and bead complexes were resuspended in an aliquot of medium to be adjusted to 100  $\mu\text{l}$ , and then the extraction of virus RNA or DNA was carried out from the 100  $\mu\text{l}$  of virus-bead complexes or the virus solution with a SMI-TEST EX-R&D kit (Genome Science Laboratories, Fukushima, Japan). The extracted RNA and DNA were dissolved in 20  $\mu\text{l}$  of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4/0.1 mM EDTA).

**Determination of Viral-Infectivity** The infectious titer of each virus suspension was determined using each indicator cell. Sindbis virus and poliovirus were introduced into Vero cells, and PPV was introduced into ESK cells.<sup>14-16)</sup> The virus suspension and PEI-magnetic bead-treated suspension were subjected to infectious assay (TCID<sub>50</sub> assay) using each indicator cell. Cells were maintained as stock cultures in  $\alpha$ -MEM and replated 2 d before infection in 96-well plates for the TCID<sub>50</sub> assay.<sup>17)</sup> Each virus suspension was serially diluted. Cell cultures were then infected for 1 h. The medium for dilution and infections was Hank's balanced solution supplemented with 20 mM HEPES buffer (pH 7.4). Postinfection TCID<sub>50</sub> cultures were washed and then fed with the media. After 48 or 72 h of incubation postinfection, the MTT assay was carried out after the degeneration of virus-infected cells became evident.<sup>18)</sup> The MTT method utilizes 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT),

Table 2. Primer and Probe Sets Used in the Real-Time PCR and Real-Time RT-PCR

Primer and probe set	
PPV	5'-CGTGGAGCGAGCCAAACA-3' 5'-AGTTGGGACTTGGTGCCGTATTG-3' FAM-labeled 5'-TGCACTTAACTCCAACACCCGCCAGATT-3'
Poliovirus	5'-ATTACACGCTGACAAAAACCAAG-3' 5'-ATAGTTTCACCGAAGCGGA-3' FAM-labeled 5'-CTAGAAATAGTCGTCCTCCCTCTTTCGA-CACCCAG-3'

DNA and RNA from Sindbis virus, VSV and SV-40 virus were quantitatively determined using Syber Green PCR Master Mix<sup>TM</sup> (Applied Biosystems).

which is converted to a water-insoluble blue crystal (formazan) in viable cells through mitochondrial dehydrogenase activity.<sup>19)</sup> Dead cells are unable to reduce MTT to formazan; thus, the amount of formazan present is an indication of the number of viable cells. The optical density (OD) of formazan was determined using a computer-controlled microplate reader.

**Viral Genome Amplification** The PCR was carried out in a 50- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 25  $\mu\text{l}$  of PCR-Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems Co.), 13  $\mu\text{l}$  of DNase-free distilled water, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer set, and 10  $\mu\text{l}$  of extracted sample. PCR was performed on a GeneAmpPCR System 9700 (Applied Biosystems Co.). Thirty-five cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s (5 min during cycle 1), annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  were carried out. After the final cycle, the tubes were incubated for an additional 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$  and cooled down to  $5^{\circ}\text{C}$ . The reverse-transcriptional PCR was carried out in a 50- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 25  $\mu\text{l}$  of RT-PCR-Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems Co.), 13  $\mu\text{l}$  of DNase/RNase-free distilled water, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer set, and 10  $\mu\text{l}$  of extracted sample. RNA virus genome was reverse-transcribed into cDNA (45 min at  $50^{\circ}\text{C}$ ), and the target fragments were amplified by PCR, with 35 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 30 s (5 min during cycle 1), annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and extension at  $72^{\circ}\text{C}$ . After amplification, electrophoretic separation of the PCR products (10  $\mu\text{l}$ ) was performed on 2% agarose gels in 1x Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.4), and the PCR products were stained with ethidium bromide and visualized with UV illumination.

**Real-Time PCR on the ABI PRISM 7000** Real-time PCR was carried out in a 50- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 25  $\mu\text{l}$  of TaqMan Gold Master Mix (Applied Biosystems Co.) or 25  $\mu\text{l}$  of Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems Co.), 13  $\mu\text{l}$  of DNase/RNase-free distilled water, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer set with or without a fluorescence probe, and 10  $\mu\text{l}$  of extracted sample. The reaction mixture for PCR was prepared in a single tube as follows; at first, the RNA virus genome was reverse-transcribed into cDNA (50 min at  $42^{\circ}\text{C}$ ), and the reaction was terminated for 15 min at  $95^{\circ}\text{C}$ . The reaction mixture was then mixed with 25  $\mu\text{l}$  of Syber Green RT-PCR Master Mix, 13  $\mu\text{l}$  of DNase/RNase-free distilled water, and 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer set. The real-time PCR was monitored on the ABI PRISM 7000 Sequence-Detection System (Applied Biosystems Co.).



## RESULTS

Since several reports suggested that divalent cations interact with viruses,<sup>20-24</sup> we expected the viruses to form complexes with divalent cations. We tried to trap the complexes of virus and divalent cation with negatively charged SO-magnetic beads. To clarify whether the model viruses interacted with the SO-magnetic beads in the presence of divalent cations, we compared the infectious titers of virus suspension treated with SO-magnetic beads to the untreated suspension. As shown in Table 3, in the presence of 10 mM Zn<sup>2+</sup> ion, the infectious titers of Sindbis virus, PPV, and poliovirus suspension treated with SO-magnetic beads decreased dramatically compared to those of the untreated samples. The infectious titers of Herpes Simplex I, vesicular stomatitis virus, and SV-40 virus were also decreased by the treatment with SO-magnetic beads (data not shown).

We next analyzed the virus-genome content of SO-magnetic bead-adsorbed fractions by PCR or RT-PCR. Figure 1 shows that in the presence of 10 mM Zn<sup>2+</sup> ion, the treatment with SO-magnetic beads concentrated the Sindbis virus, PPV and poliovirus genome as compared with untreated fractions. Similar results were obtained in the presence of 10 mM Cu<sup>2+</sup> ion instead of Zn<sup>2+</sup> ion. These results suggest that in the presence of divalent cations such as Zn<sup>2+</sup> ion or Cu<sup>2+</sup> ion, SO-magnetic beads can adsorb PPV and poliovirus which could not be adsorbed by PEI-magnetic beads\*.

Table 3. Reduction of Infectivities in Viruses Treated with SO-Magnetic Beads in the Presence of Zn<sup>2+</sup> Ions

		Concentration of infectious virus ( $\times 10^4$ )
Sindbis virus	Applied sample	6.5 $\pm$ 4.8 <sup>a)</sup>
	Upper layer treated with SO-beads	4.3 $\pm$ 2.0
PPV	Applied sample	6.8 $\pm$ 5.3
	Upper layer treated with SO-beads	4.5 $\pm$ 2.4
Poliovirus	Applied sample	7.0 $\pm$ 5.7
	Upper layer treated with SO-beads	3.3 $\pm$ 1.5

a) Means  $\pm$  S.D. (n=4).

Next, to examine the effects of divalent cations on the adsorption efficiency of SO-magnetic beads, the virus genome in the concentrated samples was quantitatively determined by real-time PCR. As shown in Fig. 2, the PPV-trapping efficiency by SO-magnetic beads was most effective in the presence of either 5–10 mM Zn<sup>2+</sup> or Cu<sup>2+</sup> ions. In the case of poliovirus, the most effective concentration of poliovirus was observed in the presence of 10 mM Cu<sup>2+</sup> ion. On the other hand, in the presence of Mn<sup>2+</sup> ion, SO magnetic beads only weakly adsorbed either poliovirus or PPV. In the presence of Ca<sup>2+</sup> ion or Mg<sup>2+</sup> ion the effective virus adsorption could not be observed (data not shown). Concerning the effect of divalent ions, the same tendency was observed for the adsorption of Sindbis virus or SV-40 virus (data not shown). The following experiment was performed in the presence of either 10 mM Cu<sup>2+</sup> ion or Zn<sup>2+</sup> ion.

Next, 1 or 10 ml of serially diluted suspension of poliovirus and PPV was concentrated to 100  $\mu$ l with SO-magnetic beads in the presence of 10 mM Cu<sup>2+</sup> ion. After the adsorption to SO-magnetic beads, the virus genome in the complex of virus and SO-magnetic beads was extracted, and then the copy numbers were compared to that in the original suspension by means of quantitative PCR and RT-PCR. As shown in Fig. 3, poliovirus and PPV, which were diluted to various concentrations with the medium, were efficiently concentrated by SO-magnetic beads. While the 10-fold concentration procedures for poliovirus and PPV by SO-magnetic beads resulted in the expected concentrations from the original solutions, respectively, in the case of 100-fold concentration, sufficient recovery was not observed for poliovirus or PPV. On the other hand, the detection limit of poliovirus and PPV could be lowered by the concentration using the SO-magnetic bead method. The same results were obtained for Sindbis virus or SV-40 (data not shown).

Finally, we examined the adsorption ability of SO-magnetic beads and PEI-magnetic beads for human disease virus. As shown in Fig. 4, both magnetic beads efficiently adsorbed cytomegalovirus. This result also clearly demonstrated that both magnetic beads are useful for the concentration of viruses.

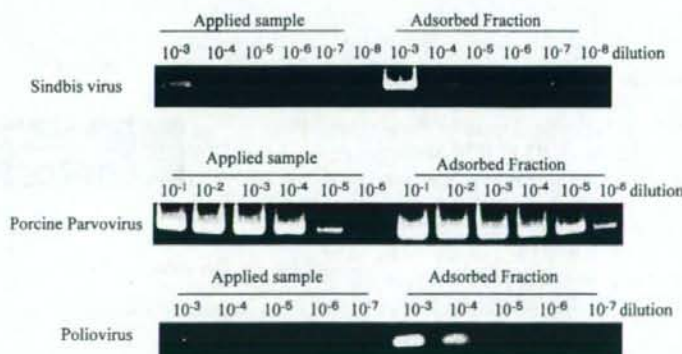


Fig. 1. Concentration of Model Viruses by SO-Magnetic Beads

One milliliter of virus suspension was incubated with 100  $\mu$ l of SO-magnetic beads. The virus genomes in the complex of viruses and SO-magnetic beads were extracted as described in "Materials and Methods." The virus genomes in the serial dilutions of virus suspensions were compared with those in the SO-magnetic bead-concentrated samples by PCR or RT-PCR.

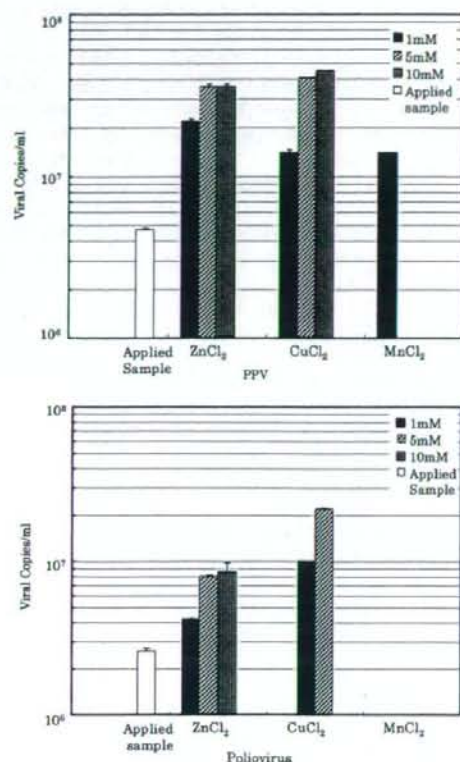


Fig. 2. Concentration of PPV and Poliovirus by SO-Magnetic Beads in the Presence of Various Amounts of Divalent Cations

One milliliter of PPV or poliovirus suspension was incubated with SO-magnetic beads in the presence of various amounts of Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> ions. After the incubation, viruses bound to SO-magnetic beads were resuspended in 100  $\mu$ l of medium, and the virus genome was then extracted as described in "Materials and Methods." The copy numbers of virus genome (original) in the serial dilutions of virus-infected medium were determined by real-time PCR or RT-PCR.

## DISCUSSION

Previously, we reported that PEI-magnetic beads efficiently adsorbed many viruses, such as Sindbis virus, SV-40, HSV-1 or VSV, resulting in the enhancement of the sensitivity of virus detection by PCR or RT-PCR<sup>\*1</sup>. Some non-enveloped viruses, such as PPV or poliovirus, however, could not be adsorbed by PEI-magnetic beads. We, therefore, tried to establish a new method for the concentration of PPV or poliovirus. Divalent cations, such as Cu<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup> ions, have been reported to interact with several species of viruses.<sup>20-24</sup> We, therefore, suspected that after incubation with viruses and divalent cations, the SO-magnetic beads may adsorb the complex of virus and divalent cations. The present study shows that the SO-magnetic beads adsorb many viruses, including not only Sindbis virus or SV-40, but also PPV or poliovirus. In particular, the most effective concentration of poliovirus or PPV by SO-magnetic beads was observed in the presence of either Zn<sup>2+</sup> ion or Cu<sup>2+</sup> ion, compared with Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> ions. In the absence of divalent cations, the SO-magnetic beads did not adsorb any viruses (data not shown). The analysis by PCR or RT-PCR of virus genome

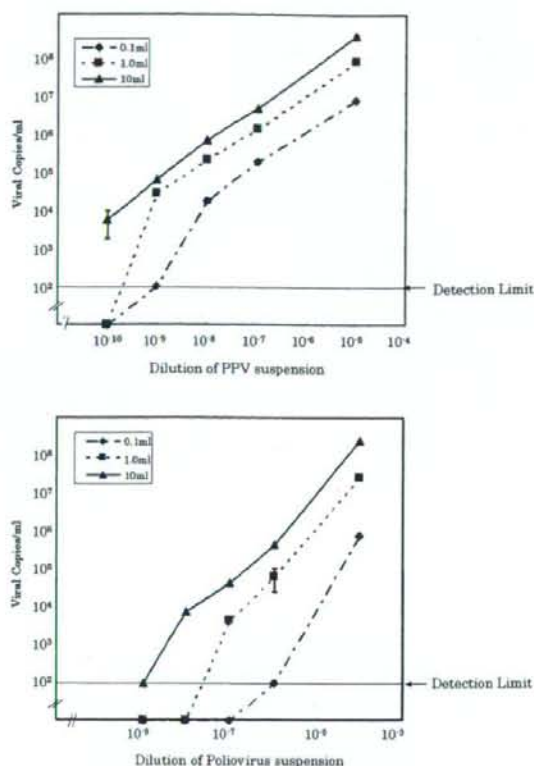


Fig. 3. Quantitative Analysis of Virus Concentration by SO-Magnetic Beads

One milliliter ( $\times 10$ ) or 10ml ( $\times 100$ ) of virus suspension was incubated with SO-magnetic beads. After the incubation, the viruses bound to SO-magnetic beads were resuspended in 100  $\mu$ l of medium, and the virus genome was then extracted as described in "Materials and Methods." The copy numbers of the virus genome (0.1 ml) in the serial dilutions of virus-infected medium were compared with those in the extract (1.0 ml and 10 ml) of SO-magnetic beads by real-time PCR or RT-PCR. The vertical axis indicates the copy numbers of viral genome in the extract.

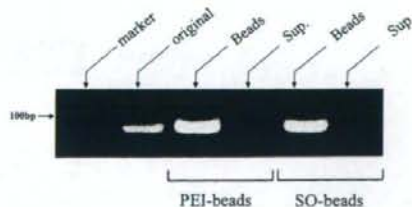


Fig. 4. Concentration of Cytomegalovirus by SO-Magnetic Beads or PEI-Magnetic Beads

One milliliter of cytomegalovirus suspension was mixed and then incubated with either SO-magnetic beads or PEI-magnetic beads. After the incubation, the viruses bound to both magnetic beads were resuspended in 100  $\mu$ l of medium, and the virus genome from magnetic beads fractions (Beads) and supernatant fractions (Sup.) was then extracted as described in Materials and Methods. The virus genome in the extract was amplified by PCR.

copies in the concentrated fraction derived from the serial dilution of viruses by SO-magnetic beads reveals that SO-magnetic beads can be used to improve the sensitivity of the detection limit of virus genomes by PCR or RT-PCR. Whereas sufficient recovery of the virus genome to 100  $\mu$ l did not



occur with 10 ml virus suspension, quantitative recovery to 100  $\mu$ l was observed with the 1 ml virus suspension. The concentration of CMV obtained using PEI-magnetic beads was compared with that obtained using SO-magnetic beads, and it was found the efficiencies of both methods were comparable. The most significant point is that the virus concentration by SO-magnetic beads is applicable to PPV and poliovirus, which is not adsorbed by PEI-magnetic beads.

The virus-adsorption mechanism of SO-magnetic beads remains unclear at present. Both  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ions were reported to inactivate or interfere with many viruses.<sup>22-24</sup> Kümél *et al.*<sup>22</sup> showed that  $Zn^{2+}$ -inactivated virus cannot properly penetrate a susceptible cell because the bound  $Zn^{2+}$  ion functionally inactivated the viral surface glycoprotein. Electron micrographs showed deposition of zinc onto the virion surface, which blocked presentation to the cell of a virion binding site.<sup>22</sup> Chruscinski *et al.*<sup>20</sup> reported the specific interaction of  $Cu^{2+}$  ions with fragments of envelope protein of hepatitis B virus. These data indicate that some divalent cations interact with virus surface protein or phospholipid. In these contexts, we suppose that some divalent cations form a complex with viruses, and the resulting complex of divalent cation and virus may be adsorbed by SO-magnetic beads that are negatively charged. In the present study, we successfully concentrated some nonenveloped viruses that could not be concentrated by PEI-magnetic beads as reported previously. Divalent cations are also suspected to interact with the surface phospholipids of enveloped viruses.

In conclusion, in the presence of divalent cations such as  $Cu^{2+}$  ions or  $Zn^{2+}$  ion, SO-magnetic beads efficiently concentrated many viruses, resulting in an increment in the sensitivity of the detection of the virus genomes.

**Acknowledgement** This work was supported in part by a grand-in-aid for health science research (H12-SAISEI-019) from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

## REFERENCES

- 1) Satoh K., Iwata A., Murata M., Hikata M., Hayakawa T., Yamaguchi

- T., *J. Virol. Methods*, under submission.
- 2) Saiki R. K., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A., *Science*, **239**, 487-491 (1988).
- 3) Willkommen H., Schmidt I., Lower I., *Biologicals*, **27**, 325-331 (1999).
- 4) Sarrazin C., Kokka R., Rabenau H., Zeuzem S., *Hepatology*, **32**, 818-823 (2000).
- 5) Kamisango K., Sumi M., Goto S., Hirao A., Gonzales F., Yasuda K., Iino S., *J. Clin. Microbiol.*, **3**, 310-314 (1999).
- 6) Alter H. J., Sanchez-Pescandor R., Urdea M. S., Wilber J. C., Lagier R. J., DiBisceglie A. M., Shih J. W., Neuwald P. D., *J. Viral. Hepatitis*, **2**, 121-132 (1995).
- 7) Kern D., Collins M., Fultz T., Detmer J., Hamren S., Peterkin J. J., Sheridan P., Urdea M., White R., Yeghiazarian T., Todd J., *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 3196-3202 (1996).
- 8) Sanyal D., Kudesia G., Corbett G., *J. Med. Microbiol.*, **35**, 291-293 (1991).
- 9) Kittigul L., Kahmoun P., Sujirarat D., Utrachakij F., Chintpirom K., Chaichantanakit N., Vathanophas K., *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **96**, 815-821 (2001).
- 10) Li J. W., Wang X. W., Rui Q. Y., Song N., Zhang F. G., Ou Y. C., Chao F. H., *J. Virol. Methods*, **74**, 99-108 (1998).
- 11) Soares R. M., Durigon E. L., Bersano J. G., Richtzenhain L. J., *J. Virol. Methods*, **78**, 191-198 (1999).
- 12) Kilpatrick D. R., Nottay B., Yang C., Yang S., Silva E. D., Penaranda S., Pallansch M., Kew O., *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 352-357 (1998).
- 13) Guideline I. H. T., "Proceeding of the Fourth International Conference on Harmonization (Brussels)," ed. by Arcy P. F. D., Harron D. W. G., The Queen's University of Belfast, W&G. Baird Ltd., Northern Ireland, 1997, pp. 877-907.
- 14) Hudson J. B., Haugland R. P., Diwu Z., *Photochem. Photobiol.*, **65**, 352-354 (1997).
- 15) Ferrari M., Gualandi G. L., *Microbiologica*, **10**, 301-309 (1987).
- 16) Johnson K. L., Sarnow P., *J. Virol.*, **65**, 4341-4349 (1991).
- 17) LaBarre D. D., Lowry R. J., *J. Virol. Methods*, **96**, 106-126 (2001).
- 18) Watanabe W., Konno K., Ijichi K., Inoue T., Yokota T., Shigeta S., *J. Virol. Methods*, **48**, 257-265 (1994).
- 19) Mosmann T., *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 20) Chruscinski L., Dyba M., Jezowska-Bojczuk M., Kozłowski H., Kupryszewski G., Mackiewicz Z., Majewska A., *J. Inorg. Biochem.*, **63**, 49-55 (1996).
- 21) Sagripanti J., Routson L. B., Bonifacino A. C., Lytle D., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 812-817 (1997).
- 22) Kümél G., Schrader S., Zentgraf H., Brendel M., *J. Gen. Virol.*, **71**, 2989-2997 (1990).
- 23) Arens M., Travis S., *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1758-1762 (2000).
- 24) Sujak I., Kawecki Z., *Acta Virol.*, **20**, 196-201 (1976).

## ▶ 医薬品各条の改正点

## 生物薬品

山口 照英

国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部長

生物薬品の各条新規収載品目  
および改正品目

生物薬品委員会の医薬品各条関係では、たん白質性/ペプチド性および高分子多糖性の新規収載品目の審議および既収載品目についての改正作業を行ってきた。

第十四改正日本薬局方(十四局)第一追補, 第二追補を経て, 第十五改正日本薬局方(十五局)に至るまで, 新規収載品目は8品目, 改正は9品目であった(表1)。これらのうち, 第十四改正日本薬局方第一追補(十四局第一追補)にはリゾチーム塩酸塩(十四局第一追補では塩化リゾチームとして収載)が新規収載された。第十四局改正日本薬局方第二追補(十四局第二追補)では, オキシトシン, セラペプターゼの新規収載が行われるとともに, オキシトシン注射液, カリジノゲナーゼ, パソプレシン注射液, ヘパリンナトリウム, ヘパリ

ンナトリウム注射液, 血清性性腺刺激ホルモン, 注射用血清性性腺刺激ホルモン, 絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載), 注射用絨毛性性腺刺激ホルモン(十四局第二追補では注射用胎盤性性腺刺激ホルモンとして収載)の改正が行われた。

生物薬品委員会の局方収載に  
おける各条審議のポイントと  
基本方針

生物薬品委員会の局方収載における各条審議は, 表2にあげた基本方針に沿って行った。これらの基本方針は, 十四局収載における基本方針に準じている。

## ① 合理性に基づく規格および試験方法の設定

生物薬品の各条における試験項目や規格値の設定においては, ①品質の恒常性維持, ②科学の進歩に即応した品質確保, 品質管理, ③後続品に対する品質基準の規範となる規格・試験方法の設定, ④同一原理の試験項目を重複させないなど, 設定する各条ごとに合理性に基づく試験項目の設定, ⑤簡便で精度の高い試験法への変更, ⑥実測値に基づいた規格値の設定などの観点から審議を行うこととした。

表1 生物薬品の各条新規収載品目および改正品目

新規収載品目	改正品目
リゾチーム塩酸塩	カリジノゲナーゼ
ゴナドレリン酢酸塩	オキシトシン注射液
セラペプターゼ	血清性性腺刺激ホルモン
バルナバリンナトリウム	注射用血清性性腺刺激ホルモン
オキシトシン	絨毛性性腺刺激ホルモン
セルモロイキン	注射用絨毛性性腺刺激ホルモン
テセロイキン	パソプレシン注射液
注射用テセロイキン	ヘパリンナトリウム
	ヘパリンナトリウム注射液



表2 生物薬品委員会の各条審議の基本方針

- 1) 各条全体としての合理性に基づく規格および試験方法の設定
- 2) 範囲のある含量規格の設定
- 3) 性状の溶解性試験の見直し
- 4) 試験動物の使用削減の観点からみた合理的試験法の設定
  - ① バイオアッセイ法から理化学的試験法や免疫化学的方法への移行
  - ② ヒスタミンおよびヒスタミン様物質、異常毒性否定試験などの設定の意義および必要性の見直し
  - ③ 毒性試験の設定の意義および必要性の見直し
  - ④ 発熱性物質試験のエンドトキシン試験への切り替え
- 5) 比活性の独立示性値としての設定
- 6) 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証
- 7) 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し
- 8) 同種同効医薬品の収載にあたっての調和

## ② 範囲のある含量規格の設定

酵素製剤などの原薬については、単位質量当たりの活性について、上限値と下限値を設定する。このことにより、品質の恒常性の確保を目指す。

## ③ 性状の溶解性試験の見直し

たん白質やペプチド医薬品の特性から、有機溶媒などへの溶解性に関して、意義の乏しいものは削除することとし、合理的な性状を規定する。

## ④ 試験動物の使用削減の観点からの合理的試験法の設定

動物福祉やより合理的な試験法の採用を行うとの観点から、*in vivo*アッセイ法から*in vitro*アッセイ法や理化学的試験法などへの移行を図る。ヒスタミンやヒスタミン様物質試験や異常毒性否定試験などは、設定の意義や必要性を見直すこととした。発熱性物質試験からエンドトキシン試験への切り替えを進める。

## ⑤ 比活性の独立示性値としての設定

比活性は製品の特性を示す値であることから、純度試験として設定するのではなく、独立した示性値として設定することとした。

## ⑥ 純度試験などに液体クロマトグラフィー法の積極的活用、電気泳動法で試験を実施する際の検出感度の保証

液体クロマトグラフィー法などの技術進歩が著しいことから、純度試験などに積極的に活用していくこととした。その際、検出感度を設定し、保証していくことにした。

## ⑦ 血液凝固性物質、血液型物質などの設定の意義および必要性の見直し

血液凝固物質や血液型物質の混入に関する試験項目については、起源からみて混入の可能性のないものについては見直すこととした。

## ⑧ 同種同効医薬品の収載にあたっての調和

インスリンや成長ホルモンなどの同種同効医薬品の収載にあたっては、試験項目や規格値について、合理的な場合に調和を図ることとした。

## 新規収載候補品目の策定

上記の十五局の収載方針の策定と並行して、継続審議中の各条審議に加えて、新規収載候補品目の策定を行った。候補品目の策定

にあたっては、保険医療上重要な医薬品としてオーファンドラッグの指定を受けた医薬品や市場で広く使用されている医薬品、さらには米国薬局方(USP)や欧州薬局方(EP)に掲載されているなど国際的にも広く使用されている医薬品から、候補とすべき品目を選定した。さらに、標準品の策定が可能な医薬品を候補品目とすることにし、20品目を新規収載候補品目とした。十五局では、このうちパルナバリンナトリウム、セルモロイキン、テセロイキンが収載されることになった。

## 収載品目別の概説と審議の 経緯の要点

### ① リゾチーム塩酸塩

リゾチームはムコ多糖分解作用をもつ酵素であり、溶菌活性を示す。リゾチーム塩酸塩の本質はニワトリ卵白より精製される塩基性ポリペプチドである。消炎酵素剤として用いられ、単味あるいは感冒薬に配合して用いられている。さらに、歯科領域などの小手術の止血時、点眼剤として慢性結膜炎、外用剤として皮膚科医用などにも幅広く臨床使用されている。

リゾチーム塩酸塩は医療用、一般用として広く使用され、品目数としても多数に上っている。日本薬局方外医薬品規格(局外規)に収載されていた品目であり、第十四局第一追補に収載された。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。性状についてはエーテルへの溶解性の情報は意義が乏しいことから、水およびエタノールへの溶解性を記載することとした。確認試験では、ニンヒドリンによる呈色反応および参照スペクトルとの一致を規定した。純度試験として、局外規では、溶状、重金属、ヒ素、および窒

素を規定していたが、製造工程からヒ素を規定する意義は乏しいとして、原案ではヒ素の規定を除くことが提案された。審議の結果、ヒ素を規定する必要はないとされた。一方、窒素については示性値として設定すべきとして、純度試験から独立した示性値として規定することとし、幅をもつ規格値とした。定量法としては、迅速分析法の記載に従い *Micrococcus luteus* を基質として、その溶菌活性で規定することとした。局外規では、同様に溶菌活性を指標とする定量法を採用していたが、反応停止法が規定されていなかった。そこで、定量法として反応停止を含めて規定することにより、より精度の高い試験法を採用することとした。保存条件としては、気密容器で保存可能であり、冷所などの温度規定は必要とされた。

### ② ゴナドレリン酢酸塩

ゴナドレリン酢酸塩は、ゴナドトロピン(LH, FSH)分泌促進作用をもつペプチドで、視床下部性腺機能低下症、ゴナドトロピン分泌不全を伴う下垂体性小人症、視床下部器質性障害、ゴナドトロピン単独欠損症の治療や下垂体性LH分泌機能検査薬として用いられる。

基原、性状、確認試験、施光度、pH、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、水、メタノール、酢酸、エタノールに対する溶解性を規定した。確認試験として、紫外可視吸収スペクトルと赤外吸収スペクトルを採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。また、本品は酢酸塩であることから、酢酸を含むことを確認することとした。液体クロマトグラフィ法を用いた構成アミノ酸分析法を採用し、アルギニンに対する各構成アミノ酸の比を規定した。純度試験として、溶状を紫外可



視吸光度測定法を用いた350nmにおける吸光度を限度値として規定した。また、液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質の限度値を規格した。定量法として、生物活性試験に替えて、液体クロマトグラフィー法を採用し、ゴナドレリン酢酸塩標準品を基準としてゴナドレリン量を求めることとした。ゴナドレリン酢酸塩は、吸湿性があり、また光感受性もあるため遮光して、冷所、密封容器に保存することとされた。

一方、ゴナドレリン酢酸塩は現在のところ、製造しているのは1社のみであり、供給できる標準品が非常にわずかしくなく、受け入れ試験として吸湿性のある本品の水分含量の測定や他の項目を十分に試験するだけの量の確保が困難との報告があった。生物薬品では、各条に記載される製品で1社のみが製造しているものが増加してくることが予想され、標準品の策定においても特別な配慮が必要と考えられた。このため、標準品の試験として必ずしも必要と考えられない試験項目については、設定しないこととした。また使用量などが必要以上に多い項目については適切な量を用いるように変更することとした。確認試験として、質量分析法を用いた分子量の規定、およびゴナドレリン酢酸塩のペプチド配列を確認できるMS/MS分析(質量分析)を行うこととした。さらに、標準品の配布制限も行うこととした。

### ③ セラペプターゼ

セラチア属菌から製造されたたん白質分解活性を有する酵素であり、抗炎症作用を有する。手術後や外傷時の抗炎症作用、副鼻腔炎や気管支炎の消炎、喀痰喀出不全に対する治療を目的として内服で用いる。

基原、性状、確認試験、純度試験、乾燥減量、強熱残分、定量法を規定した。SDSポリ

アクリルアミド電気泳動や免疫化学的手法を用いた確認試験の設定を要望したところ、金属プロテアーゼの特性を利用した方法が原案作成者より提案された。検討の結果、提案は適切であるとされ、定量法を準用した方法を規定することとした。原案では、重金属およびヒ素に対して独立した試験が規定されていたが、これらは純度試験として規定するべきとされた。とくに重金属に関しては実測値に基づき、より適切な規格(50ppmから20ppm)にすることとされた。定量法として、乳性カゼインの分解活性をトリクロロ酢酸可溶性画分のチロジン残基の増加を指標とする試験法により設定した。貯法としては気密容器とした。

### ④ バルナバリンナトリウム

ブタ腸粘膜由来のヘパリンを化学的に分解して得たヘパリンのナトリウム塩であり、血液中のアンチトロンビンⅢ(ATⅢ)を活性化することにより血液凝固阻止作用を発現する。血液透析や血液ろ過などの血液体外循環時の灌流血液の凝固防止を目的として使用されている。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、乾燥減量、分子量、分子量分布、硫酸エステル化の度合、総窒素、抗第Ⅱa因子活性、抗第Ⅱa因子活性・抗第Ⅱa因子活性比、定量法を規定した。基原に関して、ダルテバリンナトリウムの整合を図り、参考情報の「日本薬局方の通則等に規定する動物由来医薬品起源としての動物に求められる要件」との対応から、原料を得る動物の表記に「健康な動物」と記載することとされた。原案では試験溶媒として用いていない、エタノール(95)およびエーテルへの溶解性について記載されていたが、意義は低いとして削除することとされ、エタノール(99.5)への溶解性を追加することとし



た。確認試験として、トルイジンブルーOの反応を用いた多糖類染色試験を設定するとともに、ナトリウム塩の定性反応を規定した。パルナパリンナトリウムは多くの分子量の異なるヘパリンナトリウムの集合体であることから、規格項目として分子量と分子量分布を設定し、分子量の項では平均分子量を規定することとした。分子量測定には「分子量測定用低分子量ヘパリン標準品」を用いることとした。ヘパリンナトリウムは、注射剤としても使用されることから「溶状」を設定した。硫酸エステル化は電位差滴定法を用いる試験法を採用した。原料のヘパリンナトリウムでは総窒素を規定していることから、総窒素の項を設定することとした。定量法は、標準品として低分子量ヘパリンを用い抗第Xa因子活性を指標とする試験法を採用し、1mg中の低分子量ヘパリン単位を求めることとした。また、別に抗IIa因子活性の比活性を求め、抗第Xa因子活性・抗IIa因子活性の比を幅で規定することとした。貯法は密封容器とした。

### ⑤ オキシトシン

下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンで、化学合成により製造され、子宮収縮作用がある。子宮収縮の誘発、促進ならびに子宮出血の治療を目的とし、分娩誘発、微弱陣痛、弛緩出血などの治療に点滴静注あるいは、筋注により用いられる。オキシトシン注射液は既収載であったが、その原薬の新規収載を行った。

基原、性状、確認試験、構成アミノ酸、純度試験、水分、定量法を規定した。性状について、規格・試験法で使用する溶媒について調査し、水、エタノール(99.5)、および塩酸試液への溶解性を規定した。確認試験として、吸収スペクトル法を採用し、参照スペクトルとの同等性を確認することとした。構成アミ

ノ酸を設定したが、血圧上昇成分であるバソプレシン様ペプチドが存在しないことを担保するために、オキシトシンに含まれないほかのアミノ酸の限度値を規定した。純度試験では、酢酸を幅規格で設定するとともに、類縁物質について規格値を設定した。定量法は、オキシトシン注射液で動物を用いた生物活性試験が規定されていたが、高速液クロマトグラフィー(HPLC)法に変更することとした。このために、オキシトシンの強制分解溶液を用いて、生物活性試験とHPLC法を比較し、両試験法に良好な相関関係が認められたことから、HPLC法の採用が妥当とされた。貯法温度は2~8℃とし、吸湿性をもつことから気密容器とした。

### ⑥ セルモロイキン

セルモロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるインターロイキン(IL)-2であり、進行腎細胞がん、悪性黒色腫、血管肉腫に点滴静注ないしは皮下投与される。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、酢酸アンモニウム、エンドトキシン、無菌、定量法が設定された。確認試験では、フォリン試薬を用いたたん白質としての反応性の確認、アミノ酸分析による構成アミノ酸、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた分子量、ペプチドマップ試験、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞の増殖活性の抗IL抗体による阻害を指標とする試験を設定した。アミノ酸分析の試験法は、第十四局第二追補参考情報アミノ酸分析法に準じた設定を行った。ペプチドマップ試験法の規格として、ピーク位置の同等性のみならず量的な同等性を確認するために溶出ピークの高さの同等性についても確認することとした。純度試験として、酵素免疫手法による大腸菌由来たん白質、SDSポリアクリルアミド電気泳動を用いた重

合体、液体クロマトグラフィー法を用いた類縁物質のそれぞれの試験を設定した。重合体以外にSDSポリアクリルアミド電気泳動で分離可能な不純物としては、大腸菌たん白質やメチオニル化体などのセルモロイキン類縁物質が考えられるが、これらは製造工程でSDSポリアクリルアミド電気泳動の検出限度以下となるとのデータが示された。したがって、重合体の試験法としてSDSポリアクリルアミド電気泳動を採用した。緩衝液成分として、酢酸アンモニウムを用いていることから、幅をもった規格として酢酸アンモニウム量を規定した。原案では発熱性物質が規定されていたが、エンドトキシンへ変更することとした。定量法として、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞のセルモロイキン依存的な増殖活性を指標として、IL-2標準品を用いて定量する方法を採用した。また、別にたん白質量を測定し、比活性を求めることとした。貯法温度は、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下とし、滅菌した気密容器を用いることとした。

## ⑦ テセロイキン

テセロイキンの本質は組換えDNA技術によって作られるメチオニル化IL-2であり、進行腎細胞がん、悪性黒色腫、血管肉腫などに点滴静注ないしは皮下投与される。

基原、性状、確認試験、pH、純度試験、エンドトキシン、比活性、定量法が設定された。確認試験として、IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験、構成アミノ酸分析法、SDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量、等電点電気泳動法を採用した。中和抗体を用いた生物活性抑制試験では、定量法を準用し、生物活性の中和率を規格として採用した。分子量および等電点の規格は、標準品を用いるのではなく標準物質から算出した分子量や等電点の値を規格として設定するこ

ととした。純度試験として、大腸菌由来たん白質、テトラサイクリン塩酸塩、デスメチオニル体、二量体、その他の異種たん白質、酢酸を設定した。大腸菌由来たん白質は、当初イムノラジオメトリックアッセイ法を採用していたがイムノエンザイモメトリック法に変更した。

テセロイキンは、メチオニル化体であるために、メチオニンがはずれたデスメチオニル化体の量を液体クロマトグラフィー法を用いて求めることにした。二量体およびその他の異種たん白質に関して、それぞれ液体クロマトグラフィー法を用いる試験法を採用した。定量法として、IL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を採用し、IL-2標準品を用いて力価を求めることとした。また、別にたん白質定量試験より、テセロイキンのたん白質量を求め、比活性を規格として採用した。貯法温度として $-10^{\circ}\text{C}$ 以下とし、密封容器に保存することとした。

## ⑧ 注射用テセロイキン

テセロイキン注射液として、基原、製法、性状、確認試験、pH、純度試験、乾燥減量、エンドトキシン、製剤均一性、不溶性異物、不溶性微粒子、無菌、定量法を規定した。確認試験として、テセロイキンの確認試験を準用し、IL-2中和抗体を用いた生物活性抑制の確認試験、およびSDSポリアクリルアミド電気泳動による分子量の試験を規定した。定量法としては、同様に、テセロイキン定量法のIL-2依存性マウスナチュラルキラー細胞を用いた増殖能促進作用を指標とする生物活性試験を準用することとした。貯法温度は、凍結を避けた $10^{\circ}\text{C}$ 以下とし、凍結乾燥品であることから、密封容器に保存することとした。



## 物薬品各条審議のポイントと 物薬品改正の基本方針と の対応

生物薬品改正の基本方針については最初に述べたが、この基本方針に沿った各条審議での対応については以下のとおりである。

ゴナドレリン酢酸塩およびオキシトシンでは当初、生物活性試験が規定されていたが、収載にあたって物理的定量法へ変更を行った。セラペプターゼの酵素製剤の原薬について、単位質量当たりの範囲のある含量規格の

設定を行うこととした。発熱性物質を規定していたセルモロイキンでは、エンドトキシンに替えることになった。また、リゾチーム塩酸塩では、試験法の見直しを行い、より精度の高い方法を採用した。また、一般的に規格値の見直しを求め、安定性を考慮した実測値に基づいた規格値を設定した。

今回の収載品目ではセルモロイキンとテセロイキンの同種同効医薬品を収載した。これらの審議にあたっては、共通の標準品を用いるものであり、各条の構成などの調和を図った。



### 新しい小型機械 “第24号鉢傾斜型”が 出来ました

《カタログ贈呈》

攪拌・混合・ねり合せ作業を精密に組み合わせ、貴重な薬剤をムラなく安定して製造する機械として、大学医学部、病院、薬局にて長年ご愛用頂いています。小型石川式攪拌擂潰機にウォーム機構の第24号型が開発され、ご好評を頂いております。

**AGA型用に  
高純度アルミナ鉢・杵  
新発売!!**

加熱型・冷却型もあります。



標準第24号機に比べ

- ①ずっと静かな運転
- ②鉢をハンドルで傾斜出来ますので鉢・杵の着脱が容易
- ③大型機と同じウォーム機構ですから一段と安定した作業を致します

用途——

軟膏・散薬・顆粒・  
ローション・パップ剤・  
リニメント剤

株式会社 石川工場

〒135-0053

東京都江東区辰巳1-1-8

TEL 03-3522-1018 / FAX 03-3522-1017

http://www.ishikawakojo.jp