

# 日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 抗生物質の品質評価手法の標準化に関する研究  
(英語) Standardization of quality evaluation methods for antibiotics

研究開発実施期間: 平成30年4月1日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 鈴木里和  
(英語) Satowa Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター 室長  
(英語) Chief, Antimicrobial Resistance Research Center, National Institute of Infectious Diseases

## II 研究開発の概要

近年、抗生物質医薬品の品質管理は、その安定供給とも関連するため、薬事上の重要性が増している。製薬企業における品質試験には日本薬局方(日局)標準品が必要であり、その安定供給は医薬品の品質確保上不可欠である。日局抗生物質標準品は国立感染症研究所(感染研)が製造・交付しているが、組織制度上の問題によりその供給能力には限界があった。本研究班の検討に基づき、抗生物質以外の日局標準品の製造・頒布を担い、標準品供給能力のより高いRS財団に、交付本数の多い17品目の日局抗生物質標準品の製造・交付業務が移管された。過去の試験成績の解析および実施条件の検討などを進めて移管した17品目は、品質管理試験が安定して実施可能であることを本研究班で検証し、抗生物質医薬品の臨床現場における使用状況を検討して選定したものである。

また、移管に伴う日局抗生物質標準品の品質管理試験法は、これまで感染研のみで実施されていたため現在の分析技術を踏まえた妥当性を議論する場が乏しかった。本研究により、抗生物質標準品の品質評価試験法について、様々な観点からの研究を開始する端緒となり、その意義は大きかったと考えられる。

移管品目の一部についてはRS財団においてロット更新を研究期間中に実施した。力価制定にあたり、これまでLot to lotの相対定量法から、絶対定量法であるマスバランス法の導入を開始した。メロペネム標準品とアンピシリン標準品については従来法(HPLC法による相対定量法)とマスバランス法とで力価を測定し比較し両方とも同値が得られた。今後はマスバランス法による標準品の力価制定をより多くの品目に適応していくことが望まれる。ただし、力価制定法を相対定量法からマスバランス法へ置き換えの可否を判断する際、類縁物質が多いなどの理由でマスバランス法の測定精度が悪い場合、両法で得られた結果が乖離した場合、及び現在の力価がすでに理論力価を超えている場合などについては、慎重に置き

換え時の対応を検討する必要がある。また、水分測定法は容量滴定法から試料量の低減化可能な電量滴定法に変更した。さらに、定量及び純度試験の HPLC 法の測定条件を改良し、より精度の高い測定条件を確立した。

力価に影響を及ぼす水分含量は、本研究を進める中でその体系的評価の必要性が認識された。移管品目を含む 35 品目について水分収着測定用装置により吸湿性を評価したところ、きわめて多様であることが明らかとなり、特に糖やペプチドを含む構造の抗生物質（例：アミノグリコシド系）では吸湿性が高く製造時や品質試験時の湿度管理が重要と考えられた。またクリンダマイシンリン酸エステルは製造所の違いにより吸湿性が異なり、そのため水分値が異なるものがあった。この異なる製造所由来のクリンダマイシンリン酸エステルは赤外吸収スペクトル等の物性測定でも同様に差を認め、結晶形の違いに起因する可能性が示唆され、今後日局への情報の記載が有用と考えられた。近年、抗生物質医薬品の製造販売承認が開発メーカーからジェネリック医薬品メーカー等に継承される品目が増えている。そのため、開発メーカーから提供されたこれまでの標準品の製造所とは異なる製造所からの標準品原料候補の提供が今後増えると思われる。ロット更新の際には吸湿性の評価を同時に実施することの重要性が明らかとなった。

抗生物質の力価試験のうちバイオアッセイ法については、実施される品目数が少ないこと、手法として古典的であること、長年にわたり阻止円の測定に用いる専用機器が国内に普及していた事からその技術的検討がなされることが少なかった。本研究では、国内で製造販売され広く普及していた専用機器の販売終了を受け、現在国内で販売され海外などでも使用されている測定機器の互換性についての検証と確認を実施した。現在の日局の抗生物質の微生物学的力価試験法（バイオアッセイ）には、形成された阻止円の「直径」を測定する旨明記されている。しかし、現在販売中の測定機器の中には、阻止円の面積からのみ直径を算出するものがある。日局抗生物質標準品の 7 品目について直径を直接測定する従来機種と面積より直径を算出する新機種とを平行してバイオアッセイを実施、測定力価の同等性を確認した。直径を直接測定する従来機種（ゾーンアナライザー）と面積より直径を算出する新機種（ProtoCOL3）とで測定した力価の比は 7 品目の平均で 0.989 とほぼ同等の結果であり、互換可能であることが確認された。しかしその一方で ProtoCOL3 のほうが、ゾーンアナライザーよりもわずかに力価が高く測定される傾向を認めた。これは、測定用のカメラの軸が測定プレートの中心よりわずかにずれていることによるものであり、カメラの軸に測定プレートの中心を合致させるためのテンプレートを使用するなど、補正によってこの差異は調整可能と思われた。ProtoCOL3 といった機器は測定精度が高くかつ日本国外でも広く使用されている。試験法の向上および国際協調の面から、面積からの直径の算出を認める旨、日局の試験法記載の変更が望ましいと考えられた。日局試験法の記載内容を変更するための手続きについては、研究班での検証結果を踏まえてすすめている。

新たな品質管理試験法開発の試みとして、NMR 法を用いて、確認試験にて日局に記載されていない各標準品も含め、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルのデータを蓄積し、ライブラリー化した。これは長期保存における分解産物の質的变化を検出・確認すると共に、近年日局で検討が進められている定量 NMR 法の抗生物質標準品への応用である。RS 財団に移管した品目のうち、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシン、スルバクタム、ミノサイクリン塩酸塩、エピルビシン塩酸塩、バンコマイシン塩酸塩、タゾバクタム、セフトリアキソンナトリウム、セフォチアム塩酸塩、セフェピム塩酸塩、ペペラシリンではそれぞれ基準物質と混合した重溶媒溶液において測定時間内で安定であることを確認した。定量 NMR 法による抗生物質標準品の純度は、試料提示の力価と比較したところ、クラリスロマイシン、ロキシスロマイシン、スルバクタム、ミノサイクリン塩酸塩、エピルビシン塩酸塩では提示力価と比べて ±1.5% 以内の誤差で純度を得ることができた。また、タゾバクタム、ペペラシリンで 1% 以内、セフトリアキソンナトリウム、セフォチアム塩酸塩、セフェピム塩酸塩では 2.1~2.7% の誤差を示した。吸湿性が高いため単位重量あたりの力価が未記載のバンコマイシン塩酸塩は、定量 NMR 用標準物質を基に含有量を計算した結果、試料 1 瓶あたり 470.7 mg の値を得た。今後はこれらの情報をどのように公開し、かつ品質評価試験に活用するかを検討が必要となる。さらに現時点で移管予定のない品目についての同様の解析が必要と考えられる。

分析技術の進歩により、これまで日局抗生物質の定量法はβ-ラクタム系を中心にバイオアッセイから、定量性、精度の優れた HPLC 法などの物理的試験法に変更されてきている。一方で、単一物質でない、もしくは紫外線吸収がない等の理由で、力価測定がバイオアッセイ法でのみで規定されている抗生物質が存在する。バイオアッセイは、その手法に付随する測定力価のばらつきの問題があり、標準品力価制定の際に問題が生じやすい。本研究では、RS 財団への移管を見込んでいる品目のうち、複合医薬品であるゲンタマイシン硫酸塩、及びアムホテリシン B を対象に、力価測定法、純度試験法につき、現在の手法よりも定量性、精度の高い新たな手法を HPLC-MS/MS 等を用いて開発することを目的に研究を遂行した。ゲンタマイシン硫酸塩に関しては、その主要な構成成分であるゲンタマイシン C1, C1a, C2 を親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) で分離し、三連四重極型質量分析計を用いて、感度・特異性高く定量する系を構築した。本定量系により、単離した各成分を用いて検量線を作成することで、標準品に含まれる各成分の定量が可能であることを示した。さらに主要な不純物であるガラミン、シソマイシンの定量法を LC-MS/MS により構築した。本評価系は、日局収載の薄層クロマトグラフィーの代替法としてゲンタマイシン硫酸塩の成分含量比の算出、及び純度試験に有用であり、標準品のロット更新を想定した試験においてロット間の各成分含量の詳細な比較を可能にした。さらに、各成分を定量し、それを力価に換算する方法の開発をすすめた。力価換算にあたってはゲンタマイシンの各成分の解析と力価測定も実施した。それによりロットの異なるゲンタマイシンにおいて成分比が異なること、成分ごとの力価をバイオアッセイにて測定したところ日局に収載されている成分別の力価の比 C1 : C2 : C1a = 1 : 1.35 : 1 とは異なることが明らかとなった。また、力価換算では、各成分のフリー体としての純度を考慮する必要があることを示した。ゲンタマイシン硫酸塩は、吸湿性が高いこと、また、保存条件により吸湿率が異なることから、乾燥減量を測定し、力価定量法は、dried base (乾燥後の重量あたり) で行うことにより、異なるロット間で比較できることを明らかにした。

アムホテリシン B について、HPLC 法を用いた品質評価法を開発した。日局アムホテリシン B 標準品のロット更新を想定して、純度試験を行い、日局収載の紫外可視吸光光度法と比較して、本評価系は、不純物であるアムホテリシン A, X1, X2 を分離して、評価可能であることを示した。一方、純度試験においてアムホテリシン A の限度値算出の際に対照として用いるナスタチンは、標準溶液の調製後、分解によるピーク面積値の低下が経時的に起こることが示され、HPLC 法による品質評価において注意を要すると考えられた。得られた成果は、抗生物質標準品の品質管理の基礎的情報として利用可能であると共に、構築した系により多面的な制定力価の評価が可能となり、標準品の日常の品質管理やバッチ間のキャリブレーションが容易になり、有効で安全な医薬品の供給に貢献できると考える。

Reference Standards of antibiotics for Japanese pharmacopoeia (JP) have been prepared by National Institute of Infectious Diseases (NIID), while other drugs are prepared by Pharmaceutical and Medical device Regulatory Science Society (RS) of Japan. The recent concern of stable supply of antibiotics is related to quality assurance of them, especially in generic drug manufacturers. It resulted in an increased need for JP antibiotic reference standards, which exceeds the supply ability of NIID. Thus, the transfer of preparation of 17 JP antibiotics reference standards from NIID to RS was executed. In the transfer process, quality assessment methods of JP antibiotics reference standards were verified for standardization between NIID and RS. In addition, more robust methods to determine the potency of JP standards as mass-balance methods were introduced. To improve the quality assurance of JP antibiotics reference standards, a systematic review of water content was also assessed by moisture absorbing property.

A microbiological assay is a bioassay that determines the potency of an antibiotic based on its antimicrobial activity which is quantified by measuring the inhibitory zone diameter. The Zone Analyzer Systems ZA-FII (ZA; System Science, Co., Tokyo, Japan) is an automated zone diameter measurement device widely used in Japan. However, because of the discontinuation of ZA production, the suitability of ProtoCOL3 (Proto; Synoptics Ltd., Cambridge, England) as a substitute device to ZA was assessed. Seven antibiotics were subjected to bioassay using the cylinder-plates method as outlined in the JP. ZA measures the diameter directly (as defined in JP), whereas Proto calculates the diameter from measurements of the inhibitory zone area. The zone diameters on the plates were measured using both devices for comparative analysis. For the seven antibiotic bioassays, the average potency ratio of the two devices was 0.989, which is an acceptable margin. In conclusion, Proto can be used as a substitute device for ZA.

To establish a method for detecting qualitative changes in antibiotic reference standards during long-term storage, we applied the quantitative NMR method. Furthermore, for several multicomponent antibiotics without typical UV absorption, their potency cannot be directly determined by physical methods such as HPLC, and the traditional microbial assay is still used. In this study, focusing on gentamicin sulfate and amphotericin B, we aimed to develop the quality control procedures using HPLC-MS/MS applicable for assay and purity test, which would be superior to those adopted in JP monographs.

GM components (C1, C1a, and C2) and major impurities (sisomicin and garamine) were separated by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), and MS analysis was performed by selective reaction monitoring (SRM). By creating a calibration curve using the isolated components, C1, C1a, and C2, contents and their ratios of each component containing JP reference standard were able to determine. Impurity (%) was calculated based on the amounts of sisomicin and garamine. The developed analytical procedure using HPLC-MS/MS is useful for routine quality control of GM as an alternative to thin-layer chromatography. In addition, gentamicin sulfate was shown to be very hygroscopic, and water contents were variable depending on the storage conditions. Therefore we should measure the loss on drying, and its potency should be expressed as a dried base. Furthermore, to convert contents into the potency of GM samples, single components of C1, C2, C1a were prepared and their purities and potencies were analyzed.

We established an HPLC method for the determination of the purity of amphotericin B. The physical method we constructed by HPLC was capable to determine the impurity (%) of not only

amphotericin A but also amphotericin X1 and X2.

Our results provide useful information for quality control of antibiotic JP reference standards and help their potency determination, which contributes to the safe and effective supply of antibiotic medicine.