

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開発および標準化に関する研究  
(英語) Study of development and standardization of quality assessment methods for antibiotics

研究開発実施期間: 令和3年7月1日～令和6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

研究開発の成果およびその意義等

抗生物質は開発より時間の経過しているものが多く、開発メーカーが製造販売承認を他社に承継する傾向も強いことから、国内の需要の多くをジェネリック医薬品メーカーが担っている。そのため、日本薬局方(JP)の品質評価法に最新の技術が反映されにくく、最新の測定法がより反映されている米国薬局方(USP)や欧州薬局方(EP)との調和が不十分な手法も散見される。特に微生物学的力価測定法(バイオアッセイ法)は実施品目数が約30品目のみと少なく、これまで十分な標準化の検討がなされてこなかった。

バイオアッセイ法においてJPに明記されていない具体的な試験手順のうち、力価に明らかな影響を生じうるものとして、試料溶液と標準溶液の注入順であることが本研究により明らかとなり、品目によっては注入順を入れ替えることで最大10%の差異が生じた。USPでは注入順の影響を受けない方法がとられており、EPでは注入時間の差異に留意する旨の記載があったが、JPには記載を認めなかった。また、3局のバイオアッセイ法においてJPでは、測定された力価の信頼区間など統計学的処理法の規定がないが、EP, USPでは規定されており、一定の信頼区間におさめるため、繰り返し試験回数に関しての規定もある。一方、JPでは、これらの規定がないだけでなく、繰り返し試験回数は1アッセイあたり5回と定められている。アッセイ内で注入順をランダム化することでアッセイ間の差異はなくなるが、平行性が担保されない、極めて広い信頼区間になる等、試験の精度への問題が考えられた。

新たに得られたこれらの知見より、標準品の値付けなど高い精度および頑健性を求められる場合は、注入順を入れ替えた複数の試験を実施し、その平均値を採用するのが妥当と考えられた。一方、メーカーが実施する場合、試験回数増加は実行性が低くなりうることから、JP に注入順について明記することで、すべての試験実施機関が同一の条件で測定できるよう整備する必要性が明らかとなった。

バイオアッセイ法と異なり、HPLC 法で測定される抗生物質標準品の力価は、ばらつきの少ない安定した測定値が得られる。しかし、日本抗生物質医薬品基準が用いられた当時にバイオアッセイ法で制定された力価は lot to lot の相対評価で定めてきたことに加え、精製技術の向上により力価が 1000 $\mu$ g/mg を超える品目が存在し、問題となっていた。標準品の交付がレギュラトリーサイエンス (RS) 財団標準品センターに移管したことに伴い、類縁物質や HPLC での力価測定との比較の結果、可能な品目についてはマスバランス法での力価算定を行い、過去のロットとの整合性を担保したうえで、標準品の力価制定法を変更することとした。これにより頑健かつ理論的にも担保された抗生物質標準品の力価制定が可能となった。

また、抗生物質標準品の力価の制定時にはほとんどの品目で水分値 (乾燥減量を含む) が必要となるが、JP の多くの品目では試料量の多い容量滴定法が記載されている。水分特性を体系的に評価したうえで少量の試料で測定可能な電量滴定法に互換可能かを検討した。また乾燥減量法においては試料を減量することによる影響について評価した。セフォチアム塩酸塩、クリンダマイシンリン酸エステル、セフポドキシムプロキセチルでは電量滴定法に、アミカシン硫酸塩では試料の減量が可能であることを明らかにした。これにより、過去の検討と合わせ、計 16 品目における試料の低減を実現した。さらに、体系的な水分特性の評価から、クリンダマイシンリン酸エステルでは、Lot 間で水分特性が異なることを見出し、IR, XPRD を実施し結晶形が異なることを明らかにした。これに基づき、本品目の JP 各条に、結晶多型に関する記述と IR 再処理規定の追加、および参照スペクトルの削除について要望を提出した。

抗生物質標準品の一部は交付本数が極めて限定的であることから、製造から既に 10 年以上経過しているものが約 30 品目程度存在する。抗生物質標準品の長期安定性等の評価手法については定まったものがないことから、定量 NMR (qNMR) 試料調製条件等を検討し、新旧標準品について qNMR 法を用いて純度を求めることで長期保存安定性試験法を検証した。ロット更新が 15 年ぶりにされることとなったコリスチン硫酸塩は、コリスチン A,B 混合物であることから、NMR 測定溶媒の検討を行い、重ピリジン-重水=2:10 で高磁場メチル基シグナルの分離が良好となり、A,B のシグナルが分離可能となった。さらに室温付近の測定温度 20~30 $^{\circ}$ C においても高磁場付近のシグナルはほぼ同様の分離を示し、試料濃度 5~20 mg/ml において、化学シフトの変化が若干観測されたが、高磁場付近シグナルはほぼ同様の分離であることが判明した。この条件で定量 NMR 測定を行い、A,B の含有率を算出したところ、コリスチン硫酸塩 LotA (旧ロット) および LotB1 (新ロット) の A,B の含有率は、それぞれ硫酸塩 として 57.5%、28.4% および 69.8%、12.5% であった。新旧ロット間で A, B 含有率の和はほぼ同様であったが、A, B の比率は異なることが判明した。また、コリスチンメタンサルホン酸ナトリウムおよびアズトレオナムについて qNMR 法の適用を検討しコリスチンメタンサルホン酸ナトリウムは、局法記載の性状をもとに溶媒の検討を行った検討内ではいずれもブロードなシグナルを示したために、qNMR を用いた純度算出は困難であった。本品については、さらに試料調製条件の検討が必要である。アズトレオナムは、市販試薬を用いて局法記載の性状をもとに試料調製条件の検討を行い、D<sub>2</sub>O 溶媒にて qNMR 測定を行ったところ、シグナルの分離も良好で、定量に用いた 7.14 ppm のシグナルの面積値は 6 時間は安定であった。これを用いて本品の純度解析を行った結果、91.1% (不確かさ 0.4%) の値を得た。本条件を用いて標準品の純度を求めることで長期安定性試験に寄与できると考えられた。

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のうち、LC-MS/MS 法等を用いた定量法、及び不純物等の測定法を開発すると共に、開発した品質評価法の実践的検証を行い、その適応範囲を明確にすることを目的に研究を遂行した。これにより、測定精度に技術的限界のあるバイオアッセイ法の力価測定品目においてより頑健性の高い力価を得ることを目指した。

ゲンタマイシン硫酸塩に関しては、LC-MS/MS 法により標準品に含まれる各成分量を算出し、これとバイオアッセイ法で求めた各成分の力価から、標準品としての力価を換算する手法を開発した。なお、複合医薬品であるゲンタマイシン硫酸塩に関して、各成分の局方標準品が存在しないため、市販のゲンタマイシン混合物からそれぞれ目的の成分の単離を研究班にて検討した。その結果、アンバーライト CG50 およびシリカゲルカラムを複数回用いることでゲンタマイシン C1、C1a および C2 を硫酸塩として単離した。得られたゲンタマイシン C1、C1a および C2 は、定量 NMR より、それぞれフリー体換算で  $60.9 \pm 1.2\%$ 、 $58.2 \pm 1.1\%$ 、 $61.8 \pm 0.6\%$  ( $k = 2$ ) の純度を示し、これを測定・算出方法に用いた。

本定量系を用いて、異なるロットの3種類の標準品の力価を定量したところ、類縁物質シソマイシン含量が多い標準品を除いて、算出された力価は、バイオアッセイ法に基づく制定力価とほぼ一致し、本手法の頑健性が証明された。シソマイシン含量が多い標準品では、算出された力価は制定力価より低い値となったが、これは、ゲンタマイシン3主成分の含量とその理論力価を指標とした本定量法と、全成分の抗菌活性を指標としたバイオアッセイ法との力価算出の違いが反映されたためと考える。本手法は、標準品のロット更新時の品質評価における主成分の定量及び類縁物質の純度試験、成分含量比の算出に適応可能であり、バイオアッセイ法による力価制定を補完しうる有効な手法となりうる。本定量法は、ゲンタマイシン注射剤1種の表示力価を95%以上の正確性で定量できたことから、注射剤の定量にも適応できる可能性が示唆された。また、定量に用いる各成分の標品は、研究班内の共同研究者から2ロット供与されたが、それらの成分の力価比は、ほぼ一致しており、既報 (Acta Pharmaceutica Sinica 2012, 47: 1660-1666) と矛盾しなかったが、日局に記載されている成分別の力価の比 C1 : C2 : C1a = 1 : 1.35 : 1 とは異なった。今後は日局での力価比設定の経緯を含め、検討が必要である。

アムホテリシン B に関して、HPLC 法と LC-MS 法の2種の手法を用いた品質評価系を開発し、標準品と製剤の品質評価を実施し、適応範囲を実践的に検討した。開発した2種の評価系は、Amphotericin A の他、ヘプタエン構造体の Amphotericin X1 及び X2 をそれぞれ分離して評価可能であり、不純物含量が少ない標準品、注射剤の定量に適用可能であった。一方で、Amphotericin A や Amphotericin X1 等の不純物を多く含む標準品や経口剤の場合、本法で算出した力価と制定力価との間に差が生じることが明らかになり、抗菌活性を有する不純物が力価に寄与していることが原因と考えられた。HPLC 法で得られたピークの多変量解析により制定力価を予測する回帰モデルに寄与する成分として、Amphotericin B の他、Amphotericin X1, Amphotericin A, 及び未知成分6種が抽出された。LC-MS 法では、未知の不純物が、Amphotericin A や X1 の異性体である可能性が示唆された。今後、HPLC 法と LC-MS 法の両法の結果を照合し、活性を有する不純物を同定し、その含量をどのように力価に反映していくかが今後の課題である。バンコマイシン塩酸塩に関しては、JP, EP, USP の純度試験で使用される HPLC 法を比較し、検出される不純物や主成分の定量範囲を確認した。

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られた。

For antibiotics, the latest technologies are less likely to be reflected to Japanese Pharmacopoeia (JP), and less harmonized with the United States Pharmacopoeia (USP) and the European Pharmacopoeia (EP). Particularly, in the microbiological potency assay (bioassay) standardization has not been adequately considered.

In this study, we revealed that the order of injection of the sample solution and the standard solution can have a significant impact on potency as a difference up to 10%. Furthermore, in the 3 pharmacopoeias, only the JP does not address statistical processing methods and in addition, EP and USP specify repeated test counts to maintain a level of confidence interval. Based on these new findings, it was considered appropriate to conduct multiple tests with different injection orders and adopt the average value for the potency of reference standard. On the other hand, for tests conducted by manufacturers, specifying the injection order in JP may be required.

The availability of mass balance methods for defining the potency of antibiotics JP reference standard, consistency with past lots which defined by lot-to-lot comparison of HPLC methods were conducted and confirmed that mass balance methods are applicable. Additionally, while water content is required for calculating the potency of JP antibiotic reference standards, we systematically evaluated water content characteristics of antibiotics. This reveals different water absorption characteristics between lots for Clindamycin phosphate ester, and through infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction, it was found that the crystalline form differed. Based on this, requests were made to include descriptions of polymorphism and additional provisions for infrared reprocessing in the JP for this item.

Since there are no established evaluation methods for long-term stability, quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) sample preparation conditions were considered, and long-term stability testing methods were verified by using qNMR. In this study qNMR methods were established for colistin sulfate, which is a mixture of colistin A and B, and aztreonam were established. For colistin methanesulfonate, further investigation of sample preparation conditions is needed.

Gentamicin sulfate, Amphotericin B, and Vancomycin are antibiotics which potency is assayed using microbiological methods (bioassays) in JP monographs. Physicochemical methods for these antibiotics complement bioassay and verify their robustness through practical measurements. For gentamicin sulfate, LC-MS/MS measured contents of each component (C1, C1a, C2) in JP Reference standards. Total potencies were calculated based on contents and theoretical potency. Potencies agreed with bioassay-based potencies except for high sisomicin contents. This method quantifies potency, purity of related substances, and content ratio of active principles. For amphotericin B, HPLC and LC-MS methods were developed for purity tests and quantification of reference standards, injections, and oral preparations. These methods separated amphotericin A, X1, and X2, useful for determining potencies with low impurity content. Vancomycin hydrochloride purity tests were compared among JP, EP, and USP HPLC methods, confirming the quantitative range of detected impurities and main components. These results inform antibiotic JP reference standard quality control and aid in potency determination, contributing to safe and effective antibiotic medicine supply.