

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) 先進的分析法を用いた広範な医薬品等の微量不純物の管理に関する研究  
(英語)

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) 山本 栄一  
(英語) Eiichi Yamamoto

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・部長  
(英語) Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences

## II 研究開発の概要

### 研究開発の成果およびその意義等

本研究では、1) 信頼性の高い評価・管理手法の開発、2) 原薬・製剤の製造工程を中心とした生成または混入の抑制、3) 微量変異原性不純物のリスク評価に関する検討、さらに4) 国内初の指針を策定することにより、国内で流通する医薬品の安全性を向上させるとともに、ジェネリック医薬品を含む医薬品全般の効率的な開発・審査と高品質医薬品の安定供給の確保に繋げる事を目的とした。

信頼性の高い評価・管理手法の開発を目的とした医薬品製剤や薬物中の変異原性不純物等の微量不純物の高感度定量法の開発においては、薬物中の NDMA 等のニトロソアミンを主たるモデルとして、液体クロマトグラフィー (LC)、ガスクロマトグラフィー (GC) 及び超臨界流体クロマトグラフィー (SFC) を用いる複数の分析・評価手法を開発した。LC を用いる評価法の概要は以下のとおりである。多様な物理化学的特性を有する医薬品中の NDMA を LC-大気圧化学イオン化 (APCI) -タンデム質量分析法 (MS/MS) で高感度定量するために、多様な物理化学的特性を示す原薬をモデルとして固相抽出を用いた医薬品中の NDMA のオフライン分離法を開発した。また、薬物をギ酸に溶解させ、次いで晶析により試料から医薬品有効成分を除去することで、難水溶性薬物試料中のニトロソアミン類を LC 紫外可視分光 (UV) で高感度定量するための試料調製法を世界初で開発した。この方法により、難水溶性の酸性アトルバスタチンと塩基性イトラコナゾールに添加した 8 種類の NA を LC-UV により高感度に定量できた。本法の感度は従来法と比較して 100 倍以上となった。

GC を用いる研究では、ニトロソアミン類の混入が、合成過程における生成、共用設備からの交叉汚染、回収溶媒や試薬中への混入、一部の包装資材の使用等、要因が多岐にわたることを鑑みて、製剤の保存中におけるニトロソアミン類生成リスクの簡易スクリーニング法を開発を目的とした。具体的には、ヘッドスペース-GC/MS 法を開発し、本法を用いて、複数メーカー、複数ロットのメトホルミン塩酸塩錠の NDMA 生成リスクを評価した。メトホルミン塩酸塩錠と PTP シートを共存下で加熱することで、2 社の旧ロットでのみ NDMA が管理指標値を超えて生成することが判明した。この 2 製剤は、他の製剤と比較して、錠剤中のジメチルアミン (DMA) 量及び PTP シート中の亜硝酸量の両者が多く含まれていた。同社の新ロットを評価したところ、PTP シートの印字インクが変更された結果、亜硝酸が検出されず、現在は改善品が流通していることを確認した。また、錠剤に抗酸化剤であるアスコルビン酸を添加することで、DMA と亜硝酸のニトロソ化反応による NDMA 生成を抑制できる可能性を見出した。以上の結果より、リスク因子である DMA と亜硝酸の共存を回避することに加えて、ニトロソ化反応を抑制する工夫も有益と考えられた。

オンライン超臨界流体抽出 (SFE) /SFC/MS を用いた医薬品中の不純物の迅速分析法の研究では、医薬品中の微量不純物のうち高リスクの変異原性不純物の混入の抑制のための信頼性の高い評価・管理手法の開発を目指し、ニトロソアミン類を対象として、試料抽出・分離・分析が自動化された“オンライン SFE/SFC/MS (超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフ/質量分析計)” システムを用いた医薬品中の微量不純物の全自動一斉迅速分析法を検討した。ニトロソアミン類 17 化合物 (NDMA、NDBA、NDPA、NMEA、NDEA、Npyr、NPiP、NMOR、NDPhA、NDIPA、NEIPA、NMBA、NMbr、NDELA、NMPPhA、NMEPhA、MNPaz) の混合液と原薬ラニチジンのメタノール溶液を用いて、MS 条件、SFC/MS 条件、SFE/SFC/MS 条件を段階的に検討し、標準溶液の一斉抽出分離検出法を確立した。このとき、比較的イオン化率の低い 2 化合物 (NDMA と NMEA) は 100 ng、その他の 15 化合物では 40 ng の試料量で検出が可能であり、自主点検通知で許容摂取量が設定された 9 化合物は本分析系で検出可能であると考えられた。一方で、ラニチジン粉末に NDMA 溶液を添加した試料をモデルとして、SFE/SFC/MS システムによる原薬と不純物の全自動一斉分析法を検討した結果、NDMA の検出に問題はないものの、大量の原薬による SFE 抽出部及び SFC 流路の汚染が課題となることを明らかにした。

原薬・製剤の製造工程を中心とした生成または混入の抑制を目的とした研究では、ラニチジンをモデルとして、NDMA 生成、混入の抑制の評価を行った。その結果、ラニチジン中に含まれるいくつかの類縁物質から、NDMA が生成すること、さらに、生成反応機構について明らかとし、NDMA の生成に関わる化学構造を同定した。さらに、原薬や製剤中で生成する分解物の構造を予測し、その構造情報からニトロソアミン化合物の生成を予測することで、医薬品への混入リスクの予測精度向上を目指したアプローチを行った。本法の妥当性を検証するために、薬物等の分解生成物の構造を予測するソフトウェア製品 (Zeneth) でニトロソアミン化合物やニトロソアミン前駆体の生成についての評価を行った。モデルとしてラニチジン類縁物質を対象とし Zeneth による分解生成物の予測を行った結果、NDMA 前駆体が生成することを明らかとした。さらにモデルウェット実験を実施し、分解物の生成しやすさと予測結果に一定の相関があることを確認した。さらに、複数の医薬品 (ダントロレン、マニジピン、グリクラジド、インダパミド) を選択し、原薬中で生成する分解物の構造を予測し、その構造情報からニトロソアミン化合物の生成を予測することで、医薬品への混入リスクの予測精度向上を目指したアプローチを行った。本法の妥当性を検証するために、Zeneth でニトロソアミン化合物やニトロソアミン前駆体の生成についての評価を行った。その結果、原薬及びその中に含まれる類縁物質からニトロソアミン化合物が生成することが予測された。実際に、グリクラジドとインダパミドは過酸化水素存在下、特にアルカリ性条件下で分解され、N-ニトロソアミンが生成することが確認された。加えて、JAN データベースに収載されている医薬品の中で、第 2 級あるいは第 3 級アミン構造を含む約 500 品目について、N-ニトロソ化反応の予測を行った。

微量変異原性不純物のリスク評価に関する検討においては、医薬品分野において微量変異原性不純物として問題になっているニトロソアミン類について、変異原性及び発がん性ポテンシャルに応じた管理が可能かを検討することを目的に、管理指針案作成に必要な現状把握を行った。50%発がん用量 (TD50) は、根拠とする発がん性試験情報には妥当とは言えないものが含まれ、必ずしも発がん性の強さの指標として妥当とは言えない。そこで、令和 5 年度は、TD50 に代わる発がん性の強さの指標を導出するため、用量反応解析が可能と考えられる試験結果に基づき、ベンチマーク ドーズ (BMD) 法により求めた数値を基点として  $10^{-5}$  発がんリスクレベルを導出した。その後、得られた  $10^{-5}$  発がんリスクレベルと各種指標の比較検討を行った。発がん性試験情報については、Lhasa 社 Carcinogenicity Database (LCDB) から、ラットを用い投与期間が 100 週前後であるもの、かつ投与用量が 2 用量以上設定されている試験を抽出し、それらの試験結果を精査した。上記条件に合致した発がん性試験情報があったのは、141 物質中 20 物質であった。用量相関性が認められた腫瘍 (あるいは用量相関性がありそうな腫瘍) については、その発生頻度データを用いて EFSA Bayesian Bridge sampling MCMC method (v 0.0.0.9073) で BMDL10 を計算した。導出した 20 物質の  $10^{-5}$  発がんリスクレベルは、最小値が 6.8 ng/day/body (CAS. 614-00-6, N-Nitroso-N-methylaniline)、最大値が 816,666 ng/day/body (CAS. 86-30-6, N-Nitroso-N,N-diallylamine) であった。得られた  $10^{-5}$  発がんリスクレベルと各物質の CLogP 値、 $\alpha$  位の電子密度データとの相関性を検索したが、各値との相関性は認められなかった。また、EMA が提案している CPCA カテゴリー及び Acceptable Intake (AI) 値を検索し、本検討で導出した  $10^{-5}$  発がんリスクレベルと比較した結果、対象とした 20 物質の多くが CPCA カテゴリーあるいは既存/推定 AI 値が示す発がん性の強さと概ね一致していることが分かった。

## Study overview

The purpose of this project is to improve the safety of pharmaceutical products distributed in Japan and to ensure the efficient development, review, and stable supply of high-quality pharmaceutical products, including generics, by 1) developing reliable evaluation and control methods, 2) controlling the generation and contamination of APIs and drug products, especially in the manufacturing process, 3) studying the risk assessment of trace mutagenic impurities, and 4) establishing the first guidelines in Japan. The purpose of this study is to improve the safety of pharmaceutical products distributed in Japan, to ensure efficient development and review of pharmaceutical products in general, including generics, and to ensure a stable supply of high quality pharmaceutical products.

In developing reliable evaluation and control methods, first, for sensitive determination of NDMA in pharmaceuticals by LC-atmospheric pressure chemical ionization (APCI)-tandem mass spectrometry (MS/MS), we developed an off-line separation method for NDMA using solid-phase extraction, using APIs that exhibit diverse physicochemical properties as models. We developed the world's first pretreatment method for simultaneous high-sensitive determination of low-molecular-weight nitrosamines in poorly water-soluble drugs by LC-UV, and confirmed its usefulness. In headspace-GC/MS, we evaluated the risk of NDMA formation for metformin hydrochloride tablets from multiple manufacturers and multiple lots, and found that avoiding the coexistence of DMA and nitrous acid, which are risk factors, leads to a reduction in the risk of NDMA formation. For on-line SFE/SFC/MS, we investigated the SFE/SFC/MS conditions using a mixture of 17 nitrosamines and a methanol solution of the API ranitidine, and established a simultaneous detection method for the standard solutions. On the other hand, a fully automated simultaneous analysis method was examined using a sample of ranitidine powder with NDMA solution as a model, and contamination of the equipment by a large amount of API became an issue.

In controlling the generation and contamination of APIs and drug products, especially in the manufacturing process, we predicted the structure of the degradation products formed in the API and the formation of nitrosamine compounds from the secondary degradation products using a software (Zeneth), and demonstrated the validity of the results through wet experiments. In addition, N-nitrosation reactions were predicted for about 500 drugs listed in the JAN database that contain secondary or tertiary amine structures.

In studying the risk assessment of trace mutagenic impurities, to derive an alternative index of carcinogenicity to the TD50, a  $10^{-5}$  carcinogenicity risk level was derived based on the benchmark dose-response method using the Lhasa Carcinogenicity Database. The results of studies in rats that were administered for approximately 100 weeks and at two or more doses were carefully examined using the Lhasa Carcinogenicity Database (Lhasa). The derived  $10^{-5}$  cancer risk levels for the 20 substances were 6.8 ng/day/body minimum and 816,666 ng/day/body maximum. In addition, most of the 20 substances covered were generally consistent with the carcinogenic strengths indicated by the CPCA categories or existing/estimated AI values proposed by the EMA.