

医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の定量

大阪ラボラトリー 小西 太・松井 茜・大神 泰孝

1 はじめに

医薬品の安全性や品質、有効性については、日米欧医薬品規制調和国際会議 (ICH) にて発効されたガイドラインにより、その考え方が示され、これに基づいて管理されている。昨年 6 月、ICH より新たなガイドラインとして ICH M7「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理」(3 章にて詳述する) が最終合意に至った。当該ガイドラインの実施により、医薬品メーカーは新たに「DNA 反応性 (変異原性) 不純物」について、品質・安全性上のリスクを考慮する必要が生じている。今回は、当該ガイドラインに基づいた DNA 反応性 (変異原性) 不純物の種類、規制、管理、分析についての考え方及び分析実施例について述べる。

2 医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物

同ガイドラインによると、DNA 反応性 (変異原性) 不純物 (かつて遺伝毒性不純物とも言われていた) とは、「変異原性、即ち遺伝情報に変化を引き起こす作用を有し、ヒトに癌を引き起こす不純物」と定義されている。

DNA 反応性 (変異原性) 不純物は、低レベルの曝露でも変異を引き起こすリスクがあり、閾値レベルが低いとされている。このため、ICH Q3A/B のような既存の不純物の ICH ガイドラインでは補完できないレベルで管理する必要がある。ただし、その管理レベルは不明瞭なものが多いことから、管理上の指針となるものが求められてきた。

3 ICH M7 ガイドライン

この DNA 反応性 (変異原性) 不純物について、2006 年に EU (EMA (欧州医薬品庁, 旧 EMEA)) にて「Guideline on

the Limits of Genotoxic Impurities (遺伝毒性不純物の限度値に関するガイドライン)」が公開され、2008 年には米国 (FDA (アメリカ食品医薬品局)) においても「Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products - Recommended Approaches (製剤原料および医薬品中の遺伝毒性不純物と発がん性不純物—推奨されるアプローチ)」が公開され、DNA 反応性 (変異原性) 不純物についての考え方が示された。

その後、日米欧にて調和されたガイドライン作成に向け、2010 年に ICH M7 ガイドラインとしてトピック化された (M は Multidisciplinary, 即ち安全、品質、有効性の複合領域を指す)。当該ガイドラインは、2014 年 6 月に Step4 (ガイドラインとしての最終合意) に至り、同年 7 月 15 日に ICH の Step4 文書が公開された。2015 年には、Step5 (各極における国内規制への取入れ) が予定されている。

3.1 ICH M7 ガイドラインの適用範囲と適用時期

ガイドラインの適用範囲を表 1 に示す。

ガイドラインの適用開始時期は ICH M7 ガイドラインのホームページ上での公開日 (2014 年 7 月 15 日) から起算される。臨床開発中の医薬品については、公開後 18 ヶ月後まで、第 II b / III 相臨床試験を実施しない医薬品については、公開後 36 ヶ月後まで

は管理を求められていない。また、公開前、すでに第 II b / III 相臨床試験を開始していた分についても管理を求められない。

3.2 不純物のクラス分類の方法

ICH M7 ガイドラインにおける管理の考え方について説明する。不純物の管理にあたり、まずクラス分類を行い、不純物それぞれの許容摂取量を定める必要がある。

不純物を分類するには、まずデータベース及び文献検索による変異原性の調査を実施し、対象となる不純物について、がん原性試験及び Ames 試験により変異原性が認められた事例の有無を確認する。

分類に用いるデータが得られない場合には、コンピュータを用いて変異原性を引き起こす構造の有無を予測する。具体的には、in silico(Q)SAR システムと呼ばれるシステムを用い、互いに相補的な 2 種類のベースに基づき予測する。一つが統計ベースで、これは各種毒性試験データやヒト副作用データを元に予測する、という方法である。もう一方が知識ベースで、これは毒性のある化合物から予測する、という方法である。これらの方法により、変異原性が懸念される構造 (アラート構造、図 1) の有無を予測する。in silico(Q)SAR システムによりアラート構造が示されない場合は、変異原性はない、と結論付けることができる。一方、アラート構造を有していた場合でも、構造と毒性について専門的な知識により検

表 1 ICH M7 ガイドラインの適用範囲

| 適用対象 | 適用対象外 |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ・新原薬、新製剤、臨床開発中の医薬品 ・下記に該当する既存医薬品* <ul style="list-style-type: none"> - 新規不純物が生じたり既存不純物の増加を伴う原薬の合成法の変更申請 - 剤形変更などに伴い、新規分解物、既存の変異原性分解物の増加が懸念される既存製剤 - 製造承認申請後の追加申請 (新効能、新用量など) により新たな変異原性不純物による発がんリスクが懸念される場合 <p>*既存医薬品の解釈は各極に委ねられる</p> | <ul style="list-style-type: none"> ・生物学的製剤/バイオテクノロジー製剤、ペプチド、オリゴヌクレオチド、放射性医薬品、醗酵産物、生薬及び動植物由来の医薬品 ・進行がんを適応症とする医薬品 ・医薬品有効成分自体が遺伝毒性を有する場合 ・既存添加剤 ・新規添加剤及び包装に関連する溶出物 (ただし必要であれば対象とする) |

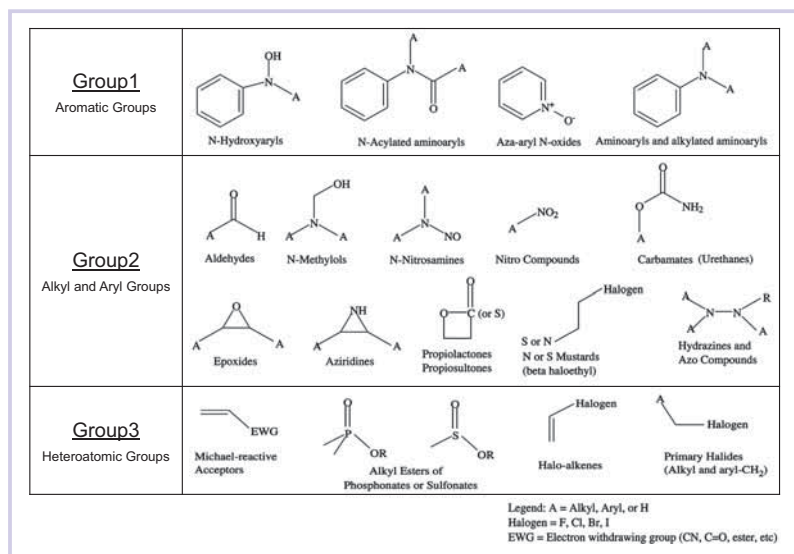


図1 変異原性を起こす可能性のあるアラート構造¹⁾

クラス1 既知の変異原性発がん物質
 →化合物に特異的な許容限度値以下で管理
 クラス2 発がん性が不明の既知の変異原性物質 ICH M7ガイドラインに基づき管理
 →許容限度値(適切なTTC)以下で管理
 クラス3 原薬の構造とは関連しないアラート構造を持ち、変異原性試験データがない物質
 →許容限度値(適切なTTC)以下で管理又はAmes試験を実施 (Ames試験にて変異原性が陽性→クラス2、陰性→クラス5)

クラス4 原薬又は原薬に類似の化合物と関連したアラート構造を持ち、非変異原性が示されている物質 ICH Q3A/Bガイドラインに基づき管理
 →非変異原性不純物として扱う
 クラス5 警告構造を持たないが、警告構造を持つが変異原性又は発がん性のないことが十分なデータにより示されている物質
 →非変異原性不純物として扱う

図2 不純物のクラス分類

表2 DNA反応性(変異原性)不純物の規制値*

| 1日摂取量(μg/day) | 投与期間 | 1ヵ月以下 | 1ヵ月超 12ヵ月まで | 1年超 10年まで | 10年超 一生まで |
|---------------|------|-------|----------------|--------------|--------------|
| 個々 | | 120 | 20 | 10 | 1.5 |
| 総量 | | 120 | 60 | 30 | 5 |

*臨床初期(14日以下の第1相)の治験薬に関しては、COC(Cohort of Concern), Class1, Class2以外の不純物を非変異原性不純物として扱ってもよい。

討し、当該化合物についてのリスクを判断することも可とされている。また、Ames試験が陰性であれば、変異原性なしと結論付けることができる。

先述した文献検索やコンピュータを用いたアラート構造の予測、あるいは実際のAmes試験の結果より、5つのクラスに分類される(図2)。クラス1~3はICH M7ガイドラインに基づき、許容摂取量を決定し、管理する必要がある。クラス4~5は、既存の不純物のICH Q3A/Bガイドラインにて管理する。

既知の変異原性発がん物質はクラス1に分類され、その化合物に特異的な許容限度値以下で管理する必要がある。次に、発がん性は不明であるが変異原性物質であることが既知である物質、こちらはクラス2に分類され、TTC(毒性学的懸念の閾値、次項にて詳述する)に基づいた許容限度値を設定する必要がある。

原薬の構造とは関連しないアラート構造を有し、変異原性のデータがない物質はクラス3に該当する。変異原性を有する可能性があるため、クラス2と同様、TTCに基づいた許容限度値にて管理することになるが、Ames試験により変異原性が示されなかった場合は、クラス5に分類されることになり、通常の不純物としての管理が可能である。逆にAmes試験により変異原性が示さ

れた場合は、クラス2に分類される。このように、クラス3については、変異原性のデータによって、分類が変わることになる。

クラス4は、原薬又は原薬に類似した化合物と関連したアラート構造を持ち、その化合物が変異原性でないことが示されている場合、当該不純物も同様に変異原性はないと判断でき、ICH Q3A/Bガイドラインによる管理で良いとされている。

最後に、アラート構造を有さない、あるいはアラート構造を有するが、変異原性または、がん原性がないことが十分に示されている化合物は、クラス5となり、ICH Q3A/Bガイドラインによる管理で良いとされている。

3.3 TTC

先述のクラス分けによりクラス2、3と分類された場合、TTCの考え方に基づき、許容限度値を設定することになる。TTCは Thresholds of Toxicological Concern、即ち毒性学的懸念の閾値を示す。毒性学的懸念の閾値とは、それ以下では、ヒトの健康にリスクを与えないであろう1日許容摂取量のことであり、医薬品においては、ヒトの生涯の発がんリスクが10万分の1を超えない“実質安全量”を推定した値である。具体的な数値として、毒性量の明らかなものを除いて、1.5 μg/day以

下に抑制することが、ガイドラインに示されている。変異原性がある、あるいは変異原性が疑われるが許容限度値に関するデータがない場合、このTTCの考え方が適用される。

ただし、アフラトキシン様化合物やニトロソ化合物等、アラート構造により強力な発がん性物質と考えられる化合物は、Cohort of concern(COC)と分類され、TTCによる管理は不適切となり、別管理となる。

TTCとして1.5 μg/dayという管理が必要であるが、投与期間に応じて、この規制値はある程度緩和される(表2)。個々の不純物は、10年以上一生まででは1.5 μg/dayが許容される1日摂取量となるが、1年超10年までで10 μg/day、1ヵ月超12ヵ月まででは20 μg/day、1ヵ月以下では120 μg/dayまで許容される。更に、14日以下の第1相臨床試験の治験薬については、クラス1、2やCOC以外の不純物は、非変異原性不純物として扱って良いとされている。

個々の許容限度値を求める具体例として、例えば用量100 mgの製剤を10年超一生まで1日1錠投与する場合、1日のDNA反応性(変異原性)不純物の摂取量の上限は1.5 μg/dayであるため、1.5 ÷ 0.1 g/dayで15 μg/g即ち、15 ppmが不純物量の許容限度値となる。

上記は個々の不純物についての考え方であるが、複数のDNA反応性(変異原性)不純物について管理する場合、その総量の規制値についての考え方がICH M7ガイドラインに示されている。1ヵ月以下の投与期間では、個々の不純物と同じ120 µg/dayであるが、1ヵ月以上の投与期間では、おおよそ個々の不純物より3倍程度の値を総量とするよう示されている。許容限度値については、個々の規制値と同様、1日摂取量の上限による計算で、不純物量の上限を求めることになる。

3.4 管理戦略

次に、規制値を実際の製造工程のどの時点で管理すべきかについて記載する。

最終製品での分析により管理する場合、規格試験の項目として管理することになる。但し、パイロットスケール連続6バッチあるいは、実生産スケール連続3バッチについて分析し、不純物の濃度が許容限度の30%未滿が示された場合は、DNA反応性(変異原性)不純物が許容限度値以上となるリスクは低いとみなすことができ、スキップ試験の対象となる。

原料や中間体等、上流工程での分析の場合、

規格試験あるいは工程内試験として実施するが、原薬における許容限度値と同じかそれ以下が判定基準となっている。但し、ラボスケールの添加実験において、許容限度の30%未滿であることを示すことができれば、原薬の時よりも高い許容限度値を判定基準としても良いとされている。

また、許容限度値よりも低くなることから説明できるのであれば、分析不要と判断することができるかとされている。

4 DNA反応性(変異原性)不純物の分析例

当社はDNA反応性(変異原性)不純物、及び変異原性が疑われる化合物の分析について、豊富な実績を持っている(表3)。ここでは、分析法を設定する上での考え方と分析の実施例を述べる。

分析法を設定する上で、まず、定量下限は規制値よりもさらに低いレベルを設定する必要がある。通常、検出限界は規制値の1/3-1/2以下、定量限界は規制値の1/2以下若しくは報告の閾値以下

であるが、企業のポリシー等により更に低いレベルでの要望を受けて、定量限界が数ppmレベルとなることも多く、より微量なレベルでの管理が求められる。このような微量な不純物を定量する際、装置の感度に合せて分析試料の濃度を上げると、試料マトリックスの影響を受け適切に定量することが困難となることが多い。以上のことから、DNA反応性(変異原性)不純物の分析は、数百ppmレベルを定量する通常の不純物分析と比して難易度が非常に高く、高感度で選択性の高い分析法が求められるため、LCあるいはGCの検出器にMSを使用する 경우가多くなる。

また、検出器にMSを選択したとしても、試料マトリックスの影響を受ける場合がある。その場合、誘導体化法による選択性、感度の向上や、感度の変動が認められる場合は標準添加法による補正、貧溶媒の添加による試料除去や、GCであればヘッドスパー

表3 DNA反応性(変異原性)関連不純物分析における当社の実績(2015年4月現在)

| 成分名 | 実績(件) | 手法例 | 定量下限濃度(µg/mL) |
|--------------------|-------|----------|---------------|
| ヒドラジン | 64 | LC/MS/MS | 0.001 |
| ベンゼン | 51 | GC/MS | 0.01 |
| アニリン | 14 | GC/MS | 0.25 |
| 4-クロロ-3-ニトロベンゾニトリル | 13 | GC/MS | 0.05 |
| メタンスルホン酸メチル | 12 | GC/MS | 0.01 |
| メタンスルホン酸イソプロピル | 11 | GC/MS | 0.01 |
| クロロメタン | 11 | HS-GC/MS | 0.025 |
| メタンスルホン酸エチル | 8 | GC/MS | 0.01 |
| クロロエタン | 7 | HS-GC/MS | 0.025 |
| アリルプロミド | 6 | GC/MS | 0.025 |
| アリルアニリン | 5 | GC/MS | 0.25 |
| ジアルリアニリン | 5 | GC/MS | 0.25 |
| フルオロニトロベンゼン | 5 | GC/MS | 0.02 |
| 1,3-ブタジエン | 4 | HS-GC/MS | 1 |
| クロロプロパン | 3 | HS-GC/MS | 0.025 |
| エチレンオキシド | 3 | GC/MS | 0.1 |
| 1,3-ジヒドロキシベンゼン | 2 | LC/UV | 0.5 |
| N,N-ジメチルカルバモイルクロリド | 2 | GC/MS | 0.02 |
| メタンスルホン酸プロピル | 1 | GC/MS | 0.025 |
| エピクロロヒドリン | 1 | GC/MS | 0.05 |
| 2-メチルイミダゾール | 1 | GC/MS | 0.05 |

<ヒドラジン>

- IARCにおいてグループ2B(ヒトに対する発癌性が疑われる)
- 強い還元性を有する。
- 医薬品の製造にも使用される事がある。

<試験方法>

- 分析法: LC/MS/MS
- 誘導体化法: アルデヒドを用いたヒドラジン誘導体化合物を定量
- 目標定量下限: 0.1 ppm(試料換算濃度)

$$\text{H}_2\text{NNH}_2 + \text{R}-\text{CHO} \xrightarrow[\text{Methanol}]{\text{H}^+} \text{R}-\text{CH}=\text{N}-\text{NH}-\text{R}$$

図3 ヒドラジン測定法の要領

■ 直線性

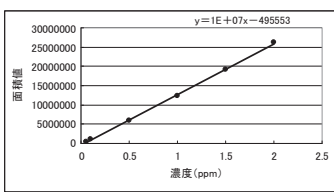
- 0.05 ~ 2 ppm(試料換算濃度)
- 相関係数: 0.99以上を確認

■ 注入再現性精度

- 同一溶液6回注入
- 相対標準偏差10%以下を確認

■ 添加回収率

- 仮想原薬(チアゾール化合物)への添加により確認
- 回収率70%以上を確認



| 試料換算濃度 (ppm) | 相対標準偏差 (%) |
|--------------|------------|
| 0.05 | 2.2 |
| 0.1 | 3.2 |

| 添加濃度 | 回収率 (%) |
|-------------|---------|
| 0.1 ppm相当添加 | 83 |
| 1 ppm相当添加 | 70 |
| 2 ppm相当添加 | 82 |

図4 ヒドラジン測定法の簡易バリデーション試験の結果

＜メタンスルホン酸エチル(MSE)＞

- IARCにおいてグループ2B(ヒトに対する発癌性が疑われる)
- メタンスルホン酸とエタノールを使用している場合、生成する可能性あり。
- メタンスルホン酸はアルキル化剤等の脱離基や、対陰イオンとして利用される。

＜試験方法＞

- 分析手法：HS-GC/MS
- 誘導体化法：ペンタフルオロベンゼンチオールを用いた誘導体化MSEを定量
- 目標定量下限：0.1 ppm(試料換算濃度)

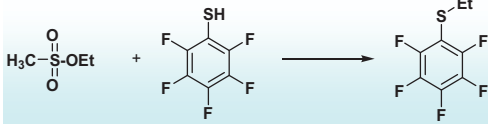


図5 メタンスルホン酸エチル測定法の要領

手法により気相のみを分析装置に導入することにより、試料マトリックスの影響の回避を図る。次に実際にDNA反応性(変異原性)不純物の分析における実施例を紹介する。

4.1 ヒドラジン

ヒドラジンは強い還元性を有し、医薬品の製造にも使用されることがあり、IARC(国際がん研究機関)では、グループ2B(ヒトに対する発癌性が疑われる)に分類されている(図3)。本化合物の微量分析法として、アルデヒドを用いて誘導体化させたものをLC-MS/MSにて定量した。目標定量下限は0.1 ppmとして、分析法の性能を示すデータ(簡易バリデーション)を取得した。

簡易バリデーションの結果(図4)、直線性は、ヒドラジンの試料換算濃度が0.05~2 ppmの標準溶液において、相関係数は目標としていた0.99以上であることが確認できた。連続6回における注入再現精度についても、試料換算濃度0.05 ppm、0.1 ppm標準溶液における誘導体化物のピーク面積の相対標準偏差は、2.2%、3.2%と目標としていた10%以下という結果が得られた。また、仮想原薬を用いて0.1 ppm、1 ppm、2 ppm相当のヒドラジンを添加した際の添加回収率は、70~83%といずれも目標としていた70~130%の範囲内であり、0.1 ppmのヒドラジンを定量する条件を設定することができた。

4.2 メタンスルホン酸エチル

次に、メタンスルホン酸エチルの分析事

例を紹介する。こちらもIARCにおいて、グループ2Bに分類されている(図5)。過去、2007年にピラセプト錠中に混入が認められ、欧州の全市場より回収されたこともある成分である。メタンスルホン酸エチル自体が製造に用いられているのではなく、アルキル化剤の脱離基や原薬のカウンターイオンとしてメタンスルホン酸が使用されており、製造に使用されていた。エタノールと反応し、メタンスルホン酸エチルを生成することから、分析対象となる場合が多い。測定法はヘッドスペースGC-MS法を採用したが、メタンスルホン酸エチルは沸点が215℃と、ヘッドスペース法で気化させるには高沸点のため、ペンタフルオロベンゼンチオールを添加し、ヘッドスペースサンプラー内で加熱、誘導体化し、GC/MSにて分析した²⁾。目標定量下限はヒドラジンと同様、0.1 ppmとし、簡易バリデーション試験を実施した。

簡易バリデーションの結果(図6)、ヒドラジンと同様、試料換算濃度0.1~2 ppmの範囲において、良好な直線性、注入再現精度、添加回収率が得られ、0.1 ppmのメタンスルホン酸エチルを定量する条件を設定することができた。

5 おわりに

ICH M7ガイドラインの発効により、医薬品を開発する上で、DNA反応性(変異原性)不純物の管理の必要性を確認してい

■ 直線性

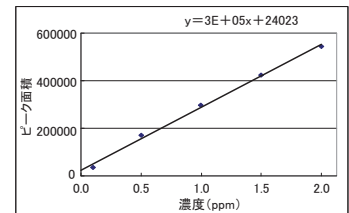
- 0.1~2 ppm(試料換算濃度)
- 相関係数：0.99以上を確認

■ 注入再現性精度

- 同一溶液6回注入
- 相対標準偏差10%以下を確認

■ 添加回収率

- 仮想原薬(アルデヒド基を有する芳香族化合物)への添加により確認
- 回収率70%以上を確認



| 試料換算濃度 (ppm) | 相対標準偏差 (%) |
|--------------|------------|
| 0.1 ppm | 4.0 |

| 添加濃度 | 回収率(%) |
|-------------|--------|
| 0.1 ppm相当添加 | 108.4 |
| 1 ppm相当添加 | 84.6 |
| 2 ppm相当添加 | 88.1 |

図6 メタンスルホン酸エチル測定法の簡易バリデーション試験の結果

くこととなり、開発における負荷が増加するものと考えられる。今後、分析法開発における当社の豊富な実績を活かし、分析支援に注力していく。

文献

- 1) Müller, L., et al, Regulatory Toxicology and Pharmacology 44: 198-211 (2006)
- 2) Roberto A, et al, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45: 472-479 (2007)



小西 太
(こにし ぶとし)
大阪ラボトリー



松井 茜
(まつい あかね)
大阪ラボトリー



大神 泰孝
(おおがみ やすたか)
大阪ラボトリー