

## 〈原 著〉

## 我が国において抗生物質医薬品の品質基準の 果たした役割に関する薬史的・公衆衛生学的考察： 第6報 抗生物質医薬品に課された生物学的試験

八木澤守正<sup>1)</sup>・Patrick J. Foster<sup>2)</sup>・黒川達夫<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup> 慶應義塾大学薬学部医薬品開発規制科学講座

<sup>2)</sup> 慶應義塾大学薬学部基礎教育講座

<sup>3)</sup> 現所属：日本OTC医薬品協会

(2018年2月2日受付)

抗生物質医薬品は、微生物の発酵生産により得られる天然物であることから、ワクチンなどと同様な生物学的製剤と見なされ、薬事行政上は国家検定の対象となる基準品目として取り扱われてきた。初期の抗生物質の発酵工程、抽出工程、精製工程及び製剤化工程は何れも未熟であったため、患者に投与する製品中に未知の毒性物質、発熱性物質、血圧降下物質などが混入することが懸念され、それらの有害物質の混在を検出するためにマウス、ウサギ、ネコを用いる生物学的な安全性試験が課されていた。

抗生物質医薬品の発展は著しく、作用や薬理学的性状に優れる多数の化学誘導体が臨床に導入されて主流となった結果、従来の生物学的製剤と見なす取り扱い是不合理となり、一般の化学薬品と同様に取り扱うことが適切であると判断された。その結果、抗生物質医薬品の国家検定は廃止され、「日本抗生物質医薬品基準」は「日本薬局方」に統合された。統合に際しては、「日本薬局方」の理念に適合しない動物試験を廃止するか化学的な試験に置き換える必要があり作業が進められた。

本報では、抗生物質医薬品に課されていた各種の生物学的な安全性試験の制定の意義と試験法の変遷及びそれら試験の見直しについて、薬事行政上の対応を含めて調査・解析し、考察を加えた。

著者らは、我が国において抗生物質医薬品に規定されてきた医薬品基準と国家検定が、優れた品質の製剤の製造を促進し、ひいては国民の健康維持に貢献してきたことを薬史的に検証し公衆衛生学的に解析することを目的とする研究を行い、行政文書を含む多数の資料に基づく多岐にわたる結果を得ており、それらの結果を個別の主題の下

に報告<sup>1~4)</sup>してきた。前報<sup>5)</sup>では、米国Rutgers大学のSelman Waksmanが発見した世界で最初の抗結核性抗生物質であるstreptomycin (SM)が、米国の製造技術と品質管理手法を導入することにより、発見の6年後の1950年には我が国における工業生産が開始され、その後、製造法の改良と品質管理の徹底により高品質のSMが供給された結

果、国民病とされていた結核が制御された経緯を詳述した。

我が国において、最初に臨床使用に供された penicillin (PC) から第二の SM, 第三の chloramphenicol (CP) 等の抗生物質医薬品の品質確保の規範として制定され、製造現場における品質管理に用いられた「PC 基準」等の個別の基準<sup>4)</sup>には、品質規格への適否を判定するための各種試験法が規定されていた。それら試験のうち、生物学的試験としては、1) 微生物学的な力価試験法、2) マウスを用いる毒性物質試験法、3) ウサギを用いる発熱性物質試験法、及び、4) ネコを用いるヒスタミン試験法が設定されていた。抗生物質医薬品の種類と品目数の増加に伴い、1952年に個別の基準を纏めて「抗菌性物質製剤基準」が制定<sup>6)</sup>され、その後、医薬品の品質管理技術の国際化に対応するための改訂が行われ、1969年に「日本抗生物質医薬品基準 (日抗基)」が制定<sup>7)</sup>されたが、それらの生物学的試験は見直しと改訂が重ねられながら存続してきた。

本報では、それらの基準において、抗生物質医薬品に対して特異的に課されてきた生物学的試験の意義と試験法の変遷及び見直しの経緯について調査・解析した結果を記述し考察する。

## I. 材料と方法

資料の収集方法については、著者らの前報<sup>1)</sup>に詳細に記述しており、本報では重複記述を避けることとする。収集した資料に基づき、各々の生物学的試験が課された背景と意義を解析し、各試験の実施・改変・見直しなどの経緯について調査・解析した。

なお、著者の一人 (MY) は、財団法人日本抗生物質学術協議会 (日抗学協) に勤務した1981～2002年の間に4回にわたる「日抗基」の改正作業に従事し、抗生物質医薬品に課された生物学的試

験の実態調査と見直しの実務を担当しており、見直しに係る研究班及び小委員会並びに厚生省中央薬事審議会 (中央薬審) 抗菌性物質製剤調査会及び特別部会における検討に用いた各種の資料も、本報の著述の参考に供した。

抗生物質医薬品に課されてきた生物学的試験のうち、「毒性物質試験」については、著者の一人 (MY) が昭和60年度厚生科学研究として行われた「抗生物質の毒性物質試験法に関する研究」の主任研究者を務め、国立予防衛生研究所 (予研) 抗生物質部の水野左敏部長に分担研究者、同部の高橋佐喜子抗生物質製剤室長及び抗生物質医薬品製造会社21社の品質管理担当者に研究班員として協力を得て、製造会社における抗生物質医薬品製造の実態に基づき同試験の見直しを提起する報告書<sup>8)</sup>を作成し、1986年に厚生省薬務局に提出したことにより、中央薬審での審議を経て、1990年の「日抗基」の大改正<sup>9)</sup>の機会に同試験は廃止された経緯がある。

「発熱性物質試験」については、試験に用いるウサギに関する規定の変化や、「日本薬局方 (日局)」及び外国の薬局方における試験法の変更などに対応して、「日抗基」に規定される同試験法の改正も行われており、その改訂の経緯を調査・解析した。「ヒスタミン試験」は、ネコを用いる試験であり国際的な動物愛護運動に対応する見直しが必要であった。しかしながら、同試験を削除後の安全性の担保に適する代替え試験法がなく、同試験は2002年12月末に「日抗基」が廃止された時点まで継続されたが、著者の一人 (MY) は10年以上にわたり同試験の見直し作業に従事しており、その作業において入手した各種の資料も参照した。

## II. 結果

### 1. PCに課された生物学的試験

PCをワクチンなどの生物学的製剤と同様に取

り扱うことは、1946年10月に米国の食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) が制定した「PC検定規則」<sup>10)</sup>の基本概念であり、同規則は我が国においてPCの工業生産化を主導した連合国軍最高司令部総司令部 (General Headquarters/Supreme Commander for Allied Powers; GHQ/SCAP) の公衆衛生福祉局 (Public Health and Welfare Section; PHW) が、日本の厚生省に対してPCの品質管理の基準と国家検定制度の確立を指示した際の規範とされた。同規則には、黄色ブドウ球菌 FDA209P株を検定菌とする微生物学的な力価検定法、体重1.5kg以上の健康なウサギ3頭を用いる発熱性物質試験法及び体重18~25gのマウス5匹を用いる毒性物質試験法が規定されていた。同規則では、PCの生物活性を表すのに“力価 (potency)”という用語が用いられていたが、この用語は免疫グロブリンの活性を表す“抗体価”と同様の概念に基づいており、その強弱を“単位 (unit)”として表示していた。

PCの力価を示す“単位”としては、1940年にPCを感染症に対する化学療法薬として再発見<sup>11)</sup>した Ernst ChainやHoward Floreyらが考案した“Oxford unit”が国際単位として採用され、benzylpenicillin (PCG) のナトリウム塩の結晶 $0.6\mu\text{g}$ が1単位を含有すると定義された<sup>12)</sup>。すなわち、5,000単位がPCGナトリウム塩3mgに含有 (1,667単位/mg) されていることになるが、PCの発見者である Alexander Flemingは著作<sup>12)</sup>の中で、純粋なPCが治療に用いられるほど十分に得られるようになれば、単位ではなく重量 (mg) で表示されるようになるであろうと予測していた。

国内におけるPCの工業生産<sup>13)</sup>が始まり、新設の予研における製品の国家検定の準備も整った1947年5月に我が国の「PC基準」が制定<sup>14)</sup>された。同基準は、米国FDAの「PC検定規則」を手本として簡明な規定がなされており、生物学的な試験としてPHWから提供された黄色ブドウ球菌

FDA209P株を用いる円筒平板法による力価試験と、ウサギを用いる発熱性物質試験及びマウスを用いる毒性物質試験が規定されていた。

「PC基準」における力価検定は誤差が大きい従来の希釈法ではなく、円筒平板法 (検定用円筒は硬質硝子管、陶器、不銹鋼またはアルミニウム管製) により検定することとされ、製品1mg中に60国際単位以上を含有することが規定されていた。当時の標準PCとして指定されたPCGナトリウム塩の結晶は1mg中に1,667国際単位を含有すると定義<sup>15)</sup>されていたので、その純度を100%と仮定するならば、1mg中に60国際単位を含むPC製品の純度は3.6%に相当した。初期のPCの純度は僅か3.6%であったが、当時の我が国における生産量<sup>2)</sup>は月産4,600万単位 (3万単位瓶が1,500本程度) という少量であり、肺炎などの治療には1日30万単位を5日間投与 (合計150万単位) が必要とされていた。そのように切迫した需給状況においては、精製工程を重ねることによる収量の減少は許されず、低純度ながらも可能な限り多量の製品を供給することが求められた。

PCの性状とされた“黄色~黄褐色”を示す色素は全くの不純物であったし、力価を示す3.6%の本質と3.5%の湿度以外の90%を超える夾雑物には、培養に用いた基材 (乳糖、トウモロコシ浸漬液、無機塩類) の残余物やそれらの代謝物、生産菌の菌体成分や抗菌力を示さない諸々の産生物などが含まれていた。致命的な細菌感染症の治療のためには、低純度のPC製品であっても供給しなければならず、最低限度の安全性を確保するために、ウサギを用いる発熱性物質試験とマウスを用いる毒性物質試験を行い、合格品のみ市販を許可したのである。

## 2. 予研におけるPCの国家検定

PHW局長のCrawford Sams軍医大佐は、厚生省管下に公衆衛生分野の研究所が存在せず、また

生物学的製剤を検定する機関も存在しないことを制度的な不備であると考え、東京帝国大学附置伝染病研究所（伝研）から、生物学的製剤の研究部門及び検定部門を分離して厚生省管下の予研を設立することを指示した。予研には、伝研の職員の約4割に当たる134名が移籍し、伝研本館の一部を専用面積として発足した<sup>16)</sup>。予研の官制公布<sup>17)</sup>には、第1条として“厚生大臣の管理に属し”と規定されており、その業務の第2項には“予防、治療及び診断に関する生物学的製剤、抗菌性物質、消毒材料等の検査、検定及び試験的製造に関する事項”が規定されていた。

伝研は、予研が設置されるまでは国内で最大の生物学的製剤の製造所であると同時に、厚生省に代って生物学的製剤の検定や認可を行っていた<sup>16)</sup>。それ故、血清製造のための大動物のみならず、マウス・ラット・モルモット・ウサギなどの実験用小動物の飼育や取扱いに熟練した技術者が多く、伝研の一部を分割した形で設置した予研においては、生物学的製剤や抗菌性物質の生物学的試験を国内で最高の技術水準で遂行することが可能であった。

新設の予研抗菌性物質部ではPC力価検定の方法と検定誤差に関する資料<sup>18)</sup>を公表しており、初年度（1947年度）のPCの検定概況の報告<sup>19)</sup>の中で、PC力価検定が従来の希釈法から円筒（カップ）法に切り替えられ、ステンレス鋼製のカップを用いることにより、検定誤差が2.5%程度まで小さくなったことを記述している。

### 3. 力価試験の微生物学的試験法から液体クロマトグラフ法への変遷

抗生物質医薬品は、その生物活性を特定の微生物に対する抗菌力として測定・表示できることが特徴の一つであり、試験に供する微生物の生育を肉眼で判定する希釈法、円筒平板法及び比濁法が力価測定の定法とされており、特に円筒平板法は

検定誤差を極めて狭い幅に収められる試験の精度と真度が確認された試験法である。微生物学的な力価試験法は、力価を“単位”で表示する品目には合理的な試験法であり、マクロライド系やペプチド系のように類似する複数の成分が混在する品目には、力価を各々の成分の抗菌力の和として測定し表示できる利点がある。

しかしながら、抗生物質医薬品の製造技術の発展により、単一成分で高純度の製品が得られるようになるに伴い、その物理化学的な性質を応用して力価を測定する方法が考案され、微生物学的な力価測定法の代替法として用いられるようになった。例えば、高純度のPCGカリウム塩は、アルカリ処理後にヨウ素滴定を行い消費されるヨウ素を定量することによりPCGの量を算出する<sup>20)</sup>ことが可能であり、高純度のoxytetracycline塩酸塩は塩酸酸性水溶液中で塩化第二鉄と反応後の波長490nmにおける吸光度を測定し、常用標準品の吸光度と比較して力価を算出する<sup>21)</sup>ことが可能であることが確認され、それらの試験法が定量試験として採用された。

1982年の「日抗基」の大改正<sup>22)</sup>において、セフェム系抗生物質の6品目と抗真菌性抗生物質の2品目の力価試験に高速液体クロマトグラフィーを用いる液体クロマトグラフ法が代替法として初めて採用されたが、その後の新規承認品目では次々と同法が採用された。「日抗基」においては、抗生物質医薬品が国内外の複数の製造所において製造・検査されることに対応して、力価試験に複数の試験法を設定しており、製造所・検査機関において最適な試験法を採用することが可能であるとされていたので、第1法として従来の円筒平板法、第2法として液体クロマトグラフ法を採用する品目が増加していた。

しかしながら、2002年末に「日抗基」を廃止し、抗生物質医薬品を「日局」に移行するに際しては、「日抗基」の“力価試験法”に相当する“定量法”を

表1. 抗生物質医薬品原薬の力価試験法/定量法の変遷

力価試験法/定量法	「日抗基2000」*1	14改正「日局」*2	17改正「日局」*3
	原薬172品目	原薬147品目	原薬135品目
<b>【微生物学的方法】</b>			
円筒平板法	167	54 (36.7%)	41 (30.4%)
標準曲線法	32		
比濁法	20	1 (0.7%)	
<b>【理化学的方法】</b>			
光学的標準曲線法	6		
吸光度測定法	20	5 (3.4%)	3 (2.2%)
ヨウ素滴定法	23	2 (1.4%)	2 (1.5%)
液体クロマトグラフ法	93	85 (57.8%)	86 (63.7%)
ガスクロマトグラフ法			1 (0.7%)
電位差滴定法			2 (1.5%)

\*1 「日抗基2000」では、各品目に複数の力価試験法が設定されていた。

「日局」では、各品目の定量法は一つの試験法に限られている。

\*2 14改正「日局」には、14改正「日局」第1追補に収載の抗生物質医薬品原薬を含む。

\*3 17改正「日局」は、17改正「日局」第1追補告示時点の抗生物質医薬品原薬を示す。

一つの試験法に限定することが必要であった。「日局」への移行に先立って行われた検討では、2000年8月の時点における「日抗基」収載の原薬172品目に採用されていた力価試験法は、表1に示すように円筒平板法が167品目で主であり、ついで液体クロマトグラフ法が93品目に採用されていた<sup>23)</sup>。

2001年1月に厚生省が厚生労働省に再編され、従来の中央薬審は薬事・食品衛生審議会に改組されたが、同審議会薬事分科会日本薬局方部会が取り纏めた第14改正「日局」が同年3月30日に告示された。同改正においては、翌年の「日抗基」の廃止に伴う抗生物質医薬品の取り込みに備えて、抗生物質医薬品原薬65品目について「日局」としての品質基準を設定<sup>24)</sup>し、一般試験法に「抗生物質の微生物学的力価試験法」として円筒平板法、穿孔平板法及び比濁法の3試験法を規定した。

第14改正「日局」第1追補は2002年12月27日に告示<sup>25)</sup>されたが、同日をもって「日抗基」は廃止<sup>26)</sup>され全ての抗生物質医薬品原薬は「日局」へ移行された。表1には第14改正「日局」及び第1追補に収載された147品目の抗生物質医薬品原薬に採用された定量法を示しているが、液体クロマ

トグラフ法が85品目(57.8%)に採用されているのに比して、円筒平板法は54品目(36.7%)と採用品目が減少していた。円筒平板試験法などの微生物学的力価試験法は自動化に限界があり、試験結果の判定には試験菌が生育するまでの十数時間を要するので、自動化が可能で短時間のうちに結果が得られる液体クロマトグラフ法が主流になったことは当然のことであった。

なお、現行の第17改正「日局」<sup>27)</sup>及び第1追補<sup>28)</sup>には、抗生物質医薬品原薬135品目と製剤76品目が収載されており、原薬41品目(30.4%)及び製剤15品目(19.7%)に円筒平板法が採用されているのに比して、液体クロマトグラフ法は原薬86品目(63.7%)及び製剤60品目(78.9%)に採用されており、その有用性が高まっている。

#### 4. 発熱性物質試験及び毒性物質試験の規定

発熱性物質試験は、米国FDAが制定した「PC検定規則」<sup>10)</sup>に規定されており、日本の「PC基準」<sup>14)</sup>においても低純度のPCに課する最低限度の安全性確保のために必須の試験であると考えられた。初期のPC製品にはPC生産菌が産生する高分子化合物が混入しており、その中にはリポ多糖体など

の発熱性物質が含まれていた<sup>15)</sup>。FDA規則ではウサギに注射する量を体重1kg当り2,000単位、体温上昇は0.6°C以下と規定されているのに比して、我が国の「PC基準」では注射量を体重1kg当り500単位に減じ、体温上昇を1°C以下に緩和していた。FDA規則の可否の判定は、3頭とも0.6°C以下の体温上昇であれば合格であり、もし1頭が0.6°C以上の体温上昇を示すか若しくは3頭の体温上昇の和が1.4°C以上である場合には、新たに5頭のウサギを用いて同様な試験を行い、0.6°C以上の体温上昇を示すウサギが5頭中1頭以下である場合に合格とするという厳しい規定であった。それに比して、日本の「PC基準」では、3頭とも1°C以下の体温上昇であれば合格であり、もし1頭が1°C以上の体温上昇を示す場合には、新たにウサギ3頭を用いて同様の試験を行い、体温上昇が3頭とも1°C以下の体温上昇であれば合格とすることと規定された。このように規定を緩和した理由は、FDA規則と同様の厳しい規定を設けるならば、我が国の未熟なPC生産技術では発熱性物質試験で落第とされる製品が多くなり、切迫している需要に応じるだけのPC製品を供給することは不可能であったからである。

毒性物質試験は、FDA規則ではマウス5匹を用いて、1匹当り4,000単位/mLのPC溶液0.5mLを投与（投与量は2,000単位/マウス）することになっていたが、当時の米国薬局方（13<sup>th</sup> Edition of United States Pharmacopoeia: USP XIII<sup>29)</sup>）に収載のPC（複数成分の混合物のカルシウム塩またはナトリウム塩の不定形の粉末）は1mg当り500単位以上を含有することと規定されており、2,000単位の投与はPC粉末にして4mgの投与に相当した。一方、日本のPCは1mg当り60単位以上を含有することと規定されていたので、もし2,000単位を投与することになれば、マウス1匹当り33.3mgを投与（マウスの体重を20gとするならば、1,667mg/kgの投与；体重60kgのヒトに換算すれば100g投

与に相当）することになり、安全性試験としては投与量が過剰であると考えられた。その結果、投与量はFDA規則の10分の3に相当する、1匹当り3,000単位/mLの溶液を0.2mLの投与（600単位/マウス）と決められた。なお、毒性物質試験の判定はFDA規則と同様に、48時間以内に斃死するマウスがいなければ毒性なしと判定し、もし1匹が48時間以内に斃死した場合には、新たに5匹のマウスを用いて再試験を行い、斃死するマウスがいなければ毒性なしと判定することと定められた。

PC製剤に関する発熱性物質試験と毒性物質試験については、製法の改良に伴う製品の純度上昇に従って規格値を厳しくする改定が行われた。1950年12月16日に改正された「PC基準」<sup>30)</sup>では、PCの含有力価が1mg当り500単位以上（純度30%以上）と規定され、発熱性物質試験における投与量はウサギの体重1kg当り2,000単位に増量され、可否判定は、体温上昇が3頭のウサギの全てで0.6°C以下である場合は合格とする厳しい基準に改正された。再試験の条件も、1頭のウサギの体温上昇が0.6°C以上であるか3頭の体温上昇の和が1.4°C以上である場合には、新たに5頭のウサギを用いて再試験を行い5頭全てで体温上昇が0.6°C以下である場合は合格と判定するという厳しい規定に改定された。この改定内容は、1946年のFDAの「PC検定規則」<sup>10)</sup>の規定と合致しており、日本の“国産PC”は僅か4年の遅れで米国の安全性評価の水準に追い付いたのである。なお、ウサギを用いる発熱性物質試験は1951年3月に制定された第6改正「日局」<sup>31)</sup>においても新たに規定されたが、その試験法の詳細（試験動物、操作法、判定）は全て改正「PC基準」の規定に従っており整合性が保たれていた。

改正「PC基準」において、毒性物質試験は体重12~15gのマウス5匹それぞれに4,000単位/mLの試料溶液を0.5mL静注し、48時間以内に斃死するマウスがない場合に無毒と判定することと規

定された。もし48時間以内に1匹以上のマウスが斃死する場合には、新たに体重 $12\text{ g}\pm 0.5\text{ g}$ のマウス5匹を用いて同様な試験を行い、全てのマウスが斃死しない場合は無毒であると判定することとされた。ここで規定する投与量や再試験の要件などはFDAの規定に合致しているが、FDAの規定ではマウスの体重が通常は $18\sim 25\text{ g}$ であり、再試験には $20\text{ g}\pm 0.5\text{ g}$ のマウスを使用することになっているのに比して、我が国の改正「PC基準」では用いるマウスの体重が40%ほど軽いので、体重当りの投与量は約1.7倍多いこととなり、FDAの規定よりかなり厳しく設定されていたのである。

## 5. ヒスタミン試験法の規定

我が国ではPHWの主導の下に、PCに次いで第二番目の抗生物質医薬品としてSMの工業生産<sup>5)</sup>が始められたが、国内生産に先だって米国からSM製剤の輸入が行われた。1949年3月に第1回輸入分<sup>32)</sup>の209kg(1症例に40gを使用するとして5,225症例分)、同年10月に第2回輸入分<sup>33)</sup>の400kgがガリオア資金で輸入され、PHWの指示に従って全国の結核療養専門病院に重点的に配給された。輸入SMは、米国Merck社が製造したSM塩酸・塩化カルシウム複塩であり、そのパッケージに同封されていた「使用書(現在の添付文書)」が和訳<sup>34)</sup>されて臨床試験を行う医療機関に配布された。一方、この輸入SMを用いて種々の検討が行われ、新薬事法第32条第1項の規定<sup>35)</sup>に基づいた「SM基準」が制定<sup>36)</sup>された。同基準では、枯草菌PCI 219を用いる円筒平板法による力価試験が設定され、含有力価は“mg当り300 mcg(力価)以上であること”と規定しているが、これはSM硫酸塩、SM塩酸塩及びSM塩酸・塩化カルシウム複塩の純度に換算すると、それぞれ37.6%、35.6%及び38.5%以上という規定であり、当時の米国製SMの純度はかなり低いものであった。

SMの化学構造はアミノサイクリトール/アミ

ノグリコシド系と呼ばれる塩基性で水溶性の三糖類であり、当時の天然化合物の精製技術では高精度に精製し単離するのは難しい化合物<sup>37, 38)</sup>であった。米国FDAでは天然物であるSMに対してPCと同様に発熱性物質試験と毒性物質試験を課したが、トウモロコシ浸出液を用いて製造した初期のSMにヒスタミン様の降圧物質が混入した経緯があった<sup>39)</sup>ために、ネコを用いる「血圧降下物質試験(depressor substances test)」を追加的に課したのである。

我が国における「SM基準」の制定の時点では、未だSMの国内生産は行われておらず、同基準は米国FDAの「SM検定規則」を規範とし、輸入SM及び予研で試験製造されたSM標品<sup>39)</sup>を用いて、予研の抗菌性物質研究部及び検定部において繰り返し実施された試験成績を勘案して制定された。米国FDAでは「血圧降下物質試験」と呼ばれる試験を我が国では「ヒスタミン試験」と呼び、成熟した健康なネコを全身麻酔し、体重1kg当り3mg(力価)のSM試験品を大腿静脈に注射した時の血圧降下が、ヒスタミン $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ を注射した時の血圧降下より小さければ合格とすることが規定された。用いるSMとヒスタミンとの注射量の比を同一とすればネコの代わりにイヌを使用してもよいとの規定が括弧付けで加えられていたが、ヒスタミン感受性が動物種により異なり、ネコはイヌより10倍、ウサギより1,000倍感受性が高いことと、 $0.01\sim 0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ のヒスタミン量と血圧降下度は直線関係を示すこと<sup>40)</sup>から、ヒスタミン試験にはネコが用いられることとなった。

ネコは神経系の形態がヒトに類似し、神経系の反応が観察しやすいので、医薬品の開発における神経生理学的検討において繁用されていたが、他の実験動物(マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ビーグル犬、マーモセットなど)のような専門の生産・供給元がなく、捕獲された野良ネコを保健所から払下げを受けるなど入手が不安定であ

り、抗生物質医薬品の製造ロット毎にヒスタミン試験を行うためのネコの入手には何れの製造企業も困難を極めていた。さらに、ネコは代表的な愛玩（伴侶）動物であり、ネコを用いる試験の実施は世界的に動物愛護団体から厳しい批判を受けていた。

## 6. 生物学的試験法の見直し

「PC基準」に続いて「SM基準」が制定され、次いで「dihydrostreptomycin (DHSM) 基準」及び「CP基準」が制定されたが、輸入された Aureomycin と我が国起源の最初の抗生物質である colistin の基準を制定するに際して、それまでの個別の基準を纏めて「抗菌性物質製剤基準」<sup>6)</sup> が制定された。同基準には、“抗菌性物質”や“力価”という用語及び“標準抗生物質”並びに“常用標準抗生物質”などを定義または解説する一章が設けられたが、各々の抗生物質医薬品に課されている共通の生物学的試験法を一章に纏めることはなされておらず、各々の条文は記載法や試験法の細部が相違していた。

生物学的試験法の最初の見直しと統一が行われたのは、「抗菌性物質製剤基準」から「日抗基」<sup>7, 41, 42)</sup>への近代化が図られた時点であり、従来は個別の抗生物質医薬品の基準中に記述されていた各種の生物学的試験法（力価試験法、生菌数試験法、無菌試験法、毒性物質試験法、発熱性物質試験法、ヒスタミン試験法）は、化学的試験法や物理化学的試験法と併せて「一般試験法」の章に纏めて収載され、各々の試験に用いる標準品と緩衝液・試薬・試液・標準液及び計量器・用器は「一般試験法附表」の章に纏めて収載されて、「日局」と同様な基準書の形式が整えられた。生物学的試験法に供する試験品の量（または単位）と調製法は、各々の抗生物質医薬品の各条において規定され、試験の可否は各条において規定される規格への適否により判定されることとされた。

「日抗基」の制定時に、同基準独自の一般試験法としてマウスを用いる毒性物質試験法及びネコを用いるヒスタミン試験法が規定されたが、それらの試験においては薬物の投与に伴う動物の生理的变化を観察することが求められていた。すなわち、毒性物質試験法においては0.5 mLの試験品溶液を体重15~20 gの健康なマウスの尾静脈に8~12秒間で注入するかカニューレを用いて胃内へ直接投与した後の48時間以内のマウスの斃死を観察することが求められ、ヒスタミン試験では成熟した健康なネコにバルビタール系麻酔薬を腹腔内注射して全身麻酔を行い、右頸動脈を露出させて迷走神経を含む全ての周囲の組織をメスを用いず完全に分離した後にカニューレを挿入し記録式キモグラフにより血圧変化の振幅を記録するように設定し、次いで大腿静脈を露出して体重1 kg当り0.05 mL, 0.1 mL及び0.15 mLの標準ヒスタミン溶液（1 µg/mL）をそれぞれ5分以上の間隔をおいて注射するか、体重1 kg当り1 mLの試験品溶液を大腿静脈に注入して血圧変化を5分間観察することが求められていた。また、「日局」と整合性が図られていたウサギを用いる発熱性物質試験法では、体重1.5 kg以上の健康なウサギを固定器に固定し、直腸内60~90 mmの範囲に直腸体温計を挿入して体温を測定した15分以内に耳静脈から体重1 kg当り1.0 mLの試験品溶液を注射し、注射後30分間隔で6回または1時間間隔で3回体温測定を行うことが求められていた。

上述したような、生きている動物を用いる試験を行うには、試験に供する動物の健康状態を判断し、試験に適するように飼育し、保持・保定または固定し、臓器・組織を損傷することなく器具を挿入し、試薬や試料を漏らすことなく臓器・器官に注入し、指定された時間に目的とする生物学的な反応を観察・測定するだけの技術に熟練した試験担当者が必要であり、薬理学領域を専門とする技術者または小動物を対象とする獣医学領域の教



育を受けた技術者が試験を担当した。試験に供する動物を健全に保つには、温度・湿度や換気条件が一定で清浄な専用の飼育設備が必要であり、飼育記録や試験実施の正確な記録が適正に保存されている必要がある。多くの製薬企業において動物を用いる試験は新規医薬品の研究開発の重要な一段階であり、通常GLPと呼ばれる「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施に関する基準」<sup>43)</sup>に準拠した設備において、同基準に定められた手順を踏んで試験を行うこととなっている。新規医薬品の研究開発のために行う膨大な非臨床試験と併行して、抗生物質医薬品の製造ロット毎の品質管理のための動物試験を行うことは煩雑であり、抗生物質医薬品に課された生物学的試験についての見直しと、代替えとなる物理化学的な試験への切り替えが求められていた。

### 1) 毒性物質試験の見直し

「日抗基」では、制定の時点で全ての抗生物質医薬品の原薬と注射用抗生物質製剤について毒性物質試験を課しており、1982年に行われた大改正においては対象品目の変更はなく、米国から輸入している品目については、米国FDAのCode of Federal Regulations (CFR 21)による規定との整合性を図るため、試験に供する量（マウスへの投与量）の変更が行われた。

ところが、米国FDAは1984年7月30日付の官報 (Federal Register) 第49巻147号において抗生物質医薬品に課されている毒性物質試験 (safety test) を削除する試案を提出し、意見の公聴などの手続き後に、1985年5月13日付官報第50巻92号において同試験の削除を告示<sup>44)</sup>し、同年6月12日に実施したが、FDAは同試験削除の理由として以下の4点を挙げた。

1. 発酵培養液中より抗菌性物質を抽出しクロマトグラフ法により分離する方法が著しく改良され、極めて高純度の抗菌性医薬物質が製造さ

れるようになった。

2. 抗生物質医薬品の製造承認申請の審査を通じて、製造会社において改良された製造法が用いられていることを確認し、また、製造工場視察の結果に基づいて、抗生物質の製造上の方法・設備は外部からの毒性物質の混入を防止するように設定され適用されていることを確認した。
3. 抗生物質の個別の規定では、外部からの毒性物質の混入がないことを確認できるような他の試験法（同定、発熱性物質、クロマトグラフ法による力価検定など）が課されていること。
4. 1960年から1982年までの23年間に、FDAによる検定を受けたバッチのうち、safety testに適合せず不合格となったのは、わずか1バッチだけであるという実績。

米国FDAがsafety testを削除した時点で我が国が米国から輸入していた抗生物質医薬品原薬は、「日抗基」に収載の157品目のうちの約45%に相当する70品目にのぼり、米国からの輸出時には課されていないsafety testが輸入時の日本では課されるという不整合が生じたこととなり、当時の日米間のMOSS (Market-Oriented and Sector Selected) 会議における協議で非関税障壁であると指摘を受ける可能性が高く、国内における抗生物質医薬品に係る毒性物質試験の要否を見直す必要が生じた。

厚生省では日抗学協と協議して、同協議会八木澤守正常務理事を主任研究者として厚生行政科学研究事業「抗生物質の毒性物質試験法に関する研究」班による調査・研究を実施し、その研究報告書<sup>8)</sup>に基づいて中央薬審抗菌性物質製剤調査会・同特別部会及び常任部会における審議を経て、1990年の「日抗基」の大改正<sup>45~47)</sup>において毒性物質試験を廃止した。

毒性物質試験法に関する研究班では、マウスが実験動物として計画的に繁殖されており、医薬品の安全性を担保するためには1群5匹を用いて試験することが必要であるという、従来の動物を用

いる安全性試験の考え方を根本的に見直すこととした。毒性物質試験は、試験に供する抗生物質医薬品の各条に規定される量の試料を規定される量の注射用蒸留水または生理食塩液に溶解または懸濁し、5匹のマウスに対して1匹当り0.5mLを尾静脈内に注射するか、カニューレを用いて直接胃内に投与して、48時間以内のマウスの生死を観察することにより予期しない毒性物質の混入の有無を判定する試験である。マウスの系統は問わず、体重18~25gの健康なマウスであって、使用前に1週間以上一定飼料で飼育し体重の減少を見なかったものを試験動物として使用することと規定されていた。試験には他の試験に未使用のマウスを新たに用いることとされており、毒性物質試験において生存したマウスは試験後に殺処分することとされていた。

第一の問題点は毒性物質の検出感度であったが、試験における投与量は試験に供する抗生物質医薬品のマウスに対する急性毒性量LD<sub>50</sub>値の1/7~1/2に設定されており、臨床用量とは全く関連付けられておらず、強毒物質しか検出することができない試験法であると判断された。通常、試験法を設定するには陽性と陰性を示す定性的若しくは定量的なモデル実験の実施が必要であるが、抗生物質医薬品に係る毒性物質試験においては如何なる系統の毒性物質が如何なる投与量で陽性を示すかという、基本的な試験設定のデータが存在せず、安全性試験において最も懸念される“偽陰性”という very major error の結果を与える可能性がある、検出感度が著しく低い試験法であると判断された。

第二の問題点は判定基準であり、同試験において5匹のマウスのうちの1匹以上が死亡した場合には新たに体重19~21gのマウス5匹を用いて再試験を行い、1匹以上が死亡した場合には毒性物質が“陽性”であると判定するという判定基準にも疑問が呈された。同試験では、マウスの死亡に

至らなくても、出血や意識混濁や体重減少など著しい健康被害を生じるような毒性物質は検出対象外であり、安全性試験としての妥当性が疑問視された。

第三の問題点は統計学的な過誤であり、マウス5匹という規定は統計学的な考慮がなされていないことであった。抗生物質医薬品に限らず、近年の医薬品開発においては、薬効を示す医薬品自体と混在する類縁化合物及び製造工程における主な副生物または混雑物について、統計学的なデータ処理が可能な匹数のマウスやラットを用いることにより統計学的な有意差の有無を示すことが求められている。動物を用いる試験では、少ない匹数を用いることによる統計学的過誤を回避する必要があるが、抗生物質医薬品に係る毒性物質試験に用いるマウス5匹という規定は統計学的な考慮がなされておらず、同試験の結果として示される“陽性”または“陰性”の判定の信憑性は疑わしいとの論議があった。

また、米国FDAと同じ論点となるが、近年の医薬品の製造工程は「医薬品の製造管理及び品質管理規則」(GMP省令)<sup>48)</sup>により管理されており、原材料の入庫から製品の製造・加工、出荷に至るまでの全ての過程で、製品が適切かつ安全に作られ一定の品質が保証されるようになっており、1947年の「PC基準」制定時に懸念されたような、予期しない毒性物質の混入の可能性は著しく低いと判断された。著しく低い可能性でありながらも混入してしまった夾雑物は、近年の鋭敏な分析化学による製品検査により検出される可能性が高く、「日抗基」の各条に規定されている確認試験及び規格に関わる試験は十分に鋭敏なものであることが論議された。

さらに、予研において過去35年間に実施された国家検査において毒性物質試験で不適合とされたロットが皆無であったことと、製造各社において過去10年間に実施された自家試験において約

53,000ロットの抗生物質医薬品原薬と約38,000ロットの注射剤で、毒性物質試験不合格ロットが皆無であったことが確認され、米国FDAと同様に過去の実績に基づいて毒性物質試験を削除することが妥当であるという結論に達した。

## 2) 発熱性物質試験の見直し

我が国において発熱性物質試験が最初に規定されたのは1947年5月に制定された「PC基準」であり、1946年10月に制定された米国FDAの「PC検定規則」を手本としていたが、試験の細部については我が国のPC生産の実情に合わせて設定されていた。同試験法は、米国においては1947年4月に制定されたUSP XIII<sup>29)</sup>に一般試験法の一つ“pyrogen test”として記載され、日本では1951年に制定された第6改正「日局」の一般試験法に“発熱性物質試験法”として記載された。その後、米国薬局方も「日局」もウサギを用いる試験法を定法としてきたが、ウサギを用いる試験には幾つかの難点があり、適切な代替法が求められていた。その難点として、1) ウサギの品種により典型的な発熱性物質であるグラム陰性細菌が産生するエンドトキシン (ET) に対する反応に差がある、2) 特定のグラム陰性細菌が産生するETによってウサギが発熱しない場合がある、3) 数回にわたってETに曝されたウサギはETに対する反応が鈍くなる、4) 試験に供する抗生物質によりウサギの腸内細菌叢が変化し下痢症状を呈する<sup>49)</sup> ことがある、5) ウサギの飼育条件により試験の感度に影響があること<sup>50)</sup> などが挙げられていた。

「日抗基」においては、注射剤の製造に用いる原薬と注射用製剤の双方の規格に発熱性物質が陰性であることを課していたが、同基準の1998年の大改正<sup>51)</sup>において、日抗学協に設置された研究班からの提言に基づいて大幅な見直しが行われた。同提言の第一の指摘は試験対象品目に関するものであり、発熱性物質の混入は人体に注射投与され

る最終形態である注射用製剤で試験を行うことで検出することが適切であり、注射用製剤の製造途中の原薬を試験する意義は少ないとの見解であった。改正「日抗基」においては、注射用製剤で発熱性物質試験を行う製剤の製造に供する52品目の原薬に課されていた発熱性物質試験陰性の規格は削除され、同試験の対象となる抗生物質医薬品の品目数は約半数に削減された。

一方、1965年頃にカプトガニの血球抽出物 (Limulus amoebocyte lysate, LAL) がETにより凝固することが解明され、その凝固反応を利用してETを検出する試験法である“リムルステスト”が確立されて、ウサギを用いる発熱性物質試験の代用試験<sup>52)</sup>としての摺合せが試みられた。米国では1980年のUSP XXの改正<sup>53)</sup>で“Bacterial Endotoxins Test (Limulus Amoebocyte Lysate Test)”が記載され、日本では1988年の第11改正「日局」追補<sup>54)</sup>で“ET試験法”が記載されたが、同試験の適用範囲は注射用水などに限定されており、USP XXIIでは注射用水の他に注射用 ciclosporin にのみ適用されていた。抗生物質医薬品に対する適用も試みられていたが、抗生物質の種類によっては凝固反応を阻害するものもあり、全面的な適用には各々の抗生物質医薬品についての詳細な検討が必要であった。

「日抗基」では、1998年の大改正に向けての研究班による検討において、注射用製剤62品目について、各々の製造会社による試験成績に基づいて発熱性物質試験法に代えてET試験法を採用する改正試案が作成された。同研究班による試案は、厚生省医薬安全局に設置された「抗菌性医薬品規格検討小委員会」における審議により、他の改正事項と合せて改正原案とされ、中央薬審の新医薬品第四調査会、医薬品特別部会及び常任部会の審議を経て、1998年8月に「日抗基」の大改正<sup>51)</sup>として告示された。

1998年の「日抗基」大改正においてET試験法

が採用されず、発熱性物質試験の対象のままとされた原薬はDHSM硫酸塩とparomomycin硫酸塩の2品目であったが、これらは何れも後に製造中止された。注射用製剤40品目が発熱性物質試験の対象のままであったが、それらのうちの9品目は後にET試験法が採用され、20品目は製造中止された。残る11品目の注射用製剤は新たに制定された「日局外医薬品規格第四部（抗生物質医薬品）」（「局外規第四部」）<sup>55,56</sup>）に記載されており、発熱性物質試験の対象として残されていた。しかしながら、1998年の「日抗基」大改正以前は原薬96品目と注射用製剤109品目の合計205品目に課されていた発熱性物質試験が、同改正の時点で42品目にまで減らされ、更に、その後11品目にまで削減できており、ウサギを用いる発熱性物質試験の見直しは好ましい成果をもたらしたと評価されている。

なお、「日局」では、2001年3月に告示された第14改正<sup>57</sup>）において、ET試験法が主要な試験法となり、全ての注射剤（皮内、皮下、筋肉内投与は除く）に課されることとされ、ウサギを用いる発熱性物質試験はET試験法が適応できない場合に限って行うことができる代替法という位置付けとなった。

### 3) ヒスタミン試験の見直し

米国からSMの輸入が行われると共に我が国において「SM基準」が作成され、米国でSM製剤に課されていた「Depressor Substances Test（血圧降下物質試験）」と同様の試験としてヒスタミン試験が規定された。同試験は、愛玩（伴侶）動物であるネコを用いる試験であるが、世界の何れの国においてもネコを実験動物として飼育（生産・供給）はしておらず、ヒスタミン試験に供するネコは純系ではないためにヒスタミンまたはヒスタミン様物質に対する反応は個体差が大きく、同試験は医薬品の安全性の検討に適した試験とは言い難

い試験であった。しかしながら、我が国において「SM基準」を制定した当時は飼い主のいない「野良猫」が多く存在しており、試験に供するネコの入手は容易であったので、製剤ロット毎の試験は順調に行われていた。

ヒスタミン試験は、SM以後に国内で臨床使用され始めた天然の抗生物質のうち、分子中に塩基性を示す残基を有し、注射剤として用いられる品目の製造用原体と注射用製剤の全てに課されてきた。PCには同試験が課されていないことから、PC系及び類似するセフェム系やカルバペネム系などの $\beta$ -ラクタム系抗生物質は対象外とされていたが、セフェム系のうちのcephaloridine（cefaloridine）の1品目のみは、側鎖として塩基性のピリジン環を有していることにより同試験を課されていた。

予研及び製造会社における抗生物質医薬品の品質管理において、ネコを入手することが難しく日常的なヒスタミン試験の実施が困難となったため、日抗学協ではヒスタミン試験対象品目を製造する製薬会社14社による「ヒスタミン試験法研究班」を組織して、同試験の対象品目の見直しを行い、同試験の代替試験となる物理化学的試験法の検討を行った。

ヒスタミン試験は試験実施の困難さに加えて、多くの抗生物質医薬品が米国から輸入されている状況下に、同一医薬品に対する米国の「CFR21」と我が国の「日抗基」による規定の間の整合性の問題が浮上した。上述したように、米国は我が国との貿易摩擦の解消を目指すMOSS会議において、米国からの輸入品に関して非関税障壁と見なされる規制の撤廃を強く要求していた。抗生物質医薬品の輸入額は相当の金額であり、ヒスタミン試験の対象品目に関して日米間で整合する必要があるが、「日抗基」では53品目が対象であるのに比して「CFR」では21品目が対象であるという大きな相違があった。特に、米国から輸入されている品目中の14品目が、米国では同試験の対象

外であるのに我が国では同試験が課されていることに関して米国側から異議が唱えられていた。

ヒスタミン試験の見直しを進める上で、日抗学協の研究班から米国FDAの担当官に対して、「CFR」において「Depressor substances test」の対象となる医薬品を指定するための基準を問い合わせたところ、必ずしも一定の基準に従って指定されてはいないとの回答を得たので、同研究班では我が国独自の基準を考案して、同試験の対象品目を見直すこととした。基準の第一として、ヒスタミンは水溶性の強塩基性物質であることに基づき、脂溶性物質及び製造工程で有機溶媒処理を経る半合成物質や、強塩基性物質が除去されるような製造工程を経る品目は同試験の対象から除外することとした。第二に、類似の製造工程を経る物質が同試験の対象外である場合や、米国「CFR」で試験対象外とされている品目を除外することとした。第三として、当該物質自体が血圧降下作用を示すか生体内でヒスタミン遊離作用を示す品目を除外することとし、第四に、注射用製剤が製造されていない品目を除外することとした。

同研究班による見直し案は厚生省に提出され、中央薬審における審議を経て、1990年の「日抗基」大改正において、アミノグリコシド系13品目、マクロライド系3品目など21品目がヒスタミン試験の対象から除外され、既に注射用製剤が削除されていた6品目と合わせて27品目が試験対象から除外されたが、依然として原薬26品目及び注射用製剤27品目には製造ロット毎のヒスタミン試験が課されたまま存続した。

その後、1998年の「日抗基」の大改正においては、ヒスタミンの混入は抗生物質生産菌の培養時に発生するとの判断に基づき、同試験は原薬についてのみ課すこととされ、それら原薬から製される注射用製剤は試験対象外とされた。また、化学合成工程を経て製造される原薬5品目及び注射用製剤が製造中止された原薬4品目が試験対象から

削除された。その結果、「ヒスタミン試験」の対象は、微生物の培養により製造される天然抗生物質であり、分子中に塩基性を示す残基を有する18品目の原薬のみとなった。

一方、米国においては、1998年4月に改訂のCFRでは22品目の抗生物質医薬品原薬が“Depressor substances test”の対象品目とされていたが、1999年5月に告示されたUSP XXIII Suppl. 10において一般試験法の“Depressor Substances Test <101>”を削除したことに伴い、同試験の対象から抗生物質医薬品の原薬10品目と製剤24品目が削除された。その削除の理由として、1) 初期のSMの数バッチを除いて同試験で検定不合格となったバッチが無いこと、2) 文献調査の結果、抗生物質の主要な生産菌である放線菌 (*Streptomyces* 属) は天然アミノ酸のヒスチジンからヒスタミンを生成するヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase: HDC) を産生しないことが確認されたことの2点が挙げられていた。USPの改訂に伴い、同試験はCFR21からも削除され、米国の全ての抗生物質医薬品から“Depressor substances”の規格が削除された。

日抗学協の研究班では、USPによる同試験の削除を受けて、2000年6月に表2に示す「ヒスタミン試験」の対象である抗生物質医薬品原薬18品目の製造会社に対して、当該抗生物質の生産菌に係るHDCまたはヒスタミン関連の文献調査及び当該抗生物質の発酵・単離・精製等の製造工程に関する情報の提出と、過去10年間の自家試験におけるヒスタミン試験実績の遡り調査などを求めた。

一方、「日抗基」は、続報<sup>58)</sup>に詳述するように、2002年末をもって従来の基準品目に係る品質規格書としての使命を終え、同基準に収載の抗生物質医薬品は「日局」に移行させる作業が進められていたが、その移行作業における最難関事項がヒスタミン試験の継続の可否であった。同試験は、

表2. ヒスタミン試験対象品目の除外の理由

抗生物質原薬名	除外の理由
aclarbucic hydrochloride	精製工程, HDC非産生
bleomycin hydrochloride	自体に血圧降下作用あり, HDC非産生
bleomycin sulfate	自体に血圧降下作用あり, HDC非産生
clindamycin phosphate	発酵工程, 精製工程, HDC非産生
colistin sodium methanesulfonate	注射剤なし
daunorubicin hydrochloride	精製工程, HDC非産生
dihydrostreptomycin sulfate	既に製造中止
doxorubicin hydrochloride	半合成品, 精製工程
enviomycin sulfate	精製工程, HDC非産生
lincomycin hydrochloride	精製工程, HDC非産生
mitomycin C	精製工程, HDC非産生
oxytetracycline	既に製造中止
oxytetracycline hydrochloride	注射剤なし
peplomycin sulfate	自体に血圧降下作用あり, HDC非産生
spectinomycin hydrochloride	HDC非産生, 過去の実績
streptomycin sulfate	発酵工程 (低ヒスタジン), HDC非産生
teicoplanin	再審査期間中, 製造工程・生産菌の情報なし
zinostatin	精製工程, 過去の実績

精製工程：精製工程で溶媒への転溶などの、水溶性アミン化合物と分離する工程を経る  
 発酵工程：発酵生産の工程で水溶性アミンが産生されていないことを確認  
 HDC非産生：生産菌がヒスタジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase) を産生せず  
 半合成品：天然の daunorubicin から化学合成工程を経て製造されている

「日抗基」においてのみ規定されている特殊な試験であり、「日局」では規定されていない試験であるが、抗生物質医薬品の移行に伴って「日局」に新たに同試験を規定することは、国際的な薬局方の整合性を保つ上で不可能であると判断された。しかしながら、同試験は注射投与される抗生物質医薬品中に血圧降下物質が混入するという、不測の事態を回避するために設けられた安全性を担保する試験であり、安易に廃止することは許されないという慎重意見も出されており、同試験を廃止するためには説得性のある理由が必要とされた。

1998年の「日抗基」大改正の直後から始まった「日局」への移行に係る作業においては、中央薬審の組織改編に伴って設置された「抗菌性医薬品規格検討小委員会 {委員長：谷本剛 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所薬品試験部室長)}」が新たな「日局」各条の文案作成を行ったが、著者の一

人 (MY) は同小委員会の委員長補佐を務めており、日抗学協の研究班が収集したヒスタミン試験に関する製造会社からの提出資料を同小委員会における審議に付した。問題とされていた原薬18品目について、製造会社における自家試験成績を10年前まで遡って調査した結果では合計9,854ロットの中で陽性を示した原薬はペプチド系抗結核薬の enviomycin sulfate の1ロットのみであり、同ロットは再試験において陰性であったことが確認された。なお、同物質は水溶性で強塩基性の鎖環状ペプチドであり、構造類似の viomycin はそれ自体がヒスタミン遊離作用を示すために米国「CFR」では試験対象外とされており、上記の1ロットが陽性を示した事例は enviomycin 自体のヒスタミン遊離作用に拠るものであると判断された。また、予研で1984年まで実施されていた国家検定における直近10年間の合計12,948ロットの成績を調

査したところ、ヒスタミン試験で陽性と判定された製品はなかったことを確認した。

日抗学協の研究班に提出された18品目に関する資料は同小委員会において審議された結果、表2の「除外の理由」の欄に示すように2品目は既に製造中止であり、2品目は注射剤が製造中止されており、1品目は半合成品であること、3品目は当該品目自体に血圧降下作用があることにより同試験の対象外とされた。残る10品目のうちの9品目は、製造工程においてヒスチジンの混入が避けられているか、生産菌がHDCを非産生性であるか、過去10年間の同試験において全て適合していたという実績に基づいて同試験の対象から除外された。ところが、teicoplaninは承認後の期間が短く再審査期間中となっており、その製造工程や生産菌のHDC産生の有無の調査結果が提出されておらず、ヒスタミン試験の対象品目として残された。同試験の対象品目が1品目のみとなったことにより、「日局」の一般試験法として「ヒスタミン試験法」を規定する必要はなくなり、抗生物質医薬品の「日局」への移行作業における最難関事項が解決されたのである。ヒスタミン試験の唯一の対象品目として残されたteicoplaninは、第14改正「日局」の各条の規格項目の中に“血圧降下物質：別に規定する”との規定がなされており、その規定は第17改正「日局」まで継続していたが、2017年12月に告示された第17改正「日局」第1追補<sup>28)</sup>において削除された。

厚労省では、2002年12月27日に第14改正「日局」第1追補の制定<sup>25)</sup>について告示し、同時に「日抗基」を同月31日限り廃止<sup>26)</sup>することを告示した。厚労省においては、1999年9月の時点で既に「日抗基」の廃止を決定しており、廃止後の各条医薬品の「日局」への移行作業を順調に進めるために「局外規四部」を制定していたが、廃止された「日抗基」を「局外規四部」の最後の各条医薬品の後に「局外規四部その2」として追加する<sup>59)</sup>

こととした。従来の「日抗基」に規定されていた「ヒスタミン試験法」は第14改正「日局」第1追補には追加収載されなかったが、「局外規四部その2」には現存しており、今後、ヒスタミン試験を課す必要がある医薬品が出現した場合には同試験法を準用することが可能となっている。

### III. 考察

我が国の薬事行政において、抗生物質はSMの発見者であるSelman Waksmanが1945年に著書<sup>60)</sup>の巻末に付した用語集の中で定義した“微生物由来の化学物質であり、細菌またはその他の微生物の生育又は代謝活性を阻害するもの”であるとして取り扱われてきた。その定義には、由来（製法）と作用（薬効）の2つの異なる観点が含まれており、製法としては天然物の抽出及び誘導体作成、薬効としては抗細菌・抗真菌・抗ウイルス・抗原虫活性に限定した定義であった。

抗生物質の製法が微生物発酵工程を経るため、抗生物質医薬品はワクチン等と同様に生物学的製剤の範疇に含まれると見なされ、初期の製造工程においては有害物質が生成または混入する可能性があること懸念された。それ故、抗生物質医薬品には有害物質が混在しないことを担保するために、各種の生物学的な安全性試験が設定された。

本稿では、抗生物質医薬品の薬効を測定するための微生物学的力価試験法と代替え試験法、未知の毒物の混入を検出するためのマウスを用いる毒性物質試験法、発酵工程由来のリポ多糖（エンドトキシン）などの混入を検出するためのウサギを用いる発熱性物質試験法、水溶性塩基性の抗生物質に混在する可能性がある血圧降下物質を検出するためのネコを用いるヒスタミン試験法の制定の経緯と意義及びそれらの試験法の見直しの経緯について調査・解析した。

抗生物質医薬品の品質を確保するための品質規

格書として「日抗基」が制定され、同書に規定の試験法に拠る自家試験と国家検定において適合と判定された高品質の製品のみが供給されてきた結果として、我が国の感染症等の疾患は効果的に制御されてきた。抗生物質医薬品に課されていた安全性を担保するための生物学的試験は、製薬企業と予研にとっては実施する上での負担は大きかったが、一般医薬品には課されていない試験が課されていたことにより、抗生物質医薬品に関しては偽薬や粗悪品の製造が難しいことがあり、特に注射剤は高品質の製品のみが供給されてきており、国民にとっては健康維持上の大きな利点があった。「日抗基」に規定する規格に適合する製品のみを供給するという国家検定の理念に沿った好ましい効果であったと評価することができる。現在は、GMPにより高品質の製剤を供給する製造工程を管理することが可能であり、最終製品について煩雑な生物学的試験を実施する必要はなくなったと判断されている。

予研における抗生物質医薬品の国家検定は、製造技術や自家試験技術が十分に習熟されGMP省令が遵守されていると判断されたことにより、経口用製剤は1979年3月に対象から外され、注射剤は1985年3月の厚生省告示<sup>61)</sup>をもって薬事法第43条第1項の規定に基づく厚生大臣の指定する検定を受けるべき医薬品から削除され、以後は薬事法第71条の規定に基づく検査命令の対象品目となった。

抗生物質医薬品の品質向上の実例として、微生物の発酵により製造される天然物のストレプトマイシン硫酸塩<sup>2)</sup>を挙げると、規格値から換算した純度が1949年には37.6%であったものが、1952年には81.5%、1982年には90.0%、2002年には92.7%まで向上し、現在の「日局」では規格値が740~820 $\mu\text{g}/\text{mg}$ と設定されており、純度換算では92.7~102.8%であって、一般の化学薬品と比較して遜色のない高純度の医薬品である。

それ故、抗生物質医薬品は1947年5月に告示された「PC基準」以来、2002年12月に「日抗基」が廃止されるまでの55年間にわたって、ワクチンと同様な生物学的製剤としての取り扱いを受けてきており、未知の毒性物質や発熱性物質や血圧降下物質などが混在する可能性がある天然物由来の医薬品として、安全性を担保するための動物を用いる安全性試験が課されてきたが、今日では他の医薬品と同様に「日局」において規定される医薬品として取り扱われることとなり、特別な安全性試験が課されることはない状況となっている。

## 謝辞

著者の一人(MY)は、財団法人日本抗生物質学術協議会に勤務した期間中、同財団理事長で国立予防衛生研究所抗生物質部元部長の梅澤濱夫博士の指導の下に「日本抗生物質医薬品基準」の改正作業に従事し、本稿の主題である抗生物質医薬品の生物学的試験について研鑽を積むことができたことを深く感謝している。

## 利益相反

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

## 引用文献

- 1) 八木澤守正, Foster PJ, 黒川達夫：我が国において抗生物質医薬品の品質基準の果たした役割に関する薬史学的・公衆衛生学的考察：第1報 抗生物質医薬品の発展。薬史学雑誌2015; 50: 119-30.
- 2) 八木澤守正, Foster PJ, 黒川達夫：我が国において抗生物質医薬品の品質基準の果たした役割に関する薬史学的・公衆衛生学的考察：第2報ペニシリン及びストレプトマイシンの国産化の達成。薬史学雑誌2015; 50: 131-42.
- 3) Yagisawa M, Foster PJ, Kurokawa T: Historical and hygienic aspects on roles of quality requirements for antibiotic products in Japan: Part 3-Introduction of technology and knowledge in



- production process and quality control of penicillin from the United States of America. *J History Pharm.* 2016; 51: 18–28.
- 4) 八木澤守正, Foster PJ, 黒川達夫: 我が国において抗生物質医薬品の品質基準の果たした役割に関する薬史的・公衆衛生的考察: 第4報 個別の抗生物質医薬品の基準制定の経緯. *Jpn J Antibiot.* 2016; 69: 221–34.
  - 5) Yagisawa M, Foster PJ, Kurokawa T: Historical and hygienic aspects on roles of quality requirements for antibiotic products in Japan: Part 5-Introduction of technology and knowledge on streptomycin production from the United States of America. *Jpn J Antibiot.* 2016; 69: 235–56.
  - 6) 抗菌性物質製剤基準. 昭和27年3月8日厚生省告示第49号. 官報第7549号.
  - 7) 厚生省. 日本抗生物質医薬品基準1969. 昭和44年8月11日厚生省告示第275号.
  - 8) 抗生物質の毒性物質試験法に関する研究. 昭和60年度厚生科学研究報告〔主任研究者: 八木澤守正 (財団法人日本抗生物質学術協議会)], 1986. 104 p.
  - 9) 日本抗生物質医薬品基準解説1990. 財団法人日本抗生物質学術協議会編. 薬業時報, 東京, 1990.
  - 10) 米国FDA ペニシリン検定規則 (上)・(下). ペニシリン1947; 1: 112–4及び175–8.
  - 11) Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, Orr-Ewing J, *et al.*: Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet.* 1940; 236: 226–8.
  - 12) Fleming A. History and development of penicillin. In: Fleming A, editor. *Penicillin – Its Practical Application*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Butterworth & Co. Ltd.; 1950; p. 1–25.
  - 13) 梅澤濱夫: それはペニシリンから始まった—抗生物質の研究を顧みて—. *科学朝日* 1961年11月号, 151–9.
  - 14) 「ペニシリン基準」. 昭和22年5月1日厚生省予防局告示. ペニシリン1947; 1: 181–2.
  - 15) 安藤晝一: ペニシリン療法の基礎知識. 日本臨床社, 東京, 1947.
  - 16) 小高健: “第八章予防衛生研究所の創設”. 傳染病研究所 近代医学開拓の道のり. 学会出版センター, 東京, 1992; p. 417–68.
  - 17) 予防衛生研究所官制公布. 昭和22年5月21日政令第58号. 官報第6102号. 国立国会図書館デジタルコレクション <http://dl.ndl.go.jp/info:ndljp/pid/2962617> (参照2017-11-13)
  - 18) 梅澤濱夫, 鈴木幸朗, 竹内富雄: ペニシリン検定に就て (中央検定部報告). ペニシリン1947; 1: 248.
  - 19) 検定概況 ペニシリン. 年報昭和22年度. 予防衛生研究所, 東京, 1948; p. 59–61.
  - 20) 医薬品各条 ベンジルペニシリンカリウム. 「日本抗生物質医薬品基準1969」. 厚生省, 東京, 1969; p. 295.
  - 21) 医薬品各条 塩酸オキシテトラサイクリン. 「日本抗生物質医薬品基準1969」. 厚生省, 東京, 1969; p. 184–5.
  - 22) 「日本抗生物質医薬品基準」改正告示. 昭和57年6月30日厚生省告示第117号. [略された「次のよう」: 財団法人日本抗生物質学術協議会編「日本抗生物質医薬品基準解説1982」. 薬業時報社, 東京, 1982.]
  - 23) 谷本剛, 八木澤守正, 藤原博: 日本抗生物質医薬品基準の日本薬局方への移行における問題点とその対応 (その2) —一般試験法—. *医薬品研究* 2001; 32: 423–31.
  - 24) 谷本剛: 第十四改正日本薬局方の改正点. *医薬品各条の改正点. 抗生物質医薬品.* 薬局2001; 52: 1603–8.
  - 25) 第14改正日本薬局方第一追補: 平成14年12月27日厚生労働省告示第395号.
  - 26) 日本抗生物質医薬品基準を廃止する件: 平成14年12月27日厚生労働省告示第398号.
  - 27) 第十七改正日本薬局方. 平成28年3月7日厚生労働省告示第64号. <http://jpdh.nihs.go.jp/jp17/> (参照2018-01-10)
  - 28) 第十七改正日本薬局方第一追補. 平成29年12月1日厚生労働省告示第348号. <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/17-1.pdf> (参照2018-01-13)
  - 29) *The Pharmacopoeia of the United States of America Thirteenth Revision (U.S.P. XIII)*. Washington D.C., United States Pharmacopoeia Convention, 1948.
  - 30) ペニシリン基準改正. 昭和25年12月16日厚生省告示第300号. 官報第7181号 [省略された「以下のように」: *J Antibiot.* 1951; 3: 892–914.]
  - 31) 第六改正日本薬局方. 昭和26年3月1日厚生省告示第31号. 官報第7240号.

- 32) 輸入ストレプトマイシンの配給及使用等について。昭和24年5月10日厚生省予防局長及び薬務局長通知, 予発第36号。臨床部会第1回中間報告。ストレプトマイシン研究協議会, 東京, 1949.
- 33) ストレプトマイシンの配給について。昭和24年11月8日厚生省薬務局長通知, 薬発第1832号。J Antibiot. 1949; 3: 56.
- 34) 資料 ストレプトマイシンの使用書。ペニシリン1949; 2: 554-6.
- 35) 薬事法。昭和23年7月29日法律第197号。官報第6461号。
- 36) ストレプトマイシン基準。昭和24年12月20日厚生省告示第275号。官報第6882号。〔省略された「以下のよう」; J Antibiot. 1950; 3: 147-50.〕
- 37) 梅澤濱夫: ストレプトマイシン その他放線状菌の作る抗菌性物質。薬事振興会, 東京, 1948.
- 38) Tishler M: Production and isolation of streptomycin. In Waksman SA editor. Streptomycin - Nature and Practical Applications. Baltimore, Williams & Wilkins, 1949.
- 39) 梅澤濱夫: “IVストレプトマイシン, 2. タンク培養”。梅澤濱夫著。ペニシリンとストレプトマイシン。中央公論社, 東京, 1949; p. 124-30.
- 40) 第4章 一般試験法: ヒスタミン試験法。日本抗生物質学術協議会編。日本抗生物質医薬品基準解説1982。薬業時報社, 東京, 1982; p. 717-8.
- 41) 日本抗生物質医薬品基準の制定および日本薬局方第一部の一部改正について。昭和44年8月27日付厚生省薬務局長通知, 薬発第657号。
- 42) 日本抗生物質医薬品基準解説1969。薬業時報社, 東京, 1969.
- 43) 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令。平成9年3月26日厚生省令第21号。
- 44) Antibiotic drugs. Deletion of safety test. Agency: Food and Drug Administration, Action; Final rule. Federal Register. May 14, 1985; 50 (No. 92): 19917-21.
- 45) 日本抗生物質医薬品基準1990。平成2年3月31日厚生省告示第87号。
- 46) 國枝卓: 日本抗生物質医薬品基準の改正について。月刊薬事1990; 32: 923-7.
- 47) 日本抗生物質医薬品基準解説1990。財団法人日本抗生物質学術協議会編。薬業時報社, 東京, 1990.
- 48) 「医薬品の製造管理及び品質管理規則」(GMP省令)。昭和55年8月16日厚生省令第31号。
- 49) 原由起子, 長岡芳昭, 高橋佐喜子, 水野左敏: 抗生物質の発熱性物質試験におけるウサギ下痢症と *Clostridium difficile* の分離。日化療学会誌1991; 39: 211-6.
- 50) 各論第4章一般試験法: 発熱性物質試験法。財団法人日本抗生物質学術協議会編: 日本抗生物質医薬品基準解説1993。薬業時報社, 東京, 1993.
- 51) 日本抗生物質医薬品基準解説1998。財団法人日本抗生物質学術協議会編。薬業時報社, 東京, 1998.
- 52) Wachtel RE, Tsuji K: Comparison of limulus amebocyte lysates and correlation with the United States pharmacopeial pyrogen test. Appl. Environ. Microbiol. 1977; 33: 1265-9.
- 53) The Pharmacopoeia of the United States of America Twentieth Revision (U.S.P. XX). Rockville, MD, United States Pharmacopoeial Convention, 1980.
- 54) 第十一改正日本薬局方追補一般試験法エンドトキシン試験法。昭和63年10月1日厚生省告示第250号。
- 55) 日本薬局方外医薬品規格第四部の創設等について。平成11年9月22日厚生省医薬安全局長通知, 医薬発第1117号。
- 56) 日本薬局方外医薬品規格 第四部 (抗生物質医薬品)。財団法人日本抗生物質学術協議会編: 抗菌性物質医薬品ハンドブック2000。薬業時報社, 東京, 2000.
- 57) 第十四改正日本薬局方 製剤総則 注射剤。平成13年3月30日厚生省告示第111号。
- 58) 八木澤守正, Foster PJ, 黒川達夫: 我が国において抗生物質医薬品の品質基準の果たした役割に関する薬史的・公衆衛生学的考察: 第8報「日本抗生物質医薬品基準」の日本薬局方への統合。(投稿準備中)
- 59) 日本薬局方外医薬品規格第四部 (抗生物質医薬品) の一部改正について。平成14年12月27日厚生労働省薬務局長通知。医薬発第1227016号。
- 60) Waksman SA: Microbial antagonisms and antibiotic substances. New York: The

Commonwealth Fund; 1945; 350 p.

61) 検定を受けるべき医薬品等を定める件の一部  
改正について。昭和60年3月20日厚生省薬務

局長通知。薬発第265号 [http://www.japal.org/wp-content/uploads/mt/19850320\\_265.pdf](http://www.japal.org/wp-content/uploads/mt/19850320_265.pdf)  
(参照2018-01-18)

---

## Historical and hygienic aspects on roles of quality requirements for antibiotic products in Japan: Part 6 - Biological tests imposed on antibiotic products

Morimasa Yagisawa<sup>1)</sup>, Patrick J. Foster<sup>2)</sup> and Tatsuo Kurokawa<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup> Division of Drug Development & Regulatory Science,  
Keio University Faculty of Pharmacy

<sup>2)</sup> Division of Basic Education in Arts & Sciences,  
Keio University Faculty of Pharmacy

<sup>3)</sup> Present Affiliation: Japan Self-Medication Industry

Antibiotic products, like vaccines, had been regarded as “biological products”, due to their natural substance quality from being produced by microorganism fermentation. Consequently, they were dealt with legally as “inspection objects” to be subjected to the national certification program.

In the early stages, all processes of fermentation, extraction, purification and formulation of antibiotic products were unskilled practices. There were concerns about unknown toxic, pyrogenic or depressive substances that might be preparation contaminants that could possibly be administered to patients. Therefore, biological safety tests using mice, rabbits and cats had been imposed on antibiotic preparations in order to detect the existence of any such harmful substances.

Antibiotic product development was so remarkable that many chemical derivatives possessing higher activity, or improved pharmacological characteristics, had been introduced into clinical use. Under such circumstances, it was determined that the traditional ways of dealing with antibiotics as biological products were irrational. A more rational approach would be to handle the development in a manner similar to that used for general chemical drugs. As a result, the national certification of antibiotic products was abolished and the “Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan” was integrated into the “Japanese Pharmacopoeia”. During the integration process, it was necessary to revise animal tests that did not conform to the principle of pharmacopoeia. This was accomplished by either the complete abolishment of or replacement with appropriate chemical tests.

In this report, we investigated, analyzed and discussed the biological safety tests imposed on antibiotic products for their importance of enactment, the transition of experimental procedures, and the sequence of events involving the reconsiderations and abolishments.