

Ⅲ 研究報告

富山シャクヤクのブランド化推進事業 —実生産規模乾燥調製法の実証と調製加工における成分変動—

田村 隆幸, 東 一彦, 大江 勇, 横田 洋一, 竹林 憲司

Demonstration studies on drying of *Paeonia lactiflora* Pallas for large-scale production and constituents change in the preparation processing

Takayuki TAMURA, Kazuhiko AZUMA, Isamu OE, Yoichi YOKOTA, Kenji TAKEBAYASHI

要 約

「富山シャクヤク」としてブランド化を図る品種「春の粧」を栽培する生産者が高品質シャクヤクを安定的に出荷するための乾燥調製マニュアルの作成を目指し、使用予定の平型乾燥機を用いた実生産規模での乾燥試験及び成分分析を実施した。その結果、考案した断続送風での乾燥調製法で乾燥が可能であり、30℃では加温送風開始から15日後（加温送風は8日間）、40℃では同13日後（同7日間）に乾燥が完了した。いずれの温度でも目標とする高品質な生薬を生産でき、30℃での乾燥の方がペオニフロリン含量が高い傾向であった。

今回の結果を基に、さらに乾燥時間やコストを削減した効率的な乾燥法へと改良し、生産者への技術移転を通して、シャクヤクの乾燥出荷を支援していく。

Summary

Drying method and quantitative analysis of constituents of *Paeonia lactiflora* for large-scale production using the flat-bed dryer was investigated for the purpose of making a processing manual for the farmers who cultivated "haru-no-yosooi (cultivar of *P. lactiflora*)" to plan branding as "Toyama peony" to ship peony root of high quality stably. As a result, fresh roots were able to dry by the drying method that we devised using an intermittent wind blast technique. The drying at 30 degrees Celsius was completed 15 days after a start of heating blast (heating blast : 8 days), and the drying at 40 degrees Celsius was completed 13 days (heating blast : 7 days) in the same way. Even drying at which temperature was able to produce crude drugs which satisfied an aim of high quality, but the paeoniflorin content by the drying at 30 degrees Celsius was a high the tendency.

We will study on the efficient drying methods that reduced time and cost for drying, and support farmers by technology transfer.

キーワード：シャクヤク, 乾燥, 平型乾燥機, ペオニフロリン

Key words : Peony root, Drying, Flat-bed dryer, Paeoniflorin

我々は、薬用植物指導センターで保有する230の園芸品種の中から薬用として高品質で、かつ切花生産も可能な品種を選定し、その栽培普及と利用の推進により付加価値の高い「富山シャクヤク」のブランド化を図るため、平成22年度から関連する研究を進めてきた。平成26年度までに実施した品種別の薬理試験及び成分分析、並びに栽培試験での生育及び病害調査の結果から、総合的に評価して優良な3品種を選抜した¹⁾。選抜の際には、新たに4年間栽培して得た生薬での薬効の再評価及び成分の再分析を実施し、品質の安定性及び再現性を確認している。平成27年度からは、選抜品種のうち実用化が最も進んでいる「春の粧」について、高品質な生薬を安定して生産するための実生産規模の乾燥調製法の確立に向けた検討を行ったので報告する。収穫から乾燥までの各工程での条件により生薬の成分等は変動することから、乾

燥調製法の検討における試料の品質確認については、優良品種の選抜のときのサンプル（自然乾燥）と同等であることを基準に評価した。

実験方法

1. 乾燥試験

(1) シャクヤク試料

富山県薬用植物指導センター（中新川郡上市町広野2732）で慣行法により栽培したシャクヤク（品種名：「春の粧」及び「梵天」）の根を10月から11月に収穫し、試料とした。収穫年は平成25年、27年及び28年で、いずれも4年栽培である。試料は、細い主根（径5 mm以下）や細根を概ね除去し、ガラ袋（PP袋）に約20 kgずつ入れた。これらを屋外、日陰の土の上に

並べ、その上にビニールシートを被せて乾燥を防止し、乾燥試験の実施まで約3ヶ月間貯蔵した。

(2)貯蔵後の再選別

第17改正日本薬局方²⁾(以下、「日局17」という)の医薬品各条「シャクヤク」における生薬の性状を参考に、概ね次の規格に適合するものを選別し、試験に供した。

- ・太さ 直径1.0 cm ~ 3.0 cm
- ・長さ 7 cm ~ 30 cm
- ・側根を分離し(股割り)、腐り、虫害、変色が認められるもの、皮の剥離の著しいもの(部分)、細根及び根茎部は除外する。

(3)洗浄

選別後の試料は、回転式洗浄機(図1)を用いて水のみで洗浄した。伝統的なシャクヤクの調製加工では、この洗浄機で砂と水とともに回転させ根の皮を剥くが、出荷予定企業の要望により、試料の根皮は剥かなかった。

【回転式洗浄機の概要】

洗浄槽サイズ：幅120 cmの六角柱型
(六角形の一辺は40 cm)

回転数：約45 rpm

【洗浄の条件】

- ・洗浄1回当たりのシャクヤク重量：約20 kg
- ・予備洗浄：水に浸漬10分間
- ・洗浄時間：計1分30秒(30秒洗浄で水の入換え)



図1 回転式洗浄機

(4)乾燥機

大紀産業(株)製 1坪型循環式平型乾燥機 HK-200-3.3C(図2)

乾燥槽は、幅1800 mm、奥行1800 mm、深さ500 mm(底板の位置調節を下段に設定)のサイズで、底板の多数の穴から温風が上方向に送風される。

(5)乾燥方法

前記乾燥機を使用したシャクヤクの乾燥方法がなかったため、第一に「全体に均一に乾燥できること」、

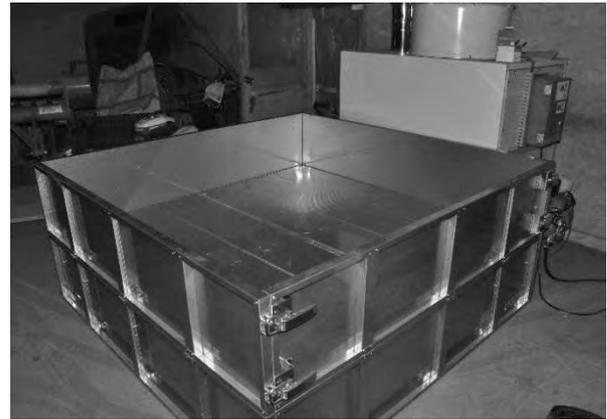


図2 試験に用いた平型乾燥機
(循環用の幌状シートを外した状態)

第二に「基礎検討³⁾で実施した連続送風乾燥よりも乾燥効率を向上させること」を目指し、次の乾燥方法を計画した。生薬の成分等の品質に最も影響を及ぼすと考えられる乾燥温度については、30℃及び40℃で比較したが、その他の乾燥条件は統一した。

【計画した乾燥方法】

底面が網目の容器(外寸 幅×奥行×深さ：595×399×229 mm)に水洗済みのシャクヤク根を入れ、乾燥槽内に1段当たりの容器数を13個として2段に重ねて計26個の容器を入れた。各容器に入れるシャクヤク根の重量は15 kgとし、1回の乾燥で合計390 kgを乾燥できる設定とした。

乾燥槽内で無加温送風を16時間実施した後、乾燥機を下記の設定で稼働させた。基礎検討の結果³⁾から連続送風より断続送風の方が短い稼働日数で乾燥し、また、休止期間を利用して次ロットの乾燥も同時進行することを想定して、24時間の稼働につき同時間の休止を繰り返す断続送風乾燥とした。休止期間中は試料を乾燥機から取り出して室内で保管した。乾燥期間中は乾燥槽内の容器の位置の入れ換えを実施した。

○乾燥機の設定条件

- ・温度：30℃又は40℃
- ・風量(インバーター設定値)：50 Hz
- ・循環機能(排気口ダンパー開閉度)：1(全開放)
- ・乾燥槽循環用の幌状シート：設置

○乾燥槽内の容器の入れ換え方法

- ・48時間毎に、①水平方向の位置、②上段、下段の位置を入れ換える。①は図3の規則に従う。
- ・①と②を同時に実施し、48時間毎に同じ要領で入れ換えを繰り返す。
- ・位置の入れ換え時に、容器内のシャクヤクを混合する。

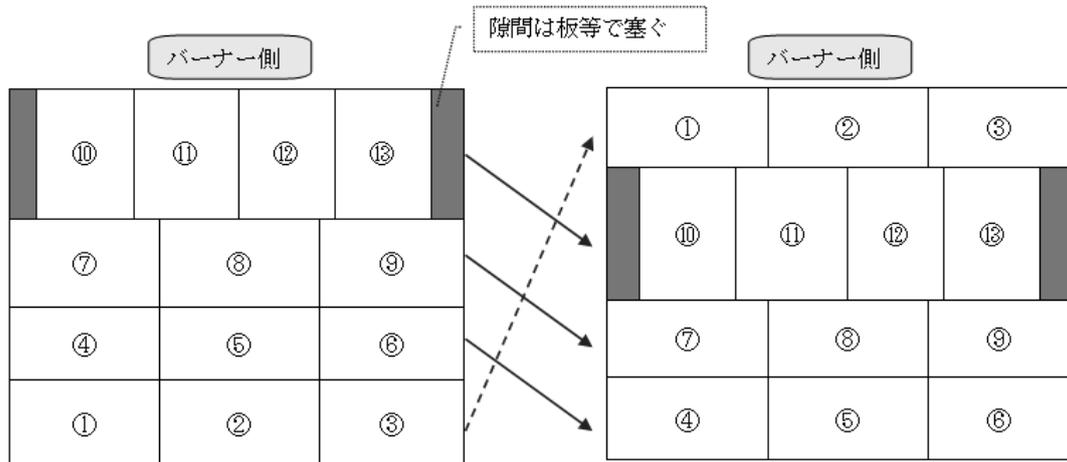


図3 乾燥槽内の容器の水平方向入れ換え規則（乾燥槽を上方から見た概略図）

(6)乾燥中の重量測定

各容器の重量を24時間毎に測定し、乾燥完了までの重量変化及び期間を記録した。また、容器の位置の違いが乾燥の進行に及ぼす影響について検討した。

(7)乾燥完了の判定

日局17ではシャクヤクの乾燥減量は14.0%以下と規定されている。正式な乾燥減量の試験を実施するにはサンプリングした試料を粉末として6時間加熱乾燥する必要があり、乾燥現場では簡易に乾燥の完了を判定できる方法が必要である。そこで、別の乾燥サンプルを用いた検討により、木材用水分計（RiXEN社製M70-D）で13%以下であれば要件を十分に満たしたことから、これを乾燥完了の目安とした。

2. 白色度

生薬シャクヤクは、市場では内部の色が白く充実したものが良品と評価されることから、ブランドイメージ構

築のため、「富山シャクヤク」を白く仕上げることも目指し、白色度でも評価することとした。

乾燥したシャクヤク根500gを細断後、粉碎して得られた粉末を試料とし、その色彩を分光色差計（日本電色工業㈱製NF555）で測定し、得られたL*a*b*値からハンター氏白色度を求めた。10回の測定値の平均を結果とした。

3. 成分分析

(1)乾燥エキス調製法（エキス含量）

乾燥したシャクヤク根の各粉末試料を用いて、日局17医薬品各条「シャクヤク」の定量法の抽出法に準じ、図4に従って乾燥エキスを作製した。この重量を生薬に対する含量%で表し、エキス含量とした。

(2)主要10成分の定量法

シャクヤクの主要10成分（ペオニフロリン、アルビフロリン、オキシペオニフロリン、ベンゾイルペオニ

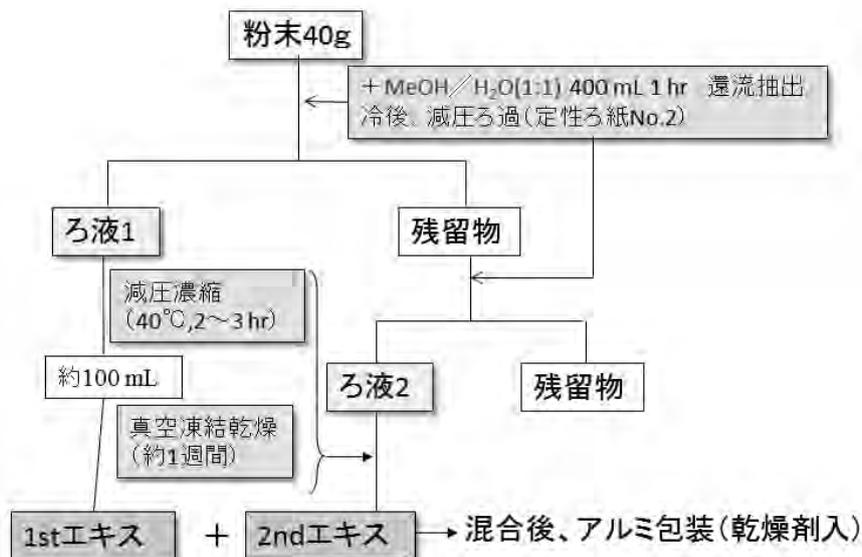


図4 シャクヤク乾燥エキスの調製法

フロリン、ペンタガロイルグルコース、没食子酸、没食子酸メチル、カテキン、安息香酸、ペオノール)を次の方法により定量した。

上記エキス約 0.1 g を精密に量り、メタノール/水混液 (1:1) を加えて溶かし、正確に 50 mL とした。この液 5 mL を正確にとり、内標準液 2 mL を正確に加え、水 2 mL 及びメタノール/水混液 (1:1) 1 mL を加え、孔径 0.2 μm のメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とし、下記条件により分析した。各成分の定量値は、換算した生薬の乾燥物に対する含量%とした。

分析機器：UPLC (Waters 社製 H-class)

検出器：PDA (検出波長：232, 280, 257 nm)

カラム：ACQUITY UPLC HSS C18 1.8 μm
(2.1×50 mm)

カラム温度：25℃

移動相：A：薄めたリン酸 (1 → 1000),

B：アセトニトリル グラジエント

時間 (min)	流量 (mL/min)	%A	%B
0	0.5	95	5
1.1	0.5	75	25
2.5	0.5	10	90
3.0	0.5	0	100
3.2	0.5	0	100
3.4	0.5	98	2

注入量：0.5 μL

内標準物質 (IS)：ケルセチン (4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(3)糖類の定量法

上記エキスを試料として、ショ糖、ブドウ糖及び果糖を次の方法により定量した。

分析機器：HPLC

検出器：示差屈折計 (RI)

カラム：CAPCELLPAK NH2 UG80 5 μm
(4.6 × 250 mm)

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル/水 (4:1)

流量：0.8 mL/min

注入量：10 μL

内標準物質 (IS)：麦芽糖 (5 mg/mL)

50% アセトニトリルに溶解

結 果

1. 乾燥に伴う重量変化及び乾燥に要した日数 (図 5)

(1) 30℃での乾燥

「春の粧」の重量は開始から 3 日後 (加温送風は 2 日) に 73% に、同 7 日後 (加温送風は 4 日) には 61% に減少し、同 15 日後 (加温送風は 8 日) で 46.8% となり乾燥が完了した。「梵天」については、同様に 3 日後に 71% に、同 7 日後には 60% に減少し、同 15 日後 (加温送風は 8 日) で 50.2% となり乾燥が完了した。

(2) 40℃での乾燥

「春の粧」の重量は開始から 3 日後 (加温送風は 2 日) に 66% に、同 7 日後 (加温送風は 4 日) には 53% に減少し、同 13 日後 (加温送風は 7 日) で 44.8% となり乾燥が完了した。「梵天」については、同様に 3 日後に 64% に、同 7 日後には 54% に減少し、同 13 日後 (加温送風は 7 日) で 49.6% となり乾燥が完了した。

2. 乾燥槽内の位置の違いが乾燥の進行に及ぼす影響

30℃及び40℃での乾燥開始から 24 時間毎の「春の粧」の重量について、乾燥槽内の上段と下段の比較、水平方向の位置の比較を行った結果 (データ掲載なし)、いずれの重量差も重量の 2% 未満であり、乾燥の進行への影響はなかった。特定の位置で乾燥の進行が異なることもなかった。また、「梵天」での結果も同様であった。乾燥開始から 24 時間後の重量については、全体的に上段より下段の方が軽い傾向があったが、その後、全ての位置で同様に乾燥が進行したのは、48 時間毎の容器の位置の入れ換えによるものと考えられた。

3. 乾燥したシャクヤク根の外観

「春の粧」及び「梵天」をそれぞれ 30℃及び40℃で乾燥した試料の外観及び輪切りの写真を図 6 に示す。いずれの試料についても目視検査で変色は認められず、外観の異常は無かった。

4. 白色度

目視で白色と認識できる白色度 60 を目標値として設定した。「春の粧」の粉末試料の白色度は、40℃乾燥で 68.9、30℃乾燥で 70.4 であった (図 7)。「梵天」については、40℃乾燥で 70.2、30℃乾燥で 73.1 であった。「春の粧」は「梵天」と比較すると白色度がやや低いが、目標値を大きく上回った。分光色差計での測定結果から、「春の粧」の色調は「梵天」と比べて明度がやや低く、赤及び黄が若干強かったことが白色度の差に現れた。また、いずれの品種でも 40℃より 30℃の方が赤及び黄がともに少ない結果、白色度が高かった。

5. 収穫後の貯蔵及び乾燥によるエキス含量の変動

エキス含量は、生薬中の成分を溶媒で抽出した重量の割合で、日局 17 ではシャクヤクに試験は設定されていない

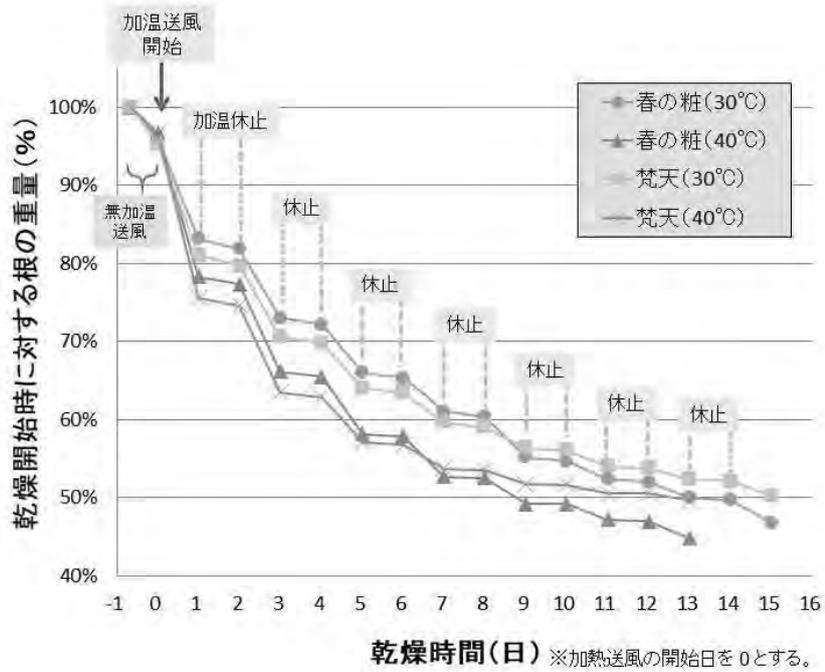


図5 シャクヤク根の乾燥に伴う重量変化

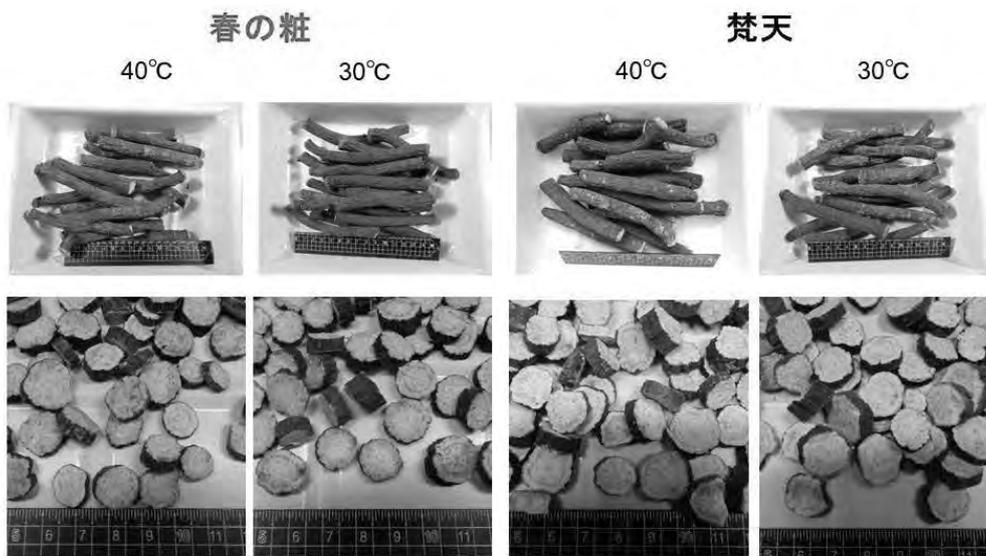


図6 乾燥した試料の外観

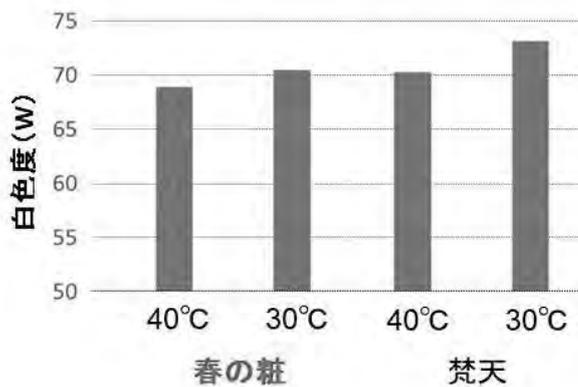


図7 乾燥した試料（粉末）の白色度

いが、エキス製剤の収量に大きく影響するため重要な項目である。一般に高い方が生薬使用企業からの評価は高くなるが、企業によって求める規格値は異なる。調製加工の方法をコントロールすることにより企業が求めるエキス含量に調整できる可能性もあり、収穫後の貯蔵及び乾燥による変動を検討した。

「春の粧」の根を貯蔵する前と後、乾燥後におけるエキス含量を図8に示す。収穫後の貯蔵前では約28%であるが、約3ヶ月の貯蔵後には38%となり、さらに平型乾燥機での乾燥(30℃)後には約53%に増加した。この値は、優良品種の選抜のときのサンプル(自然乾燥)と同等であった。

6. 収穫後の貯蔵及び乾燥による糖類含量の変動

上記4の結果(図8)と同じサンプルについて、糖類を定量した結果を図9に示す。エキス中に含有される糖類のほとんどがショ糖で、ショ糖は収穫後の貯蔵前では

約8%であるが、約3ヶ月の貯蔵後には約16%となり、さらに平型乾燥機での乾燥(30℃)後には約30%に増加した。この値は、優良品種の選抜のときのサンプル(自然乾燥)と同等であった。また、貯蔵や平型乾燥機(30℃)での乾燥によって他の成分含量はほとんど変化していない(データ掲載なし)ことから、貯蔵及び乾燥によるエキス含量の増加はショ糖によるものと推察された。

7. 平型乾燥機での乾燥温度の違いによる主要成分の変動

「春の粧」及び「梵天」をそれぞれ30℃及び40℃で乾燥した試料及び優良品種の選抜時と同じ自然乾燥した試料について、主要10成分を定量した結果を図10に示す。シャクヤク中のペオニフロリン含量は日局17で2.0%以上であることが規定されているが、実需者(生薬使用企業)からはさらに高含量の生薬が要望されていることから、「富山シャクヤク」の基準値を3.0%以上としている。30℃で乾燥した「春の粧」については、ペオニフロリン

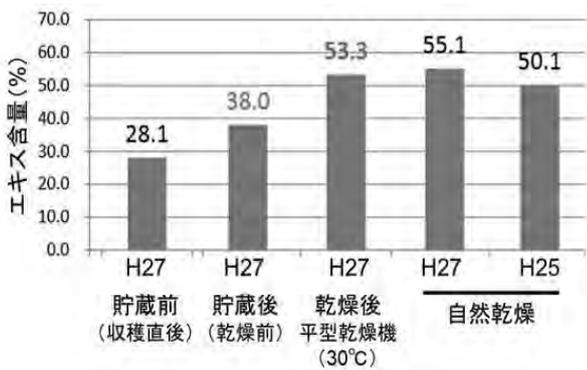


図8 貯蔵及び乾燥によるエキス含量の変動

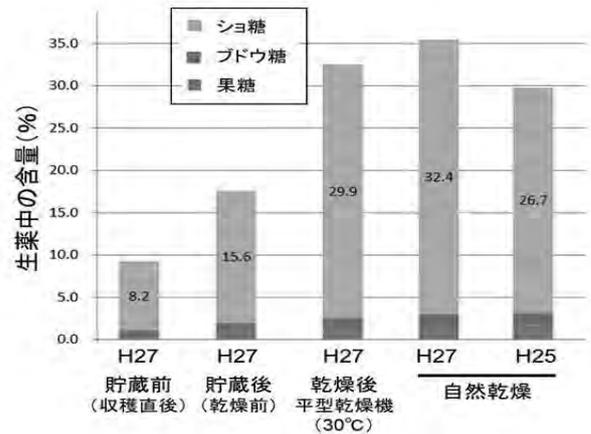


図9 貯蔵及び乾燥による糖類含量の変動

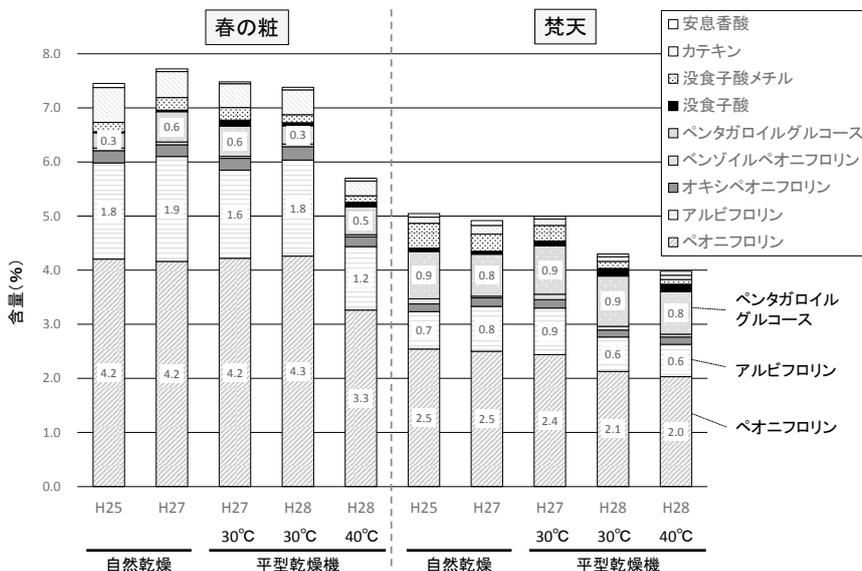


図10 平型乾燥機での乾燥温度の違いによる成分変動 (ペオニフロリンは全試料において定量限界以下であった。)

含量が平成27年産で4.2%、平成28年産で4.3%と安定して高く、定量した全成分の含量が品質の基準とした自然乾燥の試料と同等であった。40℃で乾燥した「春の粧」については、ペオニフロリン含量が3.3%であり、30℃での乾燥試料の77%に低下した。

考 察

現在、県内で栽培されているシャクヤク品種「梵天」は、未乾燥の生根で出荷されている^{4) 5)}が、県内生産者等で組織する「富山型薬用作物生産協議会」は、平成26年度の国の事業により平型乾燥機（1坪タイプ）をシャクヤク乾燥用に一部改良して導入し、乾燥出荷による新たな販路開拓と高付加価値化を目指した整備を進めている。ブランド用品種「春の粧」の生産者での栽培が平成30年11月に開始され、その4年後に収穫し出荷する際には出荷予定企業から乾燥品が求められており、当該乾燥機での乾燥が想定される。しかし、当該乾燥機を用いたシャクヤクの乾燥方法に関して乾燥条件や乾燥期間も不明であったため、事前に「梵天」を試料として当該乾燥機の基礎検討を行い、日本薬局方の規格を満たす生薬に乾燥できることを報告している³⁾。今回は、実際にブランド用品種「春の粧」を試料として、課題であった乾燥の効率化のため連続温風乾燥ではなく断続温風乾燥で乾燥試験を実施した。

シャクヤクに温風を当て続ける連続的な乾燥方法では根の表面の乾燥が急激に進行し、硬くなることによって中心部から表面への水分の移行が妨げられ、乾燥の進行が遅くなる。一方、断続温風乾燥では根の表面が硬くなる前に休止することで、中心部から表面への水分の移行がスムーズになり、乾燥効率が向上し、乾燥完了までの乾燥機稼働時間の減少によりコスト削減が可能であることを、これまでの基礎検討で明らかにしていた。そこで、本研究では、休止期間を利用して次ロットの乾燥も同時進行する効率的な乾燥を計画し、24時間の稼働につき同時時間の休止を繰り返す断続温風乾燥において、乾燥温度の違い（30℃及び40℃）による乾燥期間及び品質（成分含量及び白色度）への影響を比較検討した。

「春の粧」の乾燥完了までの期間については、30℃では加温開始から15日（加温期間としては8日）で、40℃では同13日（同7日）であった。乾燥期間に関して「梵天」との差はなかったが、乾燥歩留まりについては、「梵天」の約50%に対して「春の粧」は45～47%となり、若干低い傾向があった。両品種について別の研究における乾燥歩留まりの測定でも同様の値であったことから、これは品種特性であり、根のデンプン含量が多いほど乾燥歩留まりが高くなると推定される。

「春の粧」を実生産規模で乾燥した生薬の品質に関しては、30℃での乾燥は、ペオニフロリン含量が平成27年産で4.2%、平成28年産で4.3%と安定して高く、定量した全成分の含量が品質の基準とした自然乾燥の試料と同等であった。40℃での乾燥は、ペオニフロリン含量が3.3%であり、30℃での乾燥試料の77%に低下した。この成分低下の原因に関して、日局17のシャクヤク中のペオニフロリン定量法での抽出方法は加熱還流であり、単純な加熱による分解はほとんどないと考えられることから、乾燥中の特定の条件の組み合わせによって低下したことが考えられるが、詳細は不明である。今後の検討によりペオニフロリンが減少する条件について明らかにできれば、高品質な「富山シャクヤク」の安定的な生産に寄与できると考えられる。

今回の検討により、ブランド化を図るシャクヤク品種「春の粧」について、生産者が安定して高品質な生薬を出荷できるよう、平型乾燥機を用いた乾燥調製法を確立した。乾燥効率を考慮し、断続温風乾燥の休止期間に次ロットの乾燥を同時進行することにより、780 kgの生根の乾燥処理が30℃では16日間、40℃では14日間が可能となる。

冬期の自然乾燥が不向きである本県の気象条件において、乾燥機により乾燥条件を一定にすることで、品質の生産年次変動を抑え、高品質な生薬を安定して生産できるよう、本研究では乾燥機で乾燥する方法とした。しかし、出荷予定企業及び生産者からは、さらに効率的な乾燥法が要望されていることから、今後は品質への影響を確認しながら、自然乾燥と乾燥機の併用や容器の入れ換え作業の省略等により乾燥時間やコストを削減した方法へ改良し、高品質な富山シャクヤクの販路拡大及び生産振興を支援したいと考えている。

文 献

- 1) 川筋透, 田村隆幸, 横田洋一, 宮本(山口)朋美, 本田裕恵, 竹林憲司, 大江勇, 高田正明, 松永孝之: 富山シャクヤクのブランド化推進事業報告(平成24-26年度) 選抜品種の特性比較, 富山県薬事研究所年報, 42, 29-34 (2016)
- 2) 厚生労働省: 第17改正日本薬局方, 1817 (2016)
- 3) 田村隆幸, 高田正明, 大江勇: 実生産規模でのシャクヤクの乾燥調製を目指した基礎検討, 富山県薬事研究所年報, 42, 33-38 (2015)
- 4) 公益財団法人日本特産農産物協会: 地域特産作物(工芸作物、薬用作物及び和紙原料等)に関する資料(平成29年産), 14 (2019)
- 5) 村上守一: 富山のシャクヤク栽培, 和漢薬, 753 (2016)

微粒子コーティング法を用いた苦味マスキング法の検討と評価 (第2報)

永井 秀昌, 明官 勇雄, 薬事研究会製剤部会

Evaluation of Bitter Taste Masking using Fine Particle Coating Method (Second Report)

Hidemasa NAGAI, Isao MYOKAN,
Division of Drug Formulation Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

口腔内崩壊錠 (OD 錠) は口に含んだ際に唾液や少量の水で容易に崩壊することから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形として、近年急速に普及している。OD 錠の製剤設計においては、口腔内で数十秒程度に崩壊させるための優れた崩壊性と苦味の遮蔽 (マスキング) を施す必要がある。

今回、微粒子コーティング法による苦味マスキングの最適条件を検討し、味覚センサにより評価することで、効果的な苦味マスキング手法を検討した。その結果、予備造粒法を用いることで、苦味薬物の簡便なマスキングが実施できることを確認した。今後、コーティング顆粒を用いた口腔内崩壊錠を試作し、味覚評価を行うことにより、本法の有用性をさらに検証したい。

Summary

An Orally Disintegrating Tablet (ODT) easily disintegrate in saliva when it is held in the mouth, so it can be taken easily by elderly patients who have difficulty swallowing the tablet. In recent years, it has been rapidly spread as a dosage form which can improve drug adherence. In the formulation design of the ODT, it is necessary to provide excellent disintegration and bitterness masking.

In this study, we examined the optimum conditions of bitter taste masking by the fine particle coating method, and evaluated it using a taste sensor. As the result, it was confirmed that bitterness masking of drugs can be performed by using the *pre-granulation* method. In the future, we would like to further verify the usefulness of this method by manufacture of ODT using coated granules.

キーワード：微粒子コーティング；苦味マスキング；味覚センサ

Key words : Fine particle coating ; Bitterness masking ; Taste sensor

緒 言

口腔内崩壊錠 (OD 錠) は口に含んだ際に唾液や少量の水で容易に崩壊することから、錠剤を嚥下するのに困難な高齢者の患者にも服用しやすく、服薬アドヒアランスの改善が期待できる剤形として、近年急速に普及している。OD 錠の製剤設計においては、口腔内で数十秒程度に崩壊させるための優れた崩壊性と苦味の遮蔽 (マスキング) を施す必要がある。

これまで、化学的苦味マスキング剤として知られるシクロデキストリン (CyD) を用いて苦味薬物のマスキングを行い、試作した OD 錠の苦味を味覚センサにて評価を行ってきた。今回は、昨年度に続き、微粒子コーティング法による苦味マスキングの最適条件を検討し、味覚センサにより評価することで、より効果的な苦味マスキング手法の検討を行ったので、その結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

1) 苦味薬物

アセトアミノフェン (AA, 山本化学工業(株))
平均粒子径 : 652.6 μm

2. 装置

1) 複合型流動層造粒コーティング装置 :

FD-MP-01D (株)パウレック)
ユニット : SFP ユニット (スクリーン径 ϕ 1.5 mm),
SPC (ワースター) ユニットおよび FD (流動層) ユニット

2) レーザー回折式粒子径分布測定装置 :

SALD-2300 (株)島津製作所)

3) 卓上型電子顕微鏡 :

TM4000Plus (株)日立ハイテクノロジーズ)

- 4) 味認識装置：TS-5000Z
 (株)インテリジェントセンサーテクノロジー
 センサ：医薬品評価用苦味センサ2種 (C00, AE1)

3. 実験手順

1) 溶液の調製

コーティング用基剤には、ヒプロメロース (HPMC) を用い、固形分を蒸留水に溶解し、8% 水溶液に調製したものをコーティング液とした。

処方

ヒプロメロース (TC-5R) 水系処方

ヒプロメロース	120 g (胃溶性コーティング基剤)
蒸留水	1,380 g
合計	1,500 g

2) 微粒子コーティング

微粒子コーティング及び流動層造粒は複合型流動層造粒コーティング装置を用いて行った。装置の操作条件は Table 1 に示す通りである。得られたコーティング品は乾式法により、粒子径分布の測定を行うとともに、表面形状を電子顕微鏡で観察した。

Table 1 微粒子コーティング条件

給気温度	75℃又は80℃
排気温度	40-45℃
風量	1.0 m ³ /min
スプレーエア量	50 NL
払い落とし圧力	0.4 MPa
ローター回転数	750 rpm (SFP ユニット使用時)
スプレー速度	4.5-9.5 g/min
仕込み量	300 g
コーティング量	コーティング液として 1,125 g /300 g あたり (ヒプロメロースとして 90 g/300 g あたり)
ユニット	微粒子コーティング：SFP (ボトムスプレー) ワースターコーティング：SPC (ボトムスプレー) 流動層造粒：FP (トップスプレー)

3) 味の評価

検体を希釈する希釈液には 10 mM KCl 水溶液を用い、2) で作成したコーティング顆粒 343.9 mg を測定用カップに入れ、AA の濃度が 50 mM となるように調製した。また、コントロールとして、AA 原薬 264.5 mg についても同様に調製した (AA として 50 mM)。

4. 解析方法

各検体につき味認識装置のプログラムに従って 4 回測定し、最初の 1 回目のデータを除いた計 3 回のデータを以下の解析に使用した。

1) 電圧値での評価

得られた 3 回の測定データについて、専用の解析アプリケーションを用いて補完加算処理^{*}し、平均して得られた値を各センサの電圧値として評価した。味認識装置では最初に検体溶液中で測定する先味に加え、各センサを 3 回の洗浄後に基準液中で測定する後味 (CPA 値) の測定も行った。なお、人工脂質膜がプラス荷電である C00 と AE1 は、マイナス側に出力するセンサであるため、結果のグラフは絶対値に変換して比較した。その際、正の値については、0 とみなして表示した。

※ 味認識装置では、測定を重ねるたびにセンサ出力が減少するため、ブランクとして用いた検体 (10 mM KCl 水溶液) を用いてベースラインの補正を行う必要がある。

2) 推定値での評価

推定値は、得られた 3 回の測定データを専用の解析アプリケーションを用いて補完加算処理し、各センサ値に固有の係数を乗じることによって算出される値¹⁾であり、1 以上の差で味の差を識別することができる味覚項目として表される。

実験結果

1. 微粒子コーティング実験

微粒子コーティング法、ワースター法および流動層造粒法によって、AA のコーティングを実施し、下記の通り平均粒子径の異なるコーティング品を得た。SFP ユニットを用いたコーティングでは、整粒機構により顆粒が粉碎された。また、流動層造粒では顆粒の凝集により、コーティング粒子は得られなかった。

Table 2 粒子コーティング条件と得られた顆粒の平均粒子径

コーティング条件	スプレー速度	給気温度	平均粒子径
SFP	可変 5 → 10 g/min	75℃	267 μm
SPC-A	可変 5 → 10 g/min	75℃	738.4 μm
SPC-B	可変 5 → 10 g/min	80℃	705.9 μm
SPC-C	可変 5 g/min	75℃	742.7 μm

また、卓上型電子顕微鏡を用いて、原薬およびコーティ

ング顆粒の表面形状を撮影したところ、SPCユニットを用いたコーティング顆粒では、コーティング基剤が粒子表面に展延されている様子が観察された (Fig. 1).

2. 粒子コーティング法による AA のマスクング効果

2. で試作したコーティング顆粒について、懸濁した溶液を味認識装置で評価した。その結果、AA の苦味に反応する AE1 センサの電圧値はコーティングを施すことよって低下し、マスクング効果を示すことが確認され、SPCユニットでコーティングを行った顆粒すべてに効果が認められた。特に、コーティング操作をスプレー速度

可変、給気温度 80℃とした条件が最もマスクング効果が高く、コントロール (AA 原薬) の 1/5 以下にまで苦味を抑制していた (Table 3, Fig. 2).

また、解析アプリケーションを用いて電圧値を推定値に変換し、味覚項目にて評価した。その結果、AE1 センサ値は渋味として表され、電圧値と同様に、コーティング顆粒全てにマスクング効果が認められ、コントロールと比較して渋味 (先味) が 1/5 以下に抑制されていた。また、この結果は官能試験による結果とも相関していた (Table 4, Fig. 3).

考 察

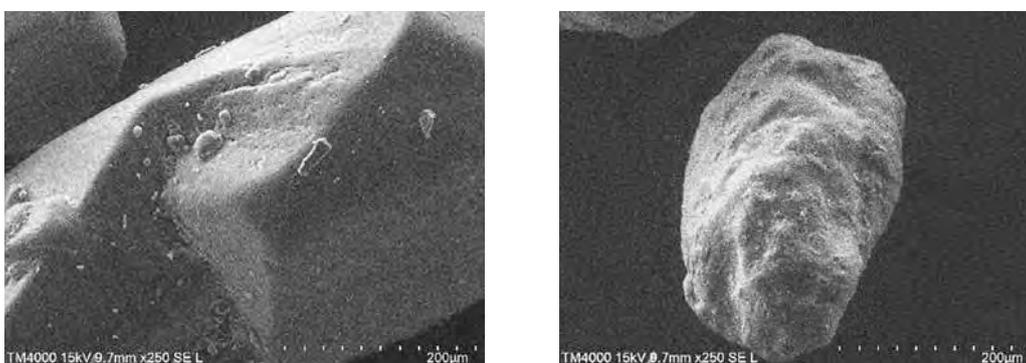


Fig. 1 AA 原薬 (左) およびコーティング顆粒 (右) の SEM 写真

Table 3 AA の味覚評価 (電圧値)

電圧値	C00	AE1	CPA1 (C00)	CPA1 (AE1)
コントロール	9.73	27.81	0.42	0.87
AA コーティング (SPC-A)	6.56	10.31	0.21	0.19
AA コーティング (SPC-B)	3.54	4.73	0.00	0.04
AA コーティング (SPC-C)	4.76	6.27	0.00	0.05

(各値は 3 回の測定値の平均)

Table 4 AA の味覚評価 (推定値)

推定値	酸性苦味 (先味)	渋味 (先味)	酸性苦味 (後味)	渋味 (後味)
コントロール	1.36	4.38	0.09	0.22
AA コーティング (SPC-A)	0.92	1.62	0.05	0.05
AA コーティング (SPC-B)	0.50	0.74	-0.02	0.01
AA コーティング (SPC-C)	0.67	0.99	-0.02	0.02

(各値は 3 回の測定値の平均)

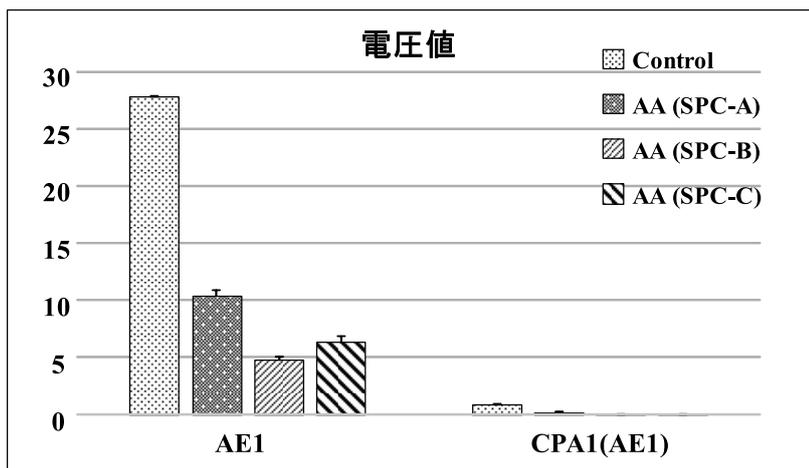


Fig. 2
AA コーティング顆粒の AE1 電圧値

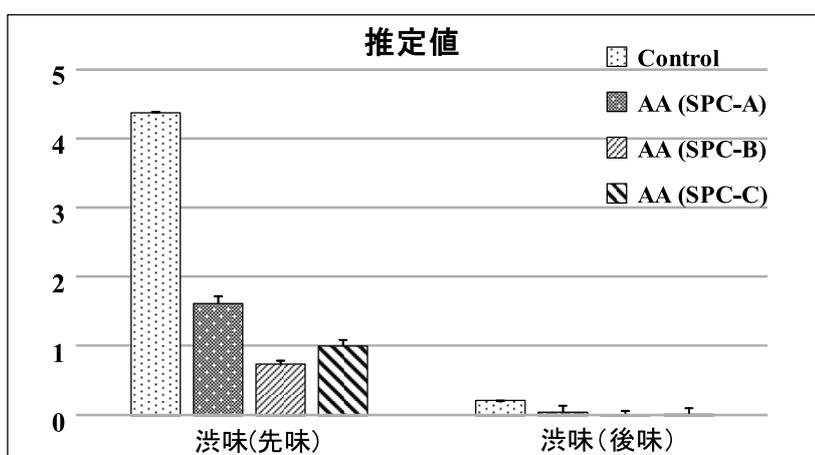


Fig. 3
AA コーティング顆粒の推定値

今回、我々は口腔内崩壊錠の製剤開発へ応用することを目的として、微粒子コーティング法を用いて AA をコーティングし、苦味マスキング効果を味認識装置で評価した。前報において、AA (微粉グレード) に胃溶性コーティング基剤を用いて、流動層内部に整粒機構を備えた複合型流動層造粒コーティング装置により、微粒子コーティングを行った¹⁾。その結果、コーティング溶液に用いたラウリル硫酸ナトリウムが AA の苦味に反応する AE1 センサに誤反応することが判明したため、正確な苦味の評価が行えなかった。また、微粒子コーティング法と流動層造粒法での苦味マスキング効果に差が認められず、少量のコーティング液で苦味マスキングを行うためには、流動層造粒等で、造粒して粒子径を大きくした後にコーティングする方法 (予備造粒法) が有効であると考えられた。

そこで今回は、コーティング基剤として味覚センサに影響を与えないヒプロメロースを用い、予備造粒法を想定した AA 結晶顆粒を用いて、顆粒コーティング法による簡便な苦味マスキング効果の検討を行った。その結

果、予備造粒法による顆粒コーティング法としてはワスター法によるコーティングが造粒品を粉碎、凝集させることなく効率的に顆粒コーティングを行えることが確認された。また、その際の最適なスプレー速度と給気温度の条件についても、原薬に対して 30% 程度の比較的低用量で苦味マスキング効果が認められることが明らかとなった。ヒプロメロースの溶液調製は容易であり、コーティングも短時間で行えることから、簡便な苦味マスキング法と考えられる。

今回の検討により、予備造粒法による顆粒コーティングにより、苦味薬物の簡便なマスキングが実施できることを確認した。今後、コーティングを行った顆粒を用いて口腔内崩壊錠を試作し、味覚評価を行うことにより、本法の有用性をさらに検証したいと考えている。

文 献

- 1) 佐藤公ら、微粒子コーティング法を用いた苦味マスキング法の検討と評価、家庭薬研究、37、42-47 (2018)

バイオ医薬品の品質評価 — バイオ後続品の同等性／同質性の検討 —

宮本 朋美、松永 孝之、本田 裕恵、柳橋 努、小笠原 勝、
高山 信幸、相川 幸彦、川尻 千賀子、薬事研究会生物部会

Quality evaluation of biopharmaceuticals — Examination of Comparability of biosimilar —

MIYAMOTO T, MATSUNAGA T, HONDA H, YANAGIBASHI T,
OGASAWARA M, TAKAYAMA N, AIKAWA Y, KAWASHIRI C,
The Biological Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

バイオ後続品は、遺伝子組み換え技術や細胞培養技術により産生されるタンパク質を製剤化するため、従来の低分子化合物医薬品と異なり、先行バイオ医薬品との同一性を実証することが困難である。そのため、①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験等により、先行バイオ医薬品との同等性／同質性を評価する必要がある。

本研究では、エリスロポエチン製剤（先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品及び局方標準品）を題材として、バイオ医薬品の特徴を理解し、バイオ医薬品の品質評価方法の習得と効率的な評価系を検討した。今回、エリスロポエチンの物理的・化学的試験による品質評価方法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるエリスロポエチン製剤の分子量測定及びウェスタンブロットング法による製剤確認試験を実施したところ、いずれも単一で幅広い泳動帯を認め、局方標準品、先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品の分子量は、各々、31.4–38.8, 31.4–37.8, 32.2–43.2, 40.9–45.5 kDa と算出され、標準品及び先行バイオ医薬品の分子量はほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳動帯は数 kDa 高分子側に認め、これはバイオ後続品であるエポエチンアルファ BS 注の審査報告書の記載内容と一致した。

また、効率的な生物活性試験代替評価系の検討を目的として、ヒトエリスロポエチン受容体 (hEPO-R) 発現細胞の増殖を指標とする *in vitro* 生物活性試験を実施し、各製剤の 50% 細胞増殖濃度 (EC₅₀ 値) を算出した結果、先行バイオ医薬品とバイオ後続品の活性に差異がなく、同程度の細胞増殖促進能を示した。一方、hEPO-R への結合親和性が低いバイオベター品は、これらの製剤よりも弱い細胞増殖促進能を示し、先行情報と一致する試験結果であった。

Summary

It's difficult that follow-on biologics, which manufactured by proteins made by DNA recombination technology and cell culture technology are prove identity with the preceding biopharmaceutical unlike conventional low molecular-medicines. Therefore, it is necessary to evaluate the equivalence/homogeneity with prior biologics by (1) structural analysis, comparative tests on physical and chemical properties, and (2) comparative tests on biological activity.

In this study, we examined the quality evaluation and efficient evaluation methods for biopharmaceuticals using erythropoietin medicine (the preceding biomedicine, biosimilar, bio-better and standard product of Japanese Pharmacopoeia) as base materials. SDS-polyacrylamide electrophoresis for measuring the molecular weight and a formulation test by western blotting were performed as the quality evaluation by physical chemical test of erythropoietin medicine. As results, single and wide band were detected, and each molecular weight of standard product, preceding biomedicine, biosimilar and bio-better were calculated with 31.4 to 38.8, 31.4 to 37.8, 32.2 to 43.2 and 40.9 to 45.5 kDa respectively. The molecular weight of the standard product and the preceding biomedicine was equal mostly. The electrophoresis band of biosimilar was higher several kDa compared with these, and it matched with the content described in the examination report of the Epoetin alfa BS.

In addition, *in vitro* bioactivity test evaluating the proliferation of cells with human erythropoietin receptor (hEPO-R) was examined for efficient biological activity test alternative evaluation system. The 50% cell growth concentration (EC₅₀) of each medicine manufacturing was calculated. There was not any difference in the cell proliferation activities of ED50s of preceding biomedicine and biosimilar. On the other hand, Biobetter with low affinity to hEPO-R showed weaker activity than these. This result matched the previous information.

緒 言

バイオ後続品とは、「国内で既に新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性及び有効性を有する医薬品として、異なる製造販売業者により開発される医薬品」のことを指す。一般に、品質、安全性及び有効性について、先行バイオ医薬品との比較から得られた同等性／同質性を示すデータ等に基づき開発することができる。

バイオ後続品は、先行バイオ医薬品とは異なる細胞基材、遺伝子発現構成体、培養・精製工程、製剤化工程を用いて製造される。そのために、①構造・組成、②物理的・化学的性質、③生物学的性質、④免疫学的性質、⑤不純物（目的物質由来不純物、宿主由来タンパク質や培養液などに由来する工程由来不純物、ウイルス等混入汚染物質等）などについて明らかにすることが求められる。また、先行バイオ医薬品との比較試験：①構造解析や物理的・化学的性質に関する比較試験、②生物活性に関する比較試験などにより先行バイオ医薬品との同等性／同質性を示す必要がある。

薬事研究会生物部会においては、平成29年から3カ年の研究計画で、バイオ医薬品の特徴を理解するとともに、バイオ医薬品の品質評価方法の習得と効率的な評価系の検討を目的として共同研究を開始した。昨年度はエリスロポエチン製剤を用いて、エリスロポエチン受容体への結合親和性試験および*in vivo*生物活性試験を実施した。本年度（平成30年度）は、物理的・化学的試験による品質評価方法として、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるエリスロポエチン製剤の分子量測定及びウェスタンブロッティング法による製剤確認試験を実施した。また、マウスにおける網状赤血球測定（日本薬局方）では、スループット性が低い等の課題があることから、効率的な生物活性試験代替評価系の検討を目的として、*in vitro*生物活性試験を実施した。

方法及び結果

1. 被験製剤

- 局方標準品：エポエチンアルファ標準品
- 先行バイオ医薬品：エポエチンアルファ（エスポー）、協和発酵キリン
- バイオ後続品：エポエチンカッパ（エポエチンアルファBS）、キッセイ薬品 JCR ファーマ
- バイオベター品：ダルベポエチンアルファ（ネスプ）、協和発酵キリン

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量測定

先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品並びに局方標準品（0.54 μg）を含む溶液 100 μL を 95℃ で 5 分間加熱し、12% ポリアクリルアミドゲルにアプライした（15 μL/well）。分子量マーカーとして、分子量範囲 10–250 kDa のマーカー（Precision Plus Protein Unstain Standards、Bio-rad）を使用した。泳動後、ゲルを染色し（Oriole Fluorescent Gel Stain、Bio-rad）、ケミルミイメージング装置（FUSION-FX7、Vilber-Lourmat）を用いて化学発光の撮影を行った。分子量マーカーの各バンドの分子量及び移動度から算出した一次回帰式を用いて各サンプルで観察されたバンドの分子量を算出した。

結果、図1に示すようにいずれも単一で幅広い泳動帯が認められ、局方標準品、先行バイオ医薬品、バイオ後続品、バイオベター品の分子量は、各々、31.4–38.8、31.4–37.8、32.2–43.2、40.9–45.5 kDa と算出され、標準品及び先行バイオ医薬品の分子量はほぼ同等であった。これらに比べ、バイオ後続品の泳動帯は数 kDa 高分子側に認め、これはエポエチンアルファ BS 注の審査報告書の記載内容と一致した。

表 1 新有効成分含有医薬品、バイオ後続品、後続医薬品（ジェネリック医薬品）の比較

定義	新有効成分含有医薬品	バイオ後続品	後続医薬品
	既承認医薬品及び日本薬局方に定められている医薬品のいずれにも有効成分として含有されていない成分を有効成分として含有する医薬品。	新有効成分含有医薬品として承認されたバイオテクノロジー応用医薬品（先行バイオ医薬品）と同等／同質の品質、安全性及び有効性を有する医薬品。	先発医薬品と同一の有効成分を同一量含み、同一経路から投与する製剤で、効能・効果、用法・用量が原則的に同一であり、先発医薬品と同等の臨床効果・作用が得られる医薬品。
申請時期	新規	先行バイオ医薬品の特許期間、再審査期間終了後	先発医薬品の特許期間、再審査期間終了後

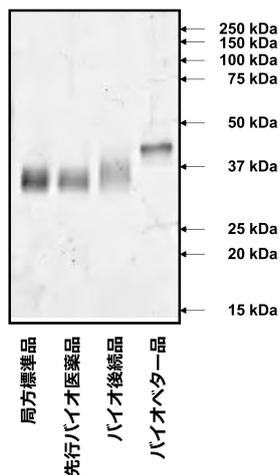


図1 SDS-PAGE 像

3. ウェスタンブロッティング法による製剤確認試験

局方標準品, 先行バイオ医薬品, バイオ後続品, またはバイオベター品 (0.54 μg) を含む溶液 100 μL を 95°C で 5 分間加熱し, 12% ポリアクリルアミドゲルにアプライした (15 $\mu\text{L}/\text{well}$). 電気泳動後, セミドライ方式によってメンブレンに転写した. メンブレンをブロッキングし, 一次抗体として抗ヒト EPO 抗体 (Anti-human EPO Antibody (Rabbit), abcam, #ab226956) を, 二次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody, CST, #7074S) を反応させ, ケミルミイメージング装置 (FUSION-FX7, Vilber-Lourmat) を用いて化学発光撮影によりバンドを検出した.

結果, 図 2 に示すように局方標準品及び各被験製剤で単一の幅広い泳動帯を認めた. 先行バイオ医薬品の泳動帯は標準品と同様の泳動パターンを示し, バイオ後続品の泳動帯は先行バイオ医薬品と比較してより高分子側に認められた. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は移動度が異なるものの, ヒトエリスロポエチン製剤であることが確認できた.

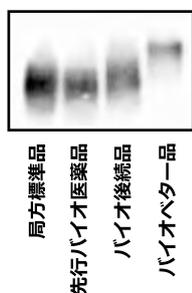


図2 ウェスタンブロット像

4. エリスロポエチン製剤の *in vitro* 生物活性試験

ヒトエリスロポエチン受容体 (hEPO-R) 発現細胞の増殖を指標に, エリスロポエチン製剤の生物活性を評価

した. 細胞増殖は, テトラゾリウム塩 (WST-1) を用い細胞全体の脱水素酵素活性を指標として解析した. 96 穴プレートにヒト赤白血病由来 TF-1 細胞を播種し (2×10^4 cells/well), 段階希釈した被験製剤 (0.0032 - 2 nM) 存在下で 3 日間培養した. 細胞懸濁液 100 μL に WST-1 溶液 10 μL を添加し, 3 時間培養後, 吸光度を測定した (450 nm / 対照 690 nm). 得られた吸光度より増殖曲線を作成し, 50% 細胞増殖濃度 (EC_{50} 値) を算出した.

結果, 図 3 に示すように先行バイオ医薬品, バイオ後続品並びにバイオベター品の EC_{50} 値は, 各々, 0.069, 0.105, 0.524 nM と算出された. 先行バイオ医薬品とバイオ後続品の EC_{50} 値に有意差は認められず, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示した. 一方, バイオベター品は, 先行バイオ医薬品及びバイオ後続品より弱い細胞増殖促進能を示した. バイオベター品は, 先行バイオ医薬品と比較して hEPO-R への結合親和性が低いことが報告されており, 本試験結果は先行情報と一致した.

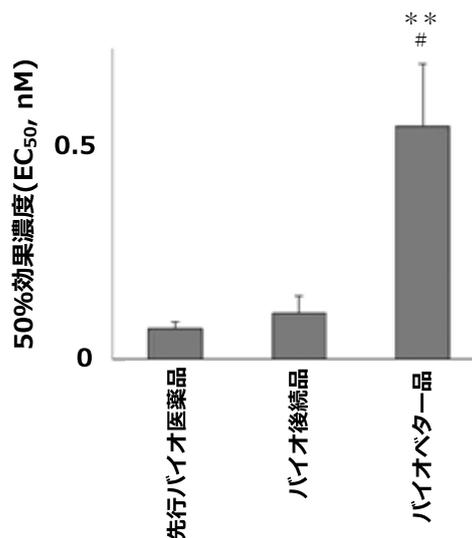


図3 細胞増殖における 50% 効果濃度
データは平均値+標準偏差で示した (n=11-13)
**p < 0.01 vs 先行バイオ医薬品, # p < 0.01 vs バイオ後続品 (one way ANOVA followed by Tukey's test)

考察および総括

SDS-PAGE による分子量測定, 及びウェスタンブロッティング法による製剤確認試験を実施した結果, 先行バイオ医薬品とバイオ後続品は分子量に差が認められたものの, ヒトエリスロポエチン製剤であることを確認することができた. 次年度, シアル酸含量の測定, ペプチドマップ, 糖鎖プロファイルなどの特性解析を行い, エリスロポエチン製剤の同等性/同質性を検証する.

日本薬局方において, エリスロポエチン製剤の生物活

性は、マウスを用いた *in vivo* 試験によって評価することが記載されている。しかし、*in vivo* 生物活性試験では、①動物を使用することによる低いスループット性、②動物愛護の観点からの代替法の必要性、③設備などの初期投資に費用がかかる、などの問題点が挙げられる。そこで我々は、培養細胞を用いた *in vitro* 評価系が、品質管理方法の一つとして *in vivo* 生物活性試験の代替法となる可能性があるか検討した。hEPO-R 発現細胞の増殖を指標にした *in vitro* 生物活性試験を実施した結果、先行バイオ医薬品エとバイオ後続品は同程度の細胞増殖促進能を示し、バイオベター品は、それらより弱い促進能を示した。本試験結果は、インタビューフォームや審査報告書などの先行情報と一致した。本試験によって生物活性の相違を反映した結果を簡便に得ることができたため、*in vitro* 生物活性試験は、通常業務での品質管理方法の一つとして利用できる可能性が示唆された。

液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置を利用した 生薬を例とする低分子化合物分析

小木曾 英夫, 薬事研究会分析部会

Component analysis of herbal medicines using liquid chromatography/ time-of-flight mass spectrometry

Ogiso H, The Chemical Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

医薬品開発において必要となる成分分析や不純物分析において、質量分析法は特異性が高く、かつ高感度測定が可能であるとともに、分子構造に由来する情報が得られることから、極めて有益な分析手段である。

当センターに導入された液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定により化合物の構造推定が可能なることから、医薬品開発においてしばしば直面する含有未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。

本研究では、LC-TOF/MS を用いた低分子医薬品の分析手法の習得を目的に、様々な成分が含まれる生薬を解析対象とし、未知化合物を含む成分の構造推定や成分含量比較を効率的に行える網羅的かつ包括的分析方法の条件検討を行い、一連の分析手法を確立した。

Summary

Mass spectrometry is a very useful tool in the component analysis, required for a drug development, because it enables the specific and sensitive measurement, and provides some information on the molecular structure.

The liquid chromatograph time-of-flight mass spectrometry (LC-TOF/MS), settled in our institute, enables to effectively estimate the molecular structure by measuring the exact mass of molecule. Accordingly, it is a very potent tool for the structural estimation and the comparative analysis of component amounts, including unknown components, which often encountered in drug development.

This study was aimed at developing a comprehensive analytical method, which can efficiently carry out a series of analyses for low-molecular-weight drugs, using LC-TOF/MS. Practically, we comparatively analyzed their component amounts between different herbal medicines, and tried to estimate their chemical structures of herbal component.

緒 言

医薬品開発においては、主成分のみならず、分解物、不純物、代謝物などの成分分析が必要になる。こうした分析において、質量分析法は特異性が高く、かつ高感度であり、分子構造に由来する情報が得られることから、極めて有益な分析手段である。県内製薬企業における医薬品分析の支援を目的に、創薬研究開発センターに導入された液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析装置 (LC-TOF/MS) は、精密質量測定により化合物の構造推定が可能なることから、未知成分の構造推定や成分含有量の変動解析などに威力を発揮する。

本研究は、LC-TOF/MS を用いた低分子医薬品分析をテーマに、様々な成分を含む生薬を解析対象として、未知化合物を含めた成分について、化合物の構造推定や成分含量比較を効率的に行える網羅的かつ包括的分析方法の条件検討を行い、一連の分析手法を確立した。

方法及び結果

1. シャクヤク末からの成分抽出法の検討

生薬含有成分の網羅的分析を目的とするためには、水溶性から脂溶性化合物までの異なる物性を持つ含有化合物群を分析対象にする必要がある。通常行われるエタノー

ル抽出などの方法では、脂溶性化合物まで十分に抽出できない懸念があったことから、本研究ではシャクヤク末を抽出する際に、ブタノール抽出法を用い、脂溶性化合物を含むブタノール層画分と水溶性化合物を含む水層画分の2つの画分に分けて取得することとした(図1)。

2. 液体クロマトグラフ(LC)による成分分離条件の検討
脂質等の脂溶性成分の分離に適したLC条件(LC-A法)と核酸塩基等の水溶性成分の分離に適したLC条件(LC-B法)を設定した(図1)。



図1 LC-TOF/MSによる成分分析手法

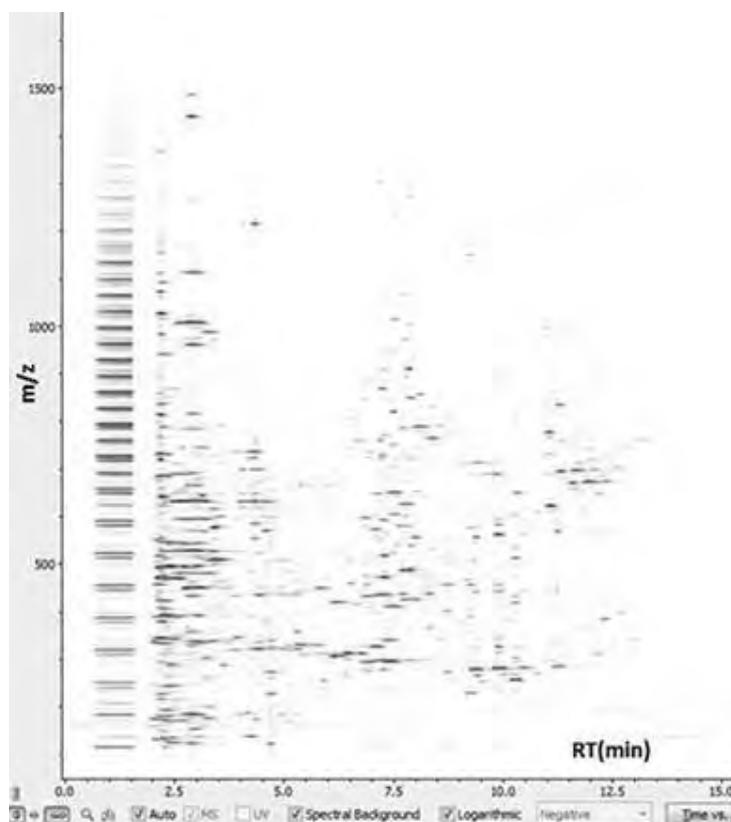


図2 LC-TOF/MSで検出された芍薬成分マップの例(LC-A法/MS-A法での測定)

横軸にLC保持時間、縦軸にm/zをプロットした2次元マップ。各スポットが1つの検出イオン(成分)に相当する。このマップからm/z 300~1000の範囲に主要な化合物が分布していることがわかる。

3. 質量分析条件の検討

一般的なイオン化法としての①エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) と②ステロイド化合物等の検出に適した大気圧化学イオン化法 (APCI) の2種類を用いることとし、それぞれについて、①ポジティブイオンモードと

②ネガティブイオンモードによる合計4種類の異なる検出条件を設定した (図1)。

4. 化合物の構造推定方法の検討

化合物の構造推定に当たり、オープンソースの巨大デー

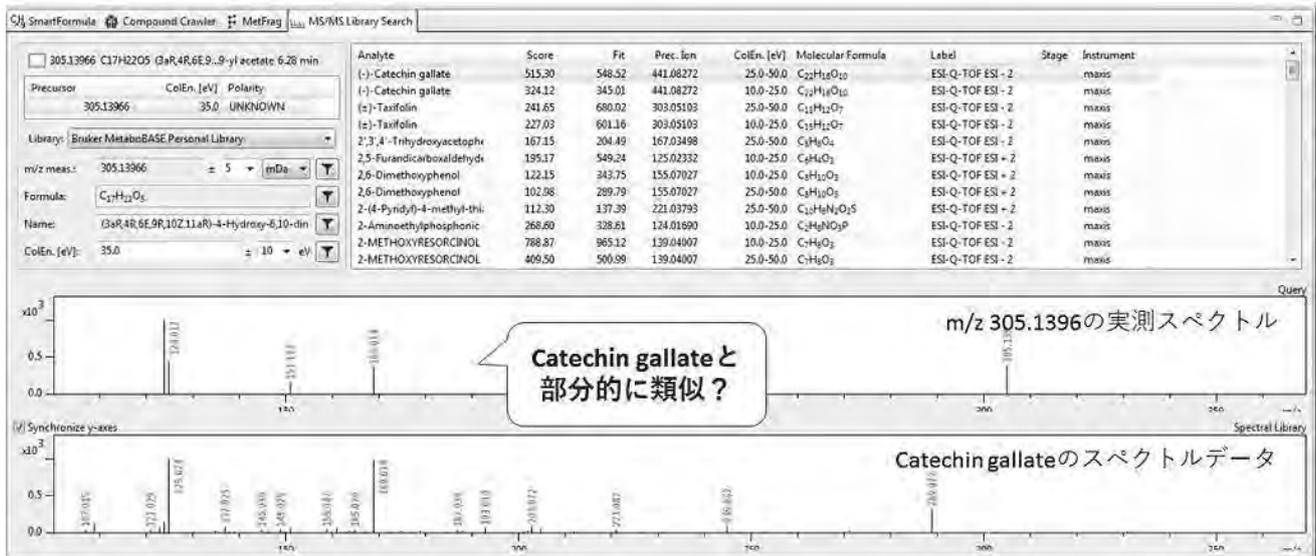


図3 MS/MS スペクトルサーチによる化合物の推定の例

MetaboScape® ソフトウェアによる化合物検索の1つであるスペクトルサーチから、m/z 305.1396の成分はgallate構造を有すると推定された。

ロット1に多い成分

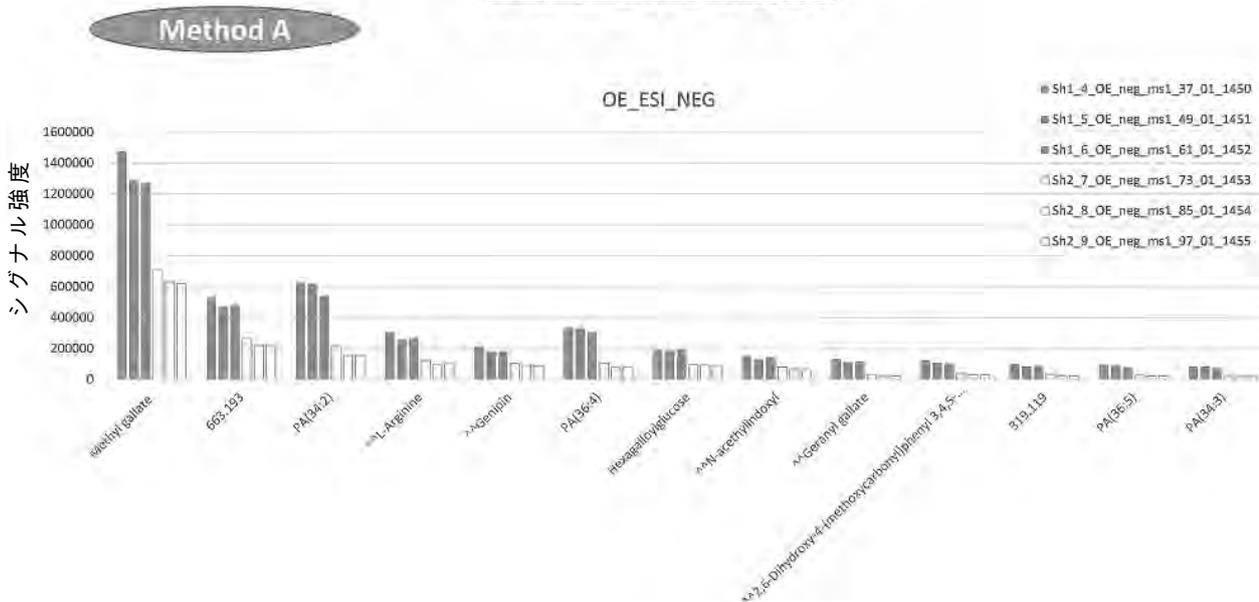


図4 局方シャクヤク末2ロット間の成分比較の例 (LC-A法/MS-A法での測定)

ロットNo. 1に多い成分 (イオン) について、化合物を推定した。概ね同定されたイオンについてはその名称を記した。候補化合物として上位に推定されたものの、MetFragのスコアが高くない成分については化合物名の前に^^を付記した。推定できなかったイオンについてはm/z値を記した。

データベース (PubMed や ChemSpider) に対する検索を行う前に、あらかじめ含有成分として推定される化合物群をリスト化したプライベートデータベースを構築し、この限定的なデータベースに対して検索を行うことにより、効率的な推定が可能となった。

すなわち、シャクヤク成分の分析を目的とする場合、既報にあるシャクヤク成分情報を収集し、それらを統合した「①シャクヤク成分データベース」を構築した。また、質量分析では一般的に、プロトンの脱着によるイオン化以外にも、ギ酸付加やアンモニア付加などによる種々の付加イオンの生成並びに、分子が2量体化もしくは3量体化などのクラスターイオンの生成がしばしば観察されることから、こうした二次的な生成イオンを特定するために、それらの情報をまとめた「②シャクヤク成分クラスターイオンデータベース」を構築した。その他に、アミノ酸、有機酸、核酸、糖類、脂質など生物(植物)が共通して含有する代謝物を収集した「③植物代謝物データベース」を構築した。これらプライベートデータベースに対して検索を行い、ヒットしたイオンを初めにアサインした。その後、アサインされなかったイオンについて、ChemSpider や PubChem などの巨大データベースに対して検索を行った。

化合物の絞り込みに際しては、MS/MS 測定で取得したフラグメントイオン情報を基に、MS/MS スペクトルデータベースや MetFrag ソフトウェアを使うことで化合物を検索し、リストアップされた候補化合物について、推定の確からしさを評価した。

5. 成分比較方法の検討

日本薬局方シャクヤク末の異なる2ロットについて、上述の方法に基づいて成分比較を行い、測定方法とデータ解析方法について検証した。1つの試料につき各3回別々に抽出操作を行い、それぞれの抽出液について合計6種類の異なる測定を行った。各測定で検出された成分について、MetaboScape® ソフトウェアを用いて網羅的な成分比較を行った。ロット間において含有量が2倍以上異なるものをリストアップし、これら成分の化合物推定を行った。

まとめと考察

LC-TOF/MS を用いて、低分子化合物分析を目的とした一連の標準手法を確立できた。本研究を通して、試料前処理及び測定パラメーターがどの程度質量分析結果に影響を及ぼすかを調べることにより、LC-TOF/MS 装置の性能とその限界について把握することができた。

本研究で確立した一連の方法は、生薬分析のみならず、

医薬品に含まれる未知不純物の構造推定にも応用可能である。

医薬品試験の効率化に関する検討

—グラジエント法を用いたイオヘキソールの純度試験の室間再現性の検討—

竹林 憲司, 薬事研究会分析部会

緒 言

医薬品試験において多成分同時定量および分析時間の短縮などの効率化が求められており、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が多用されている。HPLC において移動相の組成を連続的に変化させることによって成分を溶出させるグラジエント法が存在する。その手法を用いることによって複数成分の分離の改善や短時間で成分を溶出させることが可能である。しかし、使用機器により保持時間の差が大きいことから再現精度がよくないと考えられていた。一昨年、分析部会においてグラジエント法を用いたかぜ薬成分の分析法の検討により同時分析および室間再現性、定量性に問題ないことが確認されている¹⁾。また、昨今までは製剤化された医薬品をターゲットとしてきた。そこで本検討では、医薬品試験のさらなる効率化を図ることを目的として、グラジエント法を用いた原薬等の純度試験の室間再現性及び定量性を検証したので報告する。

方法及び結果

1. グラジエント遅れの測定

グラジエント法は設定したグラジエントプログラムに対して実際のグラジエントは少し遅れて始まり、このグラジエントの遅れは使用する分析機器によって異なる。そこで5社のグラジエント遅れについて測定したところ、グラジエント遅れは、最小で1分、最大で2.8分であることが分かった。したがって、分析に使用するHPLC装置のグラジエント遅れを統一するため、実際のグラジエントが3.5分後に開始されるようにグラジエントプログラムを各装置で補正した。

2. イオヘキソールの選定とグラジエント分析条件

イオヘキソールは安定性が高く、有害性もないため取り扱いが容易であることと、純度試験における移動相の組成が水・アセトニトリルで調製が容易であり、試験者間の試液調製の誤差が減らせると考えイオヘキソールを選定した。

試料溶液の調製

試薬イオヘキソール 0.15 g を水に溶かし、100 mL とし、試料溶液とする。

システム適合性試験用溶液の調製

試料溶液 1 mL に水を加えて 50 mL とし、システム適合性試験用溶液とする。

検出の確認用溶液の調製

システム適合性試験用溶液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 20 mL とする。

[試験条件]

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：254 nm)

カラム：内径 4.6 mm, 長さ 25 cm のステンレス管に 5 μ m の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。 Lot. 8IR96132

カラム温度：25℃ 付近の一定温度

移動相 A：アセトニトリル

移動相 B：水

流量：1.0 mL/min

注入量：10 μ L

移動相の送液：移動相 A 及び移動相 B の混合比を次のように変えて濃度勾配制御する。

グラジエント条件

(グラジエント遅れが 1 分の分析機器の場合)

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ (1.5)	1	99
(1.5) ~ 2.5	1	99
2.5 ~ 47.5	1 \rightarrow 10	99 \rightarrow 90

5社でイオヘキソールの類縁物質試験を行った結果、イオヘキソールのエキソ体及びエンド体の分離度と保持時間は5社で概ね一致した (Table 1)。不純物に関しては、5社で共通して検出された7つの不純物ピークに関して

Table 1. 試料溶液における分析結果の各パラメータ

		A社	B社	C社	D社	E社
イオヘキソール エンド体	保持時間(分)	20.25	19.11	19.71	20.14	19.52
	ピーク面積	5395458	5491	5262559	6036792	5528450
イオヘキソール エキソ体	保持時間(分)	21.65	20.65	21.15	21.53	20.87
	相対保持時間	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	ピーク面積	20751888	19846	19179968	20998613	19657964
	分離度	2.87	3.08	2.99	2.78	2.88
不純物1	保持時間(分)	24.01	23.09	23.47	23.85	23.10
	相対保持時間	1.109	1.118	1.110	1.107	1.107
	ピーク面積	8042	9.2	7492	14646	5270
	含有率(%)	0.029	0.036	0.031	0.054	0.021
不純物2	保持時間(分)	24.85	23.84	24.21	24.63	23.82
	相対保持時間	1.148	1.154	1.145	1.144	1.141
	ピーク面積	2575	2.6	2541	4345	2423
	含有率(%)	0.010	0.011	0.010	0.016	0.010
不純物3	保持時間(分)	25.59	24.61	24.94	25.36	24.52
	相対保持時間	1.182	1.192	1.180	1.178	1.175
	ピーク面積	7587	5.9	7066	9868	5513
	含有率(%)	0.029	0.023	0.029	0.036	0.022
不純物4	保持時間(分)	26.31	25.33	25.65	N/A	N/A
	相対保持時間	1.215	1.227	1.213	N/A	N/A
	ピーク面積	5946	4.2	5955	N/A	N/A
	含有率(%)	0.023	0.017	0.024	N/A	N/A
不純物5	保持時間(分)	27.16	26.33	26.57	26.96	26.57
	相対保持時間	1.255	1.275	1.256	1.252	1.273
	ピーク面積	33392	29.2	29940	44456	18803
	含有率(%)	0.127	0.115	0.122	0.164	0.074
不純物6	保持時間(分)	28.00	27.13	27.34	27.78	26.82
	相対保持時間	1.293	1.314	1.293	1.290	1.285
	ピーク面積	34133	31.3	30404	36611	22324
	含有率(%)	0.130	0.123	0.124	0.135	0.085
不純物7	保持時間(分)	28.70	27.82	28.03	28.48	27.47
	相対保持時間	1.326	1.347	1.326	1.323	1.316
	ピーク面積	18565	17.4	17000	21104	11498
	含有率(%)	0.071	0.069	0.069	0.078	0.045
不純物8	保持時間(分)	32.58	31.93	32.01	32.38	31.24
	相対保持時間	1.505	1.546	1.514	1.504	1.497
	面積値	3835	4.0	2013	4157	2909
	含有率(%)	0.015	0.016	0.008	0.015	0.011

Table 2. 試料溶液中の不純物合計量

	A社	B社	C社	D社	E社
<i>o</i> -アルキル体のピークの面積の合計(%)	0.395	0.363	0.376	0.428	0.237
<i>o</i> -アルキル体以外のピークの面積の合計(%)	0.039	0.047	0.041	0.070	0.031

は、保持時間は概ね一致した。一方で、不純物の含有率については、A, B, C社では一致したが、D社とE社では差が見られた (Table 2)。イオヘキソールのエキソ体に対する相対保持時間 1.2 ~ 1.5 の *o*-アルキル体のピークの合計量は 0.6% 以下、*o*-アルキル体以外のピークはそれぞれ 0.1% 以下、合計量は 0.3% 以下であり 5社ともに純度試験の基準値内であった。一方で、5社で不純物合計量を比較すると、A, B, C社では概ね一致したが、D社とE社の間で 0.2% 程度の差が見られ、室間再現性は得られなかった。

まとめ

今回グラジエント法を用いてイオヘキソールの純度試験を検討した結果、グラジエント補正を行うことでイオヘキソール及び不純物ピークの保持時間を一致させることが出来た。また、不純物の含有率については、差が見られ室間再現性が得られなかったため、今後さらなる検討が必要と考えられる。

医薬品試験の効率化に関する検討

—グラジエント法を用いたイオヘキソールの純度試験の分析時間の短縮の検討—

竹林 憲司, 薬事研究会分析部会

緒言

医薬品の生産量が増大する中、製薬企業には医薬品試験の効率化及び低コスト化が求められている。効率化の手段の一つとして「グラジエント溶出法」がある。グラジエント溶出法での分析は定量及び純度試験（類縁物質）にて適用されているが、どちらの試験においても一般的に分析時間が長いため、分析の効率化が課題となっている。そこで、本年はイオヘキソールの純度試験について、カラム種類及び長さの選定、これに伴うグラジエント時間の調整を行い、分析時間の短縮を検証した。

方法及び結果

まず、純度試験でグラジエント溶出法が規定されている原薬について、安全性や移動相組成、不純物の有無等を調査した。その結果、移動相が水とアセトニトリルで調製が容易なこと、欧州薬局方に類縁体である不純物 A と不純物 J が規定されていることから、イオヘキソールという医薬品を選定した。次に日本薬局方に規定されている試験条件を参考にして分析した結果を基本モデルとし、分析時間の短縮化を試みた。

1. サンプルの調製

1 mL 中の含有量がイオヘキソール 1.5 mg、不純物 A 3 µg、不純物 J 3 µg になるように混合溶液を調製した。

イオヘキソールの濃度は日本薬局方の純度試験に規定される試料濃度である。不純物 A、J の濃度は、それぞれの不純物の濃度がイオヘキソールの濃度に対して 0.2% になるように計算した場合の濃度である。

2. 基本モデルでの分析

日本薬局方に記載されている試験条件を参考にして以下の条件を基本モデルとした。「1. サンプルの調製」で調製した溶液について基本モデルの条件で測定し、保持時間及び分離度を確認した。

〔試験条件〕

検出器：紫外吸光光度計（測定波長 254 nm）

カラム：InertSustain C18 4.6 × 250 mm 5 µm

カラム温度：25℃

移動相：移動相 A：アセトニトリル

移動相 B：水

流量：1.0 mL/min

注入量：10 µL

グラジエント条件

注入後の時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)
0 ~ 1	1	99
1 ~ 46	1 → 10	99 → 90

結果

不純物 A、イオヘキソール、イオヘキソール（エキソ体）、不純物 J の順に溶出した。各ピークの保持時間と分離度を表 1 に示す。不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークが存在し、不純物 A とイオヘキソールとの分離度が測定できなかった。

表 1 基本モデルでの保持時間と分離度

化合物名	保持時間(分)	分離度
不純物 A	18.123	-
未知ピーク	18.667	-
イオヘキソール	20.016	-
イオヘキソール（エキソ体）	21.439	2.965
不純物 J	23.254	3.665

上記の結果から、今後の検討の判断基準を下記のように設定した。

イオヘキソールとエキソ体との分離度	1.5 以上
エキソ体と不純物 J との分離度	1.5 以上

イオヘキソールと不純物 A との分離については、「基本モデルの分析結果と同様に不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認める」とした。

3. カラム長さ、カラム粒子径、グラジエント条件の検討

長さを短く、粒子径を細かくしたカラムを用いて、適切な圧力の範囲内で分析時間を短縮するためには、分析条件（流量、グラジエント条件等）を最適化する必要が

あると考えられた。

そこで、カラムをショート化する際の分析条件について、以下のような計算式で注入量、流量、グラジエントタイムを求めた。（参考文献(1)参照）

最適化条件を作成するための方法を以下に示す。

カラムサイズ：4.6 × 250 mm、5 μm

グラジエントタイム：46 分

以下の通りに流量と注入量は断面積比により算出し、グラジエントタイムはカラム長さ比で算出した。

カラムサイズ	4.6 × 250 mm, 5 μm (基本モデル)		3.0 × 100, 3 μm の場合
断面積	(2.3) ² × 3.14 ÷ 16.6 注入量：10 μL 流量：1.0 mL/min	断面積比 × 1/2.3	(1.5) ² × 3.14 ÷ 7.1 注入量：約 4 μL 流量：0.4 mL/min
カラム長さ	250 mm グラジエントタイム (分) 0 → 1 1 → 46	長さ比 × 1/2.5	100 mm グラジエントタイム (分) 0 → 1* 1 → 19

※カラムの比較を行うため、全て 1 分からグラジエントがかかるよう統一した

上記の計算式に従い、ショート化したカラムの断面積及びカラム長さから、各カラムに最適な注入量、流量、グラジエント時間を算出した (表 2)。

カラム温度については温度を上げることで、分析時間

を短縮できる可能性が考えられたため、25℃及び 40℃で分析した。サンプルは「1. サンプルの調製」で調製した溶液を使用した。

表 2 各カラムの分析条件

カラム名 カラムサイズ (mm)	粒子径 (μm)	カラム温度 (℃)	流量 (mL/min)	注入後の 時間 (分)	移動相 A (vol%)	移動相 B (vol%)	注入量 (μL)
InertSustain 4.6 × 250	5	25	1.0	0 → 1	1	99	10
		40	1.0	1 → 46	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 100	3	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 19	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 75	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 14.5	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 50	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 10	1 → 10	99 → 90	
InertSustain 3.0 × 30	2	25	0.4	0 → 1	1	99	4
		40	0.4	1 → 6.4	1 → 10	99 → 90	

結 果

表2に示した条件で実際に分析を行い、分析時間の短縮化が可能かどうか検討した結果を表3に示す。

その結果、判断基準に適合したのは、「4.6 × 250 mm,

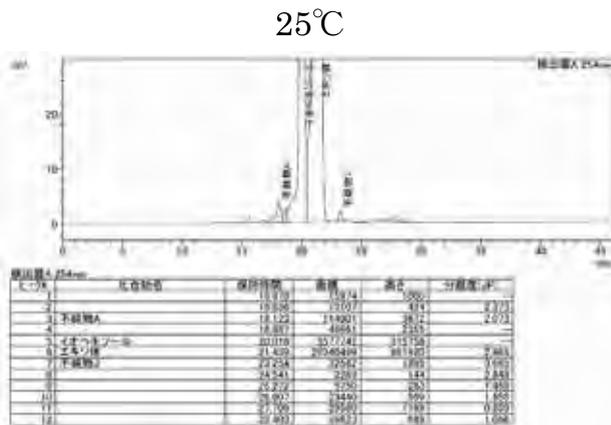
5 μm」(25℃, 基本モデル), 「3.0 × 100 mm, 3 μm」(25℃), 「3.0 × 75 mm, 2 μm」(25℃)であり、基本モデルと比較して保持時間が短縮されていた。

表 3 各カラムの分析結果

カラム名 カラムサイズ (mm)	粒子径 (μm)	カラム温度 (℃)	イオヘキソールの保持時間 (分)	エキソ体との 分離度	直前のピークと 不純物の分離度	
					不純物 A	不純物 J
InertSustain 4.6 × 250	5	25	20.010	2.965	○	3.665
		40	17.194	2.500	×	4.130
InertSustain 3.0 × 100	3	25	9.354	2.415	○	2.843
		40	7.947	2.229	×	3.471
InertSustain 3.0 × 75	2	25	6.985	2.569	○	3.293
		40	6.003	2.644	×	- *
InertSustain 3.0 × 50	2	25	7.700	1.530	○	- *
		40	6.197	1.030	×	2.000
InertSustain 3.0 × 30	2	25	5.310	1.187	○	- *
		40	3.743	- *	×	- *

○…不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認めた
 ×…不純物 A とイオヘキソールの間に未知ピークを認めなかった
 ※分離できなかった。

InertSustain C18 4.6 × 250 mm 5μm, 25℃



InertSustain C18 3.0 × 75 mm 2μm, 25℃

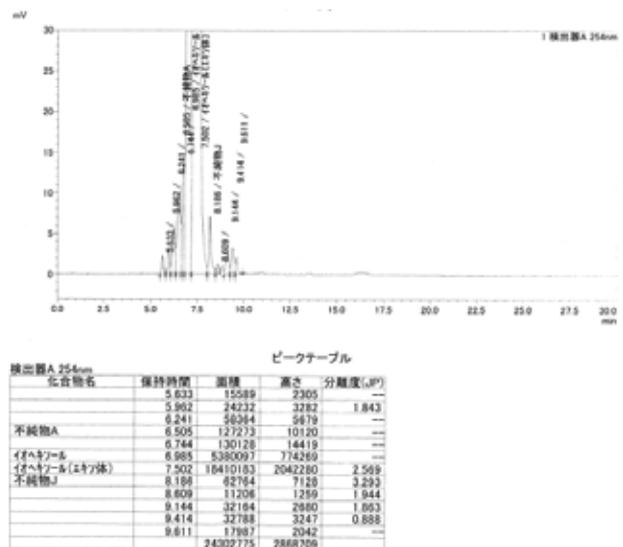


図 1 分析結果 (混合溶液のクロマトグラム)

考 察

今回、分析時間の短縮のために、内径、カラム長さ、粒子径、カラム温度を検討したところ、「3.0 × 75 mm, 2 μ m」のカラム（25℃条件）であればイオヘキソールとエキソ体、不純物 J の分離が得られ、かつ不純物 A とイオヘキソール間の未知ピークも認められた。この結果から、本試験条件において、「3.0 × 75 mm, 2 μ m」カラムを使用し、カラム温度 25℃で、グラジエントタイムを最適化した条件で分析することで、「2. 基本モデルでの分析」の条件から、分析時間を約 3 分の 1 に短縮することが可能となった。

	流量 (mL/min)	分析時間 (分)
基本モデル条件	1.0 (エキソ体の保持時間が約 21 分)	46
短縮化条件	0.4 (エキソ体の保持時間が約 7.5 分)	14.5

参考文献

- 1) 「株式会社ワイエムシイ 2008 分析展 新技術説明会」
<http://www.ymc.co.jp/data/tech/15.pdf>

IV 資 料

「平成 30 年度分析データ信頼性確保事業」 事業報告

External quality control for laboratories of pharmaceutical companies in 2018

竹林 憲司, 横田 洋一, 小笠原 勝

Kenji TAKEBAYASHI, Yoichi YOKOTA and Masaru OGASAWARA

富山県における医薬品生産金額は近年順調な伸びを示しており、平成 27 年及び平成 28 年は全国第 1 位となり、さらなる躍進が期待されている。その躍進のために取り組むべき戦略の 1 つとして、平成 25 年富山県医薬品産業活性化懇話会では「製造技術力等の強化」（品質管理技術力の向上など）が提言されており、県内製薬企業の技術力を向上させるため、様々な施策を実施しているところである。その一環として、一般社団法人富山県薬業連合会との共同で、県内製薬企業の品質管理部門を対象に外部精度管理を実施し、県内製薬企業の試験検査能力の調査及び技術指導を行う本事業を平成 21 年度から実施している^{1, 2, 3, 4, 5)}。

平成 29 年度においては、pH 測定、水分測定（電量滴定法）、定量（UV 法）、定量（HPLC 法）及び溶出試験について実施したところ、「不満足」と判定されなかった施設の割合が 94%であり、普段の業務の試験では気づくことができなかった試験上の問題点を見出すことができたことから、今後もさらに改善すべき課題があると考えられた⁶⁾。そのため平成 30 年度においては、前年度に問題があった試験項目の他、要望が多かった試験項目である定量（電位差滴定法）を追加して実施し、結果解析、原因調査及び改善指導を行ったので、その概要について報告する。

1. 実施方法

(1) 試験項目及び試験方法

試験項目は、L-イソロイシンの pH 測定、L-グルタミン酸の定量（電位差滴定法）、チアンフェニコールの定量（UV 法）、イブプロフェン含有顆粒剤の定量（HPLC 法）とした（下表参照）。なお、pH 測定、定量（電位差滴定法）及び定量（UV 法）については、市販試薬を対象品目として用い、参加施設に対象品目名を知らせなかった。

チアンフェニコールの定量（UV 法）は医薬品添加物規格に準じた試験方法とし、イブプロフェン含有顆粒剤の定量試験（HPLC）は「一般用医薬品の試験法Ⅱ - かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法 -」（株）じほう発行）を参考にして独自に作成した試験方法とした。その他の試験項目については日本薬局方に準じた試験方法とした。

表：試験項目及び参加施設数等について

試験種別	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加施設数
原薬試験	pH測定	L-イソロイシン	pH計	40
	定量（電量滴定法）	L-グルタミン酸	電位差滴定装置	28
	定量（UV法）	チアンフェニコール	分光光度計、乾燥機	34
製剤試験	定量（HPLC法）	（イブプロフェン含有顆粒剤） ブルフェン顆粒 20%	高速液体クロマトグラフ、 真空デシケーター （又は減圧乾燥器）	26

(2) スケジュール

平成 30 年 11 月 1 日に実施説明会を開催し、参加施設に試験方法等を説明して試料等を配布し、当所への試験結果報告期限を 12 月 17 日とした。報告内容をとりまとめて下記（3）の方法により評価し、その評価結果に応じて原因調査、改善指導及び再試験依頼等を実施した。また、平成 31 年 2 月 25 日に報告会を開催し、参加施設に対して結果

を説明し、改善指導を行った。

なお、実施説明会においては、平沼産業(株)の技術担当者を外部講師として、電位差滴定装置の適切な管理方法及び使用方法に関する講習会も併せて開催した。

(3) 評価方法

危険率 1% で Grubbs の方法により検定を行い、異常値と判断されたデータを棄却した後、ISO/IEC Guide 43 (JIS Q 0043) に従い、ロバスト法の第 1 四分位数 Q1、第 3 四分位数 Q3 及びメジアン Q2 から次のように Z スコアを求めて判定した。

$$Z = (X_i - Q_2) / \{(Q_3 - Q_1) \times 0.7413\}$$

$|Z| \leq 2$ 満足

$2 < |Z| \leq 3$ 疑わしい

$|Z| > 3$ 不満足

※ X_i : 各参加企業の報告値

ただし、定量（電位差滴定法）は、「平均値 ± 1.0% 以内」の場合は Z スコアの値に関わらず「満足」と判定することとした。

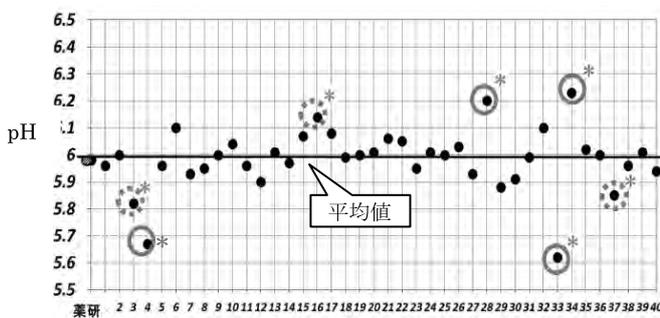
(4) 評価結果に基づく対応

「不満足」の施設に対しては、原因調査（聞き取り調査等）及び改善指導を実施するとともに、再試験を依頼した。また、「疑わしい」の施設に対しても、原因調査及び改善指導を実施した。さらに、再試験を依頼した「不満足」の施設及び再試験を希望した「疑わしい」の施設から、再試験結果の報告を受け、初回試験の Q1、Q2 及び Q3 を用いて Z スコアを算出し、再度評価した。

2. 結果及び考察

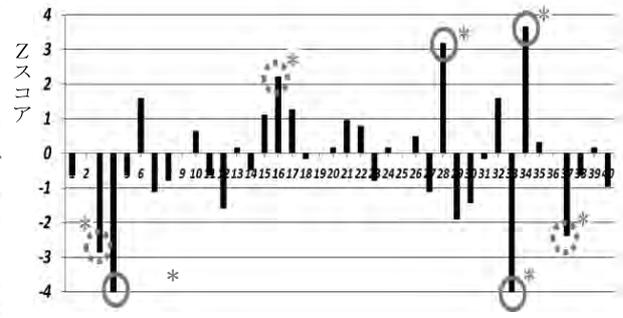
(1) L-イソロイシンの pH 測定

40 施設のうち「不満足」が 4 施設であり、「疑わしい」は 3 施設であったが、再試験により全施設が「満足」と判定される結果を得られた（図 1～3 参照）。



●... $|Z| > 3$: 不満足
○... $2 < |Z| \leq 3$: 疑わしい
*: 再試験では「満足」

図 1 L-イソロイシンの pH 測定の報告値



●... $|Z| > 3$: 不満足
○... $2 < |Z| \leq 3$: 疑わしい
*: 再試験では「満足」

図 2 L-イソロイシンの pH 測定の Z スコア

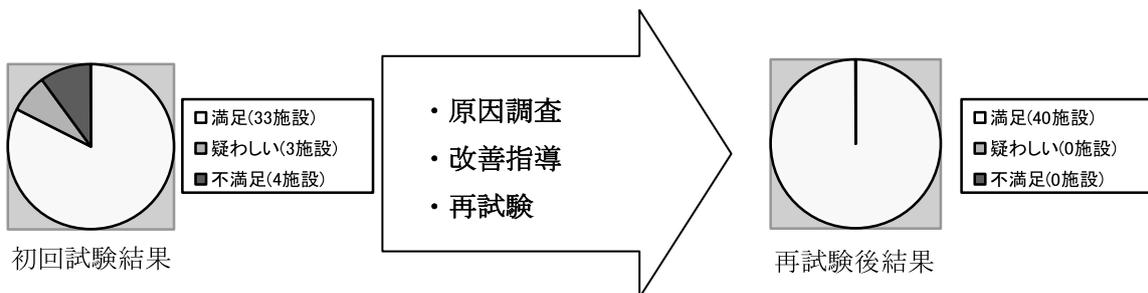


図 3 L-イソロイシンの pH 測定の評価結果

電極に異常があったこと、電源を入れてから pH 校正や測定までの時間が短すぎたこと、pH 値が安定していない状態で値を自動判定していたことなどが原因と考えられる事例があった。測定開始から pH 値が安定するまでの時間は 1 分程度の施設が多かったが、10 分以上かかった施設は電極等の異常で良好な結果が得られないことが比較的多かったため、安定までにかかる時間に注意して測定する必要があると考えられた (図 4 参照)。

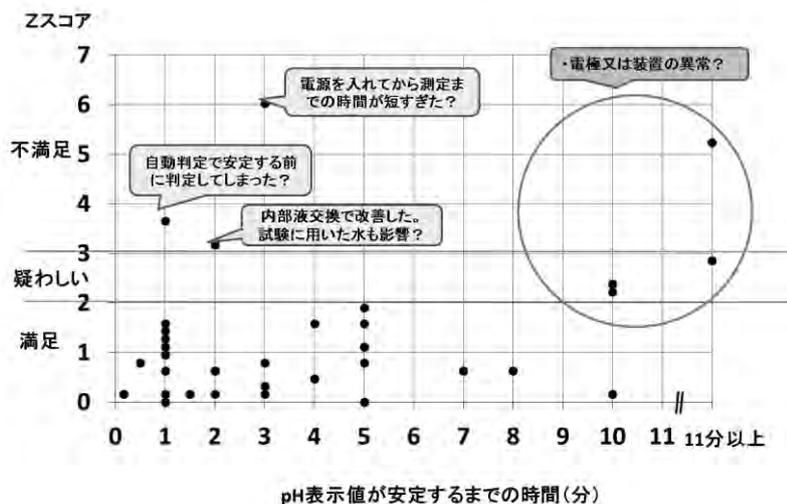


図 4 pH 表示値が安定するまでの時間と Z スコアとの関係

(2) L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法)

28 施設のうち「不満足」が 2 施設あったが、再試験で「満足」と判定される結果が得られた (図 5～7 参照)。

ブランク測定時に、ブランク測定用メソッドではなく、誤って試料測定用メソッドを使用して測定してしまい、検出感度が低すぎて正確なブランク滴定量を求められなかったことが原因と考えられる事例があった。また、電極の汚れ又は使用方法 (電極の感知部が液に十分に浸っていない) が原因と考えられる事例もあった。

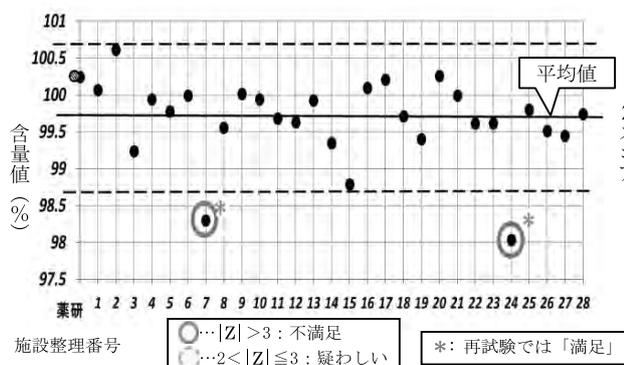


図 5 L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法) の報告値

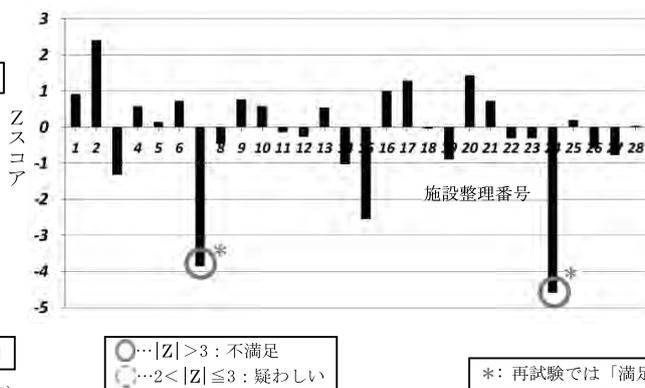


図 6 L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法) の Z スコア

図 5 L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法) の報告値

図 6 L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法) の Z スコア

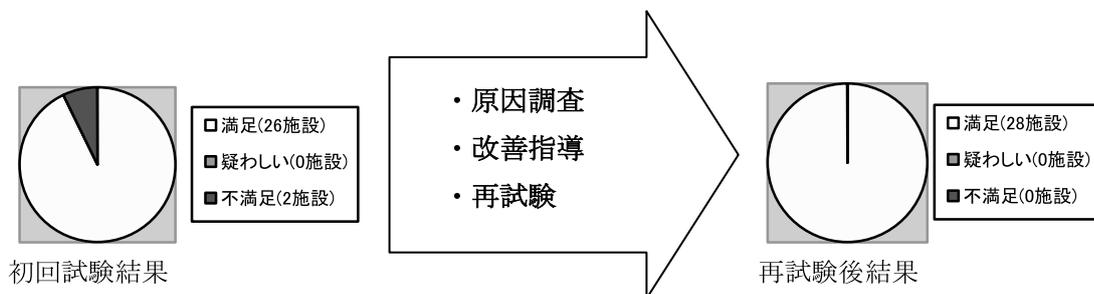


図 7 L- グルタミン酸の定量 (電位差滴定法) の評価結果

(3) チアンフェニコールの定量 (UV 法)

34 施設のうち「不満足」が1施設であり、「疑わしい」は1施設あったが、再試験により全ての施設が「満足」と判定される結果が得られた (図8～10 参照)。

原因としては、試料溶液の調製ミス (メスアップ時やホールピペットによる採取時や測定時などでの温度差に由来する体積変化など)、測定時のセルの汚れ、ブランク液測定時に問題があったことなどが考えられた。

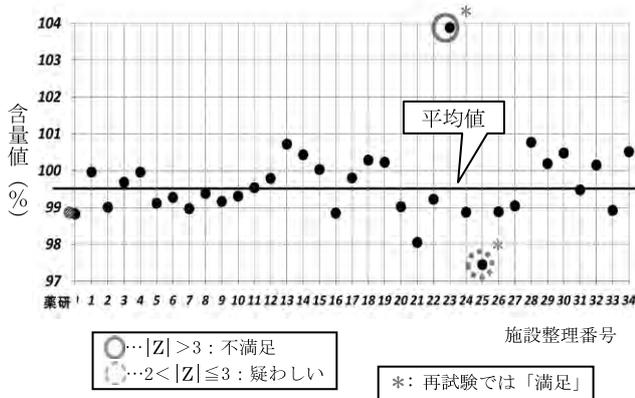


図8 チアンフェニコールの定量 (UV 法) の報告値

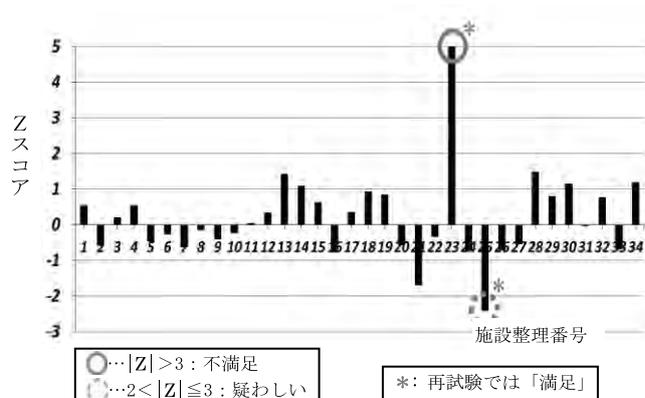


図9 チアンフェニコールの定量 (UV 法) のZスコア

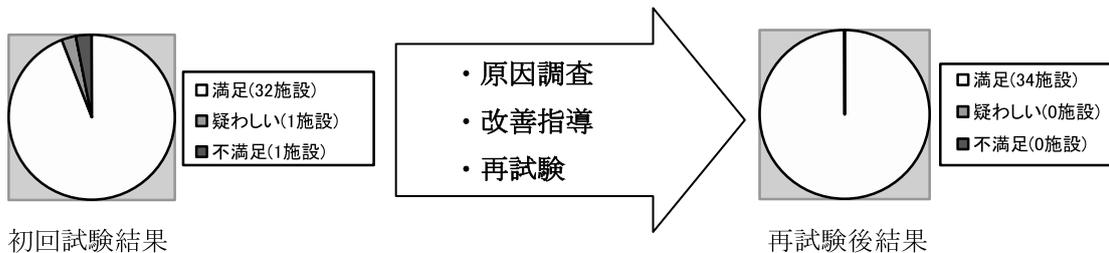


図10 チアンフェニコールの定量 (UV 法)

(4) イブプロフェン含有顆粒剤「ブルフェン顆粒 20%」の定量試験 (HPLC 法)

26 施設のうち「疑わしい」が1施設あったが、再試験で「満足」と判定される結果が得られた (図11～13 参照)。他の参加施設と比較すると、ピーク分離や再現性や保持時間や内標準物質のピーク面積には問題がみられなかったが、試料1～3のイブプロフェンのピーク面積のバラつきが大きいため、試料溶液に問題があった可能性が高いと考えられた。秤量ミス、粉碎機使用による吸着等の影響、メスアップやホールピペット操作が不正確 (温度により溶液体積が変化しやすいため)、などに注意する必要があると考えられた。

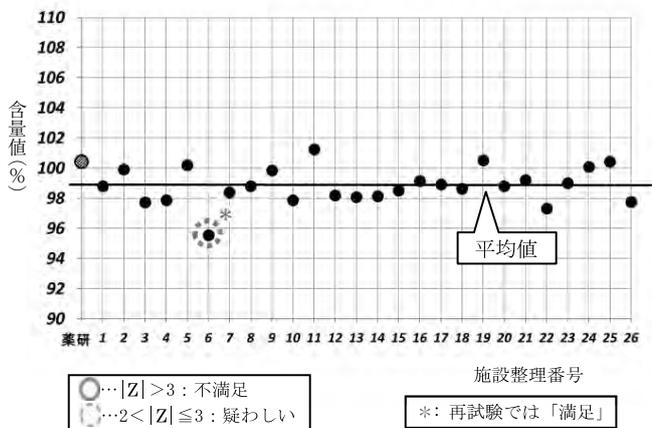


図11 イブプロフェン含有顆粒剤の
定量試験 (HPLC 法) の報告値

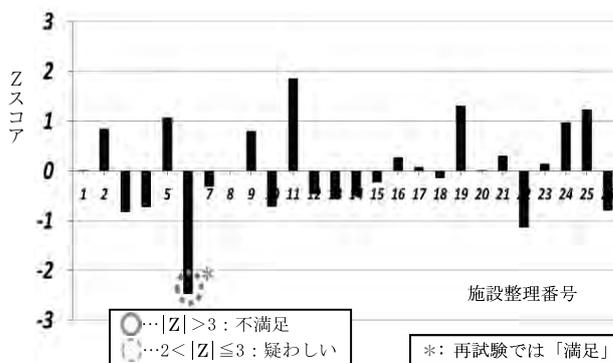


図12 イブプロフェン含有顆粒剤の
定量試験 (HPLC 法) のZスコア

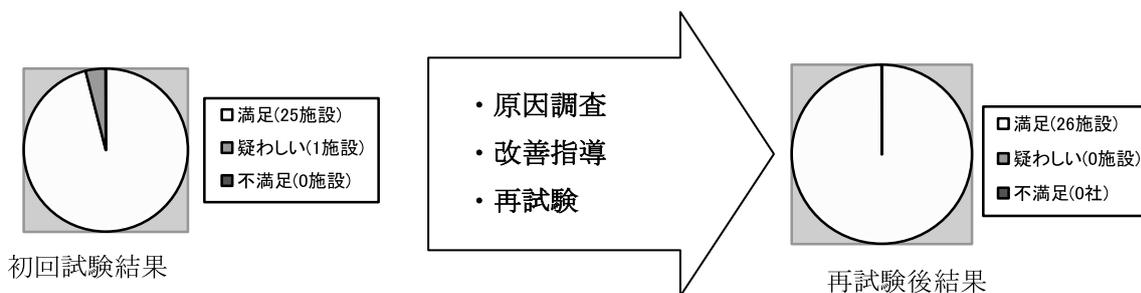


図 13 イブプロフェン含有顆粒剤の定量試験（HPLC 法）の評価結果

3. まとめ

今年度 4 項目の試験について実施したところ、全体として「不満足」と判定されなかった施設の割合は 95%（のべ 128 施設中 121 施設）であり、前年度の 94%（のべ 139 施設中 131 施設）と同様に良好な結果であった。また、再試験により全施設が「満足」と判定される結果を得られた。

装置等の異常が原因と考えられた事例があったので、日常点検や過去のデータとの比較など、異常の有無を使用の都度確認することが重要であると考えられた。また、日常の使用時では発見し難い異常が発生する可能性もあることから、定期的な点検及び器差確認等を実施することも重要と考えられた。

「不満足」や「疑わしい」の判定結果が得られた施設は、改善に向けて原因調査や再試験等に積極的に取り組む姿勢が見られた。また、本事業への参加を通して、普段の業務の試験では気づくことができなかった試験上の問題点を見出すことができたと考えられる。今後も県内製薬企業の試験技術力の向上とその水準の維持に寄与し、県内医薬品産業のさらなる発展につなげていきたい。

文 献

- 1) 寺崎さち子, 横田洋一, 出町幸男, 製薬企業の品質管理部門を対象とした外部精度管理, 富山県薬事研究所年報, 39, 69-76
- 2) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成 25 年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 41, 41-47
- 3) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成 26 年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 42, 39-45
- 4) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成 27 年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 43, 35-40
- 5) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成 28 年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事研究所年報, 44, 43-48
- 6) 竹林憲司, 横田洋一, 大戸幹也, 「平成 29 年度分析データ信頼性確保事業」事業報告, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 45, 39-44

V 誌上・学会発表など

1. 講演・学会発表

「The role of IL-5-producing group 2 innate lymphoid cells in the large intestine」

Yanagibashi T, Ikutani M, Nagai Y, Aikawa Y, Takatsu K.

第5回富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム, ポスター, 2018.8.23, 富山市

「ミニタブレットの開発研究」

永井 秀昌

第5回富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム, 講演, 2018.8.23, 富山市

「Analysis of Inhibitory Effect of Isoliquiritigenin on NLRP3 Inflammasome Activation」

本田裕恵

第5回富山・バーゼル医薬品研究開発シンポジウム, 講演, 2018.8.24, 富山市

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（2）本州以南におけるトウキの生育と品質」

甲村浩之, 菱田敦之, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 矢野孝喜, 古平栄一, 野下俊朗, 五十嵐元子, 瀧野裕之, 安食菜穂子, 林茂樹, 川原信夫, 大瀧直樹, 川嶋浩樹

日本生薬学会 第65年会, 2018.9.16, 広島県広島市

「薬用植物の栽培適性の解明と持続的栽培技術の開発（3）本州以南におけるミシマサイコの生育と品質」

菱田敦之, 甲村浩之, 横井直人, 諸橋修一, 田村隆幸, 由井秀紀, 安永真, 白石豊, 矢野孝喜, 古平栄一, 野下俊朗, 五十嵐元子, 瀧野裕之, 安食菜穂子, 林茂樹, 川原信夫, 大瀧直樹, 川嶋浩樹

日本生薬学会 第65年会, 2018.9.16, 広島県広島市

「経鼻インフルエンザワクチンのためのアジュバント開発」

宮本朋美

フォーラム富山創薬 第48回研究会, 2018.10.9, 富山市

「コガネバナ培養苗の国内各地での圃場栽培と品質評価」

吉松嘉代, 河野徳昭, 乾貴幸, 飯田修, 北澤尚, 瀧野裕之, 菱田敦之, 五十嵐元子, 林茂樹, 安食菜穂子, 東泉裕子, 竹林純, 石見佳子, 新穂大介, 木曾昭典, 田村幸吉, 田村隆幸, 小松かつ子, 吉田雅昭, 山國徹, 三位正洋, 渡辺均, 高垣美智子, 川原信夫

薬用植物栽培研究会 第1回研究総会, 2018.12.8, 神奈川県厚木市

「エゾウコギの人工水耕 - 圃場ハイブリッド栽培と作出物の品質評価」

高尾汐織, 朱姝, 村上守一, 田村隆幸, 川本元裕, 吉松嘉代, 小松かつ子

薬用植物栽培研究会 第1回研究総会, 2018.12.8, 神奈川県厚木市

「Development of adjuvant: Approach to improve the efficacy of intranasal influenza Vaccine /

経鼻インフルエンザワクチンのためのアジュバント開発」

高津聖志

第12回次世代アジュバント研究会, 2019.1.22, 大阪府豊中市

「未記載の *Botryosphaeria* 属菌によるシャクヤク茎枯病（新称）」

佐藤豊三, 石橋望, 廣岡裕吏, 田村隆幸, 一木（植原）珠樹

日本植物病理学会 2019.3.18, 茨城県つくば市

「薬用植物シヤクヤクから検出されたタバコ茎えそウイルス」

一木（植原）珠樹，大橋美保，杉山洋行，川部眞登，田村隆幸，佐藤豊三，花田薫，青木孝之
日本植物病理学会 2019.3.18，茨城県つくば市

薬用植物バイオナーサリーの構築に関する研究（5）コガネバナ培養苗の圃場栽培と品質評価

吉松嘉代，河野徳昭，乾貴幸，飯田修，北澤尚，瀧野裕之，菱田敦之，五十嵐元子，林茂樹，安食菜穂子，東泉裕子，竹林純，石見佳子，新穂大介，木曾昭典，田村幸吉，田村隆幸，小松かつ子，吉田雅昭，川原信夫
日本薬学会第139年会，2019.3.22，千葉県千葉市

2. 知的所有権

(1) 特 許

発 明 の 名 称	登 録 番 号
食後血中中性脂肪濃度上昇抑制剤及び飲食品	特許第 4815421 号
がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物	特許第 5548874 号
インフラマソーム活性制御剤	特許第 6036193 号
ラッカーゼ及びそれを用いたエピテアフラガリン類の製造法	特許第 6047813 号

(2) 特許出願

名 称	出 願 ・ 公 開 番 号
抗齶蝕性口腔用組成物及び飲食品	特開 2009-221191
抗菌周病性口腔用組成物及び飲食品	特開 2009-219484
IL-1 及び TNF 活性阻害剤	特願 2013-271897 PCT 国際出願 (PCT/JP2014/084076)
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体 BD-17】	特開 2017-081915
抗腫瘍剤 【参考 ベツリン誘導体 BD-23 等】	特開 2017-081864
乾式造粒物及び該乾式造粒物を含有する固形製剤並びにそれらの製造方法	特開 2018-35132
自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント	特願 2016-072240

3. 共同研究論文リスト

Takatsu K.: [IL-5 AND ALLERGIC INFLAMMATION]. *Arerugi*. 2018;67(2):108-113.

Ikutani M, Ogawa S, Yanagibashi T, Nagai T, Okada K, Furuichi Y, Takatsu K.: Elimination of eosinophils using anti-IL-5 receptor alpha antibodies effectively suppresses IL-33-mediated pulmonary arterial hypertrophy. *Immunobiology*. 2018 Jun - Jul;223(6-7):486-492.