

20031263

以降の10ページは、雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
下記の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

平成 14 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告 糖鎖を指
標とする糖タンパク質医薬品のバリデーションに関する基礎検討(原著論
文)

掛樋一晃, 野村千枝, 木下充弘, 西浦早織

医薬品研究. 34 巻 10 号 Page639-648(2003.10)

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
分担研究報告書

生薬に関する試験方法ならびに各条の
改正と国際調和に関する研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所
筑波薬用植物栽培試験場長

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

生薬に関する試験方法ならびに各条の改正と国際調和に関する研究

分担研究者 関田節子 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場長

研究要旨 本研究は、日中共通に用いる生薬の品質基準を認識することにより、両国間での生薬及び漢方製剤の有用性の科学的解明を促進し、両国民の健康増進に寄与することを目的として両国間の薬局方の調和を検討することから始まり、次いで、韓国の参加要望を取り入れ、日韓薬局方の比較・調和を経て、日中韓3国間の薬局方の調和へと進んできた。この流れは、環太平洋地域の日・中・韓・ベトナム・シンガポール・オーストラリア・香港のアジア地域での薬局方生薬の調和に進展し、Forum for Harmonization of Herbal Medicine (FHH) が発足しているが、本研究では FHH に先立ち日中韓それぞれの国における薬局方試験に基づくデータの比較を行っている。今年度は、微生物限度試験法の理解を深めると同時に、生薬、生薬製剤の実測結果を討議した。また、残留農薬及び重金属等の管理の現状と対策について各国のデータを検討し、対策について検討した。

A. 研究目的

日米欧3極は、ICHの取り組みと同時にPDG会議を持ち、薬局方の調和作業が行われている。生薬においても調和が必要ではあるが、3極間では収載品目が大きく異なるため、共通点が多いとは言えず、試験法、規格の設定の統一を図ることは困難である。そこで、共通生薬の使用頻度が高い日中韓3国の間の共通認識が必要であると考え、本研究を遂行している。これまでの検討により、共通生薬としてオウゴン等の含有成分測定法の相違点と規格値の比較、定量用標準化合物の設定方針、純度の比較、精製

方法の開示等を検討した。今年度は、純度試験に関わる項目として、微生物限度、残留農薬、重金属、二酸化硫黄について試験法を検討するとともに、各国内の流通生薬、生薬製剤について測定した結果を検討した。また、朮については、基原植物の品種が多く、古典に記録されている蒼朮と白朮の区別に曖昧な点が多く、植物学的形態、化学、薬理、遺伝子解析等各方面から検討が行われている生薬である。日中韓3国の現在の薬局方でも基原植物が共通ではない種を採用していることもあり、再検討を行った。

B. 研究方法

微生物限度試験法

第14改正日本薬局方

〈生薬の生菌数試験〉（細菌，真菌）

カンテン平板混釈法（混釈法）

カンテン平板表面塗抹法（塗抹法）

◇

防腐剤不活化培地の使用
好気性細菌染色色素の添加
抗真菌剤の添加
ローズベンガルの添加

〈生薬の特定微生物試験〉

（大腸菌，サルモネラ，腸内細菌とその他のグラム陰性菌）

◇

別紙1

中華人民共和国薬典

細菌数、真菌数及び酵母菌数測定

供試品 ◇ 1:10供試液 ◇ 希釈 ◇ 菌数測定

大腸菌検査法

供試品 ◇ 1:10供試液 ◇ B.L.増菌培地培養 ◇ M-I法

◇

平板分離 ◇ IMViC試験

サルモネラ菌試験

供試品 ◇ 1:10供試液 ◇ 乳糖ブイヨン培地増菌 ◇ テトラチオネート培地増菌 ◇ HLDカンテン培養 ◇ TSIカンテン培養 ◇ 生化学試験 ◇ 血清血凝集試験

緑膿菌試験

供試品 ◇ 1:10供試液 ◇ 乳糖ブイヨン培地増菌 ◇ カンテン平板培養 ◇ 生化学試験

黄色ブドウ球菌試験

供試品 ◇ 1:10供試液 ◇ 乳糖ブイヨン培地増菌 ◇ カンテン平板培養 ◇ コアグララーゼ試験

残留農薬試験

第13改正日本薬局方第一追補

供試品 ◇ 溶媒抽出 ◇ カラムクロマトグラフィー精製 ◇ 試験液調製 ◇ ガスクロマトグラフィーで定量（総BHC，総DDT）

中華人民共和国薬典

（総BHC，総DDT，PCNB）2000年（ピレトリン等を追加）2005年

韓国（調査）

BHC, Carbofuran, captan, phosalon 等

重金属試験

第14改正日本薬局方

一般試験法 重金属試験法

コウジン，ニンジン，ニンジン末各15ppm以下

中華人民共和国薬典

（原子吸光，ICP-MSを予定）2005年

韓国

植物性生薬 限度値 30ppm以下

鹿角 限度値 3ppm以下

蒼朮、白朮の検討

古文書に記載されている赤朮（蒼朮）及び白朮を調査し、基原植物とされる *Atractylodes macrocephala*, *A.*

japonica, *A. ovala*, *A. lancea*, *A. chinensis* について産地調査、含有成分、規格値について調査した。

C. 研究結果

微生物限度試験

日本

2000年～2002年における流通生薬の生菌数（細菌，真菌）調査では、115品目668検体で、第14改正日本薬局方（日局14）の参考情報に記載されている細菌 10^7 cfu/g, 真菌 10^4 cfu/g以上の菌数を示した検体数は、細菌で15（2%）、真菌で94（14%）であった。ニンジン、甘草で顕著であった。

一方、製剤においては、細菌の生菌数はほとんど検出せず、真菌の生菌数、特定微生物数ともに非検出であった。製剤では、製造設備の微生物防止システム、製造工程および衛生の管理、自主的な微生物限度基準値の設定、品質検査での試験実施等により、微生物管理が行われている。

中国

薬典に収載している全ての薬品について、剤型別に菌数を測定した。汚染が認められた薬品の中で、中成薬は微生物の種類が多く、数量も最も多かった。そこで、次の3点から微生物汚染を抑制する。第一に、原料について、生薬の吟味を確実に実施するとともに、補剤の微生物汚染についても配慮する。中間製品の微生物数の抑制を、例えば ^{60}Co を用いて、決められた安全線量での滅菌操作を行う。第二に、国家機関は生産企業に

対して規格に適合した環境と工程で生産するようGMPの遵守を指導する。第三に、微生物試験法は常に改善・改良を行う。また、行政手段として、抜き打ち試験等を監督部門に行わせる。

残留農薬試験

日本

大阪と東京の市場品の他、栽培品の14種類（トウキ、サイコ、ニンジン、カンゾウ、シャクヤク、ソウジユツ、センキュウ、ブクリョウ、ケイヒ、センナ、チンピ、トウヒ、ハトムギ、トウニン）を用い、分析農薬として、1990年まで衛生試験法で対象にしていた農薬を中心に、使用の可能性のある有機塩素剤14種、有機リン剤5種及びカルバメート剤1種を選定した。いくつかの生薬において農薬が検出されたが、それらは土壤汚染によると推定されるものや通常の食品での残留農薬基準と比較しても低い値のものであった。しかし、ニンジン類とセンナ及びセンナ末においては無視できない量の残留が認められ、第13改正日本薬局方第一追補で純度試験に残留農薬試験法と規格値を設定している。また、2003年の市場生薬から食品の基準値以下ではあるが、数種の生薬に残留農薬が検出されている。

中国

蒲公英、菟糸子、防風、川続断、半支連、蒿本、紫蘇葉、升麻、甘草、黄耆、枇杷葉について、総BHC、総DDT、

PCNB を測定した。実験結果を中国、日本、ヨーロッパの規格値（0.2ppm 以下）に当てはめると、不合格率は 4.2%であったが、アメリカ FDA の規格値では 15%が不合格であった。

韓国

11 種類の生薬について 55 種類の農薬を対象に検討したところ、9 種類の生薬から 8 種類の農薬の残留が認められた。

重金属

日本

コウジン、ニンジン、ニンジン末について、それぞれ 15ppm 以下の規定を設けている。第 15 改正時にはより多くの生薬に規格値を設けるべく実験を進めている。

中国

GACP を参考に、As, Hg, Pb, Cd について規制を検討している。

韓国

鹿角、牛膽、鶏内金、白鷺、牛黄、地龍を対象に As, Hg, Pb, Cd の測定を行った。全てのサンプルが 30ppm 以下であった。

二酸化硫黄

韓国

28 種の生薬について検討したところ、10ppm 以下であったのは 73%で、10~30ppm が 5%、30~100ppm が 7%、100~500ppm が 8%、500~1000ppm が 4%、1000ppm 以上が 3%であった。SO₂ の作用を考えると今後対策が必要である。

D. 考察

日本薬局方調査会生薬等委員会では、生薬の微生物限度試験法の検討を 1999 年から開始しており、生菌数試験、特定微生物試験の各項目について、モデルとして選定した数種の流通生薬を用いながら、試料の採取と調製、試料溶液の調製、試験の手順、培地の性能試験および発育阻止物質の確認試験、緩衝液、培地と試薬を順次制定した。また、これらの数値を基に、参考情報に限度値を明示した（日局 14, 2001 年）。1999 年の日中の会議においてこの取り組みを明らかにするとともに、データを紹介することにより必要性を表明し、採用した試験法の解説を行ってきた。中国は日本の方針に同調し、中華人民共和国薬典 2000 年版に微生物限度試験法と限度値を収載した。

日本は製剤原料である生薬に試験法を定め制御する方針であるのに対し、中国は原料ではなく、製剤について管理することにしている。微生物汚染の起因に対する認識は日中ともに一致していて、生薬の選別、水洗、乾燥、保管状態等生薬の品質に与える影響を最小限に留めるよう対策を講じている。今回の会議で初めて、中国で中間製剤について ⁶⁰Co による放射線照射法を採用されていることが薬典委員会により示された。その実態については今後把握する予定である。

日本では 2003 年に農薬取締法が改正され、国内で栽培する薬用植物にも適用される。残留量を考慮に入れた適切な農薬の使用法を検討することが優先課題である。

マイコトキシンの試験法は両国とも未収載である。しかし、WHO では特

にアフラトキシンの制御を重要課題としている。今後、積極的な取り組みが必要になると考えられる。

韓国では微生物限度試験法は未収載であるが、日局試験法の理解に努めている。

残留農薬については、日局 13 第一追補 (1997 年) で、コウジン、センナ、センナ末、ニンジン、ニンジン末の 5 品目に総 BHC 及び総 DDT を 0.2ppm 以下と規定している。中国では 2000 年版で、オウギ、カンゾウに対して総 BHC、PCNB、総 DDT を 0.2、0.1、0.2ppm 以下とした。2005 年版では対象生薬を増やす方針であることが表明された。韓国は 5 種の生薬について 14 種の農薬を測定している。

日局では、一部の生薬について重金属試験を行っている。中国は 2005 年版に収載すべく検討中で、そのデータが示された。韓国でも実態調査が報告された。残留農薬、重金属試験は WHO の作成した Good Agricultural and Collection Practices (GACP) にもその制御の重要性が示されており、今後は試験法の改訂を含めて検討が必要である。

韓国は二酸化硫黄の残留性に着目し、実測値を示して問題点を指摘した。日本では色の白いものが良いものと評価されていたことがあったが、

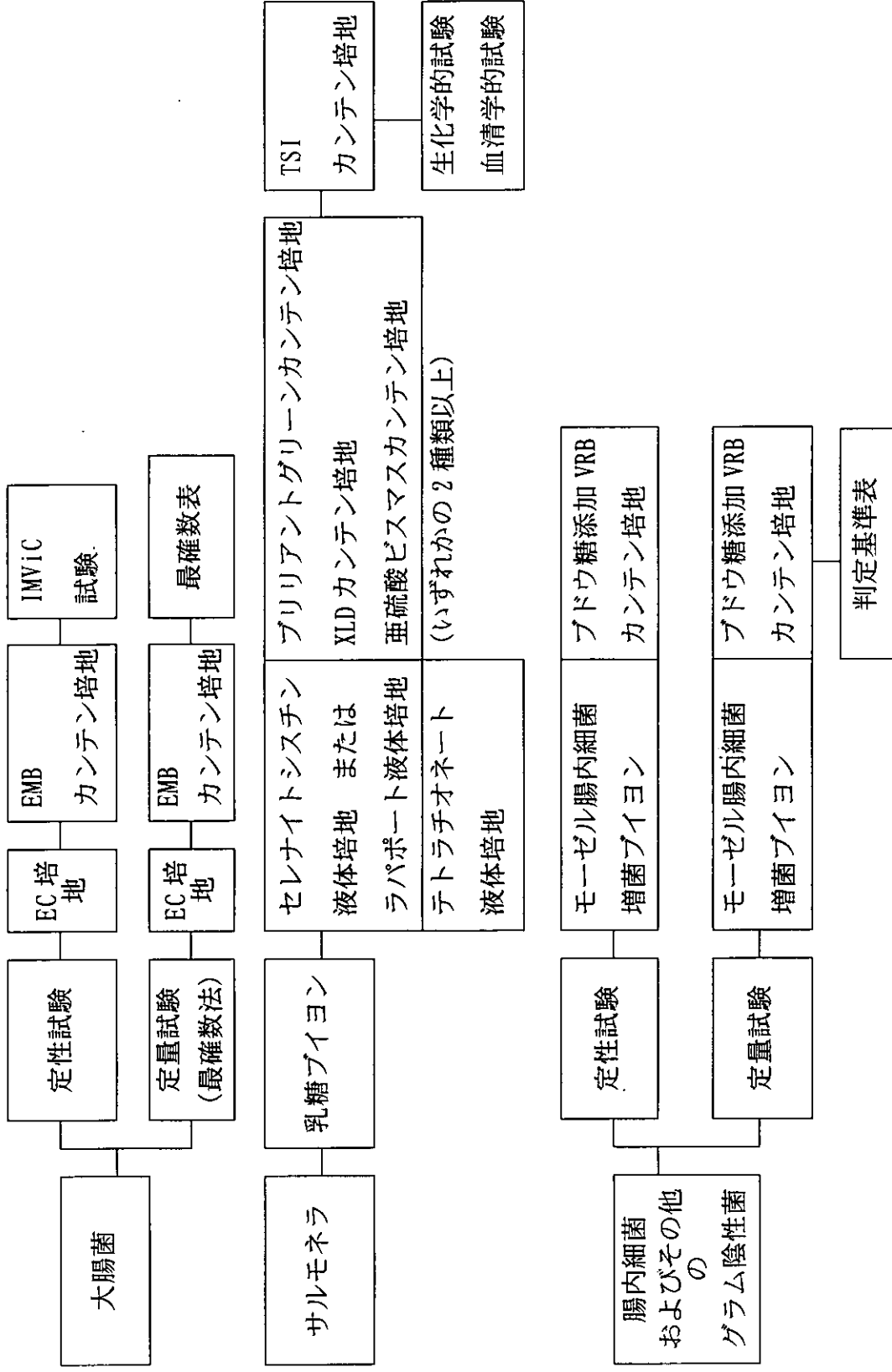
漂白度は有効性には関与しないとの認識が高まり、現在では選品の際にむしろ避ける傾向にある。現状についてのデータの集積が必要になるかもしれない。

白朮は 3 国とも共通の 2 種の基原植物が規定されている。一方、蒼朮の基原植物は、中国は 1 種、日本は中国とは異なる 2 種、韓国は中国と同じ 1 種と日本の 2 種のうち 1 種を規定しており、違いがある。各国の使用経験、供給量の確保等の差が反映しているものと考えられるが、今回示されたデータを基にこれらの違いを十分に認識することが重要である。

E. 結論

日本、中国、韓国の生薬に関する薬局方の調和を目指して、微生物限度試験法、重金属試験法、残留農薬試験法を共通テーマに検討した。また、植物の混同による間違いを誘起しないために、基原植物に違いが明らかでない生薬である朮 (ジュツ) の特異性を明確にした。アジア産生薬の世界進出が著しいが、生薬、生薬製剤の品質を確保し、有効性、安全性の評価に配慮されるよう今後もさらに各国間の情報交換、データ交換が必要である。

別紙 1



厚生労働科学研究費補助金
(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
分担研究報告書

理化学試験法の改正と国際調和に関する研究
—近赤外分光法による薬物鑑別—

分担研究者 中村 洋 東京理科大学薬学部教授

理化学試験法の改正と国際調和に関する研究
— 近赤外分光法による薬品鑑別 —

分担研究者 中村 洋 東京理科大学薬学部教授

研究要旨 微分法に変わる新しいNIRSスペクトルの変換方法の検討を行った。NIRSスペクトルを2次微分し、正規化したのち、さらに吸光度変換を施した。一般用医薬品及びその主成分の標品のNIRSスペクトルにこれらの変換を施したところ、標品のスペクトルでは固有のピークが、一般用医薬品では標品に起因すると思われるピークを確認することができた。この変換方法を応用しアスピリンとダイアルミネートの2重層で構成されるバファリン®錠の定性分析を行い、錠剤の識別コードを有する面、その反対側の面をそれぞれ個別に測定し得られたスペクトルをアスピリン、ダイアルミネート標品のスペクトルと比較したところ、識別コード面にはダイアルミネート、反対側の面はアスピリンのスペクトルと一致した。それらのスペクトルを比較することにより、識別コードはダイアルミネート層、その反対側はアスピリン層であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、近赤外分光法(NIRS)は化学、生物学などの分野から農業・食品分野、医学・薬学分野、化学工業などの広い範囲に及んで利用されている^{1)~3)}。特に、農業、食品及び医療などの分野や石油化学分野では比較的新しい品質評価法としての期待が大きい^{4)~6)}。本研究は、このように広い範囲で利用されている近赤外分光法を鑑識科学分野へ応用することを目的とする。今回は、NIRスペクトルの変換法の検討を行った。NIRSの分野では、スペクトル変換法として微分法があるが、そのスペクトルは非常に多くのピークが入り組んでいるため、サンプルのスペクトル同士を比較する場合、検討しづらいという欠点があった。そこで薬品鑑別における定性分析の可能性について検討を行うとともに、NIRスペクトルの新しい変換方法についても検討した。その新しい変換

方法の評価として、バファリン錠®の定性分析を行った。

B. 研究方法

1. 試薬類・装置

試薬：日本薬局方アセトアミノフェン（丸石製薬）、日本薬局方エテンザミド（岩城製薬）、日本薬局方アスピリン（岩城製薬）、試薬特級カフェイン（和光純薬）、試薬特級アルミニウムグリシネート（丸石製薬）、試薬特級炭酸マグネシウム（関東化学）、バファリン®錠（LION）を購入し、精製することなくそのまま使用した。

NIRS装置： InfraAlyzer 500
（BRAN+LUEBBE）

ソフトウェア： SESAME
（BRAN+ LUEBBE）

2. 新しい変換方法によるスペクトルと2次微分スペクトルの比較

アセトアミノフェン、エテンザミド、カフェイン、アスピリン 100 mg をそれぞれ封入し、スペクトルを得た。これらのスペクトルに2次微分後、正規化、さらに吸光度変換を施した。「吸光度変換」と言うと誤解を生じてしまうが、これはソフトの「変換名」であり、実際は2次微分後の正規化値の逆数の対数 ($Y = \log 1/X$) を取ったものである。

3. 新しい変換方法の評価 (バファリン®錠の定性分析)

さらにこの変換方法の評価を行うために、バファリン®錠を測定した。主成分であるアスピリン 330mg、アルミニウムグリシネートと炭酸マグネシウムを 1:2 の割合で配合し作成したダイアルミネート 100 mg をセルに封入し標品のスペクトルを得た。またバファリン®錠の同様にセルに封入し測定を行った。得られた NIRS スペクトルには、2次微分後、正規化、さらに吸光度変換を施した。

C. 結果及び考察

1. NIR スペクトルの変換方法の検討

微分法に変わる NIR スペクトルの変換方法を検討した。アセトアミノフェン、エテンザミド、カフェイン、アスピリンの、新しい変換方法によるスペクトルと2次微分スペクトルを並べて示したものを Fig.1~Fig.8 に示す。新しい変換方法のスペクトルにおいて、アセトアミノフェンでは 2032 nm、エテンザミドでは 2272 nm、カフェインでは 1690 nm、アスピリンでは 1144 nm に最も大きいピークが得られた。各 Fig.に示すように2次微分スペクトルでは化合物固有のピークや吸収帯を確認しづらいが、2次微分後、正規化、さらに吸光度変換を施す

ことで化合物固有のピークを確認することができた。

2. バファリン®錠の定性分析 (錠剤面の定性分析)

この変換方法 (2次微分→正規化→吸光度変換) を用い、アスピリンを主成分とする錠剤であるバファリン®錠の定性分析を行った。バファリン®錠はアスピリン以外にダイアルミネート (アルミニウムグリシネート、炭酸マグネシウムの混合物) を含有し、アスピリンとダイアルミネートをそれぞれ別の層に配合した2重層構造である⁵⁾。ダイアルミネート、アスピリンの標品及び錠剤 A の識別コードが刻印されている面、されていない面、さらに各面を削り落とした部分のスペクトルに先の変換を施したものを Fig.9~Fig.14 に示す。まず、識別コードが刻印されている面について、Fig.9、Fig.11、Fig.13 に示すように、共通して 1394、1416 nm にピークが見られた。またこれら3つを重ねて表示した結果、Fig.15 のようにそれ以外の波長域でもスペクトルが一致した。次に識別コードが刻印されていない面について、1146、1640、1672、1694 nm に注目した結果、3つすべてにピークが見られた。Fig.16 のように重ねて表示すると、ピークの高さに大小はあるものの、ピークは一致した。またそれ以外の波長域でも一致した。

以上より、刻印がされている面がダイアルミネートの層、されていない面がアスピリンの層である可能性が高い。ただしこの実験では、近赤外線が錠剤を完全に透過・反射せず、表面付近で透過・反射していることがわかった。

また日本薬局方の「アスピリン錠」の確認試験を行ったところ、結果は一致した。

D. 結 言

B. 2より、微分スペクトルでは互いにピークが入り組んでいるため、化合物固有のピークを比較することは難しいが、2次微分後、正規化、さらに吸光度変換 ($Y=\log 1/X$) を施すことで化合物固有のピークを抽出・検討することができた。化合物の異同識別を行う場合、微分スペクトルではスペクトル全体をもとに比較しなければならないが、この新しい変換方法により固有のピークを抽出することに成功した。また、この変換方法により2層構造を持つ錠剤の錠剤面の定性分析に成功した。バファリン®錠の識別コードが刻印されてある面はダイアルミニネート層、反対側の面はアスピリン層であることが分かった。錠剤の非破壊・定性分析を行うことができた。

E. 参考文献

- 1) 尾崎幸洋：ぶんせき, 1997, 56
- 2) 河野澄夫：ぶんせき, 1994, 75
- 3) 田辺和俊、上坂博亨、南 幸男、三井利幸、大崎一男：第57回分析化学討論会講演要旨集 p.98 (1996)
- 4) 岩元睦夫、河野澄夫、魚住 純：近赤外分光法入門、幸書房 (1994)
- 5) 尾崎幸洋、河田 聡：近赤外分光法、学会出版センター (1996)
- 6) 相島鉄郎：ケモメトリックス - 新しい分析化学 -, 丸善 (1992)

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

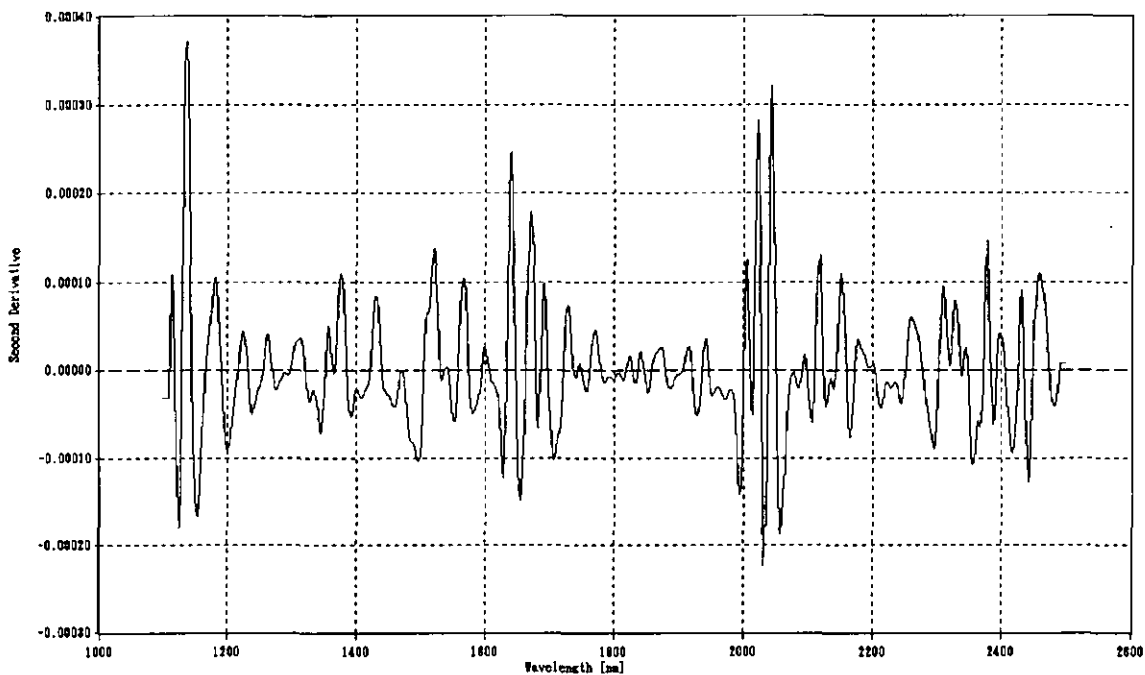


Fig.1 Second Derivative Spectrum of Acetaminophen.

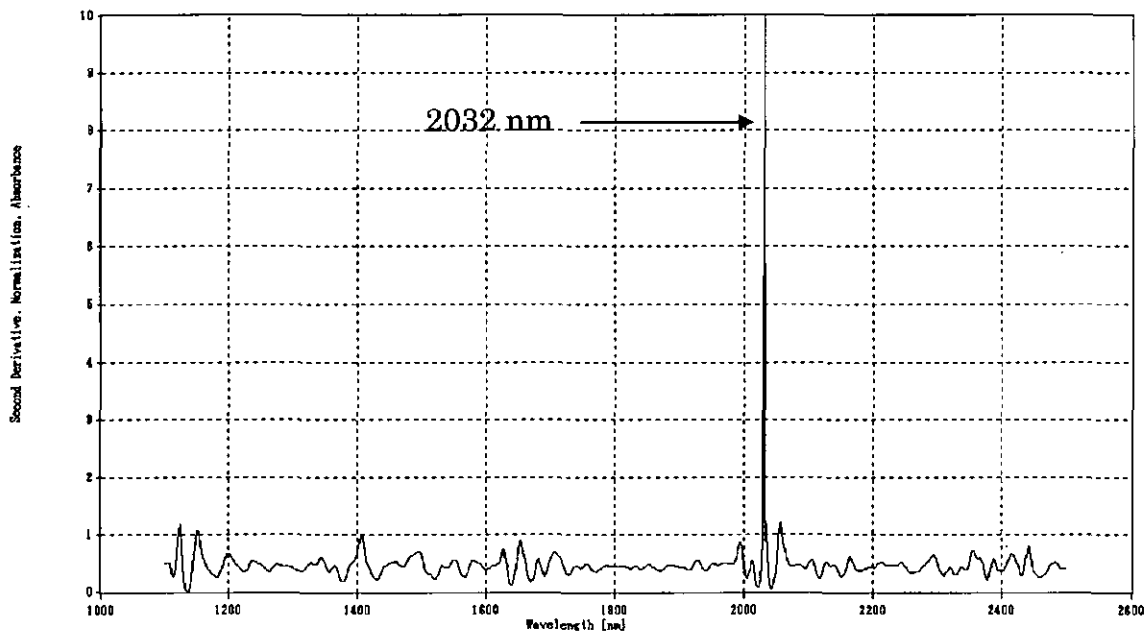


Fig.2 Normalized Second Derivative Spectrum of Acetaminophen.

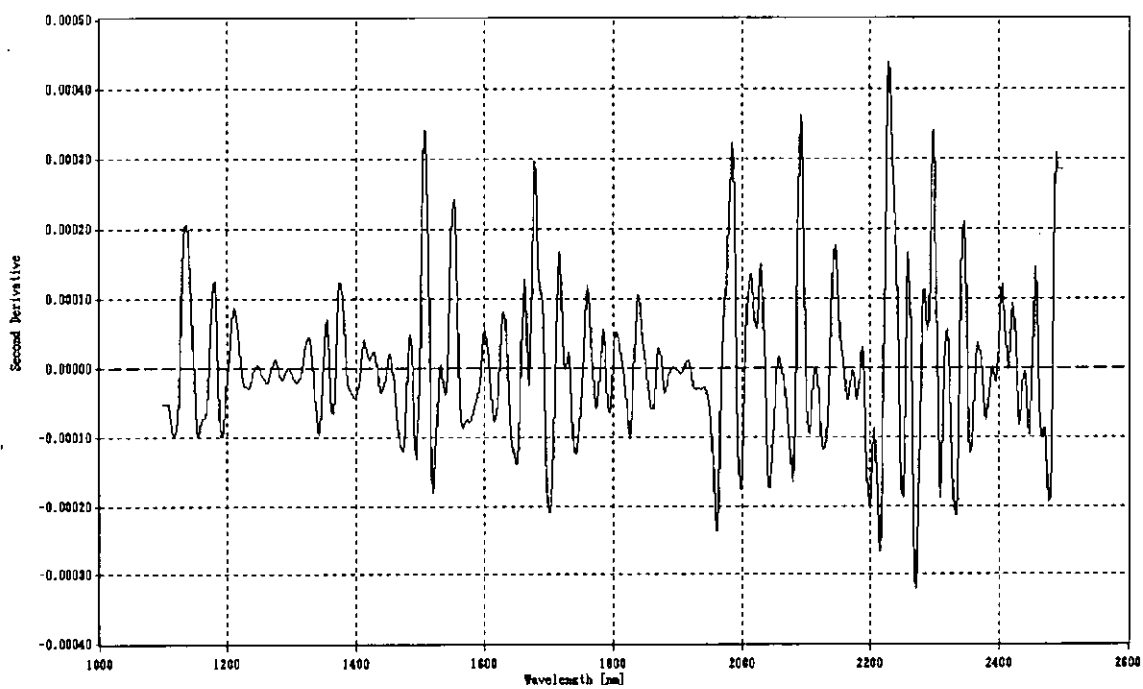


Fig.3 Second Derivative Spectrum of Ethenzamide.

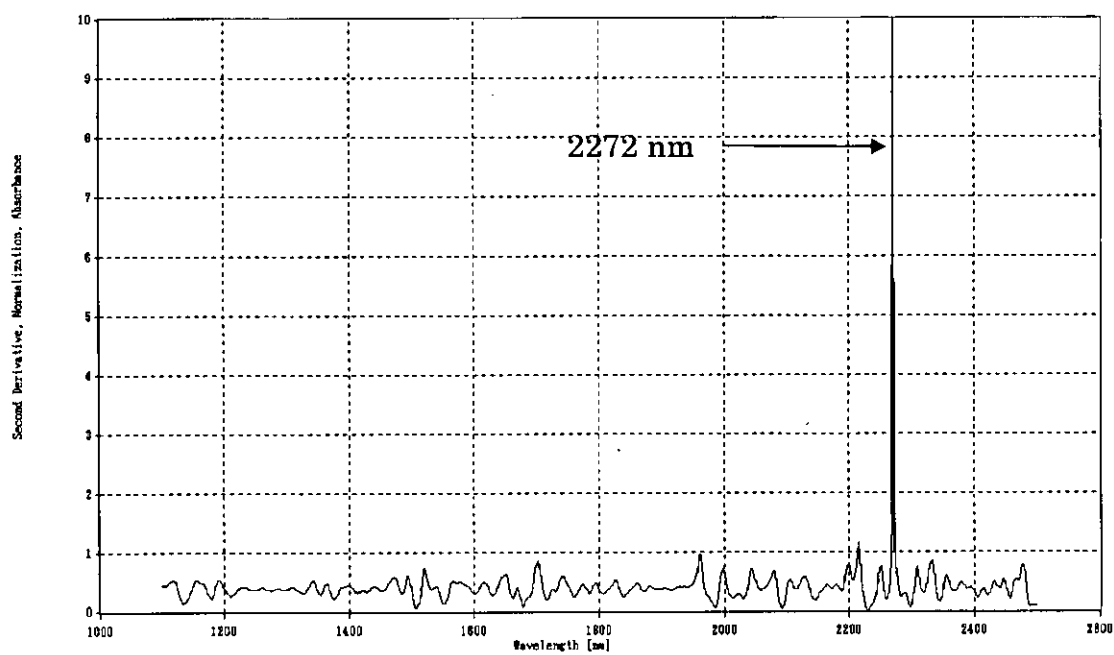


Fig.4 Normalized Second Derivative Spectrum of Ethenzamide.

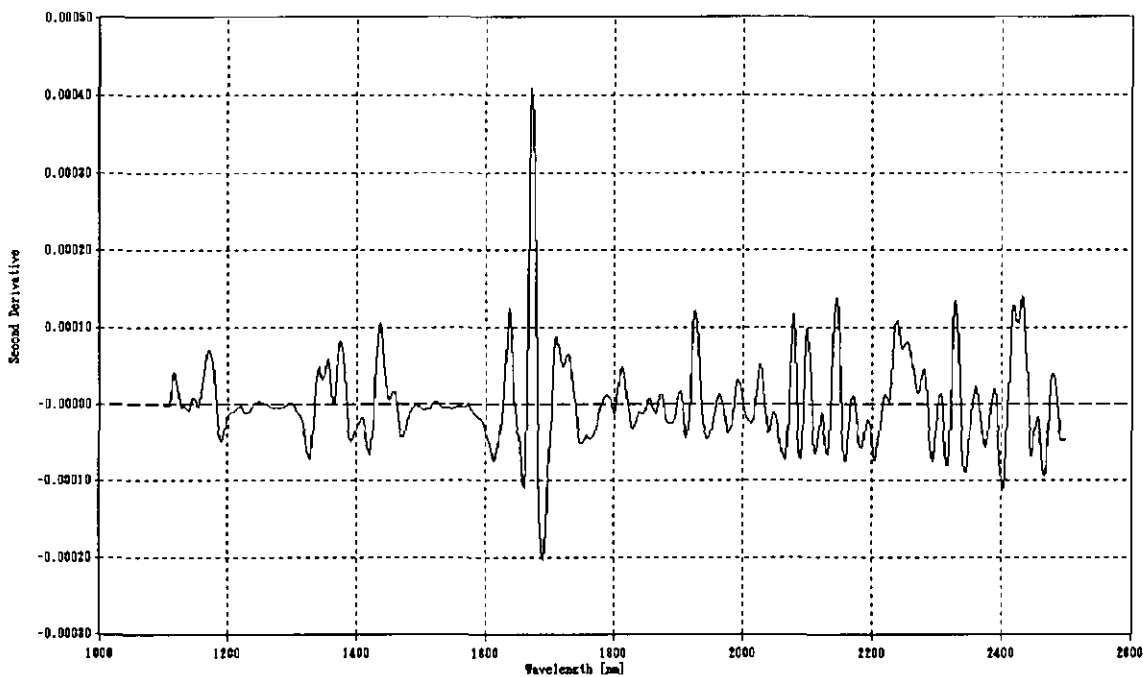


Fig.5 Second Derivative Spectrum of Caffeine.

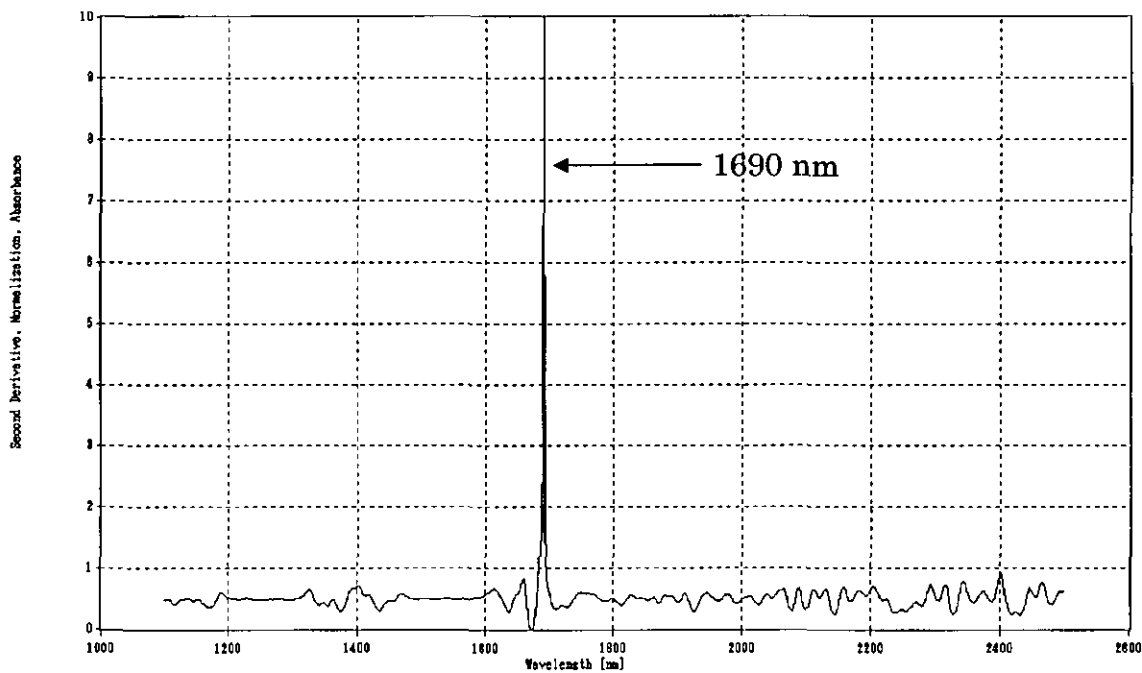


Fig.6 Normalized Second Derivative Spectrum of Caffeine.

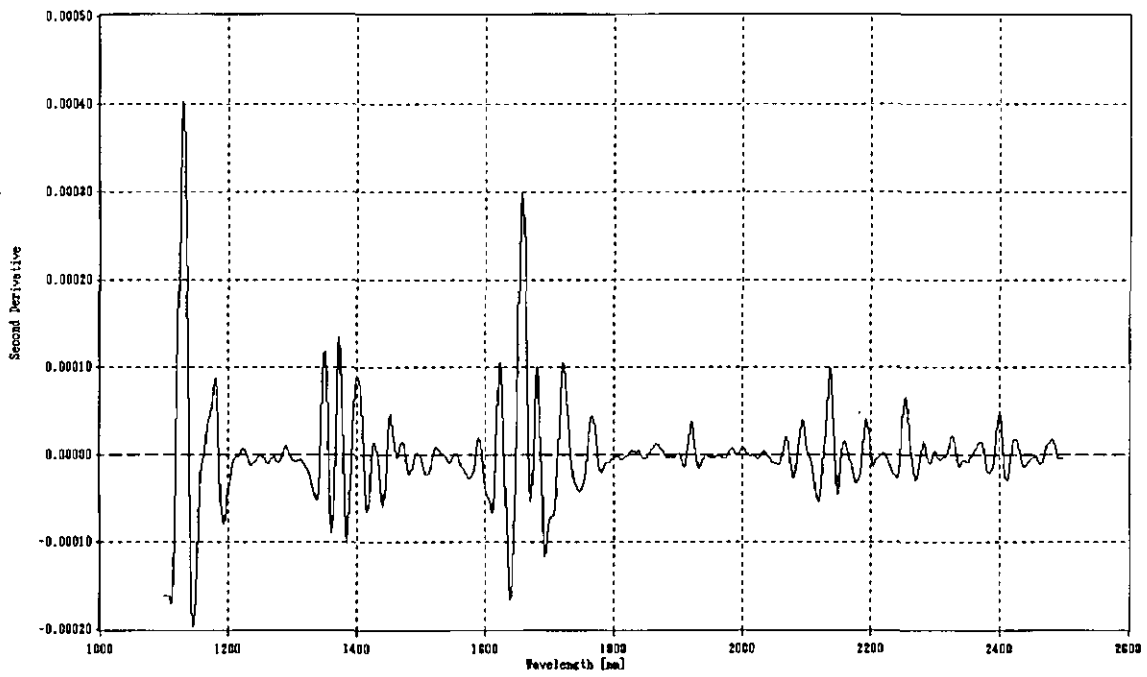


Fig.7 Second Derivative Spectrum of Aspirin.

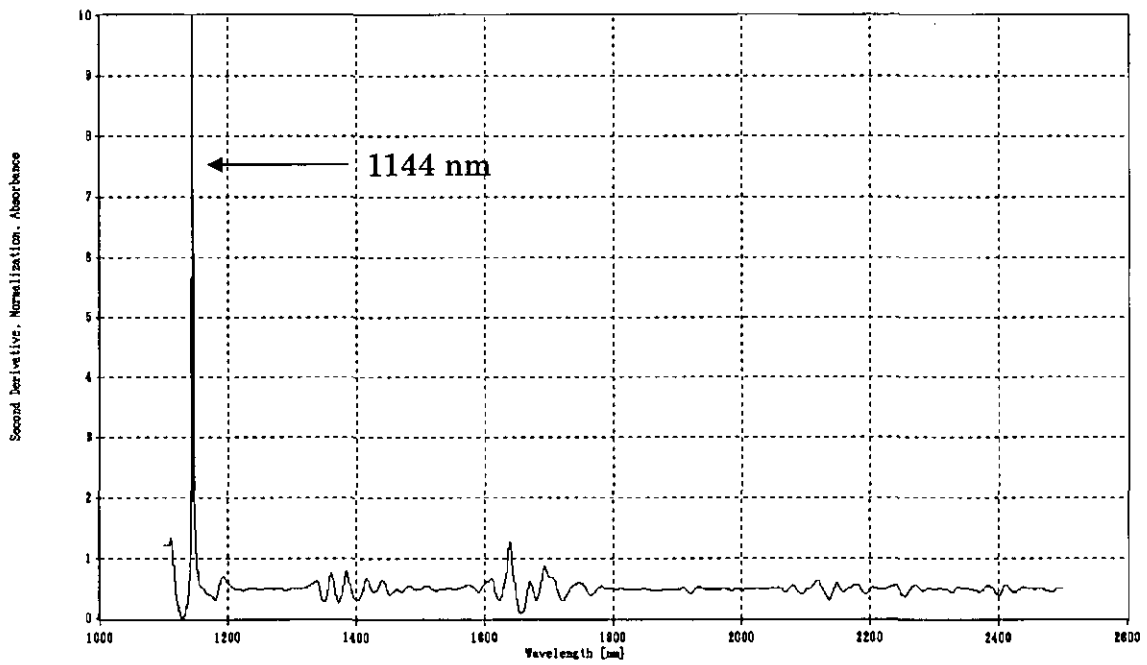


Fig.8 Normalized Second Derivative Spectrum of Aspirin.

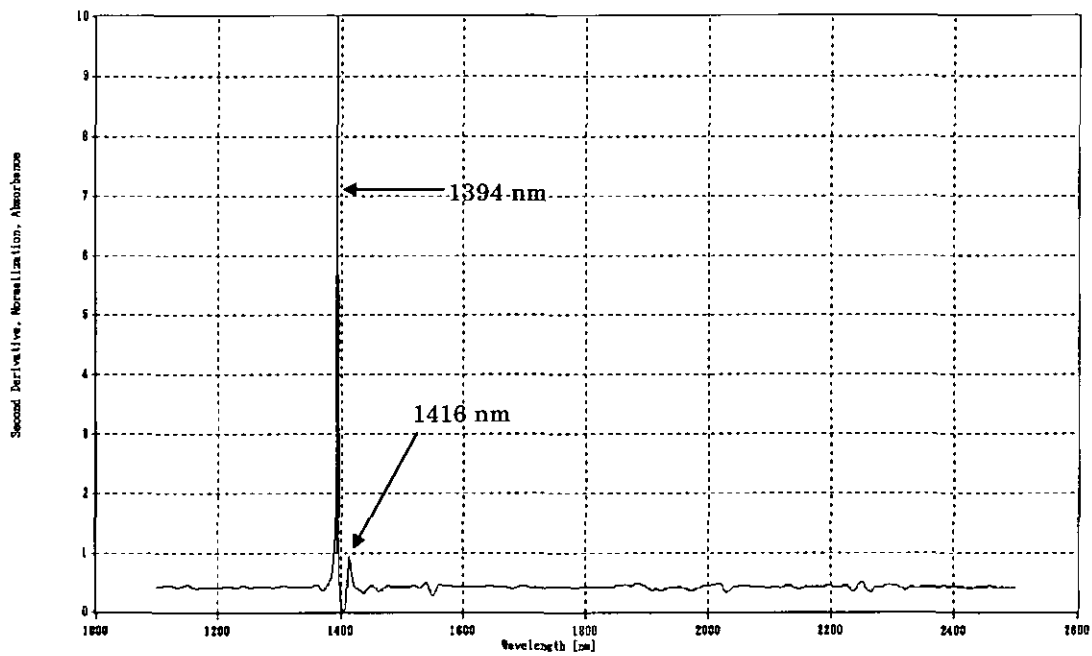


Fig.9 Normalized Second Derivative Spectrum of Di-Alminate.

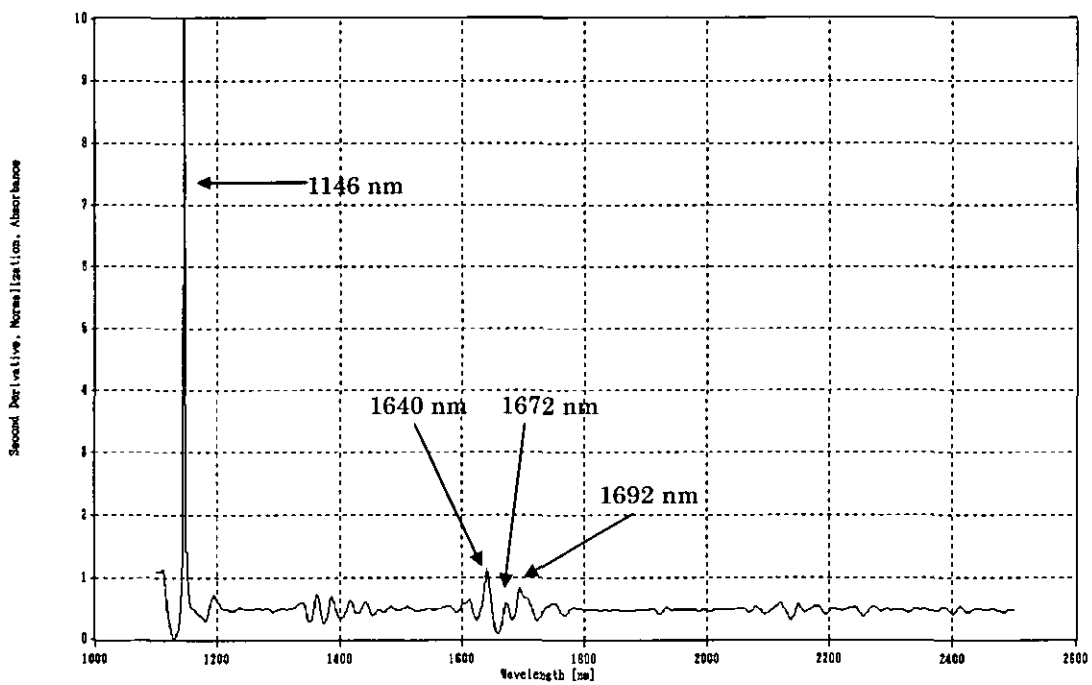


Fig.10 Normalized Second Derivative Spectrum of Aspirin.

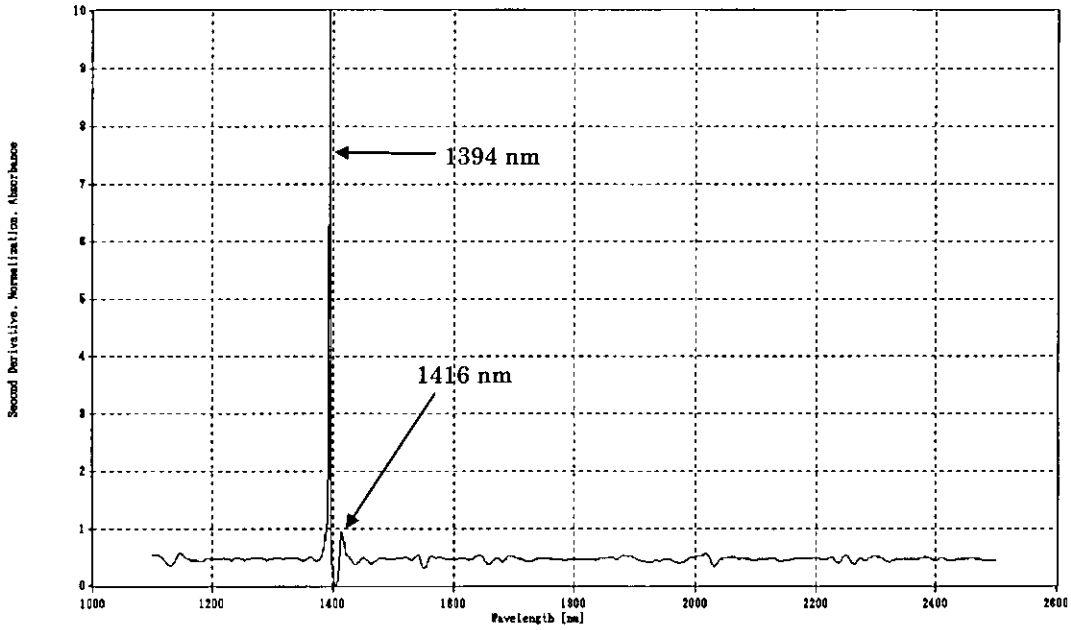


Fig.11 Normalized Second Derivative Spectrum of BUFFERIN® (The Side Stamped with The Name of The Maker).

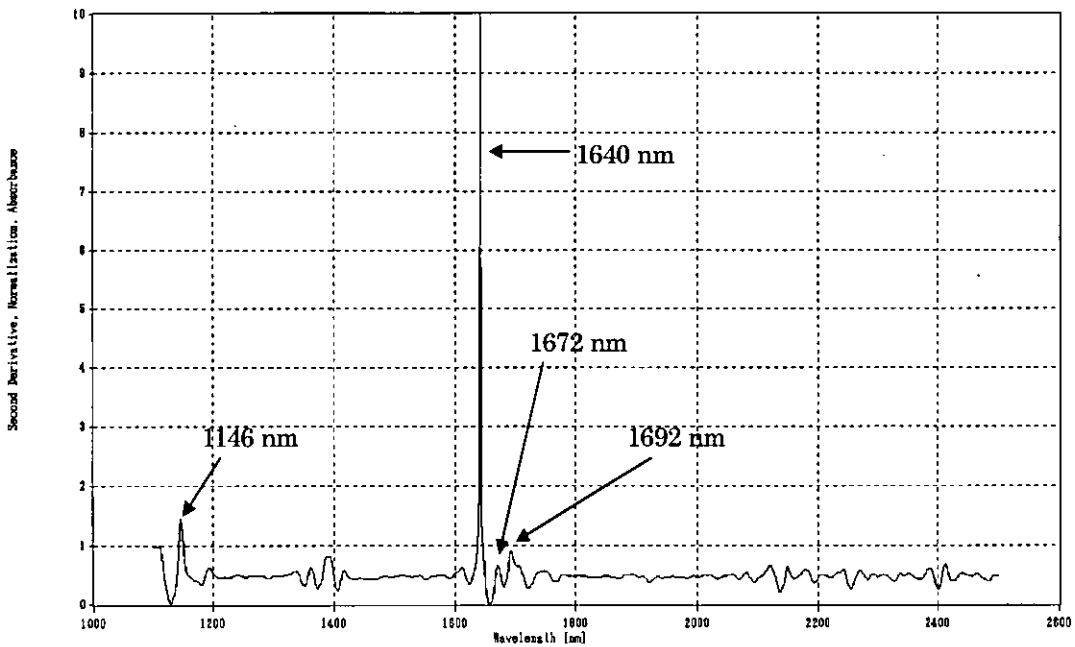


Fig.12 Normalized Second Derivative Spectrum of BUFFERIN® (The Opposite Side).

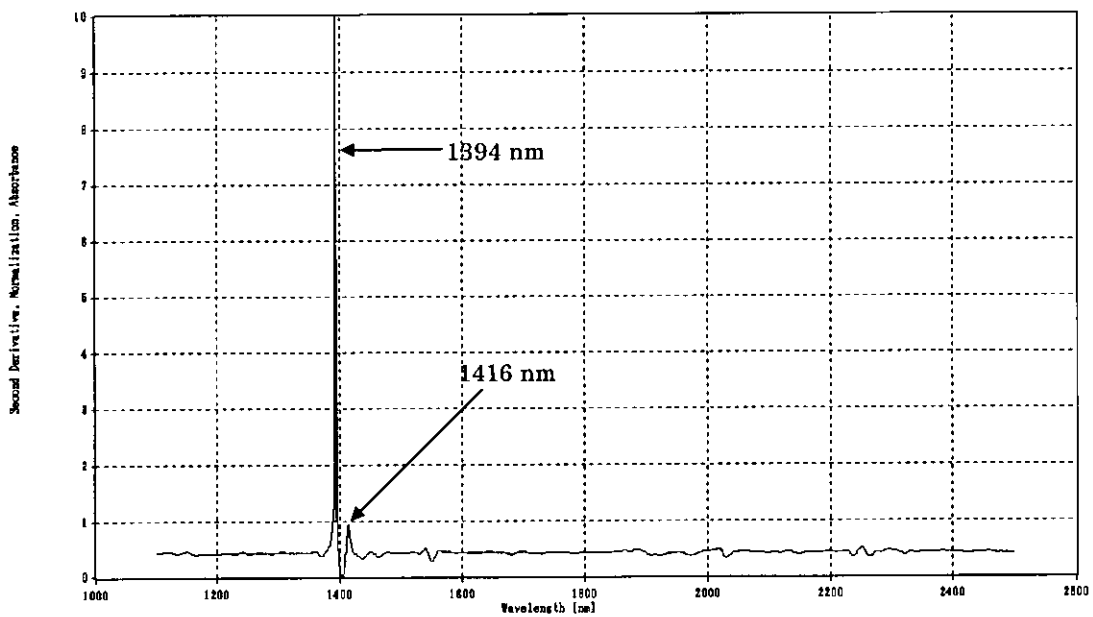


Fig.13 Normalized Second Derivative Spectrum of The Sample Scraped from BUFFERIN® (The Side Stamped with The Name of The Maker).

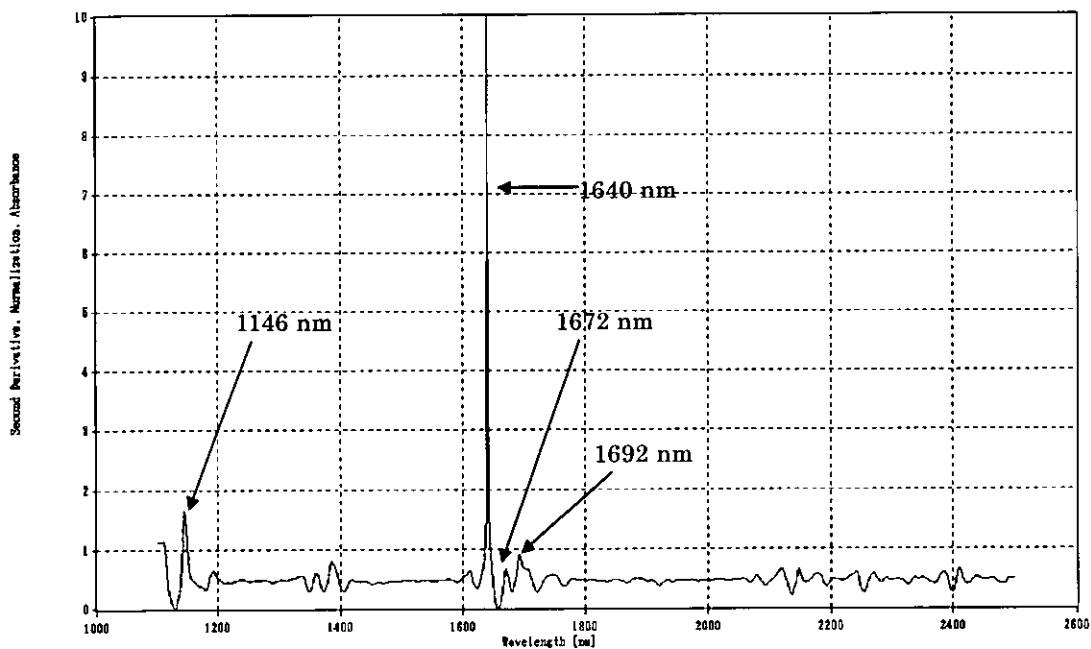


Fig.14 Normalized Second Derivative Spectrum of The Sample Scraped from BUFFERIN® (The Opposite Side).

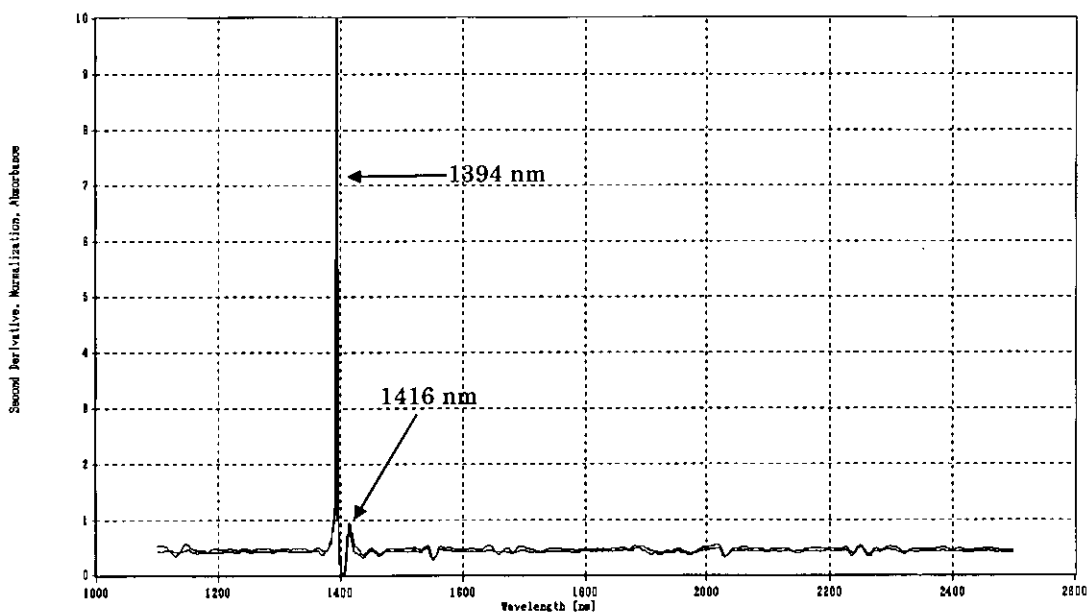


Fig.15 Normalized Second Derivative Spectra of Di-Alminate, The Stamped Side of BUFFERIN® and The Sample Scraped from The side.

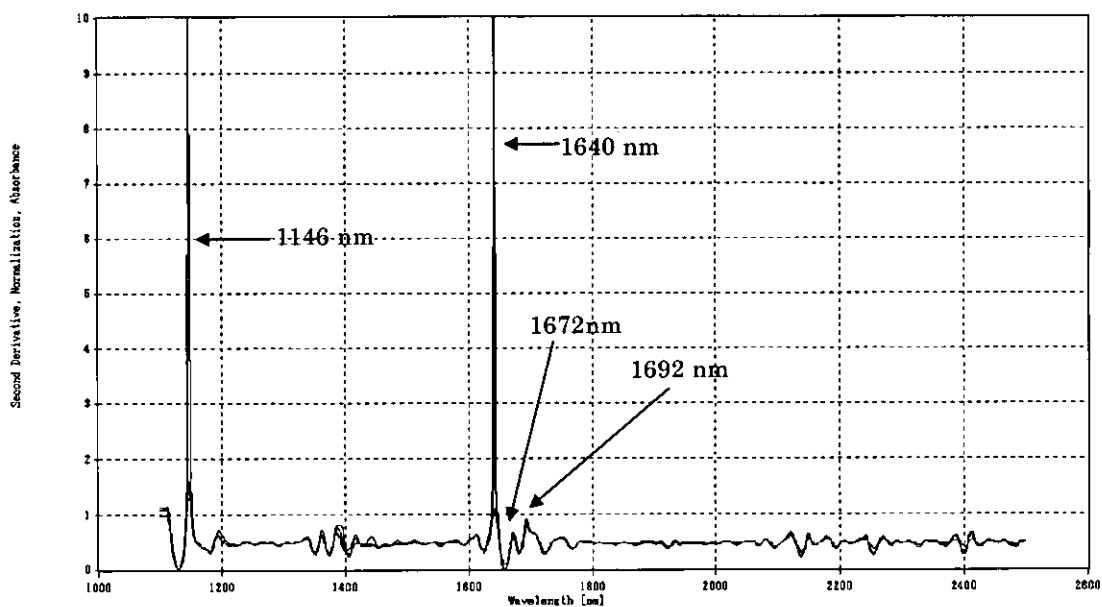


Fig.16 Normalized Second Derivative Spectra of Aspirin, The Opposite Side of BUFFERIN® and The Sample Scraped from The side.