

行し、錠剤やカプセル剤に用いられる添加剤の FRC 関連の試験項目として重要な位置を占める「比表面積測定法」、「粒度測定法」、「かさ密度及びタツプ密度測定法」、「粉体の粒子密度測定法」などの粉体特性に関する試験法は 3 薬局方で同じ試験法である。

しかし、試験項目は同じであっても、方法が異なる場合もある。例えば、Chelating and/or Complexing Agents や Antioxidant の FRC に関連する試験法として鉄試験法がリストされている。JP における鉄試験法は 2,2'-ビピリジルと鉄イオンとの錯体形成による発色を利用しているのに対して、EP や USP ではチオグリコール酸との錯体形成を利用しており、項目名は同じであっても試験法は異なる。国際調和した添加剤のなかで、この鉄試験が規定されている品目にコムギデンプン、トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、コメデンプンがある。EP あるいは USP が Coordinate Pharmacopoeia であり、調和前の JP のデンプン類には鉄試験が設定されていなかったことから、デンプン類の各条の国際調和においては、鉄試験としてチオグリコール酸を用いる方法が採用され、JP においては各条に詳しく試験法を書くことによって対応する必要が生じた。また、錠剤、カプセル剤の結合剤の試験法としてリストされた粘度測定法においても、JP、EP ではキャピラリー法による粘度測定はウベローデ型粘度計を用いることになっている。USP では各条において特定の粘度計を指定する場合もあり、結晶セルロースにおいては「キャンノン・フェンスケ型粘度計あるいはそれと同等の粘度計」を用いることになっている。試験項目名が同じであっても個々試験法について 3 局間の比較を十分に行う必要があることは言うまでもないが、FRC 関連の試験法についての国際調和が進めばこのような問題は解決されると思われる。

3 FRC に関連する試験法の JP への取り込みおよびその国際調和の重要性

添加剤各条の三薬局方の国際調和は、添加剤の調達の国際化、多様化を促すと思われる。しかし、添加剤の FRC は供給元によって大きく変動する場合もあり、また、同一の供給元の製品であっても、バッチ間の変動も大きいと言われている。一定の performance を有する製剤を

製造するためには、添加剤の FRC のなかで、製剤の機能に影響を及ぼす critical な特性を明らかにし、最適な処方やプロセスの制御が不可欠である。そのためには、添加剤メーカーとユーザーが同じ物差しを使って、当該添加剤の FRC 特性を試験し、そのデータに基づいてコミュニケーションすることが不可欠である。そのためには添加剤各条の調和し、添加剤の化学的特性が一定であることが前提である。それに加えて、三薬局方間での FRC 関連の試験法が調和していることが重要になってくると思われる。

4 結論

ICHQ8 ガイドラインなどの医薬品製造に関する新しいガイドラインを受け、製剤メーカーはキーとなる FRC 特性の変動が製剤 performance に及ぼす影響を理解し、添加剤メーカーが供給できる FRC の恒常性に基づいて、最適な処方やプロセスを設定することが必要になってきている。添加剤に関して薬局方に記載すべき情報は従来の化合物としての確認、純度、定量だけでは不十分であり、添加剤の FRC に関する記載が JP においても必要であると思われる。また、一般試験法の国際調和が進んでいるが、FRC 関連の一般試験法において、三局で方法が異なるものもあり、そのような試験法の調和を進めることも必要であると考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Stage 3—pH and Conductivity Requirements
(for atmosphere- and temperature-equilibrated samples only)

pH	Conductivity Requirement ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
5.0	4.7
5.1	4.1
5.2	3.6
5.3	3.3
5.4	3.0
5.5	2.8
5.6	2.6
5.7	2.5
5.8	2.4
5.9	2.4
6.0	2.4
6.1	2.4
6.2	2.5
6.3	2.4
6.4	2.3
6.5	2.2
6.6	2.1
6.7	2.6
6.8	3.1
6.9	3.8
7.0	4.6

Change to read:

PACKAGED**STERILE₂₅ (USP33)****WATER**

The procedure and test limits are intended for water packaged in bulk but manufactured elsewhere or for

■₂₅ (USP33)
Sterile Purified Water, Sterile Water for Injection, Sterile Water for Inhalation, and Sterile Water for Irrigation,

■and any other monographs which specify this section.

■₂₅ (USP33)
All these

■The sterile₂₅ (USP33) waters are derived from Purified Water or Water for Injection, and therefore have been determined to be compliant with the *Bulk Water* requirements before being stored in the container. The specification provided represents the maximum allowable conductivity value, taking into consideration the limitation of the measurement method and reasonable container leaching. Such specification and the sampling volume choices should be defined and validated on the basis of the intended purpose of the water.

Procedure

Transfer a sufficient amount of water to a suitable container, and stir the test specimen. Adjust the temperature, if necessary, and, while maintaining it at $25 \pm 1^\circ$, begin vigorously agitating the test specimen while periodically observing the conductivity. When the change in conductivity (due to uptake of ambient carbon dioxide) is less than a net of $0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$ per 5 minutes, note the conductivity.

For containers with a nominal volume of 10 mL or less, if the conductivity is not greater than $25 \mu\text{S}/\text{cm}$, the water meets the requirements. For containers with a nominal volume greater than 10 mL, if the conductivity is not greater than $5 \mu\text{S}/\text{cm}$, the water meets the requirements.

In-Process Revision

GENERAL CHAPTERS**General Information****BRIEFING**

(1059) Excipient Performance: The following general information chapter has been prepared by the Excipient Performance Joint Advisory Panel of the Excipient General Chapters, Excipient Monographs 1 and Excipient Monographs 2 Expert Committees. A pharmaceutical dosage form typically consists of both active ingredient(s) and excipients. The latter play a critical role in manufacturing, stability, and performance. The properties of excipients that ensure satisfactory and consistent performance depend on the dosage form, the product, the manufacturing process, and the performance requirements. Excipient monographs in the *National Formulary (NF)* provide methods and specifications that ensure excipient identity, quality, and purity. General tests, procedures, and acceptance criteria provided in the *NF* are used to evaluate material attributes of excipients.

Excipient properties that are important to dosage form performance may not be identified or specified in compendial monographs. The proposed chapter resolves this deficiency by commenting on a number of functional categories identified in the *USP-NF*. This information includes a summary of the functional capabilities of an excipient, as well as information about the physical and chemical properties of excipients that may be useful in ensuring consistent and desirable excipient performance. Additional sections will be added as needed.

The tests, procedures, and acceptance criteria delineated in the proposed chapter will not be compendial requirements, but may provide useful information to support private agreements between buyers and suppliers and also, if needed, regulatory requirements for specified excipients and drug products. The expert committee seeks input from readers of *Pharmacopeial Forum* and *USP-NF* regarding the format and content of the chapter.

(EGC: K. Moore) RTS—C76303

Add the following:

EXCIPIENT PERFORMANCE**INTRODUCTION**

Excipients are used in virtually all drug products and are essential to product performance. Thus, the successful manufacture of a robust product requires the use of well-defined excipients and processes that together yield

a consistent product. Typically, excipients are manufactured and supplied to comply with compendial standards. The development, manufacture, and performance of pharmaceutical dosage forms often depend upon the physical and chemical properties of excipients that may not be provided in *National Formulary (NF)* monographs. Also, functionality tests are usually not provided in *NF* monographs.

An excipient may have different functional purposes and may possess various required characteristics (e.g., particle size, particle size distribution, or surface area), depending on its use in a formulation or manufacturing process. A listing of excipients grouped by functional category summarizes the most typically identified purpose these excipients serve in drug products. The list of excipients included in each category is not comprehensive and is not intended to limit in any way the choice or use of the excipient. For the complete list, refer to the *USP* and *NF* Excipients, Listed by Category in the *National Formulary*, under *Contents*.

Excipient functionality is a broad, qualitative, and descriptive term for the purpose or role an excipient serves in a formulation. Of greater importance, however, are the quantitative performance requirements (e.g., critical material attributes) of excipients that must be evaluated and controlled to ensure consistent performance throughout the product life cycle. Not all critical material attributes of an excipient may be identified or evaluated by tests, procedures, and acceptance criteria in *NF* monographs. Excipient suppliers and users therefore at times wish to identify and control critical excipient attributes that go beyond monograph specifications. This requires a thorough understanding of the formulation, the manufacturing processes, and the physical and chemical properties of each ingredient. Manufacturers should anticipate lot-to-lot and supplier-to-supplier variability

in excipient properties and should have in place appropriate controls, if needed to ensure consistent excipient performance.

This general chapter provides an overview of the key functional categories of excipients, tests that may assess excipient functionality, and test procedures that may not be presented in compendial monographs. The functional categories have been organized by their most typical use in common pharmaceutical dosage forms (Tablets and Capsules; Oral Liquids; Semisolids, Topicals and Suppositories; Parenterals; and Aerosols) to provide a greater level of specificity for each functional category. Several functional categories (e.g., antioxidant) can apply to multiple dosage form types. The association of a functional category with a particular dosage form in this chapter is not absolute and does not limit use of an excipient to a single type of dosage form. Because of the complex nature and interplay of formulation ingredients, processing, and dosage form performance requirements, the information provided in this chapter should not be viewed as either restrictive or completely comprehensive. Each functional category includes a general description; the mechanisms by which the excipients achieve their activity; physical properties common to these excipients; chemical properties; and a list of pharmacopeial general chapters that may be useful in the development of specific tests, procedures, and acceptance criteria that help ensure that the critical material attributes are adequately monitored and controlled.

TABLETS AND CAPSULES

Functional Category: Diluent

Description: Diluents are components that are incorporated into tablet or capsule dosage forms to increase dosage form volume or weight. Sometimes referred to as fillers, diluents often comprise a significant proportion

of the dosage form, and the quantity and type of diluent selected often depend on its physical and chemical properties. Because the diluent may comprise a large portion of the dosage form, successful and robust manufacturing and dosage form performance depend on the measurement and control of the critical material attributes.

Functional Mechanism: Among the most important functional roles diluents play is to impart desirable manufacturing properties (e.g., powder flow, tablet compaction strength, wet or dry granule formation, homogeneity) and performance (e.g., content uniformity, disintegration, dissolution, tablet integrity, friability, physical and chemical stability). Some diluents (e.g., microcrystalline cellulose) are occasionally referred to as dry binders because of the high degree of tablet strength they impart to the final compressed tablet.

Physical Properties: The primary physical properties relevant to tablet/capsule diluents are those that can have a direct effect on diluent and formulation performance. These include: (1) particle size and size distribution, (2) particle shape, (3) bulk/tapped/true density, (4) specific surface area, (5) crystallinity, (6) moisture content, (7) powder flow, (8) solubility, and (9) compaction properties for tablet dosage forms.

Chemical Properties: Tablet diluents comprise a large and diverse group of materials that include inorganics (e.g., dibasic calcium phosphate, calcium carbonate), single-component organic materials (e.g., lactose monohydrate, mannitol), and multicomponent or complex organics (e.g., microcrystalline cellulose, starch). They may be soluble or insoluble in water, and they may be neutral, acidic, or alkaline in nature. These chemical properties of diluents may affect drug substance physical or chemical stability and performance positively or negatively. Appropriate selection of excipients with desirable physical and chemical properties can enhance the physical and chem-

ical stability as well as the performance of the drug substance and dosage form. The detailed composition of an excipient may be important because excipient function could be influenced by the presence of minor concomitant components that are essential for proper performance. Pharmaceutical scientists may need to control the presence of undesirable components (e.g., heavy metals or peroxides) to ensure adequate dosage form stability and performance.

General Chapters: The following general chapters may be useful to ensure consistency in diluent functions: *Bulk Density and Tapped Density* (616), *Density of Solids* (699), *Crystallinity* (695), *Crystallinity Determination by Solution Calorimetry* (696), *Loss on Drying* (731), *Water Determination* (921), *Optical Microscopy* (776), *Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving* (786), *Light Diffraction Measurement of Particle Size* (429), *Powder Fineness* (811), *Specific Surface Area* (846), and *Powder Flow* (1174).

Functional Category: Binder

Description: Tablet/capsule binders are incorporated into formulations to facilitate the agglomeration of powder into granules during mixing with a granulating fluid such as water, hydroalcoholic mixtures, or other solvents. The binder may be either dissolved or dispersed in the granulation liquid or blended in a dry state; other components and the granulation liquid may be added separately during agitation. Following evaporation of the granulation liquid, binders typically produce dry granules that achieve the desired properties such as granule size, size distribution, shape, content, mass, and active content. Wet granulation facilitates the further processing of the granules by improving one or more

資料2 剤形ごとの添加剤の機能とそれに関連するGeneral Chapters

剤形	機能分類	General Chapters
Tablets and Capsules (錠剤、カプセル剤)	Diluent (賦形剤)	Bulk and Tapped Density<616> Density of Solids<699> Crystallinity<695> Crystallinity Determination by Solution Calorimetry<696> Loss on Drying<731> Water Determination<921> Optical Microscopy<776> Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786> Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Powder Fineness<811> Specific Surface Area<846> Powder Flow<1174>
	Binder (結合剤)	Bulk and Tapped Density<616> Crystallinity<695> Density of Solids<699> Loss on Drying<731> Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786> Specific Surface Area<846> Viscosity<911> Powder Flow<1174> Chromatography<621>
	Disintegrant (崩壊剤)	Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786> Optical Microscopy<776> Powder Flow<1174>
	Lubricant (滑沢剤)	Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786> Specific Surface Area<846> X-ray Diffraction<941> Loss on Drying<731> Water Determination<921> Crystallinity<695> Crystallinity Determination by Solution Calorimetry<696> Optical Microscopy<776> Thermal Analysis<891>
	Glidant and/or Anticaling Agent (流動化剤/抗凝結剤)	Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786> Specific Surface Area<846> Loss on Drying<731> Water Determination<921>
	Coloring Agent (着色剤)	Color Instrumental Measurement<1061> Light Diffraction Measurement of Particle Size<429>
	Capsule Shell (カプセル)	Microbial Enumeration Test<61> Tests for Specified Organisms<62> Residue on Ignition<281> Arsenic<211> Heavy Metals<231> Color Instrumental Measurement<1061> Disintegration<701> Dissolution<711> Gel Strength of Gelatin<1081>

剤形	機能分類	General Chapters
	Coating Agent (コーティング剤)	Viscosity<911> Tensile strength<881> Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Fat and Fixed Oils<401> Thermal Analysis<891> Dissolution<711>
	Plasticizer (可塑剤)	Melting Range or Temperature<741> Water Determination<921> Organic Volatile Impurity<467> Specific Gravity<841> Refractive Index<831> Thermal Analysis<891>
ORAL LIQUIDS (経口液剤)	pH Modifier (Acidifying/Alkalizing/ Buffering Agent) (pH調整剤)	Water Conductivity<645> pH<791> Osmolality and Osmolarity<785>
	Wetting and/or Solubilizing Agent (可溶化剤)	Fat and Fixed Oils<401> Specific Gravity<841> pH<791> Specific Surface Area<846> Thermal Analysis<891> Spectrophotometry and Light-Scattering<851> Scanning Electron Microscopy<1181> Viscosity<911> Light Diffraction Measurement of Particle Size<429>
	Antimicrobial Preservative (抗菌保存剤)	Injection<1> Antimicrobial Effectiveness Testing<51> Microbial Limit Test<61> Antimicrobial Agents Content<341>
	Chelating and/or Complexing Agents (キレート剤/複合体化剤)	Antimicrobial Effectiveness Testing<51> Microbial Enumeration Test<61> Heavy Metals<231> Iron<241> Lead<251> Antimicrobial Agents Content<341> Light Diffraction Measurement of Particle Size<429> Loss on Drying<731> pH<791> Water Determination<921> Biotechnology-derived Articles<1045> Cell and Gene Therapy products<1046> Manufacturing of Cell Therapy Products<>
	Antioxidant (抗酸化剤)	Specific Surface Area<846> Crystallinity<695> Chromatography<621> Water Determination<921> Melting Range or Temperature<741> Iron<241>
	Sweetening Agent (矯味剤)	Optical Rotation<781> Specific Rotation<> Water Determination<921> Loss on Drying<731> Melting Range or Temperature<741>

剤形	機能分類	General Chapters
SEMISOLIDS, TOPICALS, AND SUPPOSITORIES (半固形製剤、 局所適用製剤、 坐剤)	Suppository Base (坐剤基剤)	Fat and Fixed Oils<401> Congealing Temperature<651> Melting Range or Temperature<741> Pharmaceutical Dosage Forms<1151>
	Suspending and/or Viscosity- increasing Agent (増粘剤)	Viscosity<911>
	Ointment Base (軟膏基剤)	Viscosity<911> Congealing Temperature<651>
	Stiffening Agent (硬化剤)	Melting Range or Temperature<741> Congealing Temperature<651> Viscosity<911>
	Emollient (軟化剤)	Fat and Fixed Oils<401>
PARENTERALS (非経口製剤)	Pharmaceutical Water (薬用水)	Injection<1> Water for Pharmaceutical Purposes<1231> Water for Health Applications<1230> Bacterial Endotoxins Test<85> Total Organic Carbon<643> Water Conductivity<645>
	Diluent (賦形剤、凍結乾燥製剤)	Injection<1> Biotechnology-derived Articles<1045> Product Formulation<> Crystallinity<695> Crystallinity Determination by Solution Calorimetry<696> Pharmaceutical Dosage Forms<1151> Water-Solid Interactions in Pharmaceutical system<1241>
	Tonicity Agent (等張化剤)	Injection<1> Biotechnology-derived Articles<1045> Product Formulation<> Pharmaceutical Dosage Forms<1151> Ophthalmic Preparations<> Pharmaceutical Calculation Compounding<1160>
AEROSOLS (エアロゾル)	Propellant (噴霧剤)	Aerosols, Nasal Sprays, Metered-dose Inhalers, and Dry Powder Inhalers<601> Chromatography<621> Water Determination<921>

資料3 FRC関連の一般試験法の比較		
JP15	USP	EP
かさ密度及びタップ密度測定法<3.01>(国際調和)	Bulk and Tapped Density<616>	Density of solid<2.2.42>
粉体の粒子密度測定法<3.03>	Density of Solids<699>	Pycnometric density of solids<2.9.23>
	Crystallinity Determination by Solution Calorimetry<696>	
	Crystallinity<695>	
乾燥減量<2.41>	Loss on Drying<731>	Loss on drying<2.2.32>
水分測定法<2.48>、乾燥減量試験法<2.41>	Water Determination<921>	Water: semi-micro determination<2.5.12>, Water: microdetermination<2.5.32>, Loss on drying<2.2.32>
粒度測定法<3.04>第1法光学顕微鏡法	Optical Microscopy<776>	Optical microscopy<2.9.37>
粒度測定法<3.04>第2法ふるい分け法	Particle Size Distribution Estimation by Analytical Sieving<786>	Particle-size distribution estimated by analytical sieving<2.9.38>
参考情報30.レーザー回折法による粉体粒度測定	Light Diffraction Measurement of Particle Size<429>	Particle size analysis by laser light diffraction<2.9.31>
粉体の細かさの表示法(参考情報)	Powder Fineness<811>	
比表面積測定法<3.02>	Specific Surface Area<846>	Specific surface area by gas adsorption<2.9.25>
参考情報26.粉体の流動性	Powder Flow<1174>	Powder flow<2.9.36>
粘度測定法<2.53>	Viscosity<911>	Viscosity<2.2.8>, Capillary viscometer methods<2.2.9>, Ciscosity-Rotating viscometer method<2.2.10>
クロマトグラフィー	Chromatography<621>	Thin-layer chromatography<2.2.27>, Gas chromatography<2.2.28>, Liquid chromatography<2.2.29>, Size-exclusion chromatography<2.2.30>
粉末X線回折測定法<2.58>	X-ray Diffraction<941>	Characterization of crystalline and partially crystalline solids by X-ray powder diffraction (XRPD)<2.9.33>
熱分析法<2.52>	Thermal Analysis<891>	Thermal analysis<2.2.34>
	Color-Instrumental Measurement<1061>	
		Degree of coloration of liquid<2.2.2>
	Microbial Enumeration Test<61>	
	Tests for Specified Organisms<62>	
強熱残分試験法<2.44>	Residue on Ignition<281>	Sulfated ash<2.4.14>
ヒ素試験法<1.11>	Arsenic<211>	Atsenic<2.4.1>
重金属試験法<1.07>	Heavy Metals<231>	Heavy metals<2.4.8>
崩壊試験法<6.09>	Disintegration<701>	Disintegration of tablets and capsules<2.9.1>, Disintegration of suppositories and pessaries<2.9.2>
溶出試験法<6.10>	Dissolution<711>	Dissolution test for solid dosage forms<2.9.3>, Dissolution test for transdermal patches<2.9.4>, Dissolution test for lipophilic solid dosage forms<2.9.42>
	Gel Strength of Gelatin<1081>	
	Tensile Strength<881>	
油脂試験法<1.13>	Fat and Fixed Oils<401>	
融点測定法<2.60>	Melting Range or Temperature<741>	Melting point-capillary method<2.2.14>, Meting point-open capillary method<2.2.15>, melting point-instantaneous method<2.2.16>
残留溶媒試験法<2.46>	Organic Volatile Impurity<467>	Identification and control of residual solvents<2.4.24>
比重及び密度測定法<2.56>	Specific Gravity<841>	Relative density<2.2.5>
屈折率測定法<2.45>	Refractive Index<831>	Refractive index<2.2.6>
pH測定法<2.54>	pH<791>	Potentiometric determination of pH<2.2.36>
浸透圧測定法<2.47>	Osmolality and Osmolarity<785>	Osmolality<2.2.35>
分光学的測定法	Spectrophotometry and Light-Scattering<851>	
	Scanning Electron Microscopy<1181>	
	Antimicrobial Effectiveness Testing<51>	
	Microbial Limit Test<61>	
	Antimicrobial Agents Content<341>	
	Injection<1>	
鉄試験法<1.10>	Iron<241>	Iron<2.4.10>
	Lead<251>	Lead in sugar<2.4.10>
旋光度測定法<2.49>	Optical Rotation<781>、Specific Rotation<>	Optical rotation<2.2.7>
凝固点測定法<2.42>	Congeeing Temperature<651>	Freezing point<2.2.18>
	Water for Health Applications<1230>	
	Water for Pharmaceutical Purposes<1231>	
エンドトキシン試験法<4.01>	Bacterial Endotoxins Test<85>	Bacterial endotoxins<2.6.14>
有機体炭素測定法<2.59>	Total Organic Carbon<643>	Total organic carbon in water for pharmaceutical use<2.2.44>
導電率測定法<2.51>	Water Conductivity<645>	Conductivity<2.2.38>
	Biotechnology-derived Articles<1045>	
	Product Formulation<>	
	Pharmaceutical Dosage Forms<1151>	
	Water-Solid Interactions in Pharmaceutical system<1241>	
	Ophthalmic Preparations<>	
	Pharmaceutical Calculation Compounding<1160>	
	Aerosols, Nasal Sprays, Metered-dose Inhalers, and Dry Powder Inhalers<601>	Preparations for inhalation.aerodynamic assessment of fine particles<2.9.18> Uniformity of mass of divered doses from multidoso containers<2.9.27>
	Manufacturing of Cell Therapy Products<>	
	Cell and Gene Therapy products<1046>	

厚生労働科学研究費補助金
(分担) 平成 21 年度報告書

ICP-AES 分析による金製剤投与ラットの体毛動態に関する基礎研究
(3) ラットへの金製剤投与実験

分担研究者 中村 洋 東京理科大学薬学部

研究要旨

本研究は日本薬局方一般試験法の高度化の一環として遂行するものであり、約 80 種類の元素の同時定量が可能であるという長所を有する高周波誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES) の薬学分野への応用性を検証するものである。過去 2 年間の研究から、ICP-AES が生体金属の一斉分析に有用であり、かつ体毛などの生体試料中に含有される微量金属の定量的な前処理・回収法が確立できたので、本年度はその実用性を検証する目的で金チオリンゴ酸ナトリウムをラットに投与し、Au (III) の体毛への移行動態を追跡した。

おける吸収・分布・代謝・排泄に関する研究に ICP-AES を活用し、内在性金属との相互作用を含め、従来知られていない生体内金属ダイナミズムを解明することを目的とした。その結果、Au (III) の体毛への移行は投与部位によらずラットの腹部に選択的であることなどが判明し、ICP-AES が薬学分野で十分に有効利用できることを立証することができた。

分担研究者氏名 中村 洋
所属機関名 東京理科大学薬学部
職名 教授

A. 研究目的

平成 19 年度の研究により、試料溶液中の Au を DEAE カートリッジに吸着させ、定量的に回収する手法を確立した。また平成 20 年度の研究により、標準溶液で得られた検討内容が実際の生体試料 (体毛) においても適用できることが判明した。そこで、平成 21 年度はラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを様々な方法で投与し、体毛中の Au の濃度を測定することにより、金チオリンゴ酸ナトリウムの体毛蓄積度を精査することを目的とする。

なお、金チオリンゴ酸ナトリウムは関節リウマチの治療薬であり、作用機序は不明な点が多いが、人間の場注射剤として投与される。金チオリンゴ酸ナトリウムは尿中に最も排泄されるため、投与ラットの尿を分析試料とした研究は見受けられるが、体毛を分析試料とした研究は未だ見受けられない。そこで、本研究では採取・貯蓄が容易な体毛に着目し、金チオリンゴ酸ナトリウム投与ラットの体毛中の金属濃度をモニターすることとした。

B. 研究方法

ICP-AES 装置及び測定条件

ICP-AES には SPS7800 (セイコーインスツルメンツ) を使用し、アルゴンプラズマ条件は Rf 周波数 27.12 MHz, Rf 出力 1.2 kW, プラズマガス流量 16 L/min, 補助ガス流量 0.7 L/min, キャリアーガス流量 0.4 L/min, プラズマ観測高さはコイル上 15 mm とした。

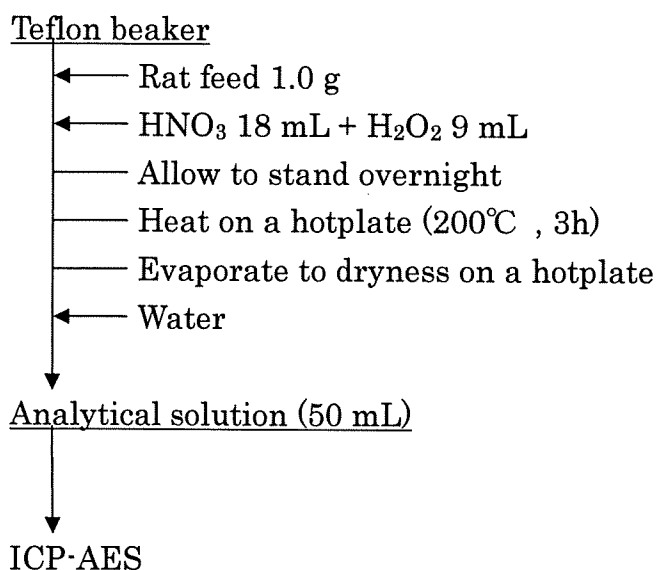
試薬

今年度新たに用いた試薬は硝酸 (原子吸光分析用、関東化学)、過酸化水素 (原子吸光分析用、関東化学)、アセトン (特級、関東化学) であり、その他の試薬は前年度と同一である。なお、分析に供した飼料は東京理科大学薬学部動物舎で使用されている Labo MR stock (日本農産工業株式会社製) である。

1) 薬学部動物舎で使用している飼料の分析操作

まず、ラットを薬学動物舎で飼育するに当たり、ラットが通常摂取する飼料及び水が本研究に及ぼす影響について調べた。

飼料の分析操作を Scheme 1 に示す。テフロン製のビーカーに乳鉢で粉末状になるまですりつぶした Labo MR stock 1.0 g 及び硝酸 18 mL, 過酸化水素 9 mL を加えて一晩放置後、ホットプレート上で 200°C、3 時間加熱して飼料を分解した。分解が完了して固形物がなくなったら分析試料の酸濃度を低下させるためにホットプレート上で酸を蒸発乾固させた。残留物を水で 50 mL に希釈して分析試料とした。ICP-AES の測定条件は前年度と同様である。



Scheme 1 Digestion procedure for rat feed

2) 飲料水の分析操作

飲料水の分析の場合は、(1) 飲料水が液体であること、(2) そのまま分析しても ICP-AES での測定に影響を与える因子はないと考えられること、などの理由から前処理は行わず、そのまま分析に供した。

3) ラットへの金製剤投与・採毛・洗毛・体毛の分解方法 (投与後 5,10,15 週間後の分析)

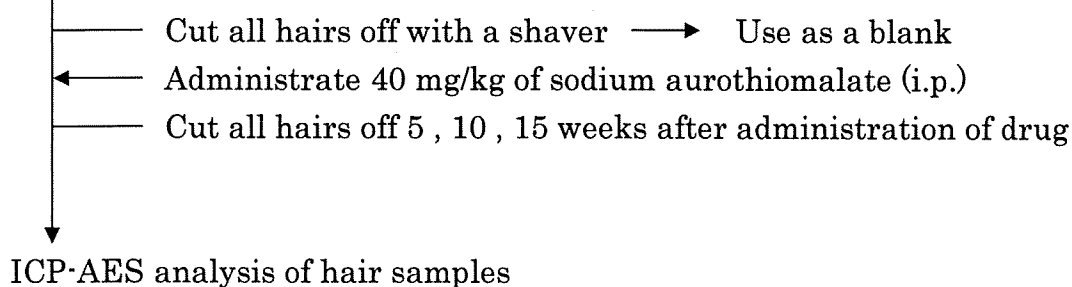
まずラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを 1 回投与し、投与後どの程度の期間で投与した金製剤が体毛中に移行するのかを調べた。

実験に使用したラットは Wistar 系 (♀, 3 週齢) であり、飼育中は薬学部動物舎 (室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$) で飼育し、小動物用固形飼料 (Labo MR stock) 及び飲料水を自由摂取させた。

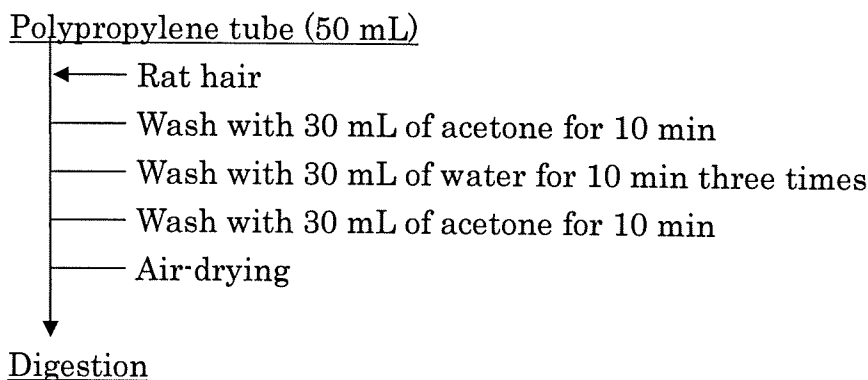
採毛方法を Scheme 2 に示す。まず投与前にラットの全体毛を専用のシェーバー (小動物用) で刈り取った。刈り取った体毛はブランク試料として分析に供した。全毛を刈り取ったラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを 40 mg/kg 腹腔内投与した。投与後 5, 10, 15 週間後に新たに生えてきた体毛を採取して分析に供した。

ラットの体毛は直接外部に接触しているため、体毛表面に付着している埃などの汚れが実験結果に影響する可能性がある。洗浄操作を行わないと測定物質が体毛の外部に付着しているものか内部に蓄積しているものか判断し難いので、適切な洗浄法により洗浄を行う必要がある。体毛の洗浄に使用される溶媒としては、TritonX-100, ヘキサン、アセトン、エタノール、SLS (ラウリル硫酸ナトリウム)、ジクロロメタンなどがあるが、本研究においては国際原子力機関 (IAEA) が提唱している方法により洗浄を行った。具体的な操作方法を Scheme 3 に示す。ラット体毛をアセトンで 1 回、次いで水で 3 回、アセトンで 1 回洗浄した。洗浄後は空气中で乾燥させて次の分解操作を行った。

Rat (Wistar, ♀, age: 3weeks, n=3)



Scheme 2 Collection of rat hair samples

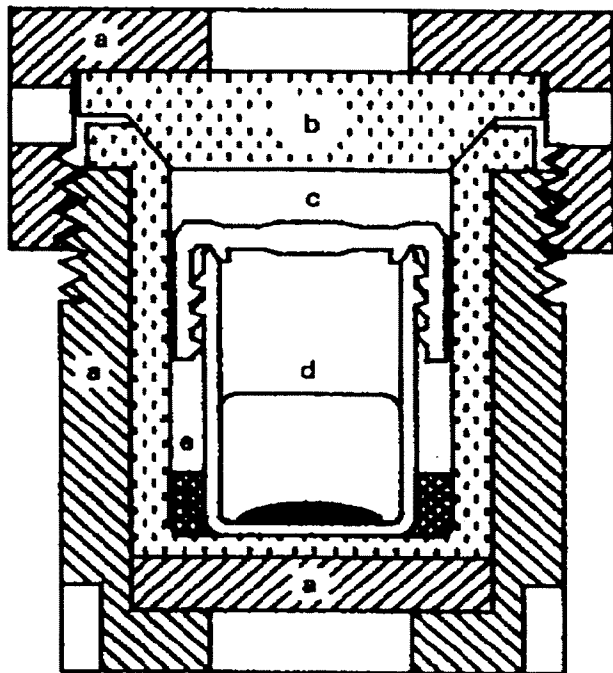


Scheme 3 Washing procedure for rat hair

体毛の分解方法を検討した結果、密閉系での湿式分解法（マイクロウェーブ湿式分解法）を適用することとした。使用した試料分解容器（三愛科学製、P-70）の構造を Fig. 1 に示す。内部容器（Fig. 1 中の d）と外部容器（Fig. 1 中の c）の 2 重構造になっており、内部容器に試料及び分解用試薬を入れ、電子レンジで加熱することにより試料を分解することができる。また、ラット体毛の分解に使用する酸は硝酸及び過酸化水素とし、試薬のグレードは原子吸光分析用とした。硝酸と過酸化水素は 2：1 の割合で加えるのが最適であるという報告が既にあったので、その構成比を引用した。

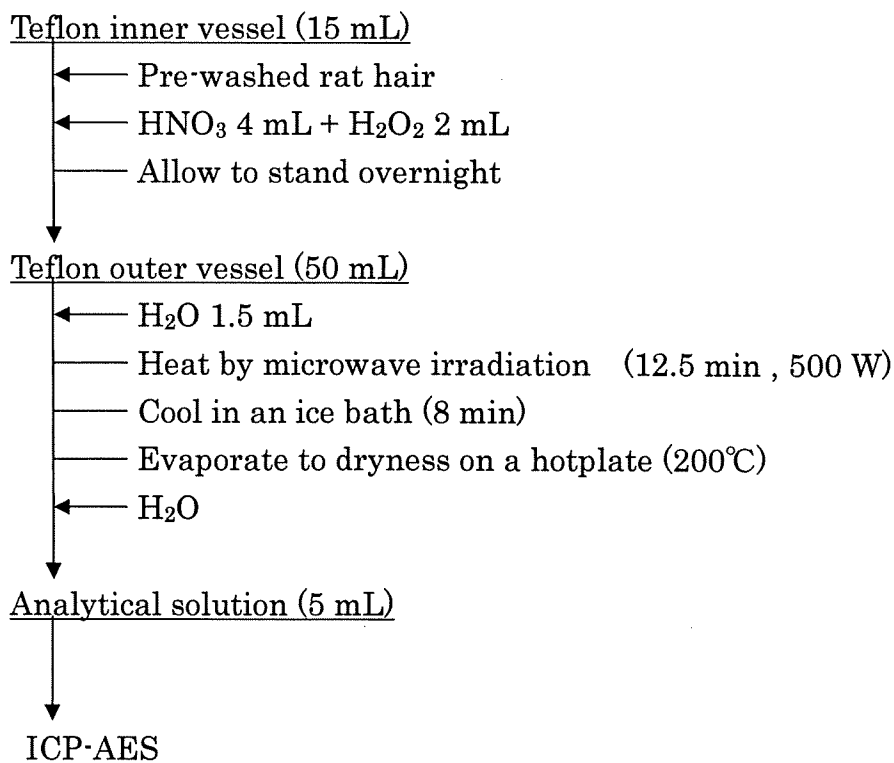
また、ラット体毛に硝酸及び過酸化水素を加えた直後に溶液化したところ、焦げのような茶褐色の沈殿物が生成してしまい、うまく分解できなかった。これは、試薬を加えてから一晩放置してから加熱することで解決できた。試薬を加えてから一晩放置することで試薬が体毛中に浸透し、分解反応が加速したものと考えられる。

詳細な操作方法を Scheme 4 に示す。内部容器にラット体毛 50 m、硝酸 4 mL、過酸化水素 2 mL を入れ、少量の水を入れた外部容器に入れ、専用のレンチで密閉した。外部容器を電子レンジ（東芝製、ER-VS1CK）で 12.5 分加熱してラット体毛を分解した。氷浴で冷却後、内部容器を取り出して開栓し、ホットプレート上で加熱して酸を蒸発乾固させた。残留物を水で希釈し分析試料とし ICP-AES で測定した。



- a : Polypropylene jacket
- b : Polycarbonate stopper
- c : Teflon outer vessel
(50 mL capacity)
- d : Teflon inner vessel
(15 mL capacity)
- e : Water

Fig. 1 Microwave digestion vessel



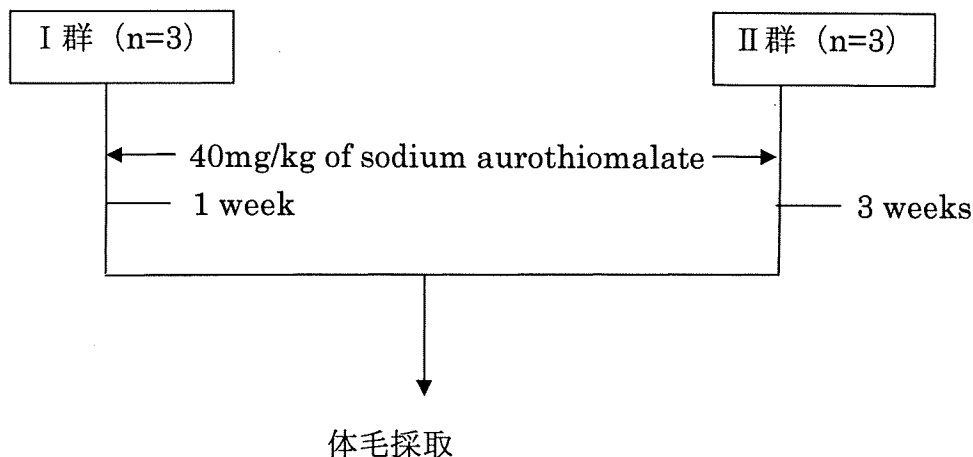
Scheme 4 Digestion procedure for rat hair using microwave irradiation

4) ラットへの金製剤投与方法、採毛方法及び前処理方法（投与後5週間まで）

前項では金チオリンゴ酸ナトリウムを投与してから5, 10, 15週間後の体毛の分析を行い、投与してから5週間後の体毛中のAuの濃度が最大となった。しかし、採毛間隔が5週間と長かったため、前節の結果だけで「投与後5週間で投与した金チオリンゴ酸ナトリウムが最も体毛中に移行する」とは言い切れない。そこで、次に投与してから1, 3週間後の体毛の分析を行った。

実験に使用したラットはWistar系（♀、3週齢）とし、飼育中は薬学部動物舎（室温23±2℃、湿度55±5%）で飼育し、小動物用固形飼料（日本農産工業株式会社製 Labo MR stock）及び飲料水を自由摂取させた。

採毛方法をScheme 5に示す。ラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを40 mg/kg 腹腔内投与した。投与後1, 3週間後の体毛を専用のシェーバーで刈り取り、採取した体毛を分析に供した。なお、本実験では投与後1, 3週間後の分析という前節と比較して採毛間隔が短い。よって、投与後1, 3週間の分析を全て同一のラットで行ってしまうと投与間隔である2週間では体毛が完全に生えてこず、分析不能になってしまう危険性が考えられた。よって、投与後1, 3週間の分析はそれぞれ別のラットを用いた（Scheme中ではI群、II群と表記している）。さらに、投与した金製剤が体毛のどの部位に蓄積しているかを調べるために、腹部と背部に分けて体毛を採取して分析に供した。



Scheme 5 Overview of experimental plan (1)

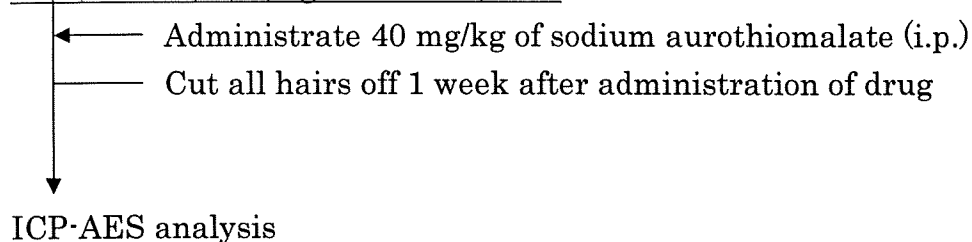
5) ラットへの金製剤投与方法及び採毛方法（投与部位による比較）

実験に使用したラットはWistar系（♀、3週齢）とし、飼育中は薬学部動物舎（室温23

±2°C、湿度 55±5%) で飼育し、小動物用固形飼料 (日本農産工業株式会社製 Labo MR stock) 及び飲料水を自由摂取させた。

採毛方法を Scheme 6 に示す。ラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを 40 mg/kg 投与した。前項までは投与部位が腹腔内投与であったが、本項では投与部位を皮下投与とし、投与部位の違いにより体毛蓄積度にどのような差が出るのかを調査した。投与後 1 週間後の体毛を腹部と背部に分けて専用のシェーバーで刈り取り、採取した体毛を分析に供した。投与後 1 週間で体毛を採取する必要があったため、投与前に体毛を刈り取り、ブランク試料として用いることはしていない。

Rat (Wistar, ♀, age: 3weeks, n=3)



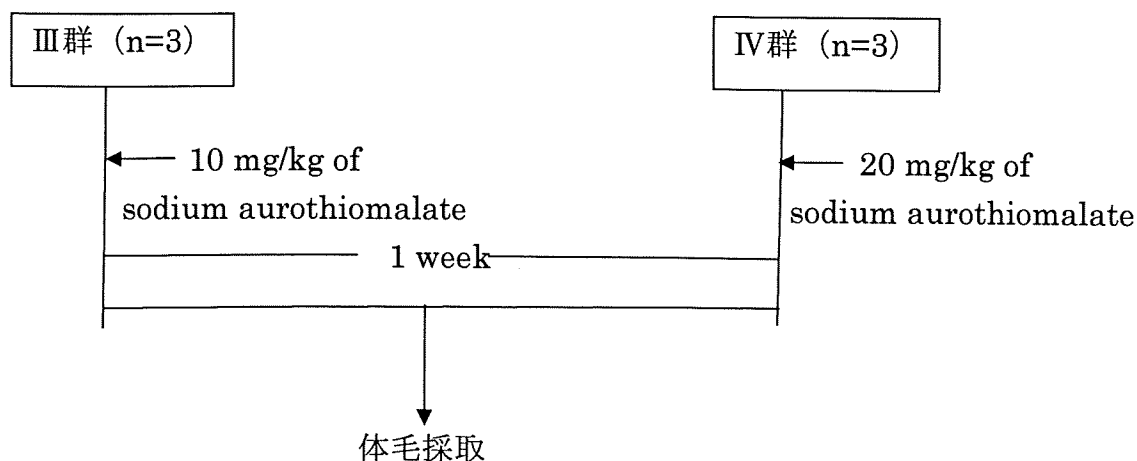
Scheme 6 Overview of experimental plan (2)

6) ラットへの金製剤の連続投与

金チオリンゴ酸ナトリウムを人間に投与する場合のことを考えると、投与は 1 回ではなく複数回に及ぶ。よって、本研究でもその場合のことを想定して複数回の金チオリンゴ酸ナトリウムの投与により体毛蓄積度にどのような差がでてくるのかを検討しておく必要がある。よって、本項では金チオリンゴ酸ナトリウムを 6 日間連続投与することにより、単回投与時の体毛中の Au の濃度と比較して蓄積が見られるかを検証した。

実験に使用したラットは Wistar 系 (♀、3 週齢) とし、飼育中は薬学部動物舎 (室温 23 ±2°C、湿度 55±5%) で飼育し、小動物用固形飼料 (日本農産工業株式会社製 Labo MR stock) 及び飲料水を自由摂取させた。

採毛方法を Scheme 7 に示す。3 週齢のラットに金チオリンゴ酸ナトリウムを 10 mg/kg の投与量で 6 日間連続で腹腔内投与した。前項までは一回のみの投与であったが、連続投与により体毛蓄積度にどのような違いがでるのかを考察した。投与完了から 1 週間後の体毛を専用のシェーバーで刈り取り、採取した体毛を分析に供した。



Scheme 7 Overview of experimental plan (3)

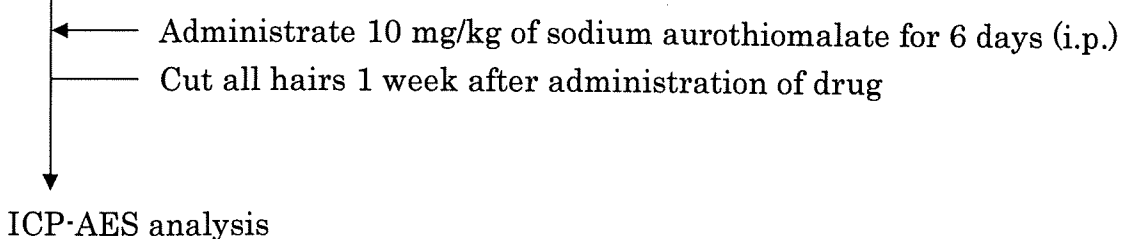
7) ラットへの金製剤投与量と体毛濃度の関係

薬物投与ラットの体毛中の金属濃度から医薬品の摂取状況の把握を可能にするためには投与量と体毛中金属濃度との間に相関関係が成立することが必要不可欠である。そこで、金チオリンゴ酸ナトリウムの投与量を 10, 20, 40 mg/kg と変化させて各々のラット体毛中の Au の濃度を測定し、投与量と体毛中の Au の濃度との間に相関関係が成立するかを検討した。

実験に使用したラットは Wistar 系 (♀、3 週齢) とし、飼育中は薬学部動物舎 (室温 23 ± 2°C、湿度 55 ± 5%) で飼育し、小動物用固形飼料 (日本農産工業株式会社製 Labo MR stock) 及び飲料水を自由摂取させた。

採毛方法を Scheme 8 に示す。3 週齢のラット (Wistar 系、♀) に金チオリンゴ酸ナトリウムを腹腔内投与した。投与量は前項までは 40 mg/kg としていたが、本項では 10 mg/kg, 20 mg/kg の 2 通りとし、投与量により体毛蓄積度にどのような違いがでるのかを検討した。Scheme 中では 10 mg/kg 投与群を III 群、20 mg/kg 投与群を IV 群と表記した。投与してから 1 週間後の体毛を専用のシェーバーで刈り取り、採取した体毛を分析に供した。

Rat (Wistar, ♀, age: 3 weeks, n=3)



Scheme 8 Overview of experimental plan (4)

C. 研究結果

1) 薬学動物舎で使用している飼料の分析

1. 定性分析

溶液化した試料溶液をまず定性分析に供した。その結果、Au は検出されず、B, Na, Mg, Al, Si, P, K, Ca, Ti, V, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Ba, La の 17 元素が検出された。

2. 定量分析

定性分析で検出された 17 元素に関して定量分析を行った。その結果を Table 1 に示す。検量線作成用標準溶液は多元素分析用として多元素混合溶液とした。この多元素混合標準溶液は元素間の分光干渉及び化学的安定性を考慮して 3 つのグループに分けて調製した。グループ分けの詳細及び各々の元素の測定波長を Table 2 に示す。

Table 1 Metal contents in rat feed

Metal	Concentration (ppm)
P	118
Ca	90.3
Na	67.6
Mg	48.6
Ba	13.1
K	8.11
Fe	2.74
Si	2.09
Mn	1.87
Zn	1.12
Al	0.59
Sr	0.48
Cu	0.33
La	0.14
Ba	0.11
V	0.10
Ti	0.03

2) 飲料水の分析結果

1. 定性分析

飲料水を定性分析に供した結果、Au は検出されず、Na, Mg, B, Si, K, Ca, V, Sr, Ba, La の 9 元素が検出された。

2. 定量分析

定性分析で検出された 9 元素に関して定量分析を行った。その結果を Table 3 に示す。検量線作成用標準溶液は多元素分析用として多元素混合溶液とした。この多元素混合標準溶液は元素間の分光干渉及び化学的安定性を考慮して 3 つのグループに分けて調製した。グループ分けの詳細及び各々の元素の測定波長を Table 4 に示す。

以上述べたように、動物舎内で使用している飼料及び水からは Au は全く検出されなかつ

Table 2 Analytical wavelengths for metals (1)

Group	Metal	Wavelength (nm)
I	Na	589.000
I	Mg	280.268
I	K	766.491
I	Ca	317.932
II	Fe	259.937
II	Mn	257.610
II	Zn	202.547
II	Al	308.214
II	Cu	324.756
II	V	309.301
II	Ti	323.450
II	Ba	455.403
III	P	253.560
III	B	249.772
III	Sr	407.773
III	La	394.902
III	Si	251.611

た。したがって、動物舎でラットを飼育するに当たって飼料及び水を自由摂取させても

飼料及び水からは Au が体毛に移行することは考えらず、本研究に及ぼす影響は全くないものと考えられた。よって、動物舎内における飼育方法に関しては、飼料及び水を自由摂取させることとした。

Table 3 Metal contents in water

Metal	Concentration (ppm)
Ca	24.5
Si	11.4
Na	7.57
Mg	5.72
K	0.23
Sr	0.08
B	0.06
V	0.01
Ba	0.01

Table 4 Analytical wavelengths for metals (2)

Group	Metal	Wavelength (nm)
I	Na	588.996
I	Mg	279.552
I	Ca	317.932
I	K	766.487
II	V	309.302
II	Ba	455.401
III	Si	251.610
III	B	249.773
III	Sr	407.770

3) 金製剤投与後の体毛中 Au の時間変化

横軸に投与してからの週数、縦軸に体毛中の Au の濃度を示したグラフを Fig. 2 に示す。投与後 5 週間で体毛中の Au の濃度は最大となり、その後徐々に減少し、投与後 15 週間で体毛中の Au の濃度がほぼゼロになっていることがわかる。

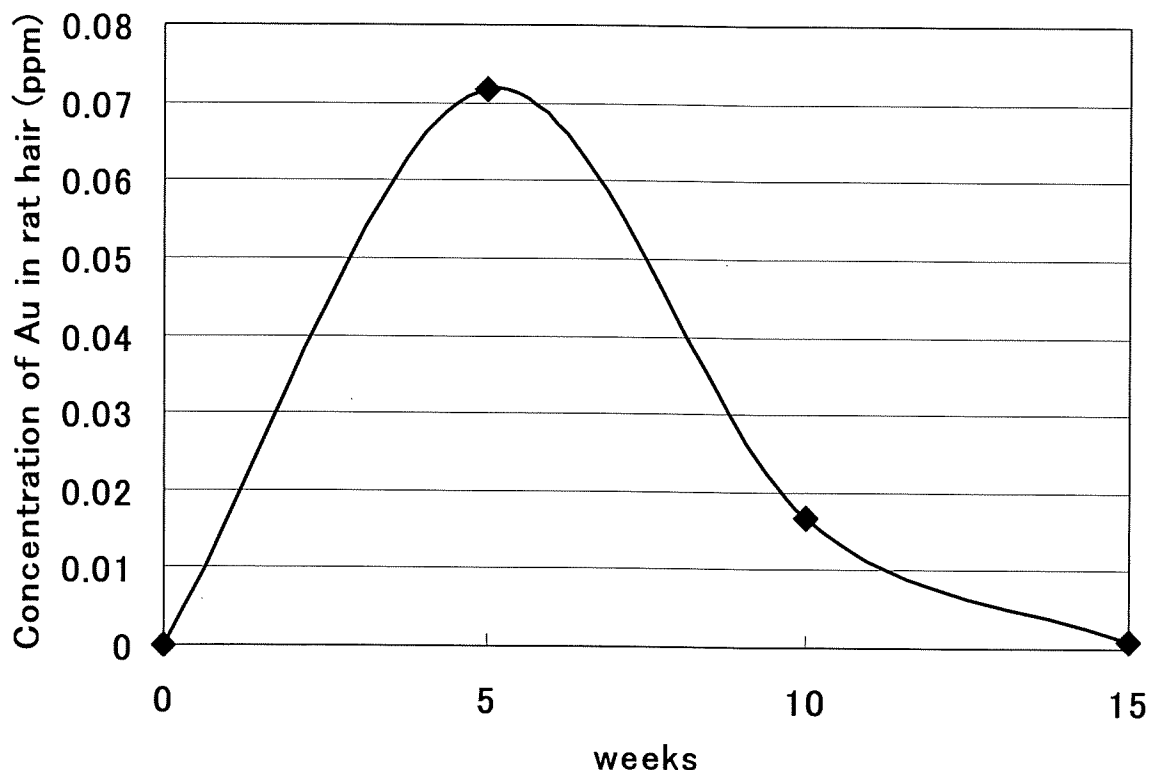


Fig. 2 Concentration of Au in rat hair after administration of sodium aurothiomalate (average of 3 rats)

4) 金製投与後 1 週間及び 3 週間後のラット体毛中 A 濃度

定量分析結果を Table 5 に示す。I 群及び II 群それぞれの体毛中の Au の濃度を上段に、腹部と背部の割合を下段 (斜字体) に示す。II 群の分析結果より投与してから 3 週間後の体毛中の Au の濃度が 0.02 ppm、5 週間後の体毛中の Au の濃度が 0.072 ppm (Fig.2) であるので、投与してから 3~5 週間間の体毛中の Au 濃度の増加が最も大きいことになり、投与後 3~5 週間で投与した金製剤が最も体毛中に移行したことになる。また、腹部と背部に分けて体毛を採取して分析した結果より、圧倒的に背部より腹部に Au の蓄積が見られることもわかった。