

求等に伴い、自分の健康に強い関心を持つ国民が増えるとともに、薬局や薬店の薬剤師等による適切なアドバイスの下で、身近にある一般用医薬品を利用するセルフメディケーションの考え方が広がりつつある。一般用医薬品のあり方等に関しては、これまでも様々な場で検討されてきた。しかしながら、以前に比べて高齢者の全人口に占める割合がさらに増加し、国民の健康ニーズも多様化している中で、今後、保健・医療資源としての一般用医薬品の有効活用を進めていくためには、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品を育成していく必要がある。このような背景から、厚生労働省では国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、平成14年6月から一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、11月にその中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を公表した。本中間報告では、時代に合わせた具体的な方策としての「漢方薬・生薬の活用、一般用漢方処方の見直し」（「漢方処方に関する提言」）が提言されている。

この中間報告を受け、平成15年度から6年間、厚生労働科学研究「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価(EBM 確保)手法及び安全性確保等に関する研究」及び「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」（主任研究者：合田幸広）において研究班が組織され、「一般用漢方処方を見直しを図るための調査研究」が行われた。この研究の成果を反映させる形で、平成20年9月30日に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として、「一般用漢方製剤承認基準の制定について」（薬食審査発第0930001号）（「新基準」）が発出され、昭和40年代末に公表された一般用漢方処方210処方の承認審査内規は、多くの見直しと共に、内規から通知へと格上げされた。この新基準では、漢方の「証」の概念に対応し、内服するすべての処方に「しぼり」として、効能・効果等の項に使用されるべき体質

傾向や症状が記載されたことが特徴のひとつとして挙げられている。

一方で、前述した研究班では、漢方処方の有用性評価の手法としての使用実態調査(AUR)の確立に取り組み、これまでに、加味逍遙散、葛根湯、猪苓湯について関東・関西両地区でそれぞれ調査を行ってきた。異なった年度、異なった場所で行ったAURは、全体として良い再現性を示し、AURが、一般用医薬品としての漢方処方（製剤）の有用性評価手法として、実行可能かつ有効な方法であるものとの結論を得た。

今回発出された新基準は、発出までに薬事・食品衛生審議会一般用医薬品部会での審議を得るが、同部会では、新基準における一般用処方の体力の「しぼり」と「防風通聖散」等の効能・効果として挙げられている肥満症について議論があり、さらに漢方処方と安全性の関係についても議論がなされた。しかし、一般用漢方製剤において漢方の証と使用される処方の安全性との関係について、具体的に調査された例はない。

そこで本研究では、部会での議論を背景として、既に一般用医薬品としての漢方処方（製剤）の有用性評価手法として、実行可能かつ有効な方法として確立したと考えられる使用実態調査研究（AUR）を用い、現在、一般用として販売が拡大している漢方処方である「防風通聖散」製剤について、「しぼり」（使用されるべき体質傾向や症状）と、効能効果（有用性）との関係を明らかにし、同時に使用者の体調変化についても調査する目的で、AURを実施した。

B. 研究方法

昨年度に作成した調査計画書、調査説明および同意書、エントリー確認票、調査記録票、調査協力者日誌、調査協力者記録票、啓蒙ポスターを用いて、5月～12月まで東京地区、大阪地区で同時に調査を行った。漢方処方を通常取り扱っている薬局と契約を結び、調査実施薬局と定めた。調査実施薬局において、実際に調査に

携わる薬剤師，すなわち調査薬剤師が，購入目的で来店した消費者に対して『一般用漢方処方防風通聖散の使用実態調査参加についての説明書および同意書』を用いて本調査研究に関する説明を行い，同意が得られた消費者を調査協力者とした。調査使用薬は『新ココアポ A 錠』（クラシエ薬品），『ツムラ防風散 BF 顆粒』（ツムラ），『ナイトール 85』（小林製薬），『和漢箋 ロート防風通聖散錠』（ロート製薬）の 4 種を使用した。また，調査実施薬局 1 店舗につき 1 製品を調査使用薬として扱った。1 店舗中で 2 社以上の製品を調査使用薬として扱うことは，混乱を避けるために行わなかった。調査使用薬を通常の販売形態にて販売をした上で，アンケート方式にて調査を実施した。

アンケートは，調査薬剤師が調査開始時および終了時に調査協力者にインタビューを行いながら記入する調査記録票，調査協力者が調査使用薬服用中および服用後に記入する調査協力者日誌で構成された。調査終了後，調査記録票および調査協力者日誌を事務局まで返送するものとした。

調査協力者に対しては，クラシエ薬品・小林製薬は 4000 円，ツムラ・ロート製薬は 5000 円分のクオカードにて調査協力に対する謝礼を支払った。

調査薬剤師に対しては，1 例の調査実施に対して 3000 円分のクオカードまたは図書カードを謝礼として支払った。

<倫理面への配慮>

本研究においては，研究対象者の不利益・危険性などを排除するため，インフォームド・コンセントや緊急時の対応等について十分に討議を行い，国立医薬品食品衛生研究所倫理審査委員会の審査を経て実施した。

C. 研究結果と考察

本調査に使用した 4 社の販路を利用して調査実施薬局を募った。全体で 35 薬局の参加協力を得た（表 1）。35 薬局のうち関東地区は 29

薬局，関西地区は 6 薬局であった。なお今回の調査に参加した薬局は，いわゆる「ドラッグストアのチェーン店」がほとんどであった。また，調査責任薬剤師も参加薬局数と同じ 35 名（表 1），関東地区 29 名，関西地区 6 名となった。

調査を行った結果，総エントリー数は 199 例となり，うち回収数（有効エントリー数）は 188 例（94.5%），脱落数（非有効エントリー数）は 11 例（5.5%）となった（表 1，2）。

<有効エントリーの解析>

有効エントリー 188 例について解析を行った。有効エントリーは，①終了，②副作用による中断，③治癒による中断・その他，の 3 パターンに分類された（表 2）。研究協力者は女性が 61%，男性が 39% となり，調査開始から 1 か月の間にスタートした人が 55 例と，一番多いことが分かった（図 1，2）。この結果は，過去に実施したパイロット調査と同様であった。

同意取得に要した時間は，5～10 分が 54% と半数以上を占め，5 分以内を含めると 95% となった（図 3）。調査協力者の年齢は，20 歳から最高 85 歳の女性まで幅広い協力が得られた。平均年齢は男女ともに 40 代だったが，50 代の協力者が多いことが分かった（図 4）。

防風通聖散の服用経験は，「なし」が 64% を占めていた（図 5）。防風通聖散を購入する際の主訴以外の病気は，「なし」と回答した人が 86% と大半を占めた（図 6）。「あり」と回答した 18 例の内訳を以下に示す。ぜんそく 4 例，不眠症 3 例，糖尿病 2 例，胃腸科 2 例，膀胱炎 2 例，不整脈，腰痛，痔，泌尿器疾患，胃潰瘍，ヘルニア，偏頭痛，うつ，骨粗鬆症，高血圧が各 1 例であった。この回答は，今後の詳細な解析の際に考慮すべき点だと考えられる。

研究協力者のプロフィールを分析した結果，健康食品/一般薬の服用がないと回答した人が 65% であった（図 7）。「はい」と回答した 64 例のうち，漢方便秘薬，センナ剤，防風通聖散以外の漢方薬，病院処方薬をはじめ，ビタミン剤等の併用が明らかとなった。これらの併用薬

を服用した際に、本調査薬の解析対象として認められるか否かを、今後調査協力医師と共に検討する必要がある。高血圧ぎみではないと回答した人が85%であった(図7)。体力の程度については、スコアを1から5までにふり、1は虚弱、5は体力がある、とした。防風通聖散は体力の程度が3以上の人が服用対象となり、エントリー確認票にて体力がないと自己回答した人は除かれる。したがって、スコア2と回答した人は調査の対象ではないはずだが、1例のみスコア2と回答した結果が確認された(図7)。身体の冷えがありますか?という質問に対して、「いいえ」と回答した人が65%であった(図7)。手足の冷えがあると回答した人のうち、87.5%は女性であった(data not shown)。

防風通聖散服用後の体調変化について、調査薬剤師が調査協力者にアンケートを取ったところ、「なし」と回答した人が88%となった(図8)。「あり」と回答した人が19例あり(図8)、内訳を表3に示した。「明らかな症状があり日常生活に支障がある」症状として、下痢、腹痛を回答した例が確認された。体調変化についての質問は、副作用を意識した質問であったが、体調が良くなったととらえた回答が1例認められた(表3)。「体調変化あり」と報告した調査薬剤師からのコメントを、表4にまとめた。1例は他会社の同効薬を服用していたことが判明し、図8の統計からは外した。

調査薬剤師による有用性評価を解析した結果、「きわめて有用」+「有用」が22%となった(図9)。これは過去に実施したパイロット調査(猪苓湯、葛根湯、加味逍遙散)を合わせた中で一番低い数字となった。これは部会でなされた論点の一つである、防風通聖散の効能・効果として挙げられる「肥満症」について、調査薬剤師、調査協力者共に肥満症に対して効果が薄いとの認識を反映したものと思われる。任意で得られた服用前後の体重・腹囲の測定結果の統計を解析し、認識をより具体化する必要がある。

188例の回収数(有効エントリー)のうち、服用中断が10例報告された(表1, 2)。10例の内訳を表5に示した。副作用による服用中断例の詳細を表6に挙げた。5例認められた中断例のうち、①, ③, ⑤の3例が本調査薬剤による因果関係がある副作用と考えられる。特に⑤は52才の女性で、服用日、夜に尿の色がレモン色に変化、使用を中止しても、2日目に腹痛、下痢、嘔吐、脂汗も出るほどの腹痛と下痢があり、かなり激しい症状であったが、その後、落ち着いたということで医者にかかっていたが、治癒による中断が2例認められたが、これは研究協力者の自己判断で中断した。その他の理由で中断した例の詳細を表7に示した。3例中2例は、一時中断し、服用を再開したことが分かった。1例は、服用後の効果が認められない、と研究協力者が自ら判断したための中断例であった。

解析を実行する中で、調査薬剤師からのコメントに「やせる薬として効果がない」「調査期間が短い」といった内容のものが多く目についた。このようなコメントと有用性評価の関係を調べてみる必要が感じられた。調査協力者日誌には、「効果が見られなかったので、もう少し服用を続けてみます」というコメントが多くみられた。引き続き調査協力者日誌の回答を解析していく。

また、事務局より調査薬局に対して発送する書類・謝品は、追跡調査のできるシステム(例えばレターパック、メール便、簡易書留等)を用いて行うことが望ましいと感じた。調査実施期間中に、「事務局から発送した郵便物が届いていません」との問い合わせが調査責任薬剤師よりあったときの対応に備えておく必要がある。特にドラッグストアの店舗によっては私書箱があり、土日に到着した郵便物が私書箱に入ったまま気づかれず、追跡の結果、書類の所在が判明した例もあった。

調査期間中に医師の受診が必要な有害事象等、重大なトラブルは生じなかった。

D. 結論

これまでのパイロット調査を経て、初めての本格的な一般用漢方処方の使用実態調査を行った。調査薬剤師による有用性評価を解析した結果、「きわめて有用」+「有用」が22%となった。これは過去に実施したパイロット調査（猪苓湯、葛根湯、加味逍遙散）を合わせた中で一番低い数字であった。また、本調査を行うことで、詳細かつ有用な副作用情報を得ることができた。188例中、本薬剤と因果関係があると考えられる副作用による服用中断は3例であった。今後、有効性、安全性の両面からより詳細な解析を行う予定である。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

特になし。

参加薬局	調査責任薬剤師	エントリー数	回収数 (有効エントリー)	脱落数 (非有効エントリー)
35	35	199	188	11

表 1. AUR実施結果

	有効エントリー (94.5%)			非有効エントリー (5.5%)			総計
	終了	副作用による中断	治癒による中断・ その他	音信不通による 書類回収不可	調査終了時 の書類紛失	年齢制限に よる対象外	
クラシエ	9	0	1	0	1	0	11
ロート	56	3	1	3	0	0	63
小林製薬	54	1	1	5	0	1	62
ツムラ	59	1	2	0	1	0	63
計	178	5	5	8	2	1	199

表 2. エントリー数の内訳

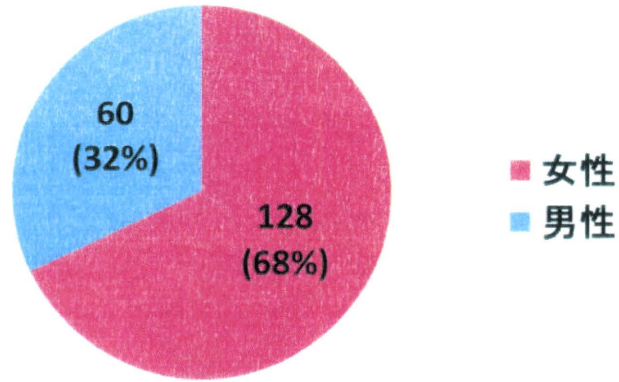


図 1. 調査協力者の男女比

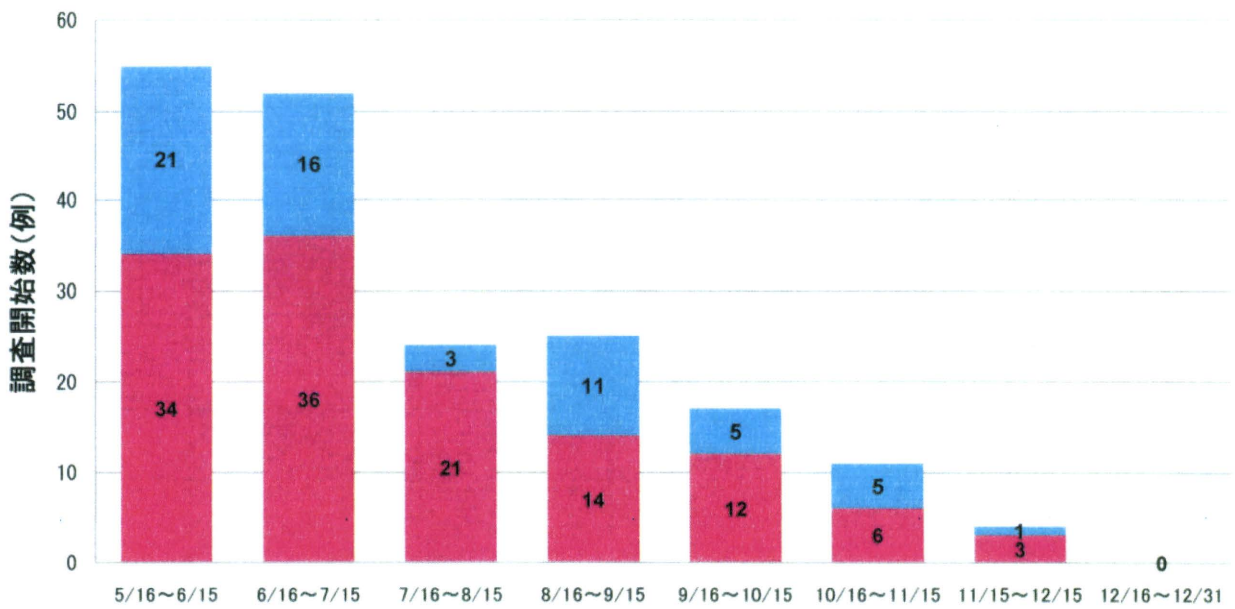


図 2. 調査開始日と開始数の推移

青：男性 赤：女性

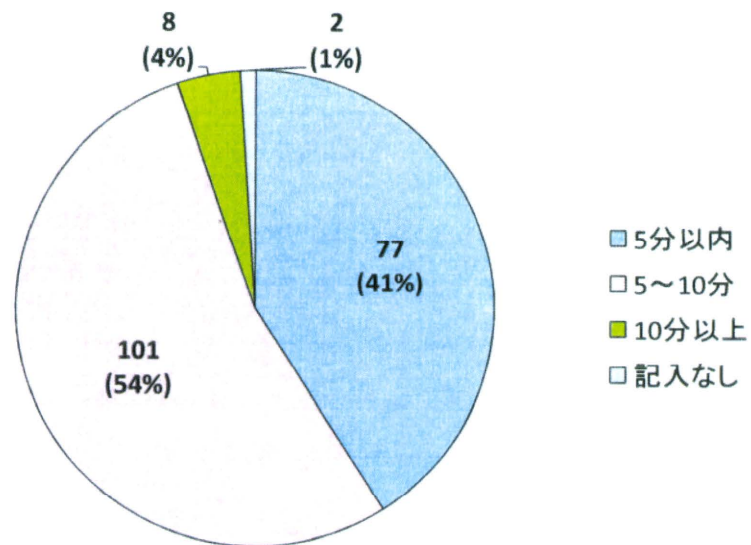


図3. 同意取得に要した時間

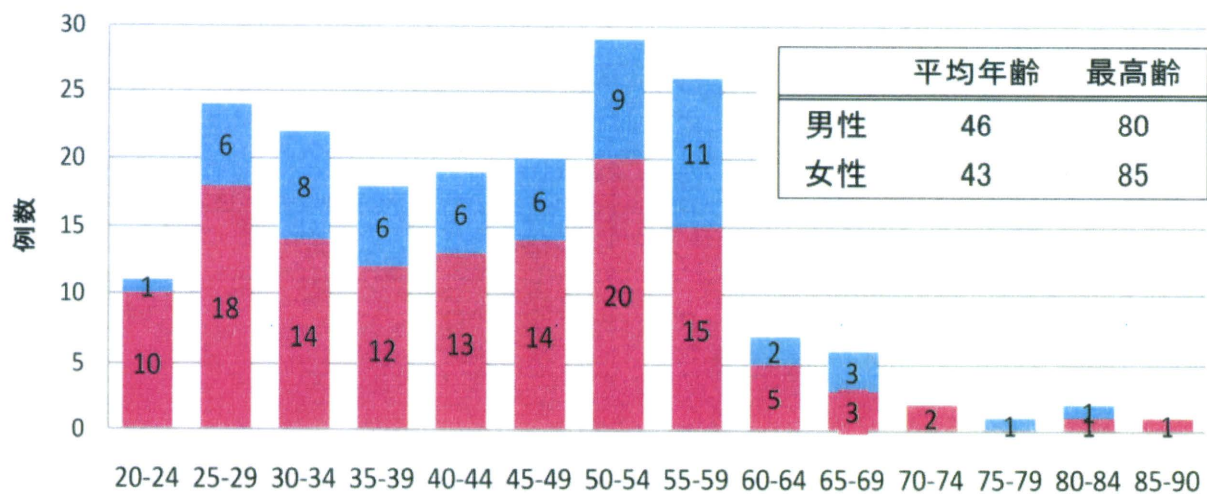


図4. 調査協力者の年齢

青：男性 赤：女性

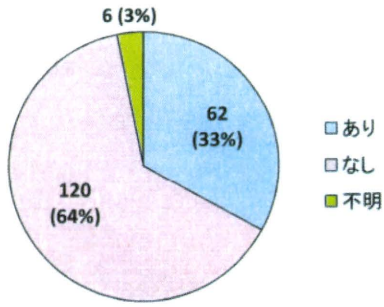


図5. 防風通聖散の服用経験

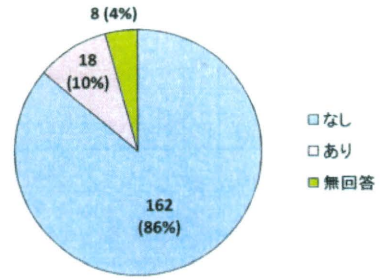


図6. その他（主訴以外）の病気

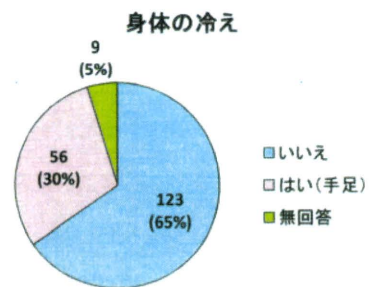
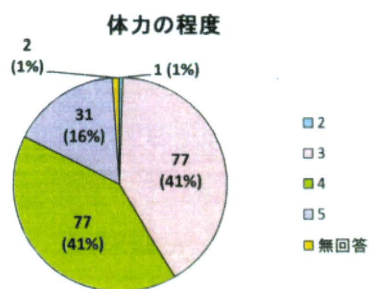
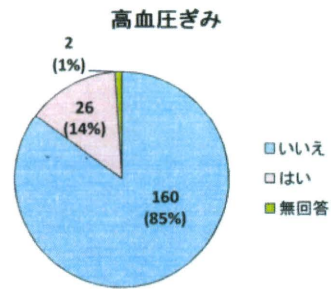
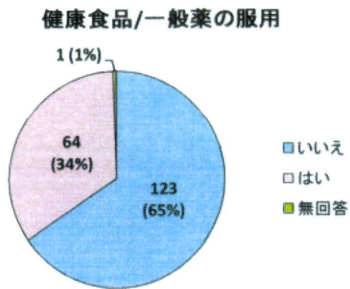


図7. 調査協力者のプロフィール

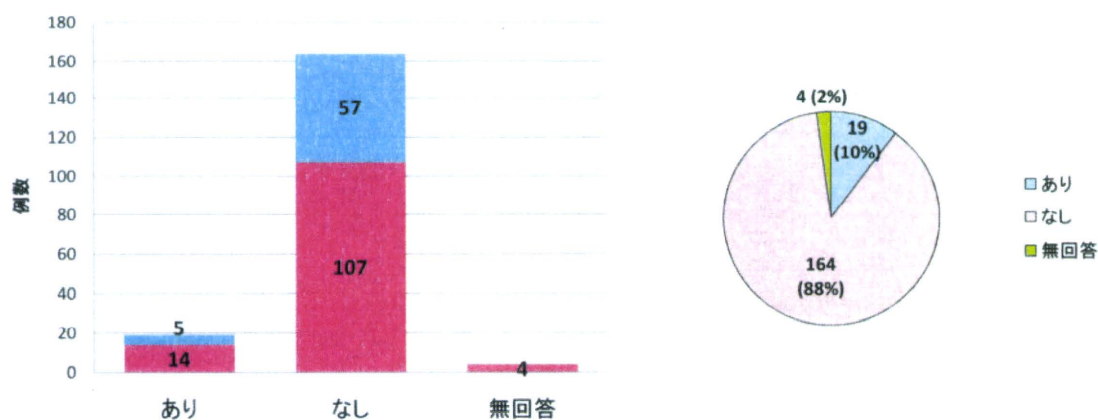


図 8. 服用後の体調変化

※他社の同効薬を服用していた人は解析から外した(1例)

青：男性 赤：女性

	4	3	2	1
下痢	4(3)	2	9	0
腹痛	3(2)	1	1	0
発疹・発赤	0	0	1	0
胃部不快感	0	0	4(1)	0
倦怠感	0	0	1	0
動悸・息切れ	0	0	2	0
手足のむくみ	0	0	2	0
その他	0	1(1)	2*(1)	0

- 4. 明らかな症状があり日常生活に支障がある
- 3. 軽い症状があり症状を意識する
- 2. わずかに症状があるが気にならない
- 1. 症状なし

※その他の1名は、良くなったという意味の体調変化でチェックをつけた。

回答人数 20名 複数回答あり

表 3. 「体調変化あり」と回答した人の内訳

カッコ内は服用を中断した人

- さほどひどくなかったとのこと
- 少し軟便気味だったそうですが、副作用ともいえない程度だったようです
- 不明
- 元々、下痢でも便秘気味でもない方で、本人の希望により調査を始めました。日誌を持参してみた時、症状が気になって
- 便秘の方が薬を服用されて便が下痢っぽくなったように感じるの仕方ないと思う
- 名前の違う他の会社の防風通聖散を服用したため倍量となってしまった。マスラック中止（他会社の同効薬）
- 排便回数が多いかもと感じたが服用前から同様との事
- 下痢以外は以前より症状あり。下痢についても問題なし

表 4. 「体調変化あり」と報告した調査薬剤師からのコメント

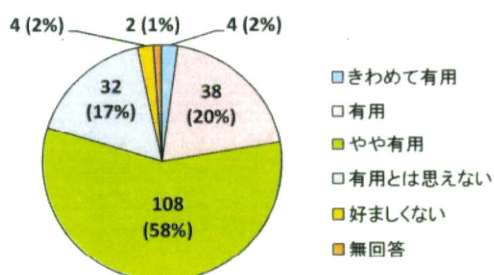
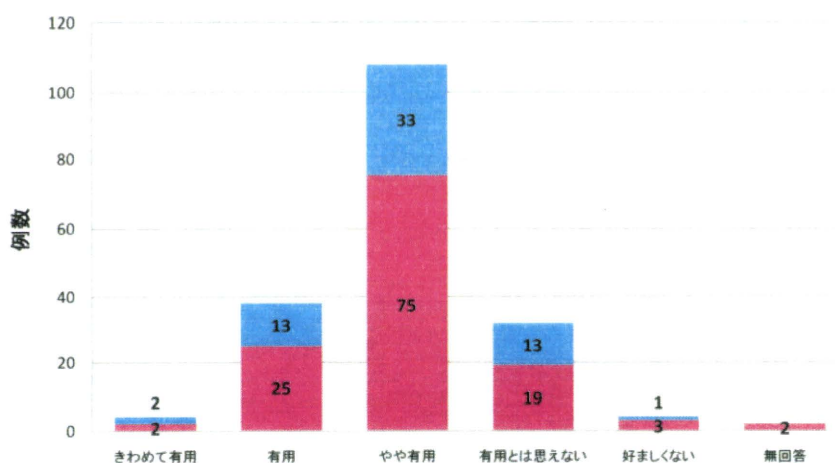


図 9. 調査薬剤師による有用性評価

青：男性 赤：女性

副作用による中断	治癒による中断	その他
5	2	3

表 5. 服用中断例の内訳

- ① 女性・25歳。4日目の服用で胃のむかつきを感じ、6日目の昼に嘔吐、7日目は下痢と嘔吐。7日目の服用で中止。中止理由3（副作用等を感じたため）。3日目まではレオピンも同時服用。
 ー日誌より抜粋ー
 風邪による吐き気かと思いましたが服用をやめて改善されたのでこれが原因かと思い中止しました。又、生理前だったので体調が万全ではなかったからだと思います。
 ー調査薬剤師のコメントー
 カゼ、生理前とも重なって体が敏感になっていたのかもしれない。
- ② 女性・50歳。3日で服用中止。3日目に生ガキを食べ、1日に10回の下痢。中止理由4（その他）。受診した。
 ー日誌より抜粋ー
 生ガキを食べた事かノロウィルスか分からないが 発熱、おう吐、下痢症状が数日間続いたため。
 ー調査薬剤師のコメントー
 ナシ（因果関係）
- ③ 女性・27歳。3日目で服用中止。中止理由3（副作用等を感じたため）。2日目で軟便・腹痛、3日目で下痢が悪化。
 ー調査薬剤師のコメントー
 因果関係あると思う（少々） 生理前の体調変化とかさなったため。下痢・腹痛は服用中止により改善。
- ④ 女性・55歳。9日目で服用中止。中止理由3（副作用等を感じたため）。
 ー調査薬剤師のコメントー
 便秘になり服用を中止にしたとのこと。
- ⑤ 女性・52歳。1日目で服用中止。中止理由3（副作用等を感じたため）。1日目の夜に尿の色がレモン色に変化。2日目（未服用）に腹痛、下痢、嘔吐。脂汗も出るほどの腹痛と下痢。1日に7回の下痢。
 ー日誌より抜粋ー
 トイレの回数が多すぎて、仕事ができなくなった為。
 ー調査薬剤師のコメントー
 ひどい下痢だったが医者にはいかないで少し落ち着いたとのこと（服用中止で）

表 6. 服用中断例の詳細

- 足のむくみがひどくなったので一時中断、おさまったので服用再開し 15 日目まで服用
- お腹が張る。一時服用を中止し、様子を見ながら再開する。3 日目夜～10 日目夜まで中止。その後も 15 日目まで飛び飛びで服用。
- 効果がない、と研究協力者自らが判断し、服用中止

表 7. その他の詳細

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題

生薬及び漢方処方薬の安全性と有効性に関する研究

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長
研究協力者 細江潤子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

定量 NMR (qNMR) による日本薬局方試薬の定量規格化の検討

定量 NMR (qNMR) を利用して、日本薬局方で使用する生薬成分含量測定用試薬を定量規格化するための検討を行っている。本年度は、日本薬局方において生薬等の成分含量測定用に用いられる化合物（マグノロール、ゲニポシド）を用い、これまでに確立した qNMR 法を用いて、同一の試料を使用し、5 機関の測定者間で独立に定量実験を行い、同法についてバリデーションを行った。その結果、分子量 300 で 10mg 程度の定量試料を調製すれば、機器間誤差を含めても得られた定量値のばらつきが 0.2 程度、さらに、機器間誤差を無視できる場合には、機器内の測定ばらつき 0.08、調液によるばらつき 0.07 程度となり、有効数字 2 桁を保証しながら十分に値付けが可能となることが明らかになった。さらに、市販されている試薬について、順次 qNMR を測定し、SI トレサブルな値付けを実施した。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生
化学部室長

末松孝子 日本電子株式会社NM事業ユニット
NMアプリケーショングループ

山田裕子 和光純薬工業株式会社試薬事業部試
薬開発本部試薬研究所主席研究員

早川昌子 和光純薬工業株式会社試薬事業部試
薬開発本部試薬開発部係長

勝原孝雄 株式会社ツムラ生産本部技術・品質セ
ンター 製剤・品質部品質設計 1 グループ主幹
西村浩昭 株式会社ツムラ生産本部技術・品質部
品質設計 1 グループグループ長

A. 目的

日本薬局方では、生薬及び漢方処方エキスについて、医薬品としての安全性と有効性を担保するため定量法（成分含量測定法）が設定されている。生薬、漢方処方エキスの場合、定量指標成分は、天然物であるため、公的な標準品（日本薬局方標準品）の設定には以下のような問題がある。化学合成医薬品と異なり、医薬品（生薬、漢方処方エキス）中、数%以下～0.1%程度の含量の化合物が指標とされている。多くの場合このような化合物の簡易合成は困難で、純度の高い化合物を得るためには、天然物より単離することになる。この場合、多大な労力が必要で、指標成分を準備する経済的コストが多たと

なる。また、原料の差、抽出、単離工程の差により、不純物の構成が異なることになり、ロット間変動が合成品と比較して大きく、公的な標準品として純度コントロールが難しい、また天然物の場合、最大の不純物は、水である場合が多いが、定量用途を目的として、厳密に水分含量を測定しようとする、カールフィッシャー法を利用することになり、水分含量規定のために貴重な指標成分を多量に消費することになる。このような隘路があるため、局方の生薬、漢方処方エキスの各条規格では、多くの場合、便宜上その時点で市販されている試薬、あるいは市販可能な試薬について規格を局方の試薬・試液の項で定め、その物質を分析用標品として、定量法（成分含量測定法）と定量規格を規定している。ところが、このような試薬を分析用標品とした場合、クロマトグラム上の純度等は規定可能であるが、成分を大量に消費する関係でカールフィッシャー法による水分含量測定を規定することはなされていない。また、事前検討に一定量の指標成分を準備する必要があるため、コスト面の難点から、乾燥減量も規定されていない。さらに、局方においてクロマトグラムで規定される純度は、国際単位系（SI）へのトレーサビリティを確保した絶対分析法ではないため、その値は、計量学（Metrology）的に値付けが行われているとはいえ、分析値の信頼性を損なう可能性を完全には否定できない。従って、法的な拘束力のある公的規格で、標準品としての公的な保証を行っていないこのような試薬に頼り、生薬及び漢方処方エキスについて規格値を設定することは、厳密には問題があるものと考えられる。

近年、このような天然物の定量問題を解決する手法として、国際単位系（SI）へのトレーサビリティを確保した絶対分析法として、定量

NMR（quantitative NMR: qNMR）が、国立衛研の杉本らを中心として実用化されつつある¹⁾²⁾。qNMRは、¹H-NMRスペクトル上に観察される化合物のシグナル面積比が分子中の個々の置換基上のプロトン数に比例することを利用している。2つの化合物が同時に存在する場合、シグナル面積比は2つの化合物のモル濃度に比例することから、一方の化合物の純度と濃度が明らかであれば、もう一方の化合物の純度あるいは含量を観察されるシグナル面積比と調製値の関係から求める事が出来る。従って、qNMRは、測定対象と同一化合物の定量用標準品を必要とせず、別の標準物質を基準として定量分析が可能な絶対定量法であり、SIにトレーサブルな一次標準測定法のうち、一次標準比率法、すなわち「物質量の基準となる別の化学物質を用い、それとの比較において目的の化学物質の物質量を測れる方法」の資格を原理的に有する分析法である。従って、本法を用いた場合、上位の標準物質「ものさし」を用いて、NMRで測定可能な、あらゆる化合物の絶対量が計量学的に正確に求めることが可能となる。

本研究では、前述した天然物の定量問題を解決するため、日本薬局方においてqNMR法を利用することを前提とし、これまでに天然物由来の試薬をどのように定量規格化していくか検討を行っている。今年度は、日本薬局方において生薬等の成分含量測定用に用いられる化合物を利用し、これまでに確立したqNMR法を用いて、同一の試料を使用し、複数機関の測定者（国立衛研生薬部、国立衛研生活衛生化学部、日本電子、和光純薬、ツムラ）間で独立に定量実験を行い、同法についてバリデーション実験を行った。さらに、市販されている試薬について、順次qNMRを測定し、SIトレーサブルな値付けを実施したので報告する。

B. 研究方法

B.1. バリデーション実験

平成 22 年 10 月下旬より 11 月下旬までの期間中、機器間誤差を確認するため同一参加者による同一機器による測定実験を除き、バリデーション実験の参加者 5 名 (O, U, E, A, S) が、全ての操作について独立して実験を行った。

NMR 測定溶媒として ISOTEC 製及び和光純薬製、重水素化率 99.9%以上の重クロロホルム (マグノロール用) 及び重水素化率 99.9%以上の重メタノール (ゲニポシド用) を用いた。1,4-BTMSB- d_4 (Mw=226.50) は、和光純薬製を、マグノロール (Mw=266.34) 及びゲニポシド (Mw=388.37) は、株式会社ツムラで分析用標品として単離精製されたものを使用した。

天秤は、最小表示量が 0.0001mg のウルトラマイクロ天秤 (Mettler Toledo XP2U あるいは UMX2) を使用した。各天秤について、25mg 程度の風袋を使用し USP 基準に則り各測定者について最小計量値を計算した結果、最大値は 0.6782 mg であることを確認した。

試料液の調製は以下のように実施した。1. 可能な限り精密に測定物質を 5.0000 mg \pm 10%の範囲で秤量する (風袋と風袋込みの試料を別計量)。2. 試料を風袋ごと希釈用容器に入れて密栓する。3. 別に、内標準物質を 1 mg 以上 1.1 mg 以下になるように精密に秤量し、スクリュー式の希釈容器に加えて密栓する。4. 次に NMR 測定溶媒を 1.0 mL 量り希釈容器に加えて密栓し、試料と内標準物質を溶解させる (試料濃度: マグノロール約 19 mM, ゲニポシド約 13 mM)。次いで測定物質について 1.-4. までの操作を 2 回繰り返し、1 測定物質あたり 3 本の試料液を用意する。これらの試料溶液について振とう器あるいはソニケーターを用いて良く攪拌し、不

溶物がないことを確認する。全ての段階で試料容器の持ち運びには汚れのないピンセットを使用し、使用した風袋の重量は 25-30 mg 程度である。

次いで、試料溶液をピペットで採り試料液高 40 mm となるように NMR 試料管に移し、キャップを閉めテフロンシールで密栓し、直ちに NMR の測定を行った。なお、NMR 試料管は Wilmad 528-pp を使用した。

NMR は日本電子製 ECA800, ECA600, ECA500, ECS400 (2 台) を使用した。このうち、ECA600 及び、両 ECS400 にはオートサンプラー (AS) が設置されており、AS が設置されている場合には、AS を使用した。観測核 1H , 測定周波数は機器に対応して 400-800MHz, 観測スペクトル幅は 20ppm, デジタルフィルタを使用し、スペクトル中心は 5ppm の位置に設定, パルス幅 90 度, 取り込み時間 4 秒, 取り込み点数 (Resolution) 0.25Hz, 遅延時間 60 秒, オート FG シムによるシム調整, 測定温度は室温とし, MPF8 による ^{13}C デカップル実施, 積算回数 8 回, ダミーキャン 2 回とし, 各試料について, 非連続に 3 回測定を行った。NMR データの処理には, 日本電子製 Alice 2 for qNMR を使用, 内部標準物質ピーク (1,4-BTMSB- d_4) のトリメチルシリルピークを 0ppm とし, マニュアル法で位相補正, オートベースライン補正を行い, 測定者の判断に基づき, マニュアル法で各ピークの積分範囲を決定した。また, 本報告では積分値は, 全て絶対純度換算 (%) により表示した。

B.2. 市販試薬の値付け

測定溶媒として ISOTEC 社製の重溶媒のみを使用した。また, 値付けを行った化合物は, 全て日本薬局方生薬試験用標準品と表記のある和光純薬製の試薬である。機器としては, オートサンプラー付き ECA600 を使用し, その他は,

B. 1. と同様の手法で行った。

C. 結果と考察

測定対象物としては、同一ロットのものを一定量（数 100 mg）用意できる生薬成分として、マグノロールとゲニポシドを選択した。測定対象シグナルとしては、昨年度検討した考え方³⁾に従い、マグノロールの場合には、6.81ppm(b)と6.70ppm(c)のダブルットシグナル（1,2,4置換ベンゼンの6位,3位）、ゲニポシドの場合には、7.26ppm(a)のシングレットシグナル（シクロペンタ(c)ピラン環の3位）、4.92ppm(c)のダブルットシグナル（シクロペンタ(c)ピラン環の1位）4.06ppm(e1)及び3.93ppm(e2)の各ダブルットシグナル（ヒドロキシメチル基のジェミナルプロトン）を選択した。得られた積分値について、マグノロールの場合には、シグナルbとcの値の平均値を、ゲニポシドの場合には、シグナルa,c,e1,e2の値の平均値を算出した。

C. 1. 積分選択シグナルの検証

C. 1. 1. マグノロール

参加者が測定した全ての1,4-BTMSB-d₄及びb,cシグナルについて形状を確認したところ、異常は観測されなかった。さらに5名の参加者のシグナルbに関する各積分値(n=3x3=9)の平均は、それぞれ98.66, 99.05, 98.80, 98.95, 98.74でこれらの平均±標準偏差(SD)は98.84±0.16であった(Table 1)。一方シグナルcに関する積分値の平均は、それぞれ98.79, 99.30, 99.06, 99.18, 98.70でこれらの平均±SDは99.01±0.26であった(Table 1)。このようにシグナルc及びbの積分値は、どちらも非常に近い値を示し(Fig. 1)、それぞれの積分範囲に不純物等が入っている可能性は非常に低く、マグノロールの絶対純度は、両ピーク

の平均値で示すことで問題ないものと考えられた。

C. 1. 2. ゲニポシド

参加者が測定した全ての1,4-BTMSB-d₄及びa,c,e1,e2シグナルについて形状を確認した。その結果、参加者Sのシグナルaのデータにおいて、チャートの対称性と分解能がやや悪いため、微少な不純物ピークも含めて積分していることが判明した。そこで、参加者Sのデータでは、aの積分値を使用しないこととした。Sを除く参加者のシグナルaに関する積分値の平均は、それぞれ95.74, 95.82, 96.27, 96.46であり、これらの平均±SDは、96.07±0.35であった(Table 2, Fig. 2)。

シグナルcに関する個々の参加者の各積分値の平均は、それぞれ95.92, 96.37, 95.59, 96.38, 96.21であり、これらの平均±SDは、96.09±0.34であった(Table 2)。同様にシグナルe1に関する個々の参加者の各積分値の平均は、それぞれ95.75, 96.15, 95.59, 96.20, 96.77であり、これらの平均±SDは、96.09±0.46であった(Table 2)。また、シグナルe2に関する個々の参加者の各積分値の平均は、それぞれ95.81, 96.33, 96.32, 96.72, 96.98であり、これらの平均±SDは、96.43±0.45であった(表2)。以上シグナルa,c,e1,e2の積分値は、それぞれ非常に近い値を示し(Fig. 2)、それぞれの積分範囲に不純物等が入っている可能性は非常に低く(参加者Sのaのデータを除く)、ゲニポシドの絶対純度は、参加者Sのデータを除きこれら4ピークの平均値(参加者Sの場合にはaを除く3ピーク)で示すことで問題ないものと考えられた。

C. 2. NMRの機器内誤差の検討

C. 2. 1. 個別積分によって得られた結果に基づく検討

今回の報告では、個々の参加者が、それぞれ独立した別の NMR を使用して測定を行っている。個々の機器内誤差を検討するため、同一サンプルについて個々の測定者が非連続に 3 回ずつ測定し、マグノロールの定量対象ピークについて積分した結果を Table 3-1 に、ゲニポシドの定量対象ピークについて積分した結果を Table 4-1 示す。

参加者 O において、マグノロールの試料 1 の個々の測定におけるシグナル b, c の積分値の平均は、それぞれ、98.75, 98.82, 98.57 であり、これらの平均±SD は、98.71±0.13 であった。同様に試料 2 の平均±SD は 98.70±0.10, 試料 3 の平均±SD は、98.77±0.06 であった。それぞれの参加者の各試料毎の平均の標準偏差は、参加者 O で 0.06~0.13, 参加者 U で 0.09~0.20, 参加者 E で 0.05~0.08, 参加者 A で 0.04~0.16, 参加者 S で 0.24~0.49 であった。

ゲニポシドを測定試料とした場合でもマグノロールと同様の傾向が得られた。即ち、それぞれの参加者の各試料毎の平均の標準偏差は、参加者 O で 0.05~0.28, 参加者 U で 0.09~0.57, 参加者 E で 0.07~0.19, 参加者 A で 0.09~0.19, 参加者 S で 0.44~0.49 であった。

両化合物を使用した同一試料の繰り返し測定において、ばらつきの大きさは、機器の測定磁場の大きさとは関係しなかった。これは、両化合物の純度が高く、十分に分離したシグナルを積分対象として選択し、積分範囲に不純物が入っていないか、不純物の可能性があったシグナルを事前に積分値計算から除いたことに由来するものと考えられる。さらに、ばらつきが小さい結果を示した参加者 O, E, A は AS を使用していることが判明した、従って、AS の使用により、機器内誤差は小さくなるものと考えられた。また、参加者 S のばらつきは、同じく AS

を使用しない参加者 U の結果と比較しても、明らかに大きいものと考えられた。そこで、その原因を突き止めるため、全ての NMR チャートを確認したところ、NMR のシムの調整が適切ではない可能性が示唆された。そこで改めて使用した NMR を再点検したところ、測定条件として設定したオート FG シムだけでは調整できない Z3 軸, Z4 軸のシムのずれが明らかになった。

C.2.2. 積分範囲を固定した手法（固定積分）での検討

上記の積分値の算出には、個々の測定者がその度に、最適と判断した積分範囲を（マニュアルで）決定する（個別積分）という行為が含まれており、この部分の影響で個々の NMR の機器内誤差以外の誤差が生じる可能性が考えられた。そこで、各シグナルにつき、固定した積分範囲を設定し、その条件で積分値を再計算し、各試料毎に平均±SD を算出した。本結果を Table 3-2（マグノロール）、Table 4-2（ゲニポシド）に示す。なお、参加者 S の結果については、前述した原因で測定結果の信頼性がやや低いものと考えられたため、本表からは除外した。

固定積分におけるそれぞれの参加者の各試料毎の平均の標準偏差は、マグノロールにおいて参加者 O で 0.06~0.13, 参加者 U で 0.08~0.16, 参加者 E で 0.05~0.06, 参加者 A で 0.02~0.12, ゲニポシドにおいて、参加者 O で 0.05~0.28, 参加者 U で 0.11~0.49, 参加者 E で 0.05~0.20, 参加者 A で 0.03~0.19 であった。さらに、これら各試料毎の全 SD の平均は、マグノロールで 0.08, ゲニポシドで 0.17 となった。

C.2.3. 誤差と S/N に関する考察

今回のマグノロールに関する qNMR の測定チャートにおいて、最もピーク高さが高いシグナルは 18 個分の H に由来する 1,4-BTMSB-d₄ の基

準ピークである。今回の NMR では、天秤の最小計量値を考慮して、1,4-BTMSB- d_4 の秤量値を 1 mg 以上 1.1 mg 以下とする一方、基本的に高価な天然物の定量を考慮して、定量対象物の秤量値を 5 mg \pm 10%とした。その結果、シグナルの多重度、モル比も考慮した場合、1,4-BTMSB- d_4 の基準ピークの高さを 1 とするとマグノロールの測定シグナルのピーク高さは 1/4 程度、ゲンポシドの測定シグナルのピーク高さは 1/12 程度となる。よって、S/N 比を考慮すれば、ピーク高さが 3 倍あるマグノロールのシグナルの方がゲンポシドのシグナルよりノイズの影響が少なくなり、 $1/\sqrt{3}\approx 1/2$ 倍程度測定のばらつき (SD) が減少すると説明することが可能となる。当然ではあるが、試料をより高濃度で測定すれば、SD は減少することになる。

今回の測定では、最もピークが低いゲンポシドの e2 シグナルに対して、ノイズの RMS に対する S/N 比は、120 から 257 に分布している。もし、機械的な精度が上がり、この S/N 比が 1000 程度になれば、今回のゲンポシド程度のモル濃度 (13 mM) であっても、機器内誤差は SD で 0.1 以下になるものと考えられる。この場合、qNMR の純度の決定に機器内誤差がほとんど影響しなくなるものと推定される。

C. 3. 参加者の調液誤差の検討

Table 3-1, 3-2, 4-1, 4-2 の Participant average の値は、各参加者について、各 3 試料毎の測定平均値 (each sample average) の平均値を示す。従って、ここで示される SD は、試料毎の各参加者の調液のばらつきを示すことになる。マグノロールに関しマニュアル法による個別積分を使用した場合の参加者 O, U, E, A に関するこの値は、0.04, 0.10, 0.05, 0.12 となり、SD の平均は 0.077 となる。一方、固定積分を行った場合には、0.04, 0.11, 0.05, 0.09

となり SD の平均は 0.073 となる。また、ゲンポシドの場合には、個別積分で、各参加者の SD は 0.12, 0.11, 0.18, 0.14 となり SD の平均は 0.135, 固定積分で各参加者の SD は 0.12, 0.12, 0.15, 0.14, となり SD の平均は 0.132 となる。従って、このような条件下での調液誤差は SD でマグノロールの場合 0.07 程度、ゲンポシドの場合 0.14 程度と考えられる。

一般に、NMR のチャートは、使用するプローブの特性とシムの状態により、そのシグナルの形状が微妙に変化するため (機器間差)、より真値に近い積分値を得るためには、積分の開始点と終了点を得られたシグナル毎に変更することが望ましい。この点を考慮して、今回の測定手順では、積分範囲をマニュアルで指定する手法 (個別積分) としている。今回の実験で、Participant average の段階では、個別積分と固定積分のどちらでも、積分値は、ほぼ同様のばらつきを示すことが判明したが、この事実は、qNMR を公定法として今後どのように規定していくか考える上で興味深い。なお、同一の機器で連続的に試料を測定する場合には、異なった調液の試料であっても、ほぼ完全に同一のシグナル形状が現れるものと考えられることから、この場合には、当然、機器内誤差を抑えるため、異なった調液試料についても、同一の積分範囲で積分することが重要と考えられる。

C. 4. 機器間誤差の検討

Table 3-1, 4-1 の参加者毎の Participant average を比較すると、各参加者が使用した機器毎の定量特徴と参加者毎の調液、個別積分の特徴が現れることになる。前述した理由でデータがばらついた参加者 S のデータを除くと、マグノロールとゲンポシドの両化合物での Participant average の値は、参加者 O, U, E, A で、それぞれ 98.73, 99.18, 98.93, 99.07 (以

上マグノロール), 95.81, 96.17, 95.94, 96.45 (以上ゲニポシド) となり, 両化合物とも参加者 O, E で低く, 参加者 U, A で高くなっている. そこで, このような傾向が, 機器の違いによるもの (機器間誤差) であるのか, 参加者の調液等の違いによるものであるのか確認する目的で, 同一の機器 (ECA600) を使用し, 同一測定者 (参加者 O) により, 参加者 O, U, E, S が調液したゲニポシド試料を用い, 改めて qNMR の測定を行った. その結果, 参加者 U が調液した試料で得られた結果 (Participant average) が最も低く (95.93 ± 0.19), 参加者 O の試料 (95.94 ± 0.05) がほとんど同じ値を示す一方, 参加者 S の試料の値がやや高く (96.08, サンプル 3 の測定ができなかった為 SD は無し), 参加者 E の試料の値が最も高い (96.19 ± 0.13) ことが判明した. 参加者 A の試料が保存中のトラブルで再測定出来なかったため, 比較可能な参加者 O, U, E の試料の結果で比較してみると, 得られる積分値の傾向は, 別々の NMR で測定したものと, 同一の NMR で測定したもので, 明らかに異なる (最大差 0.25, 測定者 O の NMR と測定者 E の NMR) ことが判明した, 個別積分を行う必要性も, 前述したように機器間で現れるシグナルの微妙な形状差に由来することを考慮すれば, 以上の結果は, 使用する機器の差により, 得られる定量値に僅かではあるが, 明らかに違いが生じることを示している.

C.5. 積分値の誤差の総合検討

Table 3-1, Table 4-1 の参加者毎の Participant average の平均値 \pm SD の値は, 今回のバリデーション実験で検討を行った全ての積分値の誤差要因 (機器内誤差, 調液誤差, 機器間誤差等) を全て含んで得られた値である. 参加者 S のデータを除くと, その値はマグノロールでは, 98.97 ± 0.19 となり, 得られた最大

値と最小値の差は 0.45, ゲニポシドでは, 96.09 ± 0.28 となり, 最大値と最小値の差は 0.64 となる. 生薬中の定量指標成分の含量は最大でも数%であり, 規制値も 0.1% が最小単位であることから, 天然物である生薬毎のばらつきを考慮すれば, 定量用の標準物質の含量精度は, 有効数字 2 桁を保証すれば十二分と考えられる. 今回の検討では, なるべく測定差が大きくなるように, 異なった NMR を使用して行った. この場合, マグノロールの指標プロトン濃度 (マグノロールの場合 2H 分の縮重したシグナルを積分しているため, 38 mM/1H, 1H 分のダブルットを指標シグナルとして, 分子量 300 で 10mg 程度) で定量試料を調製すれば, 機器間誤差を含めても得られた定量値のばらつきが 0.2 程度となり, 有効数字 2 桁を保証しながら十分に値付けが可能となる. さらに, 将来的には, 試薬会社が産業技術総合研究所の計量標準総合センターから使用機器も含めて認証を受けて試薬の値付けを行うことから, この場合, 機器間誤差は無視できることになる. 従って, 機器内の測定ばらつき 0.08 (マグノロールにおける各参加者の全ての Sample average の標準偏差の平均) に, 調液によるばらつき 0.07 程度 (マグノロールにおける固定積分での参加者の Participant average の標準偏差の平均, 秤量値が今回の 5 mg より大きい 10 mg であれば, 実際には秤量誤差がより小さくなり, 今回得られたこの値より小さくなる可能性が高い) を考慮すれば良いことになり, 定量的により正確な値付けが可能となる.

C.6. qNMR による試薬の定量値付け

得られた結果を Table 5 に示す. 多くの試薬では純度は 96% 以上を示したが, Saikosaponin a 及び Saikosaponin b2 で, それぞれ 90.1%, 86.5% の含量を, Barbaloin (2 ロット測定) で,

90.0%, 92.3%の値を示した。これらの試薬では、NMR チャート上、水由来と考えられる大きなピークが観測されており、不純物のほとんどは、水であるものと考えられる。

D. まとめ

本研究では、qNMRにより、日本薬局方で使用する試薬のSIトレーサブルな定量値付けが現実的に可能であるかどうか検討するため、実際に使用される可能性の高い化合物を利用して、5機関によるバリデーション実験を行った。その結果、有効数字2桁程度の精度を持つ値付けが、現実的に可能であることが示された。

健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

E. 研究発表

- 1) 合田幸広, 食品・天然物の新しい分析・鑑定技術, FFI ジャーナル, **215**, 127-128 (2010).
- 2) 杉本直樹, 多田敦子, 末松孝子, 有福和紀, 定量NMRを用いた有機化合物の絶対定量法の開発と食品分析の信頼性の確保, FFI ジャーナル, **215**, 129-136 (2010).
- 3) 細江潤子, 杉本直樹, 合田幸広, 定量NMR (qNMR)による日本薬局方試薬の純度規格化の検討, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **41**, 960-970 (2010).