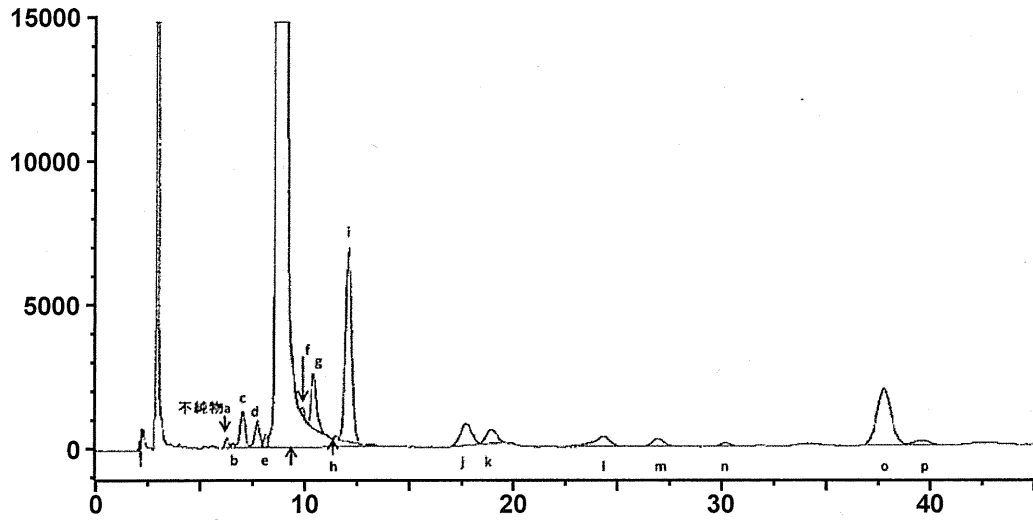


バソプレシン: CYFQNCPRG-NH₂ (C₄₆H₆₅N₁₅O₁₂S₂: Mav 1084.23; Mm 1083.44)

オキシトシン: CYI^{*}QNCPLG^{*}-NH₂ (C₄₃H₆₆N₁₂O₁₂S₂: Mav 1007.19; Mm 1006.44)

図1. バソプレシン及びオキシトシン

(A) 日局バソプレシン標準品 (Lot VAS01)



(B) バソプレシン原薬A

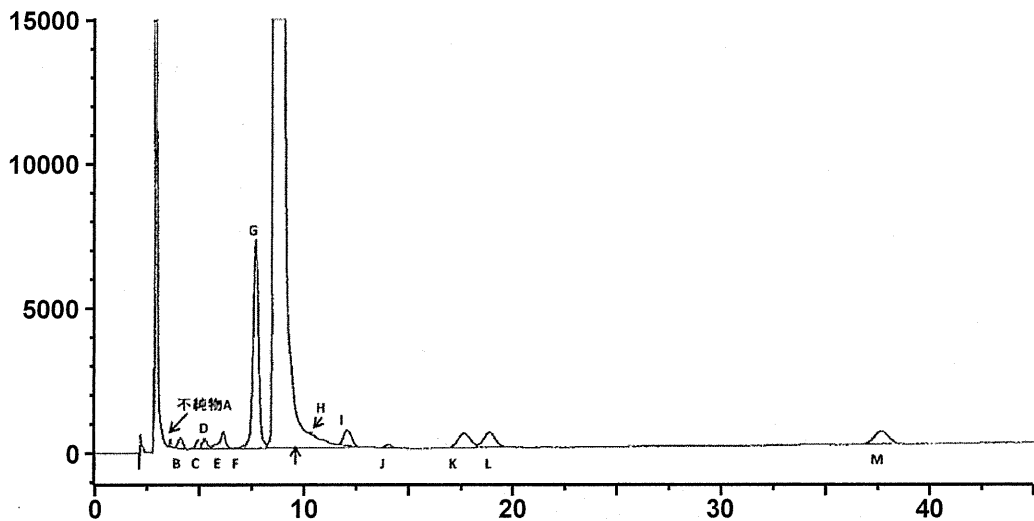


図2. バソプレシンの不純物プロファイル

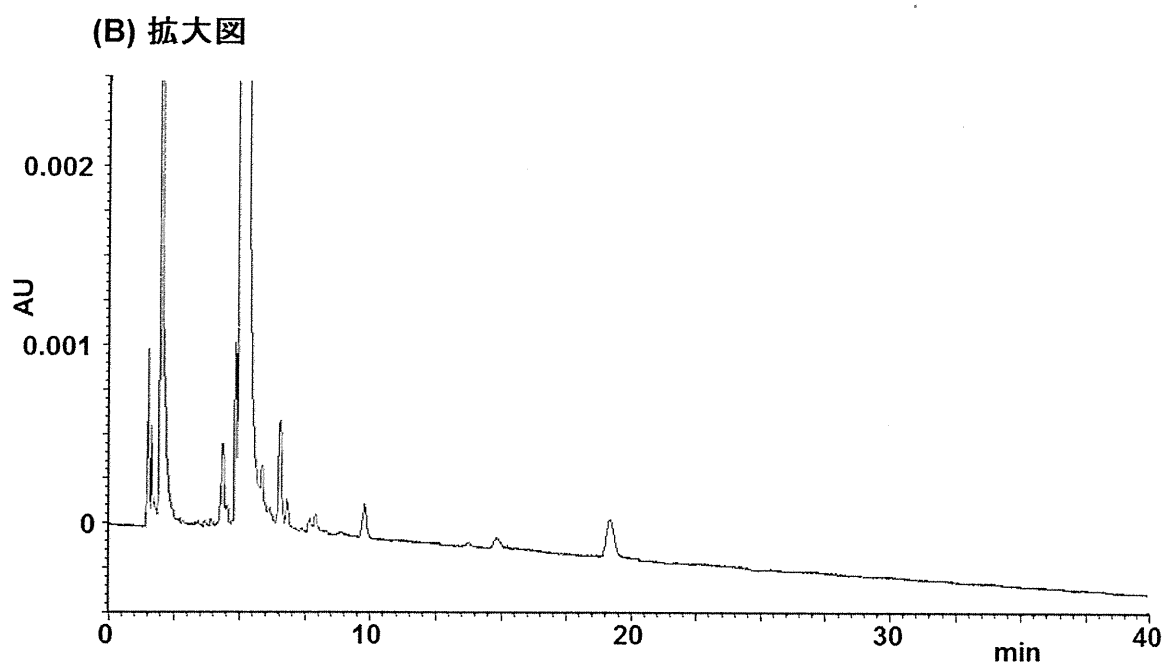
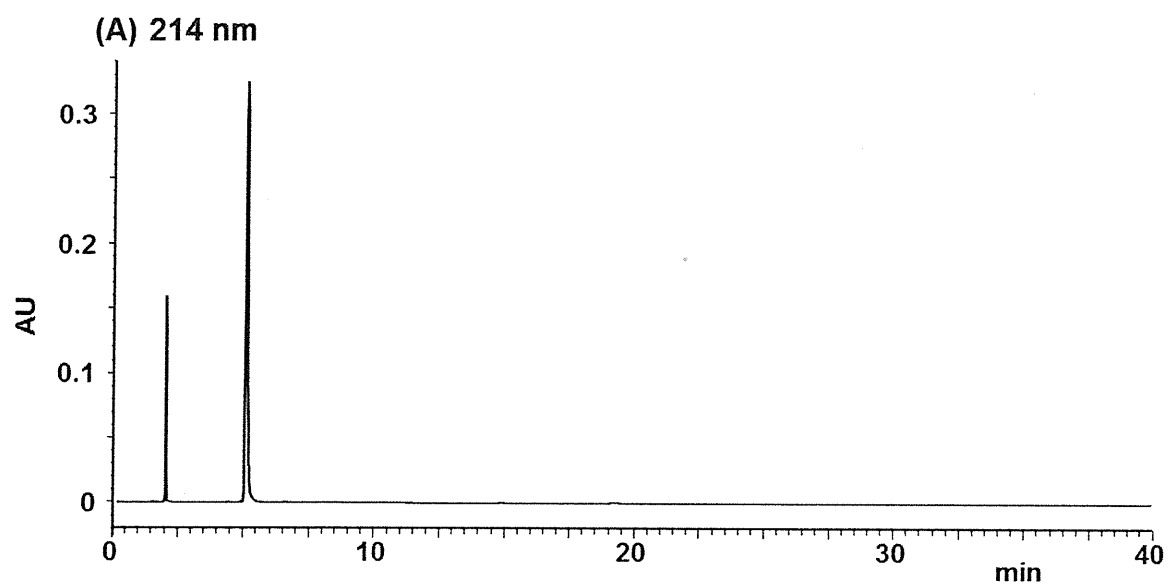


図 3. バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/UV

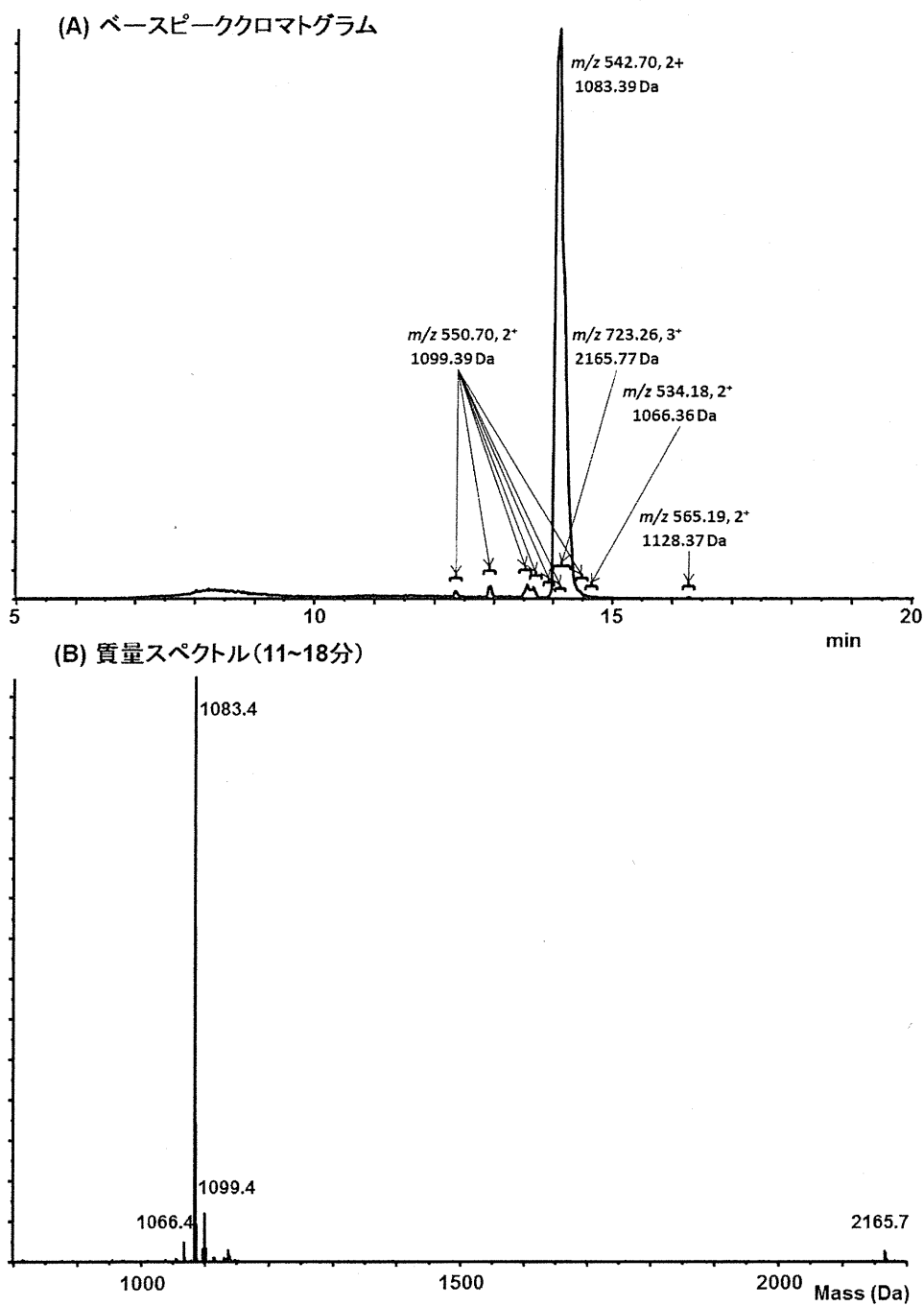


図 4. バソプレシン (ピトレシン) の HPLC/MS

分担研究課題 生薬に関する試験法及び各条規格の改正に関する研究
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 丸山卓郎

PCR 法によるアキョウの基原動物種鑑別法の検討
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生薬部流動研究員 桑田幸恵

研究要旨 ロバ由来の生薬であるアキョウの基原動物種鑑別法として、cytochrome b 遺伝子領域の塩基配列の違いを利用した PCR 法を検討した。イオン交換樹脂カラムを用いた方法で抽出したアキョウ DNA から、cytochrome b 領域の増幅が可能であることを確認した後、cytochrome b をターゲット領域としたロバ、ウマ、ウシ、ブタ DNA を特異的に検出する PCR 法をそれぞれ確立した。これらの方法をロバ由来であることが確認されているアキョウに適用したところ、ロバ特異的検出 PCR でのみ増幅産物が得られた。また、ウシ DNA の検出限界を調べたところ、少なくとも 0.1% の混入を検知できたが、混入量について定量性はみられなかった。本方法をアキョウ市場品 8 製品に適用した結果、すべての製品から、ロバ及びウシ特異的検出 PCR で増幅産物が確認されたことから、本研究で使用したアキョウは、原材料としてウシが混入されている、もしくは製造過程で非意図的なコンタミネーションが起こっている可能性が示唆された。以上のことから、本方法は、他の動物を基原とした偽物や粗悪品の流通が指摘されているアキョウ製品の、基原動物種鑑別法の一つとして有用であると思われるが、ロバに対する他の動物種混入量に関する定量法については、今後検討が必要であると考えられる。

A. 研究目的

アキョウは、ロバ *Equus asinus* の毛を去った皮、骨、けん又はじん帯を水で加熱抽出し、脂肪を去り、濃縮乾燥したもの、と日本薬局方外生薬規格に規定されている生薬であり、その主な成分はコラーゲンである。本生薬は、止血や補血、また婦人病やいくつかの慢性疾患の治療などに効果的であるとされ、「一般用漢方処方製剤承認基準」に記載される処方の約 3% の処方に配合されている¹⁾。その中には、温経湯や猪苓湯などのように臨床上汎用される処方を

含むことから、局方収載による規格基準の標準化が望まれている。

アキョウは、中国山東省を主な産地としており、中華人民共和国薬典においても、基原動物種はロバであると規定されている²⁾。しかし、アキョウは比較的高価な生薬であるため、ウマやウシ、ブタ等、他の動物種由来の皮や骨から作られた、あるいは混入された偽物や粗悪品が流通しているという現状が報告されている³⁾。このような現状から、アキョウの基原動物種鑑別法の確立が望まれており、これまでに分光法

に基づいた方法等の開発が試みられているが⁴⁻⁶⁾、サンプル処理の煩雑さから、実用化には至っていない。

近年、DNA 解析技術の進歩により、塩基配列の違いを利用した食肉及び食肉加工品の肉種鑑別法が多く報告されている⁷⁾。アキョウの基原動物種鑑別法の一つとして、DNA の塩基配列の違いを利用した方法が考えられるが、アキョウは加工度が高い製品であるため、DNA 抽出は困難であると予想されていた。しかし、Lv らは近年、アキョウからの微量かつ断片化された DNA の抽出とその検出に成功している⁸⁾。さらに、彼らはその抽出法を利用し、SINE (short interspersed elements)領域をターゲット領域とした、PCR 法によるアキョウの基原動物種鑑別法を報告している⁹⁾。SINE はレトロポゾン的一种で、300 bp 程度の短い塩基配列を単位とした散在性の反復配列であり、そのコピー数は 10^6 を超えるものもある¹⁰⁾。SINE を利用したこの方法では、ロバ DNA の検出法として、ウマ目動物 (ロバやウマ等) 特異的な ERE-1 領域¹¹⁾が増幅され、かつウマ特異的なサテライト DNA 領域の増幅はみられないこと、としている。しかし、この方法は間接的なロバの検出法であり、検体がロバとウマ混合物由来のものなのか、ウマ 100%由来のものなのかの判断をすることができない。一方、ミトコンドリア DNA は、コピー数は数千コピーと SINE と比較すると少ないが、高等動物において生物学的進化や種間の変化が現れていることが知られていることから、食肉や食肉加工品の基原動物種の鑑別に広く利用されており¹²⁻¹⁴⁾、ロバとウマの鑑別も可

能である。そこで本研究では、Lv らの報告を参考に DNA 抽出法を検討した上で、ミトコンドリア DNA cytochrome b 領域をターゲットとした PCR が、アキョウの基原動物種の鑑別にも利用可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用したアキョウ市場品の詳細を Table 1 に示した。また、牛皮を原料に、アキョウと同様の製法により製造されたと推定される黄明膠 (Bt-1) を、東阿阿膠社より購入した。

ロバ毛は、羽村市動物公園よりご恵与いただいたもの、ウマ、ウシ、ブタ肉はインターネット又はスーパーマーケットで購入したものを利用した。

2. アキョウサンプルの前処理と DNA 抽出

アキョウサンプル (板状) は、適当な大きさのブロックにした後、外部付着 DNA の処理を行う目的で、各面を UV で 2 時間ずつ照射し、MM-300 (Qiagen) を用いて粉砕したものを DNA 抽出に用いた。

アキョウサンプルの DNA 抽出は、シリカゲル膜(QIAquick spin column; Qiagen)を用いて Lv らの報告通りに、またはイオン交換樹脂 (QIAGEN Genomic tip 20/G または 100/G)を用いて、組換え DNA 技術応用食品の検査方法¹⁵⁾を参考に行った。

毛や肉サンプルからの DNA 抽出は、QIAGEN Genomic tip 20/G を用いてプロトコール通りに行った。

3. 動物種特異的検出 PCR

上記のように抽出した DNA を鋳型とし、cytochrome b 遺伝子領域のうち、ロバ、ウマ、ウシ、ブタに特異的な領域に設計したプライマーを用いてそれぞれ PCR を行い、目的とする遺伝子領域を増幅させた。反応溶液は、12.5 μ L Ampdirect Plus (Shimadzu)、0.75 U Ex Taq Hot Start Version (Takara)、0.4 μ M プライマーを含む液に、5 ng (毛・肉サンプル)又は 50 ng (アキョウサンプル)の DNA 溶液を加え、全量を 25 μ L とした。PCR 反応は、DNA Engine thermal cycler, PTC-200 (Bio-Rad)を用いて行い、温度プログラムは、94°C 4 min; 94°C 30 sec, 60°C(ロバ、ウマ、ウシ)又は 64°C (ブタ) 30 sec, 72°C 10 sec, 35 cycles; 72°C 2 min とした。増幅産物は、GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)を添加した NuSieve GTG Agarose gel (4.5%)を用いて電気泳動した。得られた PCR 産物は、MinElute PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製し、pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen/Life technologies)にサブクローニング後、塩基配列を決定した。Plasmid の蛍光ラベル化は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems/Life technologies) を用いて行い、解析は、ABI Prism 3130-genetic analyzer (Applied Biosystems/Life technologies) により行った。

4. ウシ DNA 検出限界の検討

アキョウサンプル(Eq-1)に、黄明膠 (Bt-1) を 0.1%混合した試料から、前述同様に DNA を抽出した。この DNA を鋳型として、ウシを特異

的に検出する PCR を行うことにより、検出限界を調べた。

C. 結果

1. DNA 抽出法の検討

アキョウからの DNA 抽出法として、Lv らは、フェノール/クロロホルム法、磁気ビーズ法、シリカゲル膜を用いた方法の 3 種類について比較を行い、収量と吸光度比 (DNA の純度) 及び実際の PCR 結果から、シリカゲル膜を用いた方法が最適であったと述べている⁸⁾。そこで、まずシリカゲル膜を用いた方法について追実験するとともに、遺伝子組換え食品からの DNA 抽出の際に推奨されている、イオン交換樹脂 (QIAGEN Genomic tip 20/G)を用いた方法についても検討を行った。

Lv らが用いたものと同じ東阿阿膠社製のアキョウ (Eq-1) 1 g から上記の各方法で DNA を抽出したところ、純度に大差はなかった。それぞれの DNA 10 ng について、Lv らの報告と同様、ウマ科動物に特異的な SINE 領域である ERE-1 に設計したプライマーを用いて PCR を行った結果、それぞれ予想される大きさに増幅産物が得られたが、PCR に用いている DNA 量は同一であったにも関わらず、シリカゲル膜を用いた方法よりイオン交換樹脂を用いた方法で抽出した DNA を鋳型にした方が、多くの増幅産物が得られた。

Lv らの報告では、シリカゲル膜を用いた方法で抽出した DNA を鋳型とした PCR では、SINE 領域は増幅されるが、ミトコンドリア DNA の cytochrome b 領域は増幅されなかったと記され

ている。そこで、シリカゲル膜を用いた方法より、多くの増幅産物が得られることが確認されたイオン交換樹脂を用いた方法で、cytochrome b 領域の増幅が可能か検討したところ、DNA 50 ng を鋳型とした PCR において、増幅産物が得られることが確認された。このことも、アキョウからの DNA 調製法として、イオン交換樹脂カラムを用いた方法が、シリカゲル膜カラムを用いた方法より優れていることを支持している。

アキョウより抽出した DNA から、cytochrome b 領域の増幅が可能であることが確認されたことから、次に cytochrome b 領域を動物種特異的検出 PCR のターゲット領域とし、以降の実験を行った。

2. 動物種特異的検出 PCR 条件の確立

アキョウの基原動物種はロバとされているが、ウマやウシ、ブタなどを由来とした偽物・粗悪品が流通していることから、ロバに加え、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR 条件についても確立を試みた。

アキョウから抽出される DNA は断片化されており、100 bp 以上の大きさの増幅産物は得られにくいことから⁸⁾、増幅産物の大きさが 100 bp を超えないように、cytochrome b 領域中で各動物種特異的な配列にプライマーを設計した。設計した各動物種特異的プライマーを用い、ロバ、ウマ、ウシ、ブタ各組織から抽出した DNA 5 ng を鋳型として PCR を行い、条件を検討した結果、各動物種特異的な増幅産物が得られた(ロバ, 64 bp; ウマ, 71 bp; ウシ, 68 bp; ブタ, 76

bp) (Fig. 1 A-D)。得られた増幅産物は、サブクローニング後の塩基配列解析により、各動物種から予想される塩基配列と一致することが確認された。

次に、これらの動物種を特異的に検出する PCR 条件を、ロバ由来であることが確認されているアキョウ (Eq-1) から抽出した DNA に適用したところ、ロバを特異的に検出する PCR 条件でのみ増幅産物が得られた (Fig. 2 A-D)。以上の結果により、本研究で確立した種特異的検出 PCR は、アキョウの簡便な基原動物種鑑別法として有用であることが示唆された。

3. ウシ DNA 検出限界の検討

次に、アキョウにロバ以外の動物種由来 DNA が混入している場合に、今回開発した PCR 法がどの程度の検出感度を有するかを調べるため、アキョウと同様の製法で作られていると思われる黄明膠 (Bt-1) を用いて、ウシ DNA の検出限界の確認を行った。

アキョウ (Eq-1) に Bt-1 を 0.1% 混入させた試料から抽出した DNA を鋳型に、ウシ特異的検出 PCR を行ったところ、0.1% 混入試料からも増幅産物が確認された (Fig. 3)。本実験に使用した Bt-1 は、ロバ特異的検出 PCR を行った際にも増幅産物が確認されており、製造の過程でロバ由来サンプルが混入している恐れもあるが、本実験結果から、今回開発した PCR 法は、少なくとも 0.1% のウシ由来製品の混入を検出できると考えられた。しかし、Bt-1 を 0.1% 混入させた試料と Bt-1 100% 試料とにおいて、増幅産物の量に違いがみられなかったことから、本

方法では、意図的な材料の混入と、製造過程での非意図的なコンタミネーションを区別するのは困難であると考えられた。

4. アキョウ市場品への適用

東阿阿膠社製アキョウの他、アキョウ市場品 8 試料について、ロバ、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR を行った結果が Fig. 4 である。ロバ特異的検出 PCR において、山東省産以外の製品 (Eq-7, 8, 9) は増幅産物量が少なかったものの、いずれの製品からも増幅産物が得られた (Fig. 4-A)。さらに、ウシ特異的検出 PCR においてもすべての製品から増幅産物が得られ (Fig. 4-C)、Eq-6 からはウマ特異的検出 PCR においても増幅産物が得られた (Fig. 4-B, lane 7)。また、すべての製品からブタ特異的増幅産物は得られなかった (Fig. 4-D)。前述のように、ウシ由来サンプルについてはわずかな混入でも検知されることから、これらのアキョウ製品は、原料にウシ (Eq-6 についてはウマも) が混入している、もしくはウシ (Eq-6 についてはウマも) 由来製品と同じ工場内で作られている等、非意図的なコンタミネーションが起きているという二つの可能性が示唆された。

D. 考察

本研究では、PCR 法による、ロバ由来生薬アキョウの基原動物種鑑別法の検討を行った。まずアキョウからの DNA 抽出法として、シリカゲル膜カラム、イオン交換樹脂カラムを用いた方法について比較を行った結果、イオン交換樹脂カラムを用いた方法がより優れていると考

えられた。このことは、イオン交換樹脂での調製法は、非常に緩和な条件下で行われ、調製中の DNA の更なる断片化がほとんどみられなかったか、あるいは、PCR 酵素の活性を阻害する多糖類やフェノール性化合物の除去能力に優れていたためと思われる。

次に、cytochrome b 領域をターゲット領域とした、ロバ、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR 条件を確立し、確立した PCR 法が、アキョウの基原動物種鑑別法として利用可能であることを示した。SINE 領域をターゲットとした PCR 方法と異なり、本方法はロバとウマの鑑別が直接的に可能であり、新たなアキョウの簡便な基原動物種鑑別法として有用であると考えられる。

また、本方法のウシ DNA の検出限界の確認を行ったところ、0.1%のウシ由来製品の混入を検知できる結果となった。これは SINE 領域をターゲットとした PCR 法と同等の感度である。しかし、SINE 領域をターゲットとした PCR 法と同様、本方法でもウシ由来サンプル混入量について定量性がみられなかったことから、意図的な材料の混入と、製造過程での非意図的なコンタミネーションを区別するのは困難であると考えられた。アキョウにおけるロバに対する他の動物種混入量の定量法に関しては、定量 PCR 法を利用し、0.1% 及び 100% Bt-1 試料における、PCR 産物の立ち上がりサイクル数の違いを比較する等、今後更なる検討が必要であると思われる。

東阿阿膠社製アキョウの他、アキョウ市場品 8 試料について、本研究で確立した PCR 法を適

用したところ、すべての製品から、ロバ及びウシ特異的検出 PCR において増幅産物が得られた。各製品間で増幅産物の量が異なるのは、製品により DNA 断片化の度合いや添加物の量や種類が異なるためと推測される。また、本実験で使用した製品のうち、東阿阿膠社製を除いたすべての製品から、ウシ特異的検出 PCR においても増幅産物が得られたことから、市場に流通するアキョウ製品の多くは、原料にウシが混入している、もしくはウシ由来製品と同じ工場内で作られている等、非意図的なコンタミネーションが起きている可能性が示唆された。

E. 結論

アキョウの基原動物種鑑別法として、cytochrome b 領域をターゲットとした、ロバ、ウマ、ウシ、ブタを特異的に検出する PCR 条件を確立した。本方法をアキョウ市場品に適用した結果、ほとんどの製品について、原料にウシが混入している、または製造過程で非意図的なコンタミネーションが起きている可能性が示唆された。本方法は、他の動物を基原とした偽物や粗悪品の流通が指摘されているアキョウ製品の、簡便な基原動物種鑑別法の一つとして有用であると思われるが、ロバに対する他の動物種混入量に関する定量法については、今後検討が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 桑田幸恵, 丸山卓郎, 蔡少青, 合田幸広: DNA 情報を利用したアキョウの基原動物種鑑別法の検討 (2012 年 3 月 29 日-31 日, 札幌)

G. 知的所有権の取得状況

特になし

参考文献

- 1) a. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長: 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, 平成 20 年 9 月 30 日
- b. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長: 一般用漢方製剤承認基準の改正について, 薬食審査発 0401 第 2 号, 平成 22 年 4 月 1 日
- c. 厚生労働省医薬食品局審査管理課長: 一般用漢方製剤承認基準の改正について, 薬食審査発 0415 第 1 号, 平成 23 年 4 月 15 日
- 2) Pharmacopoeia of the People's Republic of China, English Edition 2010. China Medical Science Press, Beijing, China (2010).
- 3) 一般社団法人日中経済貿易センター, 需要の急増する阿膠一品質基準化を推進, JCC マンスリー, 119 号, 東洋紙業, 2010.
- 4) Xu C. H., Zhou Q., Sun S., Wang B. Q., The identification of Ejiao by two dimensional correlation infrared spectroscopy. *Chinese J. Anal. Chem.*, **33**, 221-224 (2005).
- 5) Qu H. B., Yang H. L., Cheng Y. Y., Fast and nondestructive discrimination of donkeyhide glue by near-infrared spectroscopy. *Spectrosc. Spect. Anal.*, **26**, 60-62 (2006).

- 6) Wang W. J., Guan Y., Zhu Y. Y., Novel identification of donkeyhide glue by X-ray fluorescence analysis. *Spectrosc. Spect. Anal.*, **27**, 1866-1868 (2007).
- 7) Ballin N. Z., Vogensen F. K., Karlsson A. H., Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration? *Meat Sci.*, **83**, 165-174 (2009).
- 8) Lv P., Zhou X. S., You J. H., Ye B. C., Zhang Y. X., Extraction of trace amount of severely degraded DNA. *Z. Naturforsch.*, **64c**, 581-589 (2009).
- 9) Lv P., Zhao Y. J., Qi F., Zhou X. S., You J. H., Qin Y. F., Zhang Y. X., Authentication of equine DNA from highly processed donkey-hide glue (*Colla Corii Asini*) using SINE element. *J. Food Drug Anal.*, **19**, 123-130 (2011).
- 10) Shedlock A. M., Takahashi K., Okada N., SINEs of speciation: tracking lineages with retroposons. *Trends Ecol. Evol.*, **19**, 545-553 (2004).
- 11) Sakagami M, Hiromura K, Chemnick L. G., Ryder O. A., Distribution of the ERE-I family in Perissodactyla. *Mamm. Genome*, **10**, 930-933 (1999).
- 12) Krcmar P., Rencova E., Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *J. Agri. Food Chem.*, **51**, 7655-7658 (2003).
- 13) Pascoal A., Prado M., Calo P., Cepeda A., Barros-Velazquez J., Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method. *Eur. Food Res. Technol.*, **220**, 444-450 (2005).
- 14) Martin I., Garcia T., Fajardo V., Lopez-Calleja I., Hernandez P. E., Gonzalez I., Martin R., Species-specific PCR for the identification of meat species in feedstuffs. *Meat Sci.*, **75**, 120-127 (2007).
- 15) 厚生労働省医薬局食品保健部長：組換えDNA 技術応用食品の検査方法について，食発第 110 号，平成 13 年 3 月 27 日；最終改正，食安発第 0618001 号，平成 20 年 6 月 18 日。

Table 1 Details of the donkey glue products used in this study

サンプル名	産地	取り扱い会社	製造元
Eq-1	山東省	-	東阿阿膠社
Eq-2	山東省	A	-
Eq-3	山東省	A	-
Eq-4	山東省	B	-
Eq-5	山東省	B	-
Eq-6	山東省	C	-
Eq-7	甘肅省	C	-
Eq-8	湖南省	C	-
Eq-9	浙江省?	A	-

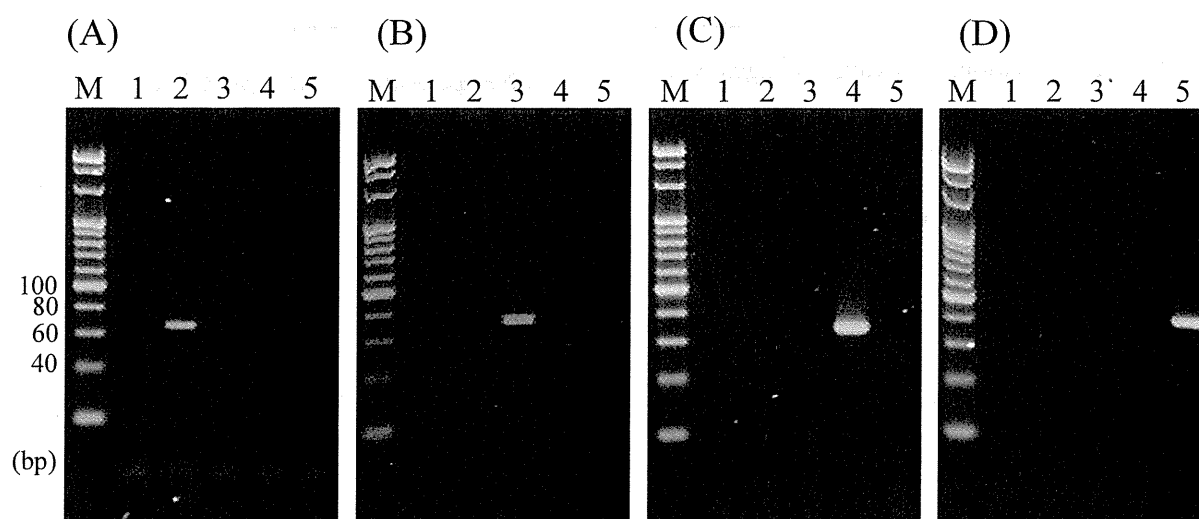


Fig. 1 Specificity of PCR of DNA from donkey, horse, cattle, and pig with each of their specific primers. (A) Donkey-specific PCR (B) Horse-specific PCR (C) Cattle-specific PCR (D) Pig-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, *Equus asinus* (donkey); lane 3, *Equus caballus* (horse); lane 4, *Bos taurus* (cattle); lane 5, *Sus scrofa* (pig); M, 20 bp ladder marker.

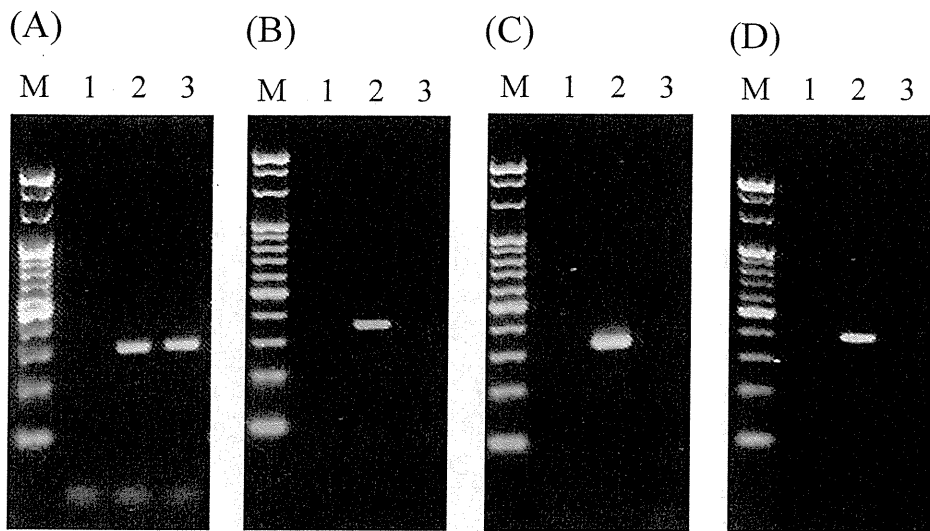


Fig. 2 Specificity of PCR of DNA from Eq-1 (donkey glue) with each of four animal specific primers. (A) Donkey-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, donkey; lane 3, Eq-1. (B) Horse-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, horse; lane 3, Eq-1. (C) Cattle-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, cattle; lane 3, Eq-1. (D) Pig-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, pig; lane 3, Eq-1; M, 20 bp ladder marker.

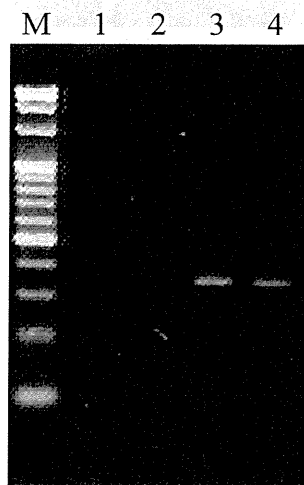


Fig. 3 Evaluation of cattle-specific PCR assay sensitivity.

Lane 1, blank; lane 2, Eq-1 (donkey glue); lane 3, 0.1% cattle glue in donkey glue; lane 4, cattle glue; M, 20 bp ladder marker.

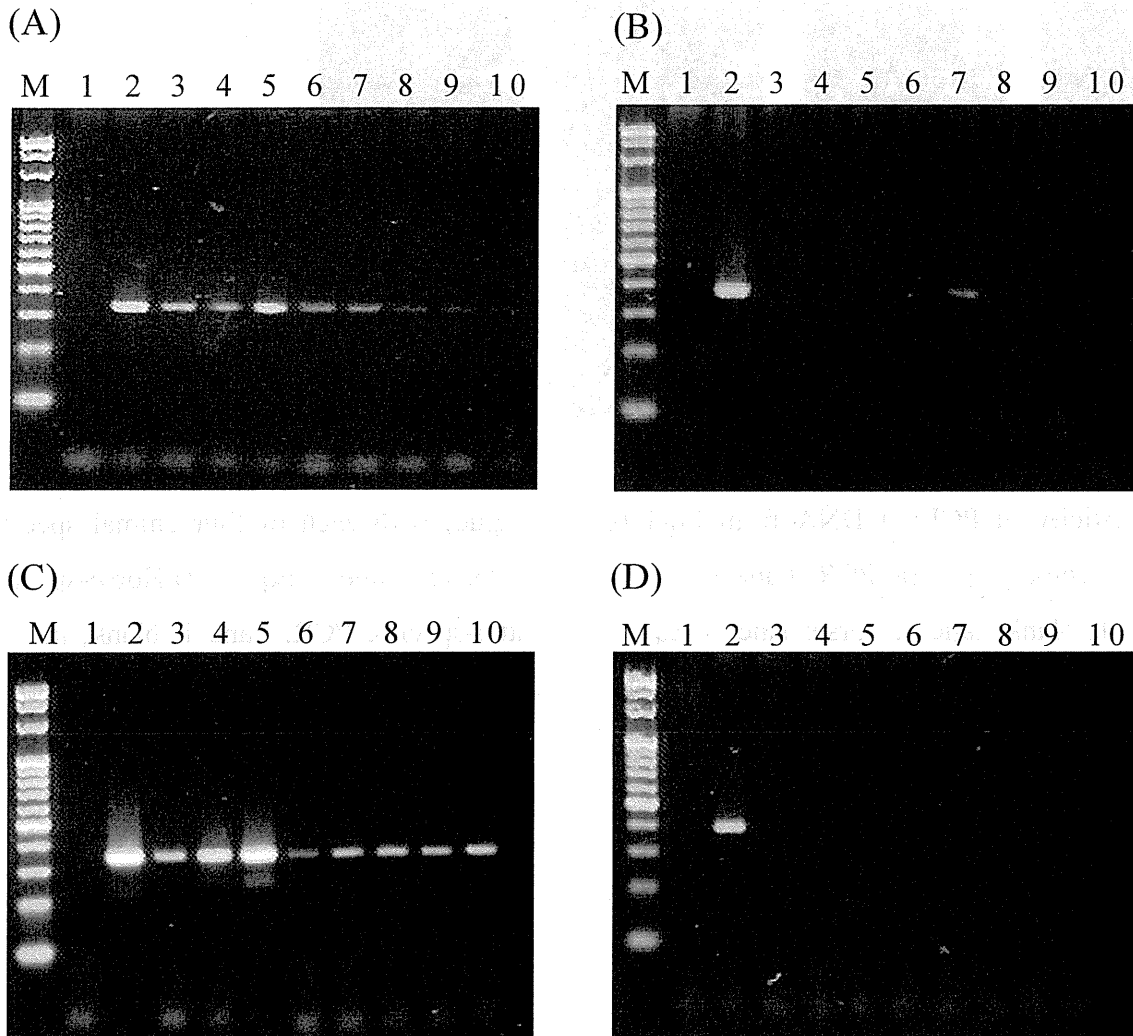


Fig. 4 PCR of DNA from the donkey glue products (Eq-2 to Eq-9) with each of four animal specific primers. (A) Donkey-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, donkey; lanes 3 to 10, Eq-2 to Eq-9 (B) Horse-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, horse; lanes 3 to 10, Eq-2 to Eq-9 (C) Cattle-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, cattle; lanes 3 to 10, Eq-2 to Eq-9 (D) Pig-specific PCR. Lane 1, blank; lane 2, pig; lanes 3 to 10, Eq-2 to Eq-9.

分担研究年度終了報告書

医薬品添加剤の試験法及び各条規格の改正に関する研究

分担研究者 阿曾幸男 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部第二室長

研究要旨 医薬品各条の国際調和が進められている D-マンニトールの試験法のうち、調和作業がこう着状態に陥っている赤外吸収スペクトル再測定サンプルの再結晶化法と水分に関する試験(乾燥減量 vs カールフィッシャー法による水分測定)について、国内流通サンプルを用いて実験を行い、その結果に基づいて、調和に向けた方策を考察した。再結晶化法については欧州薬局方(EP)の方法で再結晶化すると α 形、 β 形、 δ 形の何れの結晶形の D-マンニトールからも α 型の結晶形の D-マンニトールが得られることが明らかとなった。従って、EPの再結晶化法を受け入れ、日本薬局方の参照スペクトルを α 形の D-マンニトールに変更することが、国際調和へ向けた1つの選択肢として考えられる。しかし、試験条件が変動すると異なる結晶形の D-マンニトールが得られる場合があった。従って、 α 形の D-マンニトールが再現性良く得られるように詳細な結晶化条件を調和文書に記載する必要があること、また、異なるバッチの D-マンニトールについて、再現性の確認を行うとともに、実験室間の再現性の確認が必要であると考えられる。水分に関する試験法に関しては、試料として用いた D-マンニトールの水分量が少なく、乾燥減量とカールフィッシャー法を定量的に比較することは困難であったが、両者に大きな差は見られなかった。D-マンニトールは通常の保存条件において吸湿性が非常に低いことから、水を特異的に測定するカールフィッシャー法を設定する根拠が不明である。調和に向け、Coordinate Pharmacopeia である EP が妥当性のある設定根拠を提示する必要があると考えられる。

A 研究目的

医薬品添加剤は人体に対する作用が緩和ないしは無害であるという特徴とともに、医薬品製剤の必須の構成成分として、薬物療法におけるコンプライアンスや、有効成分の体内送達を確保するという重要な役割を全面的に担っている。医薬品添加剤は、全世界で多くの医薬品に共通に使われ、流通が極めて国際的であるため、先進諸国の薬局方に添加剤の品質に関する情報を規格として収載する意義は極めて大きく、国際調和が強く望まれている。現在、日本薬局方(日局)、欧州薬局方(EP)、米国薬局方(USP)の3局の間で、60余りの添加剤について調和作業が続けられている。

D-マンニトールは JP に収載される医薬品であり、D-マンニトール注射剤の有効成分として使用される。また、ほとんど吸湿性がないこと

や反応性が低いという特性を生かし、経口固形製剤の添加剤としても用いられ、国際調和の候補品目となっている。JP に適合する D-マンニトールとして、一般的な結晶形である β 形の他に α および δ 形の結晶多形のものが国内に流通している。

D-マンニトールの医薬品各条の国際調和の Coordinate Pharmacopeia が EP であることから、調和案は EP の D-マンニトールの各条を反映した内容になっており、JP の各条と大きく異なる点が2つある。1つ目の相違点は、IR による確認試験を行う際に、試料のスペクトルが参照スペクトルあるいは標準品のスペクトルと一致しないときの再結晶化条件が、JP と EP、USP において異なっている点である。JP においては参照スペクトルとの比較であり、参照スペクトルの測定に用いたものと同じ β 形の結

晶を得る必要があり、1gの試料を温水3mLに溶解し、5°Cで保存して結晶化させる。一方、EP、USPにおいては試料のスペクトルと標準品のスペクトルを比較するため、再結晶を行うときは試料と標準品を同時に再結晶する。従って、JPの方法で再結晶すると標準品も1g必要になるため、EP、USPはJPの再結晶化法を受け入れられない。EP、USPの再結晶化は電子レンジによる加熱乾燥または100°Cのオーブンで加熱真空乾燥する方法であるが、これらの操作によって得られる結晶がβ形であるかは不明であり、β形のマンニトールの参照スペクトルとの比較を行うJPとしてはこれらの乾燥法を受け入れることができず、調和作業はこう着状態に陥っている。

2つ目の相違点は水分に関する試験法として、JPは乾燥減量による方法を主張し、EPはカールフイッシャー法による方法を主張している点である。局方の方針とも関連するため、この試験項目についてもこう着状態に陥っている。

本研究においては、D-マンニトールの医薬品各条の国際調和の障害になっている問題点を解決することを目的とし、国内に流通するα、βおよびδ形のD-マンニトールについて、JP、EPの方法で再結晶を行い、得られる結晶形を明らかにし、妥当な再結晶化条件を提案する。また、水分に関する試験法の調和を目的とし、乾燥減量の測定およびカールフイッシャー法による水分測定を行い、D-マンニトールの水分に関する試験法としての妥当性を考察する。

B 研究方法

試料

D-マンニトールは国内に流通するα形 (PEARLITOL100SD、Lot. E050D、ROQUETTE社製)、β形 (PEARLITOL50C、Lot. E-566C、ROQUETTE社製) およびδ型 (Parteck Delta M、M659535 118、Merk社製) のD-マンニトールを用いた。

(1) 再結晶化法の検討

EPの方法に準じた電子レンジによる加熱乾燥による再結晶化法 (Method A) および真空加熱乾燥による再結晶化法 (Method B、Method C)、JPの再結晶化法 (Method D) の具体的な操作法を記す。

Method A: D-マンニトール 25mg をガラス容

器にとり、水 0.25mL を加え、加熱せずに溶かす。600 ワットの出力の電子レンジを用い 20 分間加熱する。

Method B: (Method A の変法。電子レンジを使用しない方法。) : D-マンニトール 25mg をガラス容器にとり、水 0.25mL を加え、加熱せずに溶かす。100°Cで1時間加熱した後、乾燥した粉末が得られるまで徐々に減圧度を上げながら減圧加熱乾燥する。

Method C: D-マンニトール 25mg をガラス容器にとり、水 0.25mL を加え、加熱せずに溶かす。100°C真空乾燥機に入れ、ただちに減圧にし、乾燥した粉末が得られるまで減圧加熱乾燥する。

Method D: D-マンニトール 1g を温湯 (60°C ~ 70°C) 3mL に溶かした後、5°Cで24時間または結晶が析出するまで放置した後、ろ過する。得られた結晶を少量の冷水で洗った後、105°Cで4時間乾燥する。

IR スペクトルはフーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-6300A 型、日本分光) を用い、 400cm^{-1} ~ 4000cm^{-1} の範囲において、 4cm^{-1} の分解能で測定した。

(2) D-マンニトールの水分測定法の検討

水分の測定は 684 型カールフイッシャー水分測定装置 (電量滴定法、メトローム) および 870 型カールフイッシャー水分測定装置 (容量滴定法、メトローム) を用いて行った。容量滴定法の場合は試料 1g を 50°C のメタノール-ホルムアミド (1:1) 混液 40mL に溶かした。電量滴定法では試料 200mg を電解液 (クローマット A、クロロホルムとメタノールを含有) に加えた。

水分吸着等温線の測定は MB-300G 型ソーブションアナライザー (VTI) を用い、25°C で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は化学実験のみを行い、倫理面への配慮の必要はないと考えられる。

C 研究結果

(1) 再結晶化法の検討

国内に流通するα、β、δ形のD-マンニトールについて、4つの方法で再結晶して得られたD-マンニトールの結晶形を表1にまとめた。

表 1. 異なる再結晶化法によって得られた D-マンニトールの結晶形

Re-crystallization method	Crystal used	Crystal obtained	IR spectra
Method A(EP 法-1)	α	α	Attachment 1
Method A	β	α	Attachment 2
Method A	δ	α	Attachment 3
Method B	α	α	Attachment 4
Method B	β	α	Attachment 5
Method B	δ	α	Attachment 6
Method C	α	β	Attachment 7
Method C	β	β	Attachment 8
Method C	δ	β	Attachment 9
Method D(日局法)	α	β	Attachment 10
Method D	β	β	Attachment 11
Method D	δ	β	Attachment 12

また、IR スペクトルを本報告書末尾に示した。JP の方法である Method D によって得られる結晶は何れの結晶形の D-マンニトールを再結晶しても β 形の D-マンニトールが得られた。

EP の方法に準じて、800W の出力の電子レンジを用い、5 分間加熱乾燥 (Method A) することにより結晶化した D-マンニトールの IR スペクトルは α 形の D-マンニトールのスペクトルと一致した。EP の各条では 1000W から 1500W の出力の電子レンジを使用し、15 分から 30 分間加熱することになっている。しかし、必ずしも 1000W 以上の出力の装置は必要なく、800W の出力の装置で乾燥できた。また、500W および 600W に出力を下げて、 α 型の D-マンニトールが得られた。

電子レンジを使用せずに、真空加熱乾燥する方法 (Method B、Method C) は減圧するタイミングによって異なる結晶形の D-マンニトールが得られた。100°C で 1 時間加熱後、100°C に保ちながら約 500mmHg で 1 時間、約 250mmHg で 30 分間、約 0.1 mmHg で 30 分間、減圧度を上げながら乾燥する Method B においては α 形が得られた。この場合、100°C で 1 時間加熱することにより、ほとんどの水分は蒸発し、結晶が析出していた。電子レンジを用いたときと同様の温度において結晶が析出すると

考えられる。一方、100°C のオープンに入れると同時に約 0.1 mmHg に減圧して乾燥する Method C においては β 形の結晶が得られた。この条件では試料の温度が低い状態で水分が蒸発し結晶が析出すると考えられ、結晶が析出するときの温度が結晶形の違いに影響しているものと考えられる。

JP の方法と EP の方法で再結晶したときにどの結晶形の D-マンニトールが得られるかを検討した結果、EP の方法では JP の方法と異なる結晶形のマンニトールが生成することが確認された。再結晶化法の国際調和を進めるためには、EP の再結晶化法を採用し、JP の参照スペクトルを α 形の D-マンニトールに変更することが、1 つの選択肢として考えられる。しかし、以下の点について考慮する必要があると思われる。

① 電子レンジによる加熱乾燥法を取り入れるためには、国内で容易に入手可能な電子レンジが使用できるよう電子レンジの出力の記載を修正する必要がある。

② 国内の実験室において電子レンジの使用は一般的ではないと思われ、電子レンジを用いる方法が受け入れ可能なのか、確認する必要がある。

③ オープンにより加熱真空乾燥による結晶化

法については、真空にするタイミングが重要である。また、オーブンの温度のバラツキにより、得られる結晶に差を生ずる可能性もあり、温度制御の正確さも重要である。例えばオーブンの温度を 70°C に設定して 1 時間乾燥後、減圧乾燥すると β 形の D-マンニトールが生成する場合があった。従って、真空加熱乾燥する方法を取り入れるためには、現在の調和文書の記載では不十分であり、確実に α 形の D-マンニトールが得られるよう操作条件を詳しく記載する必要がある。

④ 電子レンジによる乾燥あるいはオーブンにより加熱真空乾燥の方法を受け入れるに当たっては、異なるバッチの D-マンニトールについて、再現性の確認を行うとともに、実験室間の再現性の確認を行う必要がある。

(2) D-マンニトールの水分測定法の検討

EP では水分の定量はカールフィッシャー法で行うことが標準的であるが、JP ではカールフィッシャー法は結晶水をもつものや、乾燥により分解するものに対して適用される場合が多い。水分に対する局方間の考え方の違いが D-マンニトールの各条の調和の障害になっている。そこで、D-マンニトールの水分測定に JP の主張する乾燥減量と EP の主張するカールフィッシャー法の何れの試験法がふさわしいかを両方法で実測された値をもとに考察した。

表 2 に D-マンニトールの乾燥減量、カールフィッシャー法による水分測定の結果を示す。乾燥減量に比べカールフィッシャー法による水分の値が大きい傾向が見られた。しかし、乾燥減量の値は何れの試料においても 0.1% より小さく、1g の試料に対する減少量としては 1 mg より小さいため、正確な数値をだすことは実験的に難しい。カールフィッシャー法においては、試料の滴定量はブランクの滴定量の数倍以下であり、また、ブランクの滴定量も大きくばらついた。従って、表の数値をもとに乾燥減量とカールフィッシャー法による水分のいずれがふさわしいかを判断することは難しい。ただし、乾燥減量の大きさは α 形 $>$ β 形 $>$ δ 形の順であり、カールフィッシャー法による水分と同じ傾向であった。水分の限度試験が目的である場合、乾燥減量とカールフィッシャーによる方法に優劣はないと考えられる。

図 1 に D-マンニトールの等温吸着線を示す。この図は一定の相対湿度に保存した試料がどれだけ水分を吸着するかを示すものである。D-マンニトールは実験室内の相対湿度 (40-60%) ではほとんど吸湿性を示さず、 α 形では 70% 以上の相対湿度において吸湿したが、 β 形と δ 形の D-マンニトールにおいては 80% 以上にならないと吸湿が見られなかった。従って、吸湿性が非常に小さい D-マンニトールに対して、水を特異的に定量するカールフィッシャー法を設定することの必要性を考察する必要があるかもしれない。

D-マンニトールの定量法の国際調和案 (=EP 各条) は高速液体クロマトグラフィーによる方法であり、標準品を用いる。規格は脱水物換算をおこなうため、カールフィッシャー法による水分測定法が必要となる。ただし、標準品の水分測定は行っていない。必ずしも脱水物換算の必要性はないように思われる。今回検討した製品数が少ないため、脱水物換算の是非について結論付けることはできないが、製造メーカー等に問い合わせ、流通する製品の水分量が少ないのであれば、脱水物換算をやめ、水分の試験法を削除することにより、国際調和が可能であると考えられる。脱水物換算が必要な場合、揮発性不純物が水のみであれば、乾燥減量で代替可能と考えられる。Table 1 において乾燥減量の値が水分より大きい値になることはなかったことから、今回検討した製品には水以外の揮発性不純物が含まれないことが示唆される。しかし、流通する全ての D-マンニトールについて検討したわけではないので、製造メーカー等への聞き取り等によって、水以外の揮発性不純物が混在する可能性の有無を明らかにし、水を特異的に検出可能なカールフィッシャー法による水分測定を採用するのか乾燥減量を採用するのかを決める必要があると考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

学会発表

阿曾幸男、宮崎玉樹、奥田晴宏：D-マンニトールの結晶多形に及ぼす結晶化温度の影響

表 2 D-マンニトールの乾燥減量、水分の比較

	乾燥減量(%)* (JPの方法) 1g, 105°C, 4時間	水分(%)* (EPの方法) (1g, 容量滴定, メタル-ホルムアミド [®] 1:1, 50°C)	水分(%)* (0.2g、電量滴定)
α形	0.062±0.006	0.082±0.006	0.081±0.021
β形	0.019±0.003	0.051±0.010	0.041±0.008
δ形	0.011±0.003	0.027±0.004	0.030±0.009

*Average ± standard deviation (n=3)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

3. その他 なし

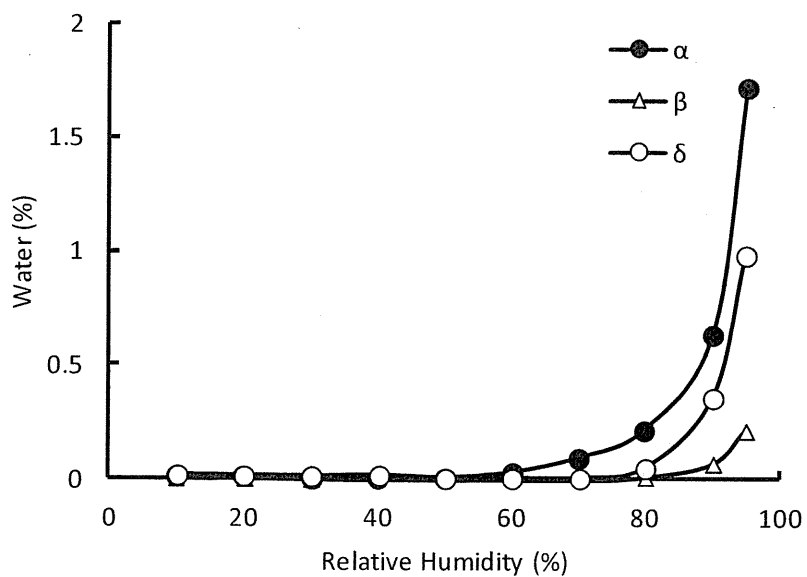
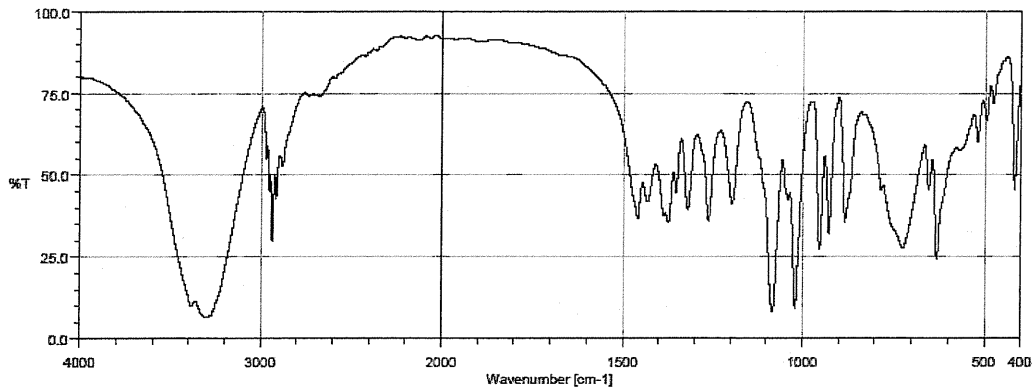


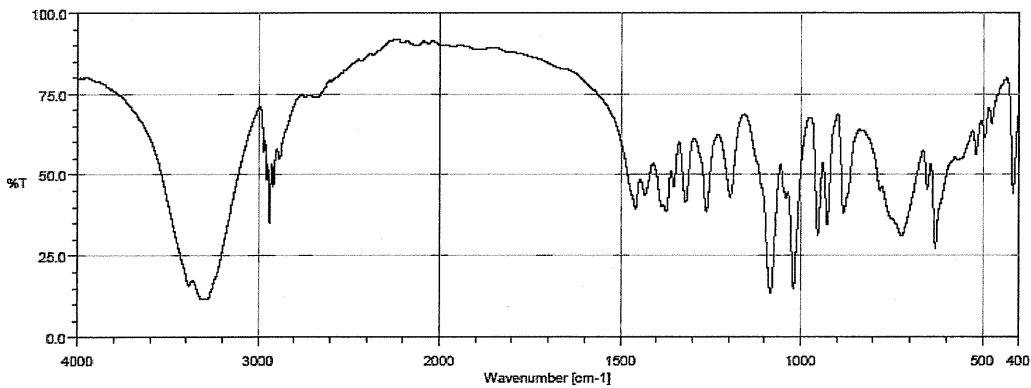
図 1 D-マンニトールの水分吸着等温線 (25°C)

Attachment 1



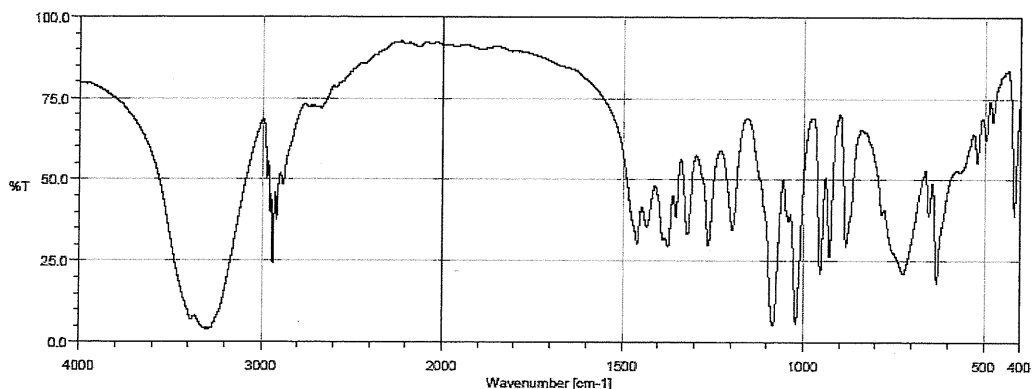
[コメント情報]	α 形, recrystallized, Microwave oven	[測定情報]	機種名 FT/IR-6300typeA
試料名		シリアル番号	A004061024
コメント		測定日時	2012/02/19 18:33
測定者		光源	輝特光源
所属会社	国立医薬品食品衛生研究所	検出器	TGS
		検算回数	64
[データ情報]		分解	4 cm ⁻¹
作成日時	2012/02/19 18:33	ゼロフライング	On
データタイプ	等間隔データ	アポダイゼーション	Cosine
横軸	Wavenumber [cm ⁻¹]	ゲイン	Auto (2)
縦軸	ST	アパーチャ	Auto (7.1 mm)
スタート	399.193 cm ⁻¹	スキャンスピード	Auto (2 mm/sec)
エンド	4000.6 cm ⁻¹	フィルタ	Auto (10000 Hz)
データ間隔	0.984233 cm ⁻¹		
データ数	3738		

Attachment 2



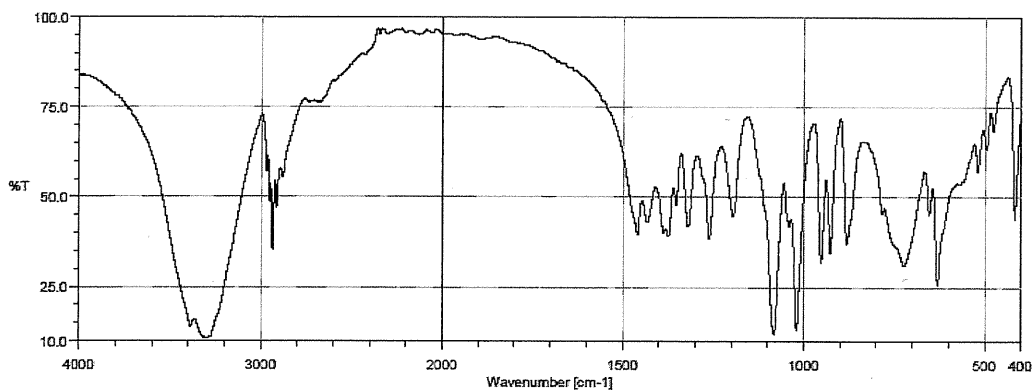
[コメント情報]	β 形 recrystallized Microwave oven	[測定情報]	機種名 FT/IR-6300typeA
試料名		シリアル番号	A004061024
コメント		測定日時	2012/02/18 17:35
測定者		光源	輝特光源
所属会社	国立医薬品食品衛生研究所	検出器	TGS
		検算回数	64
[データ情報]		分解	4 cm ⁻¹
作成日時	2012/02/18 17:37	ゼロフライング	On
データタイプ	等間隔データ	アポダイゼーション	Cosine
横軸	Wavenumber [cm ⁻¹]	ゲイン	Auto (2)
縦軸	ST	アパーチャ	Auto (7.1 mm)
スタート	399.193 cm ⁻¹	スキャンスピード	Auto (2 mm/sec)
エンド	4000.6 cm ⁻¹	フィルタ	Auto (10000 Hz)
データ間隔	0.984233 cm ⁻¹		
データ数	3738		

Attachment 3



[コメント情報]	δ形, recrystallized Microwave oven	[測定情報]	
試料名	δ形, recrystallized Microwave oven	機種名	FT/IR-6300typeA
コメント		シリアル番号	A904061024
測定者		測定日時	2012/02/19 17:56
所属会社	国立医薬品食品衛生研究所	光源	標準光源
		検出器	TGS
[データ情報]		積算回数	64
作成日時	2012/02/19 19:12	分解	4 cm-1
データタイプ	等間隔データ	ゼロフリンギング	On
Wavenumber [cm-1]		アポダイゼーション	Cosine
機軸	%T	ゲイン	Auto (2)
スタート	399.193 cm-1	アパーチャ	Auto (7.1 mm)
エンド	4000.6 cm-1	スキャンスピード	Auto (2 mm/sec)
データ間隔	0.964233 cm-1	フィルタ	Auto (10000 Hz)
データ数	3736		

Attachment 4



[コメント情報]	α形, recrystallized	[測定情報]	
試料名	α形, recrystallized	機種名	FT/IR-6300typeA
コメント	Heat at 100°C for 1hr, then dry in vacuum	シリアル番号	A904061024
測定者		測定日時	2012/02/17 20:28
所属会社	国立医薬品食品衛生研究所	光源	標準光源
		検出器	TGS
[データ情報]		積算回数	64
作成日時	2012/02/17 20:28	分解	4 cm-1
データタイプ	等間隔データ	ゼロフリンギング	On
Wavenumber [cm-1]		アポダイゼーション	Cosine
機軸	%T	ゲイン	Auto (2)
スタート	399.193 cm-1	アパーチャ	Auto (7.1 mm)
エンド	4000.6 cm-1	スキャンスピード	Auto (2 mm/sec)
データ間隔	0.964233 cm-1	フィルタ	Auto (10000 Hz)
データ数	3736		