

令和 6 年 度

富山県薬事総合研究開発センター一年報

(第 52 号)

ANNUAL REPORT
OF
TOYAMA PREFECTURAL INSTITUTE
FOR
PHARMACEUTICAL RESEARCH

No. 52 2025



富山県薬事総合研究開発センター

はじめに

私は、令和6年4月より、前高津所長から所長の任を引き継ぎ、富山県薬事総合研究開発センター（薬総研）の運営・管理に携わっている合田幸広です。専門は、医薬品と天然物のレギュラトリーサイエンスです。

令和6年度も、薬総研は、都道府県立で唯一の薬事に関する研究機関として「薬事に関する研究開発、試験、分析、技術指導と医薬品等の品質、有効性及び安全性の確保を図り、県内の薬業振興と県民の保健衛生の維持向上に資するための業務」を実施してきました。本年報は、この一年間の、組織の運営、研究業績、指導業務等をまとめたものです。

薬総研は研究機関であり、多くの研究職員は博士号を所持しています。他方、薬総研の業務のひとつとして、県内の薬業振興と県民の保健衛生の維持向上に資するため、指導業務や「富山県薬事研究会」の支援業務等を行っています。従来、これらの業務に関連する内容は、主に本誌「富山県薬事総合研究開発センター年報」の研究報告の欄に論文形式で報告を行ってきました。

これらの研究報告を読み込みますと、科学的に充分新規性を持つものもあり、またレギュラトリーサイエンスの観点から記録として残すべき重要な結果が含まれています。一方、これらの研究報告は、研究者の業績として、最も重要な指標の一つである原著論文数に反映されていませんでした。これは、本誌がいわゆる「所内報」であり、外部の査読者が客観的な目で審査を行っていないことに尽きると考えました。そこで、今年度の本誌（第52号）から、全ての研究報告において、査読の際には、必ず外部の査読者を加え、厳密な審査を行うことにしました。さらに、担当編集委員は、その報告に関与していない所内の研究者が担当することを徹底しました。従って、52号以降の研究報告は、外部の和文の学術雑誌と同等の水準を持つものと考えています。

薬総研の研究者は優秀ですが、これまでこのような学術雑誌の編集業務の経験が余りありませんでした。その意味でも、所員にとって新しい形式での本誌の発行は、研究がどのように外部に発信されるかを具体的に経験出来る場となり、大変良かったと考えています。

ご承知とは思いますが、薬総研は、創薬研究開発センター、製剤開発支援センター、薬用植物指導センターの3センターで構成されています。昨年度、創薬研究開発センターでは、県のフロンティア研究推進事業として「新規粘膜アジュバントTY001Sの作用機序解析」が採択されました。製剤開発支援センターでは、薬総研の最年少研究者である高山信幸主任研究員が、「誘導結合プラズマ質量分析計を活用した医薬品中の元素不純物分析法の確立」で、第3回公益財団法人富山第一銀行奨学財団賞努力賞を受賞しました。また、製剤開発支援センターは、現在新人の研究者を募集しています。令和7年度末に博士号取得の方でも応募できますので、県職員の募集サイトを覗いて下さい。さらに、薬用植物指導センターでは、同センターが育種した富山ブランドシャクヤク「春の粧」を原材料として含む薬用酒がついに市販されました。これらの事業だけでなく、薬総研は常に県民を念頭においた研究活動を実施しています。引き続き、県民の皆様から信頼される薬総研となるよう、所員・スタッフ一同、より一層業務に邁進する所存ですので、ご支援のほど、宜しくお願い申し上げます。

ここに、「令和6年度富山県薬事総合研究開発センター年報」をまとめましたので、ご高覧いただき、ご助言・ご意見をお寄せいただければ幸いです。

令和7年9月

富山県薬事総合研究開発センター・所長

合 田 幸 広

目 次

組織・運営

I 総 括

A. 薬事総合研究開発センター

1. 沿 革	1
2. 位置・交通	1
3. 土 地	1
4. 建 物	1
5. 組織・業務（薬用植物指導センターを含む）.....	2
6. 職 員（薬用植物指導センターを含む）.....	2
7. 予算・決算（薬用植物指導センターを含む）.....	3
8. 備 品	5

B. 薬用植物指導センター

1. 沿 革	7
2. 位置・交通	7
3. 土 地	7
4. 建 物	7
5. 主 要 備 品	8

II 薬事総合研究開発センターこの一年

1. 各センターの取り組み	9
2. 視察・取材等	13

III 研究活動

1. 競争的外部資金等を活用した研究課題	14
2. 「くすりのシリコンバレー TOYAMA」創造コンソーシアム 研究開発事業	15
3. 上記以外の研究課題	16

研究業績

IV 研究報告

- 2軸スクリー型造粒におけるデザインスペースの構築（第3報）
ー スケールアップの検討ー
.....永井秀昌, 本田裕恵, 林正幸, 薬事研究会製剤部会..... 18
- B16悪性黒色腫移植マウスモデルを用いたコハク酸付加ベツリン誘導体の抗腫瘍
メカニズムの検討
.....小笠原勝, 本田裕恵, 柳橋努, 渡邊康春, 松永孝之, 高津聖志..... 24

• 培養細胞を対象とした相対定量プロテオーム解析 ……………小島理恵子, 渡邊康春, 南谷武春, 柳橋努, 相川幸彦, 富山県薬事研究会生物部会…………… • ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討 (第4報) ……………柚木芳, 高山信幸, 米田哲也, 小笠原勝, 薬事研究会分析部会…………… • 富山シャクヤクのブランド化推進事業－生産者の持続的な出荷を支援するための 乾燥調製法の実証試験－ ……………田村隆幸, 高山信幸, 渡会三千代, 宮崎有弘, 東一彦, 小笠原勝……………	36 46 56
--	----------------

V 資 料

• 「令和6年度分析データ信頼性確保事業」事業報告 ……………小笠原勝, 米田哲也, 高山信幸, 柚木芳……………	66
--	----

VI 講演・学会発表など

1. 講演・学会発表・誌上发表・共同研究論文 ……………	74
2. 知的所有権 ……………	77

指導業務など

VII 指 導

A 創薬研究開発センター・製剤開発支援センター

1. 講演会 ……………	78
2. 分析技術講習会 ……………	78
3. 開放試験室, 試験機器の利用 ……………	79
4. 製剤機器の利用 ……………	79
5. 相談者に対する指導 ……………	79
6. 講習会等 ……………	80

B 薬用植物指導センター

1. 栽培技術指導 ……………	81
2. 種苗の供給状況 ……………	81
3. 薬草教室 ……………	81
4. 講習会等 ……………	81
5. 生薬調製機械の利用 ……………	82
6. 見学者数 ……………	82
7. 相 談 ……………	82

VIII 試 験

1. 一般依頼試験 83
2. 行政依頼試験 83
3. 後発医薬品品質情報提供等推進事業 83
4. 登録試験検査機関における外部精度管理試験 83

IX 審 査..... 84

X そ の 他

1. 客員研究員招へい事業 84
2. 外部評価委員会の開催 84

<参考資料>

1. 条例・規則 85
2. 年報投稿及び執筆規程 94

組 織 ・ 運 営

I 総 括

A. 薬事総合研究開発センター

1. 沿革

昭和4年10月	富山県売薬同業組合立売薬試験場が設置される（富山市千石町）
昭和7年4月	富山県に移管され富山県売薬試験場となる
昭和10年9月	富山県庁内に移転（富山市新総曲輪1）
昭和19年4月	富山県薬業指導所と改称
昭和22年11月	富山県薬務課試験室と改称
昭和27年8月	富山県薬事研究所と改称され移転新築（富山市千歳町1-4）
昭和40年4月	庶務課，製剤研究課，医薬品試験課の3課を設置
昭和55年4月	薬草園が付設となる（中新川郡上市町広野）
昭和58年4月	薬草園が薬用植物指導センターと改称
昭和60年10月	新庁舎が完成し移転（射水郡小杉町（現 射水市）中太閤山17-1）
昭和60年10月	庶務課，薬剤薬理研究課，バイオテクノロジー・和漢薬研究課，医薬品試験課の4課制となる
平成4年4月	庶務課が総務課と改称
平成16年4月	総務課が衛生研究所及び環境科学センターと事務統合
平成27年3月	製剤開発・創薬研究支援ラボ開設
平成28年4月	国立医薬品食品衛生研究所の共同研究拠点の設置
平成30年4月	薬事総合研究開発センターに改称し，創薬研究開発センター，製剤開発支援センター，薬用植物指導センターの3センター体制となる
平成30年5月	創薬研究開発センター開所
平成31年4月	研究協力課の設置

2. 位置・交通

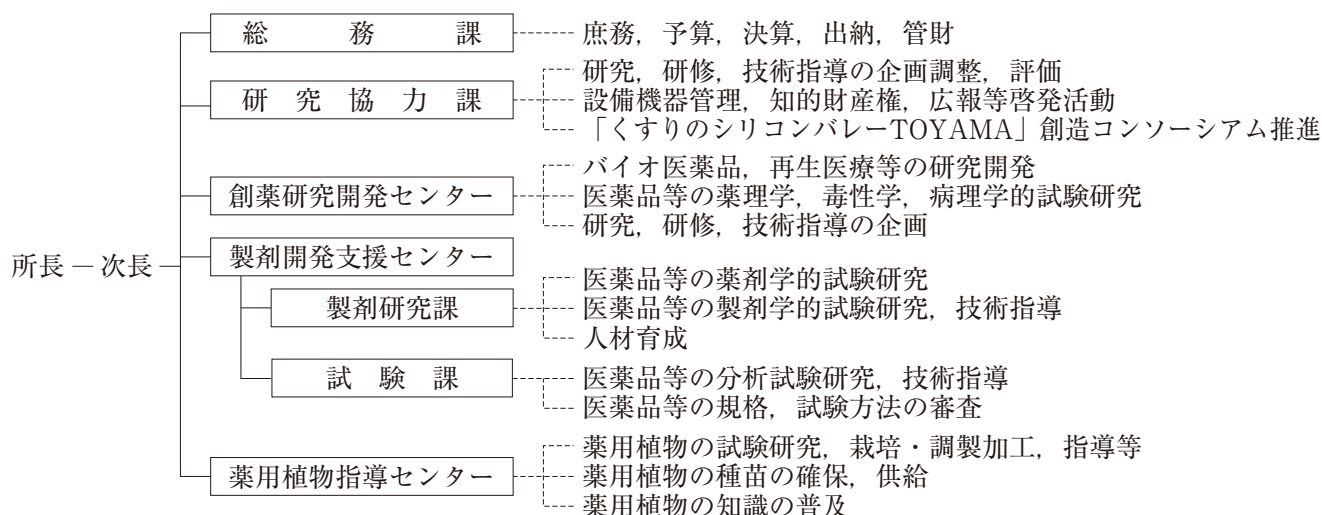
富山県射水市中太閤山17-1
あいの風とやま鉄道小杉駅より3km
北陸自動車道小杉インターチェンジより約3km

3. 土地 敷地面積 30,464.33 m²

4. 建物

研 究 棟	鉄筋コンクリート造2階建	1,969.88 m ²
動物実験棟	鉄筋コンクリート造平屋建	293.81 m ²
創薬研究開発センター棟	鉄骨造	1,287.15 m ²
そ の 他		333.49 m ²
計		3,884.33 m ²

5. 組織・業務(令和6年4月1日現在)



6. 職員

(令和6年4月1日)

所次	長	合	田	幸	広
次	長	長	谷川	千	佳
総務課					
課長	京	部	公	俊*	
係長	昇	野	陽	子**	
係主	狩	奥	佳	永子**	
主事	国	井	美	希**	
	関		久	代*	
研究協力課					
課長	浅	井	直	子	
主任研究員	小	林	直	人	
創薬研究開発センター					
センター長	相	川	幸	彦	
副主任幹研究員	南	谷	武	春	
主任研究員	柳	橋	康	努	
主任研究員	渡	邊	理	春	
主任研究員	小	島	恵	子	
(兼務)	本	田	裕	恵	
製剤開発支援センター					
センター長	小笠原		勝		
製剤研究課					
課長	本	田	裕	恵	
主任研究員	永	井	秀	昌	
技術指導員	林	林	正	幸	
(兼務)	小		直	人	
試験課					
課長(兼)	小笠原		勝		
主任研究員	米	田	哲	也※	
主任研究員	高	山	信	幸	
研究員	柚	木		芳	
薬用植物指導センター					
センター長	渡	会	三千代		
副主任幹研究員	宮	崎	有	弘	
主任研究員	田	村	隆	幸	
技術指導員	東		一	彦	

*衛生研究所, 環境科学センターを兼務

(令和7年4月1日)

所次	長	合	田	幸	広
次	長	渡	会	三	代
総務課					
課長	京	部	公	俊*	
副主任	大	西	裕	子**	
副主任	昇	奥	陽	子**	
主任	国	嶋	芙	子**	
主任専門員	中			謙*	
研究協力課					
課長	浅	井	直	子	
主任研究員	小	林	直	人	
創薬研究開発センター					
センター長	相	川	幸	彦	
副主任幹研究員	南	谷	武	春	
主任研究員	柳	橋	康	努	
主任研究員	渡	邊	理	春	
主任研究員	小	島	恵	子	
(兼務)	本	田	裕	恵	
製剤開発支援センター					
センター長	小笠原		勝		
製剤研究課					
課長	本	田	裕	恵	
主任研究員	永	井	秀	昌	
技術指導員	林	林	正	幸	
(兼務)	小		直	人	
試験課					
課長(兼)	小笠原		勝		
主任研究員	米	田	哲	也※	
主任研究員	高	山	信	幸	
研究員	柚	木		芳	
薬用植物指導センター					
センター長(兼)	渡	会	三千代		
副主任幹研究員	山	田	宗	孝	
主任研究員	田	村	隆	幸	
技術指導員	東		一	彦	

※衛生研究所を兼務

7. 予算・決算

(1) 令和6年度事業別予算

事業名	予算額	財源内訳		備考
		手数料等	一般財源	
薬事研究推進事業費	千円 30,367	千円 1,395	千円 28,972	※[薬事研究推進事業費]は、薬事研究所費、薬用植物指導センター費及び薬理毒性研究費の一部並びに医薬品等試験研究費、和漢薬研究費を一事業に統合したもの
薬事総合研究開発センター費	28,436	13,700	14,736	
創薬研究開発センター費	10,662	2,779	7,883	
薬用植物指導センター費	13,739	1,280	12,459	
薬理毒性研究費	3,415		3,415	
バイオテクノロジー研究費	2,366		2,366	
免疫応用医薬品探索研究費	2,528		2,528	
富山シャクヤクのブランド化推進事業費	3,502		3,502	
バイオ医薬品製剤研究費	16,000	12,000	4,000	
科研費等間接経費	780	780		
医薬品品質評価研究費	34,755	3,555	31,200	
薬用植物生産技術開発研究費	1,300	1,300		
医薬品製造専門人材育成事業費	8,800	6,733	2,067	
計	156,650	43,522	113,128	

(2) 令和6年度歳入決算

款項目節	予算額	決算額	増減額	備考
使用料及び手数料	円 11,127,000	円 9,679,880	円 △ 1,447,120	
使用料	10,692,000	9,624,710	△ 1,067,290	
衛生使用料	10,692,000	9,614,330	△ 1,077,670	
薬事総合研究開発セ	10,692,000	9,614,330	△ 1,077,670	
薬事総合研究開発セ	4,700,000	3,169,720	△ 1,530,280	
試験開発研究費	2,142,000	1,468,800	△ 673,200	
薬事研究推進事業費	1,395,000	945,560	△ 449,440	
薬用植物指導センター費	70,000		△ 70,000	
創薬研究開発センター費	2,385,000	4,030,250	1,645,250	
その他使用料		10,380	10,380	
その他使用料		10,380	10,380	
一般財源事業		10,380	10,380	
手数料	435,000	55,170	△ 379,830	
衛生手数料	435,000	55,170	△ 379,830	
医薬品試験	435,000	55,170	△ 379,830	
試験開発研究費	41,000	43,470	2,470	
創薬研究開発センター費	394,000	11,700	△ 382,300	
財産収入	1,210,000	1,259,955	49,955	
財産運用収入		34,430	34,430	
財産貸付収入		34,430	34,430	
建物貸付料		34,430	34,430	
一般財源事業		34,430	34,430	
財産売払収入	1,210,000	1,225,525	15,525	
生産物売払収入	1,210,000	1,225,525	15,525	
試験開発研究費	0	0	0	
薬用植物指導センター	1,210,000	1,225,525	15,525	
薬用植物指導センター費	1,210,000	1,225,525	15,525	
諸収入	10,230,000	2,829,510	△ 7,400,490	
受託事業収入	10,080,000	2,614,000	△ 7,466,000	
薬事研究所受託収入	10,080,000	2,614,000	△ 7,466,000	
薬事研究所受託事業	10,080,000	2,614,000	△ 7,466,000	
試験開発研究費	10,080,000	2,614,000	△ 7,466,000	
雑入	150,000	215,510	65,510	
雑入	150,000	215,510	65,510	
納付金		36,359	36,359	
試験開発研究費		0	0	
一般財源事業		36,359	36,359	
雑入	150,000	179,151	29,151	
試験開発研究費	150,000	150,000		
一般財源事業		29,151	29,151	
計	22,567,000	13,769,345	△ 8,797,655	

(3) 令和6年度歳出決算

款 項 目 節			決算額	備 考
総 務 費			円 315,190	
	総務管理費		315,190	
		人事管理費	63,300	
		旅費	63,300	
		財産管理費	251,890	
衛 生 費		役務費	251,890	
			148,331,957	
	薬 務 費		148,331,957	
	薬品取締費		11,997,197	
		報酬	2,331,763	
		職員手当等	729,156	
		共済費	14,890	
		旅費	146,620	
		需用費	4,545,000	
		役務費	2,467,788	
		委託料	1,164,020	
		使用料及び賃借料	597,960	
	薬業振興費		967,330	
		需用費	297,330	
		役務費	670,000	
	薬事総合研究開発センター費		135,367,430	
		報酬	20,795,531	
		職員手当等	5,468,448	
		共済費	1,079,927	
		報償費	56,000	
		旅費	3,382,053	
		需用費	38,317,989	
		諸費	13,110	
		役務費	10,113,983	
		委託料	45,020,049	
		使用料及び賃借料	1,038,690	
		工事請負費	7,920,000	
		備品購入費	2,023,700	
		負担金補助及び交付金	129,150	
		公課費	8,800	
農林水産業費			171,220	
	農 業 費		171,220	
		園芸特産対策費	171,220	
		旅費	71,220	
		需用費	100,000	
商 工 費			3,111,243	
	工 鉱 業 費		3,111,243	
		工鉱業総務費	3,111,243	
		報償費	48,000	
		旅費	52,963	
		需用費	2,010,280	
		負担金補助及び交付金	1,000,000	
合 計			151,929,610	

8. 備 品

(最近15年・取得価格100万円以上)

品 名	取得年月日	数量	型 式
超高压液体クロマトグラフ	22.10.29	1	日本ウォーターズACQUITY UPLC H-CLASS
ガスクロマトグラフ用ワークステーション	23. 6. 6	1	島津製作所 GC solution
自動細胞分析装置	23. 7.14	1	日本ベクトンディッキンソン BD FACSCanto TM II フローサイトメーター
試作用錠剤フィルムコーティング装置	24. 1.30	1	フロイント産業 ハイコーターラボHC-LABO
口腔内崩壊錠試験器	24.11.21	1	富山産業 ODT-101
乾式造粒機	26. 2.13	1	フロイント産業 ローラーコンパクター TF-LABO
レーザー回折式粒子径分布測定装置	27. 2.18	1	島津製作所 SALD-2300
味覚試験装置	27. 2.20	1	インテリジェント・センサー・テクノロジー TS-5000Z
In vivoイメージング装置	27. 2.24	1	パーキンエルマー IVIS Lnmina III
共焦点レーザー顕微鏡	27. 2.26	1	ニコン C 2 +
ガスクロマトグラフ	27. 2.26	1	島津製作所 GC-2014AF/SPL
ヘッドスペース分析システム	27. 2.26	1	島津製作所 GC-2010Plus HS-20
分子間相互作用解析装置	27. 6.29	1	GEヘルスケア・ジャパン Biacore T200
半自動型PTP包装機	27. 7.31	1	大和化成工業 K-200KS-DK
施光計	28. 3.18	1	日本分光 P-2200
原子吸光分光光度計	28. 3.29	1	島津製作所 AA-7000 フレーム／ファーンレス フルシステム
スクリュウ型押出造粒機	28.10.28	1	ダルトン マルチグランMG-55型
マルチチップ杵及び臼	28.10.31	1	ファーマシン
複合型流動層造粒コーティング装置	28.12.16	1	パウレック マルチプレックスFD-MP-01型
多機能超高速液体クロマトグラフシステム	29. 3.10	1	ウォーターズACQUITY UPLC H-CLASS Bioシステム
真空凍結乾燥機	29. 8.22	1	朝日ライフサイエンス FZ-18／STD型
高速細胞ソーター	29. 9.15	1	日本ベクトン・ディッキンソン BD FACS Aria TM III セルソーター
CCDカメラタイプ画像解析装置	30. 2.15	1	エムエス機器 FUSION-FX 7, EDGE
液体クロマトグラフタンデム四重極質量分析計 (LC-MS／MS)	30. 3.16	1	日本ウォーターズ Xevo TQ-XS
安全キャビネット	30. 3.16	1	ESCO WY-ESC-AC 2 - 6 N7
マイクロ天秤	30. 3.19	1	メトラー・トレド XPR 6 UD 5 V
大型オートクレーブ	30. 3.22	1	ウドノ医機 UH68-U10H-D-M
飛行時間型質量分析計ハイブリッド型液体クロマトグラフ高分解性能質量分析システム	30. 3.22	1	ブルカー・ダルトニクス MAXIS
誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS)	30. 3.22	1	アジレント・テクノロジー Agilent 7900／Multiwave PRO
マイクロ冷却遠心機	30. 3.22	1	トミー精工 MX-307
セミマイクロ天秤	30. 7.26	1	ザルトリウス・ジャパン MSA225S-000-DI
自動融点測定装置	30. 8.22	1	スタンフォードリサーチシステムズ MPA-100
キャピラリー電気泳動システム	30. 8.23	1	エービー・サイエックス PA800 plus
顕微赤外分光光度計システム	30.10.19	1	日本分光 FT／IR-6600, IRT-5200
超遠心分離機	31. 1.11	1	ベックマン・コールター OptimaMAX-XP

品名	取得年月日	数量	型式
卓上型電子顕微鏡	31. 3.15	1	日立テクノロジーズ TM4000plus
圧縮特性評価装置	31. 3.27	1	日本バリデーションテクノロジーズ GTP-2
比表面積測定装置	31. 3.27	1	マイクロトラック・ベル BELSORP-miniX-SP
貼付剤試作機	31. 3.28	1	コスメディ製薬 TransCoat SM15
試作用真空乳化機	31. 3.29	1	ブライミクス アジホモミクサー2M-2/5
容器回転式混合機	31. 3.29	1	徳寿工作所 容器着脱式回転混合機TCV-5
プロテオーム解析用高精度質量分析システム	1. 9.19	1	サーモフィッシャーサイエンティフィック
LC-MS専用ナノHPLC	1. 9.19	1	エーエムアール
卓上型粉砕機	2. 1.30	1	ホソカワミクロン MA013006305-007-1
個別換気飼育システム	2. 3. 9	1	77180AWR / KN-734-X1
固形連続生産システム	2. 3.12	1	フロイント産業 GF-labo
超低温冷凍庫	2. 7.20	1	日本フリーザー CLN-70CW
液体クロマトグラフ	3. 3.17	1	日本ウォーターズ Alliance HPLC Systems
サンプル密閉式超音波破碎装置	3. 9. 8	1	ソニック・バイオ BR2012A
エンドトキシン測定器	4. 1. 6	1	チャールス・リバー CES-PTS150NW0400K
プレートリーダー	4.11.18	1	サーモフィッシャー Multiskan SkyHigh TD
リアルタイムPCRシステム	5. 1.10	1	バイオ・ラッド リアルタイムPCRシステム
溶出試験器	5.10.26	1	富山産業 NTR-6600A
凍結切片作製装置	5.10.27	1	ライカマイクロシステムズ CM1860UV

B. 薬用植物指導センター

1. 沿革

- 昭和42年4月 富山県薬草園が設置される（中新川郡上市町広野）
昭和42年10月 庁舎が建設される
昭和45年10月 調製加工棟が建設される
昭和55年4月 富山県薬事研究所の付設機関となる
昭和58年4月 富山県薬用植物指導センターに改称される
昭和62年3月 本館とガラスハウスが建設される
昭和63年10月 薬草標本園が整備される
平成8年3月 薬草標本園の見学路の拡充およびボタン園の排水工事を完了する
平成10年3月 駐車場の新設およびハーブ園の移設ならびに案内看板の設置
平成11年6月 温室の新設
平成14年3月 薬草標本園見学路の舗装
平成22年3月 シャクヤク園通路の木タイル舗装
平成30年4月 薬事総合研究開発センター薬用植物指導センターの体制となる
平成31年3月 栽培技術，生薬生産技術，座学の3研修エリアを備えた新研修棟の整備

2. 位置・交通

富山県中新川郡上市町広野2732
北緯 36° 43′ 東経 137° 23′ 標高 62 m
富山地方鉄道本線上市駅から3.5 km
北陸自動車道立山I.C.から7.5 km，滑川I.C.から4.5 km

3. 土地 敷地面積 43,050 m²

4. 建物

庁舎（管理・研修棟）	鉄筋造平屋	899.33 m ²
育苗ガラスハウス	鉄筋造平屋	132.30 m ²
温室	鉄筋造平屋	213.37 m ²
ボイラー室	鉄筋造平屋	15.94 m ²
計		1,260.94m ²

5. 主要備品

品名	取得年月日	数量	型式
薬草洗浄機	H 1.10.31	1	住吉工業
トラクター	H 3. 5.29	1	ヤンマー F395D
管理機	H 5. 6.20	1	ヤンマー PST60V
蒸留水製造装置	H 8. 6.11	1	岩城硝子ASK-2DS
温度勾配恒温器	H11. 7. 1	1	日本医化器械TG-100ADCT
試料粉碎機	H11. 7. 1	1	アクタックサイクロテック-1093
冷凍庫	H24. 9. 6	1	ホシザキ電機HF-120ZT3
分光色差計	H27. 6.16	1	日本電色工業NF555
トラクター	H28. 3.18	1	クボタSL41CQMANWF8C
温湯処理機	H28. 7.21	1	タイガーカワシマYS-501M
管理機	H31. 1.15	1	ヤンマー YK750RK-LM4・HK
生薬原料洗浄機	H31. 3.14	1	タニザキ鉄工
掘り取り機	H31. 3.15	1	川辺農研産業製 バイブロスーパーリイラー
平型乾燥機	H31. 3.19	1	大紀産業 平型乾燥機HK-200-3.3C
減圧乾燥機	H31. 3.22	1	日本バイオコン 減圧乾燥機IBS-1223
自走式動力噴霧機	R 1. 7.26	1	やまびこ 共立キャリー動噴 VSC457
クローラ運搬車	R 2. 2. 4	1	やまびこ NKCG150D-LBV
定寸切り機	R 4. 8. 5	1	共栄エンジニアリング KKS-520エアーコンプレッサー
フリーザー	R 5. 2. 8	1	日本フリーザー(株) GS-5210HC
播種機	R 6. 5.23	1	アグリテクノサーチ FPZ-10

Ⅱ 薬事総合研究開発センターこの一年

1. 各センターの取り組み

創薬研究開発センター

センター長 相川 幸彦

当センターでは、*in vitro*から*in vivo*まで、様々な研究目的、研究手法に対応できる機器、環境ならびに技術／経験を駆使し、創薬・育薬研究並びに技術支援を行っている。くすりコンソ事業からの2つのプロジェクトについても引き続き推進し、プロテオーム解析技術の展開も図っている。

【創薬・育薬研究】令和6年度は、下記のテーマに取り組んだ。

- 1) 経鼻ワクチンの実用化とウイルス感染の予防に向けた研究: 粘膜免疫応答に有効な新規アジュバント（免疫賦活剤）の実用化に向けた研究・開発を継続している。BioJapan2024, 関西バイオビジネスマッチング2024にて紹介するなど、渉外活動を行った。
- 2) NLRP3 インフラマソーム阻害剤Isoliquiritigenin (ILG) の作用機序の解明と機能性表示食品としての有用性の検討に: 企業協力のもと、ILG高含有甘草エキスの機能性表示食品素材としての有用性の評価を進め、BioJapan2024, 関西バイオビジネスマッチング2024にて研究紹介を行った。また、作用機序解析に繋がる標的分子の探索などを実施した。
- 3) プロテオーム解析基盤の構築_創薬研究開発の県内振興を目指して: Orbitrap Fusion Lumos Tribrid質量分析装置を用いたプロテオーム解析法の構築と利用促進に努めた。企業利用への技術支援、共同実施を通して、解析対象の幅を広げた。R6年度の生物部会の活動として、プロテオーム解析の技術的可能性の理解と、実際にその手法を経験することを目的とした「培養細胞を対象とした相対定量プロテオーム解析」を実施した。この他にもData Independent Acquisition (DIA) 解析を導入し、安価で高深度プロテオーム解析が実施可能であることを確認した。バイオ医薬品の品質特性分析技術についても国立医薬品食品衛生研究所のAMED班会議に参加し、情報収集を行った。
- 4) バイオ医薬品の創出に係る新規技術の構築 ー抗原特異的抗体産生細胞の同定とクローニングー: 抗体医薬品の開発に繋がる抗体取得技術について、抗体遺伝子のクローニング、発現系の確立まで進めることができた。
- 5) 科研費等の外部資金による課題（3テーマ）: 各研究において、新たな研究技術並びに知見の習得に取り組み、継続的に研究スキルの向上を図っている。
- 6) 研究交流活動、等: 新たにスタートしたネクスト・ファーマ・エンジニア 養成コース(富山くすりコンソ人材育成事業)において、講義（オンデマンド）を担当した（感染・非感染症の免疫機構と創薬／渡邊主任研究員、慢性炎症と生活習慣病／本田製剤研究課長）。

【技術支援業務など】

- ・生物製剤の品質評価に関わる研究手法の検討: 薬事研究会生物部会では、「培養細胞を対象とした相対定量プロテオーム解析」を実施した（本誌 研究報告に掲載 小島主任研究員）。

製剤開発支援センター

センター長 小笠原 勝

◆製剤・分析技術支援

当センターでは、県内製薬メーカーにおける製剤開発や医薬品の品質評価・規制対応に関する技術支援を行っている。今年度、製剤機器は、年間500件、延べ1572時間ご利用いただいた。利用頻度はロータリー式打錠機が最も多く（71件、239時間）、その他、錠剤硬度計（67件、228時間）、錠剤フィルムコーティング装置（24件、101時間）、攪拌造粒機（28件、72時間）、レーザー回折式粒子径分布測定装置（37件、91時間）、卓上走査型電子顕微鏡（36件、69時間）、比表面積測定装置（40件、154時間）、圧縮特性評価装置（15件、72時間）、容器着脱式回転混合機（28件、94時間）も多くの方々にご利用いただいた。また、製剤開発の世界的な将来動向を見据え導入した造粒乾燥連続装置については、富山県薬事研究会製剤部会において県内製薬メーカー7社8名と「連続生産方式による医薬品製造法の検討－スケールアップ時における製剤品質の一貫性確保の検証－」をテーマに共同研究に取り組んだ。今後、富山県薬業連合会とも連携しながら製剤技術者の知識・経験の蓄積に取り組んでいくこととしている。

医薬品の品質評価・規制対応に関する支援においては、令和元年度から誘導結合プラズマ質量分析計による元素不純物分析について本格的に技術支援を開始し（令和元年度：7件、令和2年度：22件、令和3年度：48件、令和4年度：41件、令和5年度：46件）、今年度は23件、49時間ご利用いただいた。また、富山県薬事研究会分析部会において県内製薬メーカー10社12名と「ICP-MSを活用した医薬品中の元素不純物分析」をテーマに共同研究に取り組んだ。令和3年6月に告示された第18改正日本薬局方において医薬品中の元素不純物管理が通則に収載されたことから、猶予期間が終了した令和6年7月からは日本薬局方の製剤は原則として一般試験法の<2.66>元素不純物に係る規定に従い適切な管理が不可欠となっている。今後も継続して支援を進めていく。

◆専門人材の育成

くすりの富山エキスパート支援事業において、製剤及び医薬品分析に関する実習を行った（滑川高校薬業科37名及び富山北部高校くすり・バイオ科73名参加）。また薬剤師のお仕事体験学習において、中学生及び高校生を対象に製剤及び医薬品分析に関する実習を行った（中学生：製剤実習15名、分析実習10名参加；高校生：製剤実習14名、分析実習6名参加）。

富山大学との連携事業として、薬学部生を対象に製剤実習あるいは製剤講義を行った（講義1回、約40名参加、実習3回、延べ約40名参加）。また、工学部大学院生のファーマ・メディカルエンジニア養成プログラムにおいて製剤講義を実施した（講義1回、約70名参加）。さらに、企業人を対象とした次世代スーパーエンジニア養成コースにおいて製剤講義を実施した（講義1回、約30名参加）。富山県立大学との連携事業として、医薬品工学科の学生を対象に製剤実習を実施した（実習3回、延べ約40名参加）。その他として、高岡工芸高校の施設見学を受け入れた（12名参加）。今後も引き続き専門人材の育成に取り組んでいく。

富山県薬業連合会と連携し、製剤技術研修会を実施した（8回実施、延べ1,268名参加）。また、医薬品の品質管理に携わる技術者の分析技術の維持向上を目指した外部精度管理事業（分析データ信頼性確保事業）を実施した（6種の試験項目、延べ189施設参加）。当センター職員が講師となり、県内製薬メーカーの分析技術者を対象に初任者研修事業を行った（HPLCコース：5名/回、6回実施；電位差滴定装置・水分計コース：5名/回、6回実施）。また、HPLCのメンテナンス・

トラブル対応をテーマにHPLC装置メーカーによる研修会を昨年度に引き続き企画実施した（島津製作所製HPLCコース：6名/回，6回実施；Waters社製HPLCコース：9名/回，2回実施；アジレント社製HPLCコース：6名/回，2回実施）。いずれの研修会も大変好評をいただいた。今後も継続していくこととしている。その他，ICP-MSを用いた元素不純物分析に関する講習会を2日間に渡り実施した（53名参加）。1日目は試料のマイクロ波分解の実習，2日目はICP-MS分析の実習を行った。いずれも大変好評をいただいた。また，今年度も各種分析技術講習会を実施した（4回実施，延べ158名参加）。次年度以降も，WEB配信方式等も引き続き取り入れ，多くの方々にご参加いただけるように工夫し，要望に沿った講習会等を企画していく。

◆研究業務

「くすりのシリコンバレー TOYAMA」創造コンソーシアム事業などを通じてこれまでに製品化した国産のミニタブレット用杵臼を用いて，高齢者用ミニタブレットの開発を今年度も引き続き実施した。実験計画法により確立した条件を用いて腸溶性コーティングを施したミニタブレットを作製したところ，その品質は日本薬局方の崩壊試験（腸溶錠）と含量均一性試験に適合することが確認できた。今後，県内製薬メーカーとの共同開発に繋げられるよう引き続き検討を進める予定である。

連続生産方式による医薬品製造技術に関する研究及び医薬品中の不純物分析に関する研究について，富山県薬業連合会から事業費補助を受け，富山県薬事研究会製剤部会及び分析部会と共同で実施した。連続生産技術に関する研究では，実験計画法を用いて目標とする重要品質特性（錠剤硬度，崩壊時間等）の管理幅を満たすデザインスペースを作成した。併せて，PAT機器でモニタリング可能な水分量と平均粒子径を指標としたデザインスペースも作成した。これらより，PAT機器を用いた製品品質の保証と製造スケール変更時の利用が可能となった。さらに，スケールアップを想定し同一装置で処理速度を大きくした場合及び実生産機を用いた場合においても，構築したデザインスペースが適用できることを明らかにした。

医薬品中の不純物分析に関する研究では，LC-TOF/MSを用いた生薬中の不純物の分析，アミン構造を持つ化合物のニトロソ化体の生成検討，医薬品の強制劣化処理における分解不純物の分析を行った。LC-TOF/MS測定から得られた精密質量とMS/MSフラグメント解析を駆使することで，多くの不純物について化学構造を推定することができた。その他，医療用プラスチック容器からの抽出物・浸出物の分析法の構築，アルキル水銀の簡便な分析法の開発，医薬品中DNA反応性(変異原性)不純物の分析法の構築，核酸医薬品の分析法の構築を進めた。また，国立医薬品食品衛生研究所生薬部が進めている天然物医薬品の安全性評価検討班（重金属）に参画した。

◆行政関連業務

厚生労働省からの委託を受け，後発医薬品品質確保対策事業にて溶出試験を実施した。国立医薬品食品衛生研究所の製剤ワーキンググループに参画し，後発医薬品品質情報提供等推進事業を推進した。一般用医薬品の定量試験を実施した。医薬品等の地方委任品目の製造販売承認申請書の規格及び試験法の審査を実施した。

◆その他

柚木研究員が，（公財）田村科学技術振興財団より研究助成を受けた。高山主任研究員が，（公財）富山第一銀行奨学財団賞を受賞した。

薬用植物指導センター

センター長 渡会 三千代

◆研究活動

<富山シャクヤクのブランド化推進事業：県費>

令和5年の農家産ブランドシャクヤクについても無事に出荷することができ、「春の粧」に対する認知度も少しずつ上昇しているようだ。この影響により、シャクヤクに限らず、その他の薬用植物の栽培に対しても興味を持つ人も増えてきていて、問い合わせも多くなっている。数年前まで、参加者が少なくて困っていた研修会や講習会にも多くの栽培希望者が参加するようになった。この勢いによって、国産の生薬の生産量を増やし、最近の不安定な国際情勢下で医薬品原料の安定供給に寄与できるよう、今後とも研究を続けていきたい。

<栽培化に向けたシナマオウ優良株の選抜：県費>

県内でのマオウの栽培化を目標に、センター内圃場で栽培しているマオウの優良株を選抜する試験を継続中である。収穫量や成分含量についての調査を実施している。

<トウキ栽培の省力化に向けた播種機及び肥効調節型肥料の活用：日本医療研究開発機構（AMED）創薬基盤推進研究事業>

生薬としての利用以外にも葉を入浴剤として利用するなど、富山県では近年トウキの栽培を希望する農家が増えている。課題となっている作業の効率化を図るために、令和6年度は播種機を使用し、定植に適した苗の生産性を指標に播種条件について検討するとともに、慣行法より大幅に作業時間が短縮できることを確認した。

<トウキ育苗における追肥の影響調査：科学研究費助成事業（科学研究助成基金助成金）基盤研究C>R6年度～

トウキ育苗における追肥が苗の生育と定植後の生育に及ぼす影響を明らかにするため、追肥試験区の播種後の生育調査を実施し、対照区と比較した。

<持続可能な薬用植物の生産基盤技術開発及び産地形成に関する研究：日本医療研究開発機構（AMED）創薬基盤推進研究事業 ※研究参加者として参加>

- ・医薬基盤・健康・栄養研究所作製シャクヤク培養苗の圃場栽培
交配、採種実験、定植後の生育調査を実施した。
- ・センブリ組織培養－圃場ハイブリッド栽培と早期抽苔法の確立
圃場提供と定植後の管理

◆薬用植物の栽培並びに知識の普及の取組み

PMDA漢方セミナーで海外の薬事行政官に対してのセンターの概要及び研究内容等の説明・講義を実地で実施した。その他、富山大学の学生や（公財）日本薬剤師研修センターの研修受講者並びに、県のきらめきエンジニア事業での高校生への実地の講義を行った。

また、毎年5月に多くの見学者で賑わうシャクヤク園は、令和6年度より、見学者用スペースと栽培試験圃場を明確に区別して試験圃場への立ち入りを制限し、効率よく安全に見学いただけるように配慮した。大きなトラブルもなく、シャクヤクを鑑賞いただくことができ、県民の皆様のウェルビーイングの向上に貢献できたと思う。

2. 視察・取材等

A. 創薬研究開発センター・製剤開発支援センター

7月22日	奈良県製薬薬剤師会 視察
9月10日	三重県薬業振興担当（県庁、工業研究所職員）視察
9月20日	高岡工芸高等学校 施設見学
10月23日	バーゼルからの派遣学生 訪問
10月24日	日本製薬工業協会研究開発委員会 視察
3月5日	日本製薬団体連合会品質委員会 視察

B. 薬用植物指導センター

5月11日	朝日新聞取材
5月14日	NHK取材
5月14日	北日本新聞取材
5月16日	薬日新聞取材
5月17日	富山県映像センター取材
5月17日	ケーブルテレビNet 3取材
5月20日	厚生部長視察
7月10日	富山大学和漢医薬学総合研究所視察 1名
7月22日	奈良県薬剤師会視察 8名
7月24日	医薬基盤・健康・栄養研究所視察 3名
10月28日	J Aひみ視察 2名
11月11日	三協立山(株)視察 2名
11月25日	日本経済新聞取材
12月2日	福井県の農業者視察 2名

Ⅲ 研 究 活 動

1. 競争的外部資金等を活用した研究課題

(1) 科学研究費補助金（文部科学省）

研 究 課 題	研 究 者 名
NLRP3 インフラマソーム阻害作用を持つ天然物を活用した創薬研究への展開 (学術研究助成基金助成金) (基盤C, 代表者)	本田裕恵
視床下部炎症を誘導する自然免疫シグナル経路の解析：摂食調節異常機構の解明 (学術研究助成基金助成金) (基盤C, 代表者)	渡邊康春 (分担者：群馬大学 今野渉)
新規のパーキンソン病モデル酵母を用いた病因遺伝子の機能解析と創薬への応用 (学術研究助成基金助成金) (基盤C, 代表者)	小島理恵子
酪酸の標的であるHDACアイソザイムによる腸炎抑制機構の解明 (学術研究助成基金助成金) (基盤B, 分担者)	渡邊康春 (代表者：富山県立大学 古澤之裕)
セリ科三生薬の生産に関する日本固有の知識・技術の検証と最適化 (学術研究助成基金助成金) (基盤C, 分担者)	田村隆幸 (代表者：九州医療科学大学 渥美聡孝)

(2) その他の研究補助金

研 究 課 題	研 究 者 名
日本医療研究開発機構（AMED）創薬基盤推進研究事業 薬用植物の産地拡大に向けた生産技術の開発研究 分担課題：栽培技術の基盤整備（トウキ栽培の体系化）	田村隆幸，宮崎有弘， 渡会三千代，東一彦 (代表者：東京農業大学 菱田敦之)
令和6年度フロンティア研究推進事業 新規粘膜アジュバントの作用機序解析	相川幸彦，南谷武春， 柳橋努，渡邊康春， 柚木芳 (富山県立大との共同研究)
田村科学技術振興財団助成事業 医薬品の容器包装および製造器具由来の不純物：網羅的化合物解析と計算科学的な安全性評価を紐づけたデータベースの構築と活用	柚木芳，小笠原勝， 米田哲也，高山信幸

2. 「くすりのシリコンバレー TOYAMA」創造コンソーシアム 研究開発事業

研 究 課 題	研 究 者 名
経鼻投与ワクチンの実用化とウイルス感染予防に向けた研究 (高齢者に有効なワクチンの開発)	合田幸広, 高津聖志, 長谷川千佳, 相川幸彦, 渡邊康春, 柳橋努, 南谷武春, 本田裕恵, 小島理恵子, 柚木芳, 小林直人 (富山県立大学との共同研究)
免疫代謝の調節による生活習慣病の予防研究 (イソリクイリチゲニンと関連物質による糖尿病予防効果)	合田幸広, 高津聖志, 相川幸彦, 本田裕恵 (企業, 富山県立大学との共同研究)

3. 上記以外の研究課題

研 究 課 題	研 究 者 名
富山シャクヤクのブランド化推進事業	合田幸広, 長谷川千佳, 渡会三千代, 宮崎有弘, 田村隆幸, 高山信幸, 小笠原勝, 東一彦
プロテオーム解析手法によるタンパク質の網羅的相対定量の実践 —培養細胞を対象として—	小島理恵子, 渡邊康春, 南谷武春, 柳橋 努, 相川幸彦 (薬事研究会生物部会)
製剤開発に関する研究 1. 飲みやすい小児用ミニタブレットの開発 2. 連続生産方式による医薬品製造法の検討	永井秀昌, 林正幸 本田裕恵, 小林直人
医薬品の品質評価等に関する研究 1. 後発医薬品の品質評価事業 (厚生労働省委託事業) 2. 県内医薬品製造業者の分析データ信頼性確保事業 3. ICP-MSを活用した医薬品の品質管理への応用 4. LC-TOF/MSを用いた不純物分析法の構築 5. 核酸医薬品の分析法の構築 6. 抽出物・浸出物の評価試験系の構築	米田哲也, 高山信幸, 柚木芳, 小笠原勝
栽培化に向けたシナマオウ優良株の選抜	田村隆幸, 高山信幸, 宮崎有弘, 渡会三千代, 東一彦, 小笠原勝
プロテオーム解析基盤の構築: 創薬研究開発の県内振興を目指して	小島理恵子, 渡邊康春, 南谷武春, 相川幸彦
バイオ医薬品の創出に係る新規技術の構築 —抗原特異的抗体産生細胞の同定とクローニング—	南谷武春, 柳橋努, 渡邊康春, 小島理恵子, 本田裕恵, 相川幸彦

研 究 業 績

IV 研 究 報 告

2軸スクリー型造粒におけるデザインスペースの構築（第3報） —スケールアップの検討—

永井 秀昌, 本田 裕恵, 林 正幸, 薬事研究会製剤部会

Development of Design Space in Twin-screw Type Granulation (Third Report) - Scale-up considerations -

Hidemasa NAGAI, Hiroe HONDA, Masayuki HAYASHI,
The Drug Formulation Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

連続生産は従来のバッチ生産で行われていた製造工程毎に区切りながら生産する方法とは異なり、工程間を切れ目無く連続的に生産する方法であり、世界中で導入が進められている。当センターに設置された連続造粒装置では2軸スクリー型造粒と气流乾燥法が採用されており、従来のバッチ生産で汎用されている流動層造粒法とは異なる造粒機構である。我々は連続生産技術の導入促進を目指し、これまでにプロセス解析工学（PAT）を用いた品質管理法の習得や連続生産の管理戦略の構築に必須となるデザインスペースの作成を実施した。今回は、これまでに構築した連続造粒時のデザインスペースについて、スケールアップを想定した場合においても適用できることを検証した。その結果、同一装置で処理速度を大きくした場合および実生産機を用いた場合においても構築したデザインスペースが適用できることが確認され、スケールアップ時においても目標とする品質の錠剤を連続生産できる可能性が示された。

Summary

Continuous manufacturing is a method of continuously producing without a break between the processes, unlike batch manufacturing, and is being introduced worldwide. The continuous granulation system installed in our institute uses a twin-screw type granulation and a spiral drying system, which is a different granulation mechanism from the fluidized-bed granulation method commonly used in conventional batch manufacturing. Aiming to promote the introduction of continuous manufacturing technology, we have so far learned quality control methods using Process Analytical Technology (PAT) and created a design space, which is essential for the construction of a management strategy for continuous manufacturing. In the present study, we verified the relevance of the design space developed at a laboratory scale for continuous granulation to the production ones. First, we used a Gf-105 continuous granulator: a smaller-scale machine that was the same as a laboratory scale under increased granulation speed. After requirement analysis for particle average diameter and moisture content, the products under the four speed conditions (2-5 kg/h) showed desired values at viewpoints of tablet hardness (not less than 40N) and disintegration time (not more than 60 sec). Next, we used a Gf-215 continuous granulator: a production-scale machine, and the product obtained at the highest speed (15 kg/h) under one condition (25% moisture content) met the desired values noted above. These results suggest that the continuous production of tablets with the desired values is possible under production scales.

キーワード：連続生産；2軸スクリー；デザインスペース；スケールアップ

Key words：Continuous manufacturing；Twin-screw；Design Space；Scale-up

連続生産は従来のバッチ生産で行われていた製造工程毎に区切りながら生産する方法とは異なり、工程間を切れ目無く連続的に生産する方法である。近年、連続生産はPMDAやFDAを含め、規制当局が導入を積極的にサポートしており¹⁾、2022年11月16日付でICHによる合意事項として、「原薬及び製剤の連続生産（ICH Q13）」が採択され、2023年5月には厚生労働

省より「原薬及び製剤の連続生産に関するガイドラインについて」が通知された（ステップ5に到達）。連続生産技術は医薬品の製造・流通の仕組みに革新を起こす技術であることから、将来的には医薬品製造のスタンダードになると考えられる。今後、国内・海外大手製薬企業が連続生産技術を導入した場合、県内企業が連続生産での製造を受託するためには、導入の促進

や技術習得を実施しておくことが重要である。連続生産の造粒部分で多く用いられる2軸スクリーは、これまでのバッチ生産で用いられている造粒法とは異なる造粒機構であり、乾燥機構には特殊な気流乾燥が採用されている場合もある²⁾。このため、従来の造粒法や乾燥法との相違点を確認し、連続生産に特徴的な処方特性やパラメータを明らかにすることが今後の連続生産への移行に必要となる。当センターに導入した造粒乾燥連続装置は、連続生産に特徴的な機構（2軸スクリーによる造粒と気流乾燥）を採用しており、製剤開発法やプロセス解析工学（PAT）を用いた品質管理法の習得を目指している。これまでに、モデル処

方による各種パラメータの影響を比較するとともに、バッチ式造粒機や乾燥機構別での顆粒・錠剤物性の比較結果を報告している^{3,4)}。また、連続生産の管理戦略の構築に必須となるデザインスペースを連続造粒中にモニタリング可能な水分量と平均粒子径を用いて構築している。そこで今回はスケールアップを想定し、これまで用いてきた①ラボスケール対応機（ラボ機）で造粒処理速度を上げた場合および②実生産機を用いた場合において、目標とする品質（錠剤硬度40N以上、崩壊時間60秒以内）の錠剤が連続製造できることを検証した。

実験方法

1. 装置

1) 造粒乾燥機

造粒乾燥連続装置（連続生産機）	
	
型式：Gf-105（フロイント産業㈱） ラボ機	型式：Gf-215（フロイント産業㈱） 実生産機

2) 混合機及び打錠機

a) 容器着脱式回転混合機	b) ロータリー式打錠機
	
型式：TCV-5（(株) 徳寿工作所）	型式：VELA5（(株) 菊水製作所）

3) 物性測定機器

a) レーザー回折式粒子径分布測定装置	b) 加熱乾燥式水分計
	
SALD-2300（(株) 島津製作所）	MX-50（(株) エー・アンド・デイ）
c) 錠剤硬度計	d) 崩壊試験器
	
PC-30（岡田精工(株)）	NT-2HS（富山産業(株)）

2. モデル処方（アセトアミノフェン60%処方）および滴下水量

（モデル処方）

アセトアミノフェン（微粉，八代製薬(株)）	60%
乳糖水和物（200M，DFE Pharma）	21%
トウモロコシデンプン（日澱化学(株)）	9%
低置換度ヒドロキシプロピルセルロース（LH-2L，信越化学工業(株)）	10%
ヒドロキシプロピルセルロース（HPC-L，日本曹達(株)）	3.5%（外割）

（滴下水量）

滴下水量は加水割合20-30%の任意の値とした

3. 実験手順

1) 混合および造粒

a) ラボ機（Gf-105）を用いた場合

モデル処方 3 kgを秤量し，混合機（TCV-5，缶体MM型）に仕込み，30分間混合を行い，造粒用混合品とした．次いで混合品を造粒乾燥連続装置に投入し，以下の条件で造粒を行った．

Gf-105（最大処理速度：5 kg/hr，スクリュー径：φ23 mm）

粉体供給速度：2-5 kg/hr（33.3-83.3 g/min），
2軸スクリュー回転数：100 rpm，

加水割合：20-30%

サンプリング時間：気流乾燥8分間（約400 g），条件変更後の切り替え時間：5分間

風量：1.1 m³/min，給気温度：120℃（排気温度：60-70℃）

b) 実生産機（Gf-215）を用いた場合

モデル処方30 kgについて，80 LサイズのV型混合機（NP-08K，岩黒製作所製）を使用し造粒用混合品とした．次いで混合品を造粒乾燥連続装置に投入し，以下の条件で造粒を行った．

Gf-215（最大処理速度：15 kg/hr，スクリュー径：φ23 mm）

粉体供給速度：15 kg/hr（250 g/min），2軸スクリュー回転数：450 rpm，

加水割合：20-30%

サンプリング時間：気流乾燥2分間（約500 g），条件変更後の切り替え時間：8分間

風量：10.0 m³/min，給気温度：120℃（排気温度：70-80℃）

3) 顆粒物性評価

乾燥後の造粒物は収量を測定した後，試験用篩（φ300 mm，目開き1,000 μm）にて篩過し，顆粒剤とした．また，加熱乾燥式水分計（MX-50，(株)エー・アンド・デイ）を用いて水分量の測定を行う（設定条件：105℃，終点0.05%/min）とともに，レーザー回折式粒子径分布測定装置（SALD-2300，(株)島津製作所）を用いて平均粒子径を測定した．

4) 打錠実験

①打錠処方（錠剤1錠あたり）

アセトアミノフェン60%処方顆粒剤	345 mg/tab（99%）
ステアリン酸マグネシウム	3.5 mg/tab（1%）
合 計	348.5 mg/tab（100%）

②打錠

造粒品を打錠処方の通り100 g分秤量し，ポリ袋にて3分間混合した．次に，ロータリー式打錠機を用いて以下の条件で打錠を行った．

錠剤径φ10 mm，杵臼3本立，1錠 348.5 mg，
硬度50 N程度，打圧：10 kN，回転盤回転数10 rpm，オープンフィードシュー使用

5) 錠剤物性評価

錠剤硬度計（PC-30，岡田精工(株)）を用いて硬度を測定（n = 20）するとともに，崩壊試験器（NT-2 HS，富山産業(株)）を用いて崩壊時間を測定した（n = 12）．

結 果

1. 造粒処理速度を上げた条件での最適製造パラメータの設定

同一装置で造粒処理速度を上げた条件でのスケールアップ検討に先立ち，造粒乾燥連続装置（Gf-105）を用いて顆粒物性（平均粒子径および水分量）が同一となる製造パラメータを検討した．給気温度を調整して試作および物性評価を繰り返した結果，加水割合28%と30%の条件下において，ほぼ同一の顆粒物性（平均粒子径：200～250 μm，水分量：2.0～3.0%）が得られる造粒条件が明らかとなった（Table 1, Fig. 1）．な

Table 1. 連続造粒時における実験計画（中心複合計画）と測定データ

造粒処理速度	2 kg/hr	3 kg/hr	4 kg/hr	5 kg/hr
スクリュー回転数	66 rpm	100 rpm	133 rpm	166 rpm
給気温度	120℃	120℃	130℃	135℃
排気温度	約70℃	約70℃	約75℃	約78℃

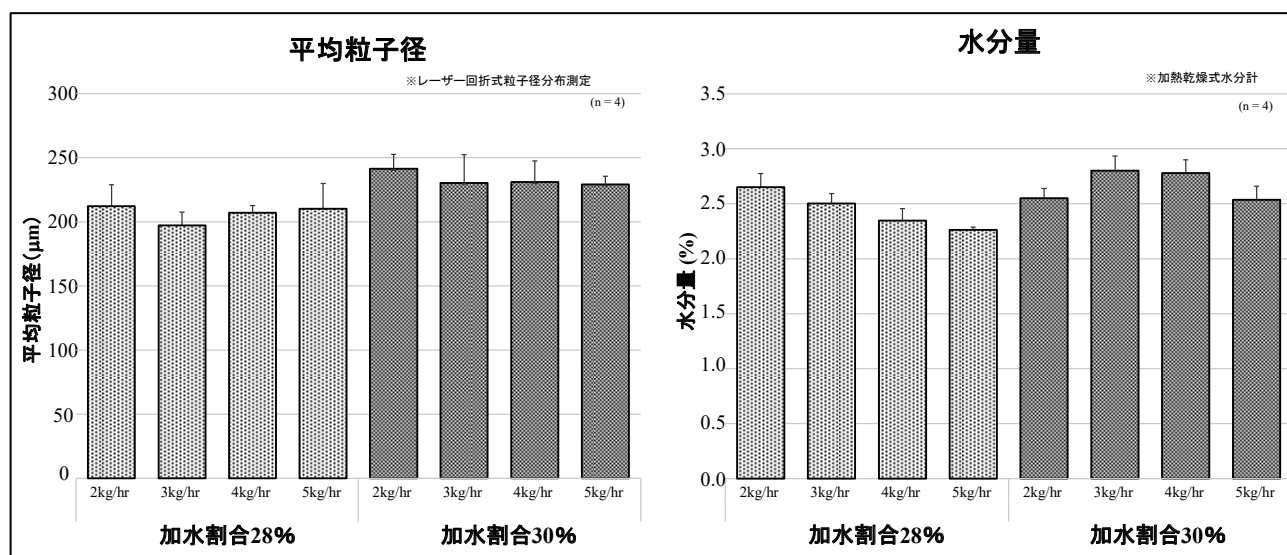


Fig. 1 造粒処理速度を上げた条件での顆粒物性

お、スクリー回転数の設定については、原料供給量と混練機回転数の比を一定にすることで同等の混練物が得られることが報告されており³⁾、その方法に準じて造粒処理速度との比を一定にすることで設定した。

2. 造粒処理速度を上げた条件でのデザインスペースの検証

既報において構築した連続造粒時のデザインスペース (Fig. 2) について⁷⁾、スケールアップを行った場合でも適用可能であることを検証するため、Table 1 の条件で顆粒を試作し、打錠後に錠剤物性の評価を行った。なお、既報のデザインスペースは硬度と崩壊時間を重要品質特性 (CQA) に選定して作成した。製剤均一性 (錠剤重量および含量) や溶出性についても CQA と考えられるが、今回は簡便に測定可能な錠剤物性である硬度および崩壊時間を選定した。デザインスペース内の顆粒を試作するため、加水割合は28%

および30%の2水準とし、処理速度は2, 3, 4, 5 kg/hrの4条件で造粒を行った。造粒後に打錠し、錠剤物性を評価した結果、すべての処理速度において、錠剤の物性値は目標値 (錠剤硬度40N以上、崩壊時間60秒以内) を満たした (Fig. 3)。

3. 実生産機を用いたスケールアップにおけるデザインスペースの検証

次に、実生産機を用いたスケールアップにおいてもデザインスペースが適用できることを検証するため、実生産機 (Gf-215) を使用した実験を実施した。処理速度は装置最大量である15 kg/hrとし、加水割合は20, 25, 28, 30%の4水準にて造粒実験を行った。その結果、加水割合25%の顆粒のみがデザインスペース内に入っていることが明らかとなった (Fig. 4)。この顆粒について打錠後、錠剤物性を評価した結果、目標値 (錠剤硬度40 N以上、崩壊時間60秒以内) を満たしていることが確認された (Table 2)。

考 察

薬事研究会製剤部会では県内での連続生産技術の導入を促進し、医薬品産業の活性化を図ることを目的として連続生産技術を用いた製剤開発に関する検討を実施している²⁻⁵⁾。これまでの検討により、連続生産の管理戦略の構築に有用なデザインスペースについて、工程パラメータに加え、連続造粒中にモニタリング可能な水分量と平均粒子径を用いたデザインスペースを構築した。これによって実際の製造では、重要物質特性 (CMA) をPATツールによりモニタリングし、

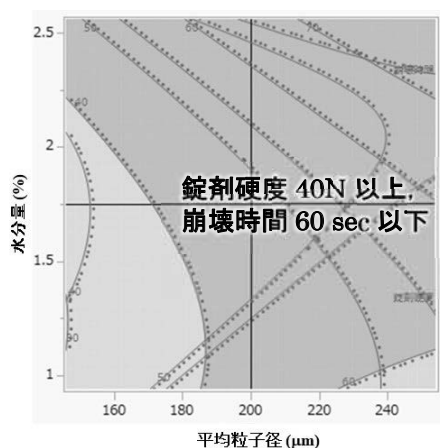


Fig. 2 連続造粒時のデザインスペース

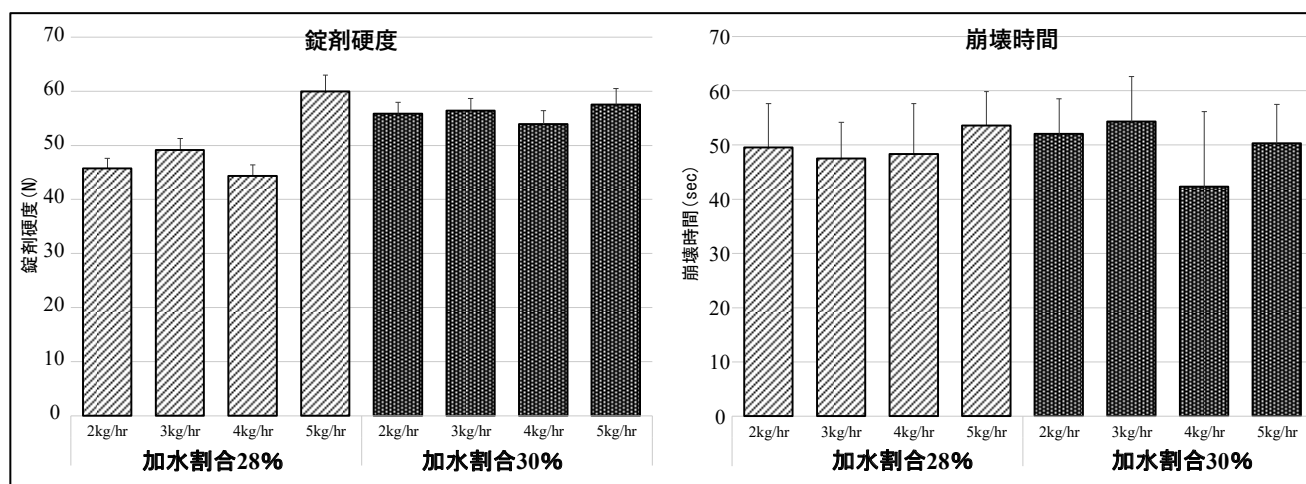


Fig. 3 造粒処理速度を上げた条件でのデザインスペースの検証

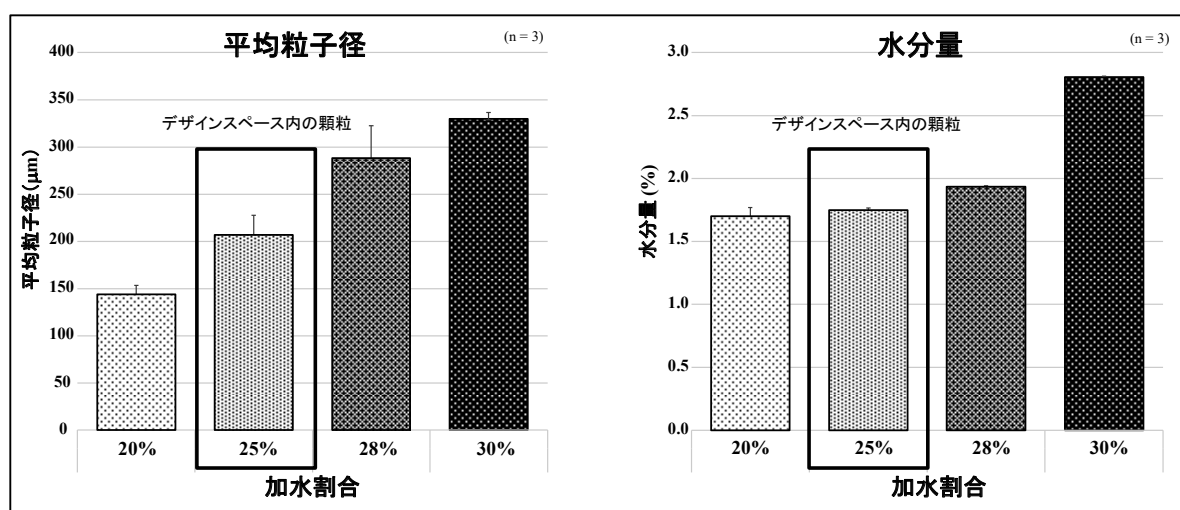


Fig. 4 スケールアップ時（実生産機）における顆粒物性の比較

Table 2. スケールアップ時におけるデザインスペースの検証結果

加水割合	25%
錠剤硬度	56.8 N
崩壊時間	49.3 sec

フィードバック制御等を行うことにより、目標とする品質の錠剤を恒常的に製造可能となる。

そこで今年度はスケールアップを想定し、同一装置で造粒処理速度を変えた場合と実生産機を使用した場合において、構築したデザインスペースが適用できることを検証した。その結果、両スケールアップ条件において、デザインスペース内で造粒した顆粒を用いて打錠した錠剤物性は目標値（硬度40 N以上、崩壊時間60秒以内）を満たした。実生産機でのスケールアップ実験ではスケールアップ条件の検討時間が短く、デザインスペース内の顆粒が1条件しか得られなかったこ

とから、1点のみでの検証となったものの、デザインスペースが適用できることが確認された。また、ラボ機では加水割合28-30%での造粒時にデザインスペース内に入る顆粒を得ることができていたが、実生産機ではデザインスペース内に入らなかった。この原因として、実生産機での乾燥不足が考えられるため、今後は最適乾燥条件の検討が必要であると考えられる。さらに実生産機でのスケールアップ条件を確立するとともに、長時間運転による製剤品質への影響について検証する必要があると考える。

文 献

- 1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 革新的製造技術WG：日本における連続生産の最新情報, <https://www.pmda.go.jp/files/000239490.pdf> (2021)
- 2) 磯部重実：連続造粒装置Granuformerを用いた安定生産に対する取り組み, 製剤機械技術学会誌, 27, 2, 136～141 (2018)
- 3) 寺田敬, 菅野琢磨, 齋藤憲一, 磯部重実：連続プロセスに対するフロイント産業の取り組みと実例, PHARM TECH JAPAN, vol.33, No.12, 35～40 (2017)
- 4) 永井秀昌, 宮本朋美, 明官勇雄, 薬事研究会製剤部会：連続式造粒法とバッチ式造粒法との顆粒物性の比較, 令和2年度富山県薬事総合研究開発センター年報, 48, 37～42 (2021)
- 5) 永井秀昌, 宮本朋美, 明官勇雄, 薬事研究会製剤部会：2軸スクリー型造粒を行った際の乾燥機構の違いによる物性比較, 令和3年度富山県薬事総合研究開発センター年報, 49, 19～24 (2022)
- 6) 永井秀昌, 本田裕恵, 林正幸, 薬事研究会製剤部会：2軸スクリー型造粒におけるデザインスペースの構築, 令和4年度富山県薬事総合研究開発センター年報, 50, 19～24 (2023)
- 7) 永井秀昌, 本田裕恵, 林正幸, 薬事研究会製剤部会：2軸スクリー型造粒におけるデザインスペースの構築 (第2報), 令和5年度富山県薬事総合研究開発センター年報, 51, 18～22 (2024)

謝 辞

本研究の遂行にあたりご協力いただいたフロイント産業株式会社の齋藤憲一様, 菅野琢磨様に厚く御礼申し上げます。

B16悪性黒色腫移植マウスモデルを用いたコハク酸付加 ベツリン誘導体の抗腫瘍メカニズムの検討

小笠原 勝, 濱田 昌弘^{*1}, 本田 裕恵, 柳橋 努, 渡邊 康春, 松永 孝之, 中島 範行^{*1},
長井 良憲^{*2}, 高津 聖志,

^{*1} 富山県立大学工学部医薬品工学科製薬化学工学講座

^{*2} 富山県立大学工学部医薬品工学科バイオ医薬品工学講座

Anti-tumor mechanism of a succinic acid derivative of betulin in a B16 melanoma-burden mouse model.

Masaru OGASAWARA, Masahiro HAMADA¹, Hiroe HONDA, Tsutomu YANAGIBASHI,
Yasuharu WATANABE, Takayuki MATSUNAGA, Noriyuki NAKAJIMA¹, Yoshinori NAGAI²,
Kiyoshi TAKATSU

^{*1, 2} Department of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Engineering,
Toyama Prefectural University

要 約

本研究では、ベツリンの3位と28位にコハク酸を付加した誘導体(BD-17)の抗腫瘍効果と作用メカニズムについて検討した。B16悪性黒色腫の皮下移植マウスモデルにおいて、BD-17は腫瘍の増殖を有意に抑制した。しかし、BD-17は試験管内においてTGF- β により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性を回復させなかった。DNAマイクロアレイ解析において、BD-17はB16F10細胞における*Mitf*遺伝子の発現量を対照群の約5分の1に抑制した。*Mitf* mRNAに対するsiRNAはB16F10細胞の増殖を約80%阻害し、BD-17も濃度に依存して増殖を阻害した。BD-17は*Mitf*遺伝子の発現を制御する転写因子*Sox10*の遺伝子発現を強く抑制した。これらの結果から、BD-17は*Sox10*遺伝子の発現抑制を介して*Mitf*遺伝子の発現を抑制し、その結果、B16悪性黒色腫の増殖を抑制したと考えられた。

Summary

In this study, we examined the antitumor effect and mechanism of action of a derivative of betulin (BD-17), where succinic acid is added at the 3rd and 28th positions of betulin. In the subcutaneously inoculated mouse model of B16F10 melanoma, BD-17 treatment significantly inhibited tumor growth. However, BD-17 did not restore the cytotoxic activity of NK cells suppressed by TGF- β *in vitro*. Using DNA microarray analysis, we found that BD-17 decreased the expression of the *Mitf* gene to about one-fifth of that in the control group in B16F10 cells. siRNA targeting *Mitf* mRNA inhibited B16F10 cell proliferation by approximately 80%, and BD-17 also inhibited B16F10 cell proliferation in a concentration-dependent manner *in vitro*. BD-17 strongly suppressed the mRNA level of *Sox10*, a transcription factor that controls *Mitf* gene expression. These results suggest that BD-17 inhibited the growth of B16 melanoma in mice by suppressing *Mitf* gene expression through the inhibition of *Sox10* gene expression.

キーワード : ベツリン誘導体 ; *Mitf* ; *Sox10* ; B16F10細胞

Key words : betulin derivative ; *Mitf* ; *Sox10* ; B16F10 cells

我々は平成20年度より、ほくりく健康創造クラスター事業(～平成24年度)において免疫抑制因子(TGF- β 及びPGE₂)の働きを解除する物質の探索研究を進め、白樺(*Betula platyphylla*)の樹皮成分のベツリンに目的とする有効性を見出した¹⁾。さらに、がん移植マウスモデルを用いた検討から、ベツリンは腫瘍増殖抑制作用を示すとともに腫瘍局所にナチュラル

キラー(NK)細胞を誘導し免疫抑制状態を回復させる可能性を報告した²⁾。当初このような作用を示す化合物は報告されていなかったことから、ベツリンは新しいタイプのがん治療薬になる可能性があると考え、誘導体合成とがん移植マウスモデルを用いた薬効評価を進めてきた。その結果、ベツリンにカルバメート構造やアミノ酸を付加させた誘導体が顕著な抗腫瘍

効果を示すことを報告した^{3, 4)}。しかし、それら誘導体は強い炎症様症状を伴うことが問題となった。そこで、副作用が少なく高い抗腫瘍効果を示す化合物の開発を目指し種々の誘導体について評価を進めたところ、ベツリンの3位と28位にコハク酸を付加した誘導体 (BD-17) (Fig. 1 A) が炎症様症状を伴うことなく強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。本研究ではBD-17の作用メカニズムについて検討した。

実験方法

1. 実験試薬

1-1. 購入試薬

ベツリンはExtrasyntheseより購入した。ポリイノシン-ポリシチジン酸 (ポリ (IC)) 及びTGF- β はInvivoGen及びPeproTechよりそれぞれ購入した。ウシ胎児血清 (FBS) はHycloneから購入した。ペニシリン、ストレプトマイシン、2-メルカプトエタノール及びRPMI-1640培地はGIBCOより購入した。Calcein-AMは同仁化学研究所より購入した。コラゲナーゼA及びDNase I はロシュ及びSigmaよりそれぞれ購入した。抗CD16/32抗体 (2.4G2), APC-Cy7抗CD45抗体 (30-F11), APC抗NK1.1抗体 (PK136) 及び7AADは日本BDより購入した。FITC抗CD3 ϵ 抗体 (145-2C11) はeBioscienceより購入した。U0126, シスプラチン及び5-FUは、それぞれプロメガ, Wako, 及びナカライより購入した。MITF siRNA及びコントロールsiRNAはAmbionより購入した。

1-2. BD-17

BD-17は、以下の方法で合成した。ベツリン (1.00 g, 2.26 mmol) および 4- (dimethylamino) pyridine (DMAP, 55 mg, 0.45 mmol) を pyridine (4.5 mL) に溶解した。この溶液に 0 °C で無水コハク酸 (1.13 g, 11.3 mmol) を加え、あらかじめ 85 °C に温めておいたオイルバスに浸し、アルゴン雰囲気下で 24 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーでベツリンのスポットの消失を確認した。氷冷後、水を加えて反応を止め、10% 塩酸を用いて酸性にした。ベンゼンで抽出し ($\times 3$), 全有機層を水, 5% 塩酸, 水, 飽和食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過で除き、溶媒をエバポレーターで濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10% MeOH in CHCl₃) で精製するとBD-17 (1.28 g, 88%) が白色粉末として得られた。得られた化合物は以下の測定結果からBD-17 (betulin-3,

28-succinate) であることを確認した; R_f = 0.33 (10% MeOH in CHCl₃) ; mp = 110-112 °C (EtOH-EtOAc) ; $[\alpha]_D^{26}$ = +9.61 (c 1.04, CHCl₃) ; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 0.62-1.80 (m, 43H) , 1.90 (m, 1 H) , 2.37 (dt, J = 10.8 and 10.0 Hz, 1 H) , 2.57-2.70 (m, 8 H) , 3.84 (d, J = 10.8 Hz, 1 H) , 4.27 (d, J = 10.4 Hz, 1 H), 4.46 (dd, J = 16.4 and 9.2 Hz, 1 H), 4.56 (s, 1 H), 4.66 (d, J = 1.6 Hz, 1 H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ = 14.8, 16.0, 16.2, 16.5, 18.2, 19.1, 20.8, 23.6, 25.2, 27.0, 27.9, 29.0, 29.1, 29.3, 29.6, 29.7, 34.1, 34.4, 37.1, 37.6, 37.9, 38.4, 40.9, 42.7, 46.4, 47.7, 48.8, 50.3, 55.4, 63.2, 76.7, 81.6, 109.9, 150.1, 171.8, 172.4, 178.1, 178.2 ppm; ATR-IR (neat) ν = 2942, 2872, 1730, 1709, 1642, 1452, 1390, 1363, 1235, 1159, 1106, 1043, 1007, 975, 915, 882, 843, 802, 748 cm⁻¹; ESI-LRMS (neg) m/z = 641 ([M-H]⁻) ; ESI-HRMS (neg) m/z = calcd for C₃₈H₅₇O₈ 641.4059, found 641.4062.

2. がん移植マウスモデルを用いた抗腫瘍効果及び腫瘍内NK細胞の解析

2-1. 細胞及び細胞培養

マウス悪性黒色腫細胞 (B16F10) 及びマウス YAC-1 細胞は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより入手し、10%の非働化FBS, 100 U/mLのペニシリン, 0.1 mg/mLのストレプトマイシン及び55 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

2-2. 抗腫瘍効果の検討

B16F10細胞をマウスの皮下に移植したモデルを用い、既報²⁾に準じて実施した。具体的には、B16F10細胞を 2×10^5 個/0.05 mL リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に調製し、C57BL/6マウス (8週令, 雌, 8匹/群) にマウス当たり0.05 mLずつ下腹部皮下に接種した。BD-17は0.1% Tween 80を含むPBSに懸濁し、がん接種後2日目から15日目まで1日1回、BD-17をマウス当たり45 nmolの用量で腫瘍内に投与した (50 μ L/マウス)。対照群には溶媒 (0.1% Tween 80を含むPBS) を同様に投与した。腫瘍径は2日あるいは3日おきに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2で算出した。既報³⁾のベツリン誘導体では投与後1日目に投与部位周辺に明らかな炎症様症状が認められたことから、BD-17についても投与後1日目に炎症様症状の有無について観察した。マウスは管理された環境下で飼育し、市販の飼料と水道水を自由に摂取できるように与えた。一週間の馴化期間後、実験に供した。すべての動物実験は2015年度富山県薬事総合研

究開発センター動物実験委員会の承認を受けて実施した。

2-3. 腫瘍内NK細胞の解析

2-2. 抗腫瘍効果の検討の項に準じてC57BL/6マウス（8週令，雌，3匹/群）にB16F10細胞を接種した。がん接種後2日目から9日目まで1日1回，BD-17をマウス当たり45 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した。投与開始後1日目，4日目，及び8日目にがん組織を採取した。がん組織を1 mg/mL コラゲナーゼA及び200 U/mL DNase Iで処置（37℃，30分間）し，ハサミで細切後，ナイロンフィルター（70 µmポアサイズ）（Falcon）を通してデブリスを除去した。遠心（430 × g，10 min）後，上清を除去し，得られた細胞を 10^5 個/mLとなるように調製した。細胞を抗CD16/32抗体（2.4G2）で処置（1.5 µg/mL，4℃，15 min）しFc受容体をブロックした後，APC-Cy7抗CD45抗体（30-F11），FITC抗CD3ε抗体（145-2C11）及びAPC抗NK1.1抗体（PK136）で処置（0.25 µg/mL～1.25 µg/mL，4℃，0.5時間）した。細胞を洗浄後，7 AADを添加してフローサイトメーター（FACSCanto II，日本BD）により測定した。

3. TGF-βにより抑制されたNK細胞の細胞傷害活性に対する影響

既報に準じて実施した²⁾。具体的には，マウス（BALB/c，7-8週令，雌）より脾臓を採取し，脾臓細胞を調製した。ベツリンあるいはBD-17はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して5 mM溶液とし，この液を適宜希釈して脾臓細胞に添加し室温で0.5時間処置した。対照群にはDMSOを0.1%となるように添加した。その後，ポリ（IC）およびTGF-βを10 µg/mL及び0.5 ng/mLとなるように添加し，96ウェルプレート（FALCON）に播種してインキュベーター内（5% CO₂，37℃）で20時間処置した。この細胞を培養液（10% FBSを含むRPMI-1640培地）で洗浄しエフェクター細胞（E）とした。ターゲット細胞（T）には予めcalcein-AMを取り込ませたYAC-1細胞を用いた。これらをE/T比率100の割合で共培養し，4時間後の上清中の蛍光量を測定（BioTeck，FLx800）した。細胞傷害活性は次式により算出した。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = (\text{測定値} - \text{自然放出量}) / (\text{最大蛍光量} - \text{自然放出量}) \times 100$$

4. がん細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

4-1. DNAマイクロアレイ解析

5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 4×10^4 個/mLに調製し，6ウェルプレート（Corning）に各ウェル当たり 4×10^4 個を播種した。細胞がプレートに接着後，BD-17を終濃度20 µMとなるように添加し，インキュベーター内（37℃，5% CO₂）で3日間処置した。コントロールには溶媒を同様に添加した。培養終了後，RNeasy mini kitを用いて全RNAを抽出し，BioSpec-nano（島津製作所）によりRNA濃度を測定した。約0.5 µg/µL（O.D. 260/280値はBD-17処置及びコントロール細胞いずれも2.2であった）に調製しDNAマイクロアレイに供した。DNAマイクロアレイにはGeneChip Mouse gene 2.0 ST array（Affymetrix）を用いた。DNAマイクロアレイの実施はフィルジェンに依頼した。データの解析はGenenSpringソフトウェア（アジレント・テクノロジー）を用いて行い，パスウェイ解析はIngenuity Pathway Analysisソフトウェア（キアゲン）を用いて実施した。

4-2. *Mitf*及び*Tyr* 遺伝子の定量PCR解析

既報に準じて実施した²⁾。培養細胞を用いた検討の場合は，5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 4×10^4 個/mLに調製し，6ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^4 個を播種した。細胞がプレートに接着後，BD-17を添加し，インキュベーター内（37℃，5% CO₂）で1～3日間処置後，RNeasy mini kit（タカラバイオ）を用いて全RNAを抽出した。

マウスを用いた検討の場合は，がん移植マウスモデルの項に準じてC57BL/6マウス（8週令，雌，3匹/群）にB16F10細胞を接種し，がん接種後2日目から9日目まで1日1回，BD-17をマウス当たり45 nmolの用量で腫瘍内に投与した。対照群には溶媒（0.1% Tween 80を含むPBS）を同様に投与した。投与開始後1日目，4日目，及び8日目にがん組織を採取し，適量のがん組織からRNeasy mini kitを用いて全RNAを抽出した。

定量PCRはSYBR Premix Ex Taq II（タカラバイオ）を用いて，Mx3000P qPCRシステム（Agilent Technologies）により実施した。ハウスキーピング遺伝子にはマウス*Rps18* mRNAを用い，対照群には溶媒を同様に処置した細胞を用いた。マウス*Rps18*，*Mitf*，*Tyr* mRNAに対するプライマーはタカラバイオから購入した（Table 1）。

Table 1. Real-time PCR primers.

Gene	Gene Symbol	Gene Name	製品番号
Ribosomal protein S18	Rps18	Mus musculus ribosomal protein S18	MA050364
Microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	Mus musculus microphthalmia-associated transcription factor, transcript variant 1	MA172967
Tyrosinase	Tyr	Mus musculus tyrosinase	MA156850
SRY (sex determining region Y)-box 10	Sox10	Mus musculus SRY (sex determining region Y)-box 10	MA111002
Paired box 3	Pax3	Mus musculus paired box 3	MA111849
cAMP responsive element binding protein 1	Creb1	Mus musculus cAMP responsive element binding protein 1	MA119837
Lymphoid enhancer binding factor 1	Lef1	Mus musculus lymphoid enhancer binding factor 1, transcript variant 2	MA153348

5. 細胞増殖に及ぼすMITF siRNA、BD-17及びベツリンの影響

5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 2×10^4 個/mLに調製し、24ウェルプレート (Corning) に各ウェル当たり 1×10^4 個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内 (37℃, 5% CO₂) で3日間処置した。コントロールには溶媒を同様に添加した。培養終了後、各ウェルからトリプシン処理により細胞を回収した。回収した細胞にトリパンブルーを添加し、血球計算板を用いて生細胞数を計数した。MITF siRNAの作用の検討においては、B16F10細胞を10%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地 (抗生物質不含) で 1×10^4 個/mLに調製した後、24ウェルプレートに各ウェル当たり 1 mLずつ播種し、インキュベーター内で一晩培養した。その後、新鮮な培地に交換し、MITF siRNA導入溶液あるいはコントロールsiRNA導入溶液を添付文書に従い調製し各ウェルに添加した。インキュベーター内 (37℃, 5% CO₂) で3日間処置後、各ウェルからトリプシン処理により細胞を回収し、血球計算板を用いて生細胞数を計数した。死細胞はトリパンブルー染色により除いた。

6. Mitf遺伝子の発現に及ぼす細胞増殖阻害剤の影響

5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 4×10^4 個/mLに調製し、6ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^4 個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を添加し、インキュベーター内 (37℃, 5% CO₂) で3日間処置後、RNeasy mini kitを用いて全RNAを抽出した。定量PCRは、4-2. Mitf及びTyr 遺伝子の定量PCR解析の項と同様にして

実施した。

細胞内メラニン量の観察においては、5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 6×10^5 個/mLに調製し、150 cm²細胞培養フラスコに各フラスコ当たり 6×10^5 個を播種した。細胞がフラスコに接着後、化合物を添加し、インキュベーター内 (37℃, 5% CO₂) で3日間処置した。その後、各フラスコからトリプシン処理により細胞を回収し、血球計算板を用いて生細胞数を計数した。死細胞はトリパンブルー染色により除いた。各群について、 1.2×10^7 個の生細胞をペレットにして写真撮影した。

7. Mitf遺伝子の発現上昇に重要な転写因子群の遺伝子発現に及ぼす影響

既報に準じて実施した²⁾。具体的には、5%の非働化FBSを含むRPMI-1640培地でB16F10細胞を 4×10^4 個/mLに調製し、6ウェルプレートに各ウェル当たり 4×10^4 個を播種した。細胞がプレートに接着後、BD-17を終濃度20 μMとなるように添加し、インキュベーター内 (37℃, 5% CO₂) で3日間処置後、RNeasy mini kitを用いて全RNAを抽出した。定量PCRは4-2. Mitf及びTyr 遺伝子の定量PCR解析の項と同様にして実施した。ハウスキーピング遺伝子にはマウスRps18 mRNAを用い、対照群には溶媒を同様に処置した細胞を用いた。マウス、Sox10, Pax, Creb1, 及びLef1 mRNAに対するプライマーはタカラバイオから購入した (Table 1)。

8. 統計処理

測定値の有意差検定は、Studentの *t* 検定により行った。

結 果

1. がん移植マウスモデルを用いた抗腫瘍効果及び腫瘍内NK細胞の解析

1-1. 抗腫瘍効果の検討

B16F10細胞の皮下移植モデルを用いて、BD-17の

抗腫瘍効果について検討した (Fig. 1). B16F10移植後2日目より15日目までBD-17を腫瘍内に投与したところ、対照群に比べて腫瘍の増殖が有意に抑制され (Fig. 1 B), 生存期間の延長が認められた (Fig. 1 C). 投与部位周辺に明らかな炎症様症状は認められなかった (Figs. 1 D and 1 E).

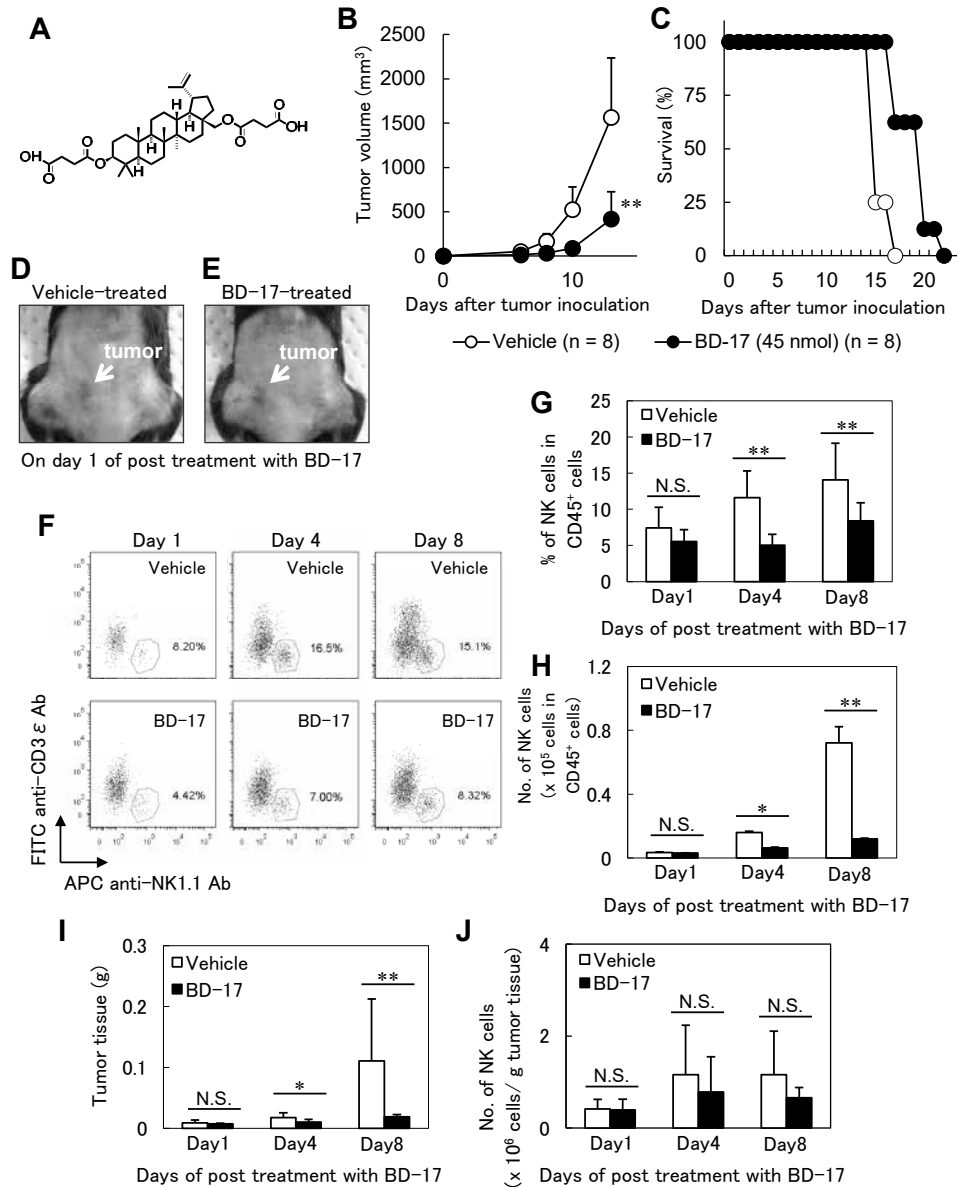


Fig. 1. Anti-tumor effects of BD-17 in tumor-inoculated mouse model and analysis of tumor-infiltrated NK cells. (A) Chemical structure of BD-17. (B, C) B16F10 cells were subcutaneously injected into mice. BD-17 or vehicle was intratumorally administered daily starting at 2 days after tumor cell injection. Every 2 or 3 days, tumor nodules were measured with a caliper. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of eight mice. Survival of the mice in each group was checked every 2 or 3 days. Open circles indicate the vehicle-treated group; filled circles indicate the BD-17-treated group. (D, E) Photographs showing representatives of mice on day 1 of post treatment with BD-17 or vehicle. Arrows indicate tumor nodules. (F-H) Representative FACS profiles (F), percentages (G), absolute number (H) of NK cells (CD3ε⁺ NK1.1⁺ cells) in CD45⁺ cells accumulated at tumor tissues. (I) Tumor tissue weight of mice administered BD-17 or vehicle as described in Fig. 1B. (J) Absolute number of NK cells per g tumor tissue. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of 9 mice pooled from three independent experiments. *, P < 0.05, **, P < 0.01 vs. vehicle treatment; N.S., not significant.

1-2. 腫瘍内NK細胞の解析

我々はこれまでに、本研究と同じがん細胞移植マウスモデルにおいてベツリンを腫瘍内に投与した場合、腫瘍局所へのNK細胞の集積が腫瘍増殖の抑制に重要であることを報告している²⁾。BD-17についても同様に検討したところ、投与開始4日及び8日後においてNK細胞の割合及び細胞数は対照群に比べて有意に低かった (Figs. 1 F, 1 G and 1 H)。一方、腫瘍組織重量はBD-17投与群で有意に低かった (Fig. 1 I) ことから、腫瘍組織重量当たりのNK細胞数は、対照群とBD-17投与群の間で有意な差はなかった (Fig. 1 J)。

2. TGF- β により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性に対する影響

ベツリンは、ポリ (I : C) の存在下においてTGF- β により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性を回復させる^{1, 2)}。BD-17がベツリンと同様の作用を示すか検討した結果、BD-17 (1.25 ~ 5 μ M) はTGF- β により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性を回復させなかった (Fig. 2)。一方、陽性対照として用いたベツリン (5 μ M) はTGF- β による抑制を回復させた。これらの結果から、BD-17の抗腫瘍メカニズムはベツリンとは異なると考えた。

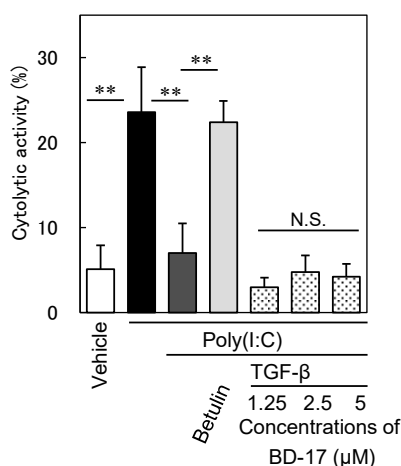


Fig. 2. Effects of BD-17 on TGF- β -induced suppression of cytolytic activity of NK cells.

Splenocytes treated with BD-17, betulin or vehicle for 30 min were incubated with 0.5 ng/mL TGF- β in the presence of 10 μ g/mL poly(I:C) for 20 h. The vehicle control was applied in the same manner. The cytolytic activity of cells was evaluated at an effector/target ratio of 100/1 using YAC-1 cells. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of triplicate wells. **, $P < 0.01$; N.S., not significant.

3. がん細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

3-1. DNAマイクロアレイ解析

BD-17はB16F10細胞に直接作用していると考え、DNAマイクロアレイを用いてB16F10細胞の遺伝子発現に与える影響を解析した。溶媒処置した細胞に対するBD-17処置した細胞の遺伝子発現量を比較したところ、発現量が1/5以下に低下した遺伝子が9種、5倍以上に上昇した遺伝子が16種認められた (Table 2)。

パスウェイ解析を実施したところ、転写調節因子であるmicrophthalmia-associated transcription factor (*Mitf*) を中心とする8種の遺伝子の発現が相互に強く影響を受けていることが分かった (Fig. 3)。その他の遺伝子については相互の関連は認められなかった。これらの結果から、BD-17の作用メカニズムに*Mitf*遺伝子の発現制御が関与していると考えた。

3-2. *Mitf*及び*Tyr* 遺伝子の定量PCR解析

MITF分子はチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子の発現を制御している⁵⁾。そこで、試験管内におけるB16F10細胞について*Mitf*及び*Tyr* mRNAの発現量に対するBD-17の影響を検討した (Figs. 4 A - 4 D)。BD-17は、*Mitf* mRNAの発現量を処置日数及び濃度に依存して有意に抑制し、20 μ Mで3日間処置した場合、対照群の約20%にまで抑制した (Figs. 4 A and 4 B)。BD-17は*Tyr* mRNAの発現量も同様に抑制した (Figs. 4 C and 4 D)。

次に、マウスに皮下移植したB16F10細胞について、*Mitf*及び*Tyr* mRNAの発現量に対するBD-17の影響を定量PCRにより検討した (Figs. 4 E and 4 F)。B16F10細胞の移植後2日目よりBD-17を腫瘍内に連日投与したところ、*Mitf* mRNAの発現量は投与後1日目で対照群の約60%に抑制され、投与後4日目では約30%にまで抑制された (Fig. 4 E)。BD-17は*Tyr* mRNAの発現量も同様に抑制した (Fig. 4 F)。

Table 2. DNA microarray analysis of BD-17-treated B16F10 cells.

Gene symbol	Gene	Expression rate (BD-17/control)
Nr4a3	Nuclear receptor subfamily4, group A, member 3	0.08
Hpgds	Hematopoietic prostaglandin D synthase	0.11
Insc	Inscuteable homolog (Drosophila)	0.14
Mc1r	Melanocortin 1 receptor	0.16
Bace2	Beta-site APP-cleaving enzyme 2	0.17
Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor	0.17
Prickle1	Prickle homolog1 (Drosophila)	0.19
Mlph	Melanophilin	0.19
Abca12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	0.19
Akr1b7	Aldo-keto reductase family1, member B7	18.3
Slc40a1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	9.5
Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	8.8
Nqo1	NAD (P) H dehydrogenase, quinone 1	7.5
Cyr61	Cysteine rich protein 61	7.5
Steap1	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	7.4
Fn1	Fibronectin 1	7.4
Gsta3	Glutathione S-transferase, alpha 3	7.4
Gadd45a E230016	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45	7.2
M11Rik	alpha RIKENcDNAE230016M11 gene	7.2
Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	7.2
Adh7	Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	6.3
Dgka	Diacylglycerol kinase, alpha	6.2
Paqr3 Bmp2k	Progesterin and adipo-Q receptor family member III BMP 2 inducible kinase	6.0
Srxn1	Sulfiredoxin1homolog (S. cerevisiae)	5.7
Fam129a	Family with sequence similarity 129, member A	5.6
Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand5	5.1

B16F10 cells were treated with BD-17 or vehicle for 3 days at 37°C, then RNA of the cells was extracted and applied for DNA microarray analysis. Genes showing the expression rates over 5.0 or under 0.2 are shown.

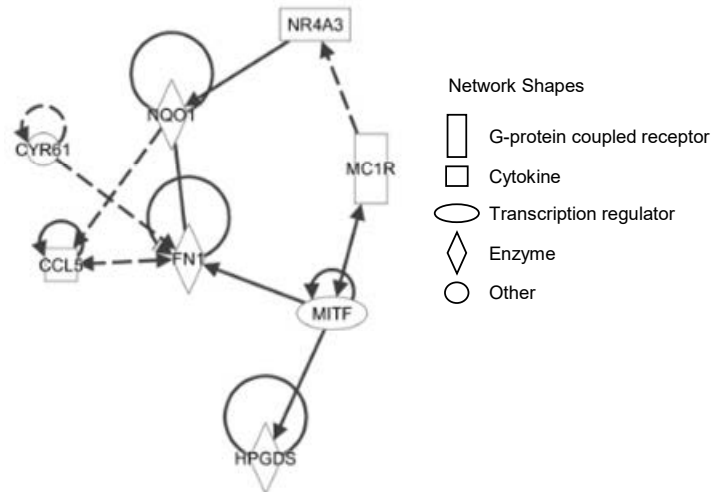


Fig. 3. The interaction network obtained by using the genes shown in Table 2.

Interaction network was modeled using Ingenuity Pathway Analysis software. Solid lines represent direct interactions, dashed lines indicate indirect interactions. Network shapes display biological functions of genes.

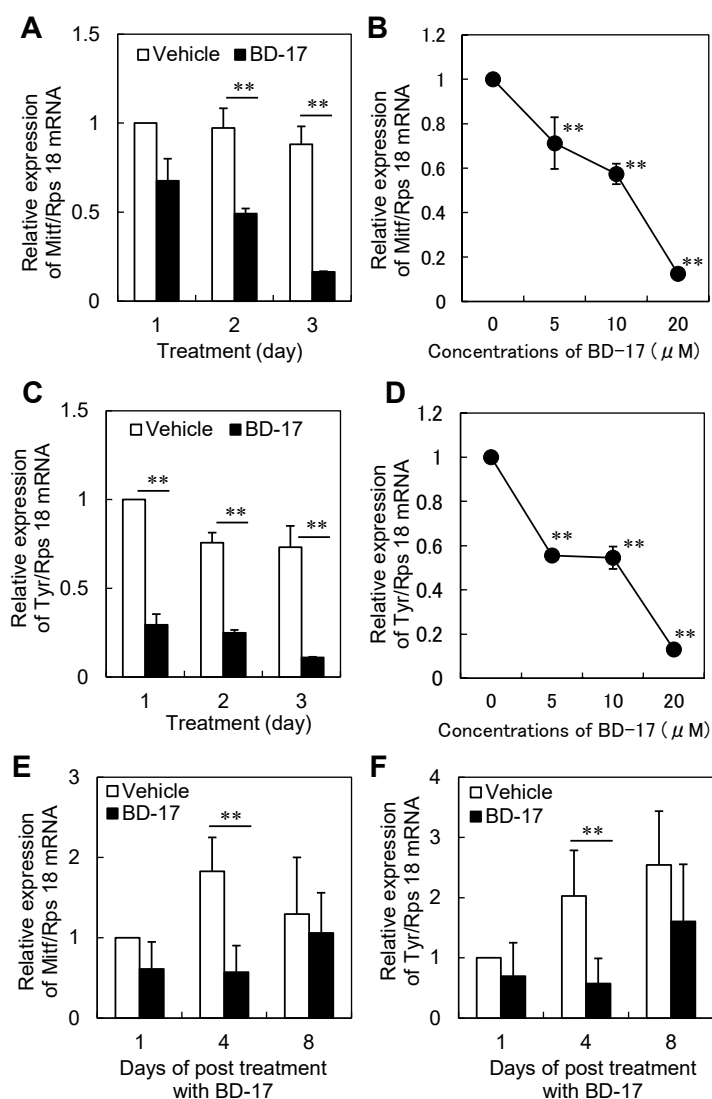


Fig. 4. Effects of BD-17 on mRNA expression of *Mitf* and *Tyr* genes *in vivo* and *in vitro*.

(A, C) B16F10 cells were treated with 20 μ M BD-17 or vehicle for indicated days at 37°C. (B, D) B16F10 cells were treated with BD-17 or vehicle for 3 days at 37°C at the indicated concentrations. Then, RNA of those cells was extracted. (E, F) B16F10 cells injected into mice were treated with BD-17 or vehicle as described in Fig. 1, then RNA of the tumor was extracted on the indicated days. cDNA synthesis and real-time PCR were performed for *Mitf* and *Tyr* genes as described in the Materials and Methods. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of triplicate wells (A-D) or three mice (E, F). **, $P < 0.01$ vs. vehicle.

4. 細胞増殖に及ぼすMITF siRNA、BD-17及びベツリンの影響

MITFはB16F10細胞の増殖に重要な細胞内分子であることが報告されている⁶⁾。そこで、試験管内においてB16F10細胞の増殖に対するMITF siRNA及びBD-17の影響を検討した (Fig. 5)。B16F10細胞をMITF siRNAで3日間処置したところ、細胞数は対照群 ($36.7 \pm 3.4 \times 10^4$ 個) に比較して処置群では $7.3 \pm 1.1 \times 10^4$ 個となり、細胞増殖は約80%抑制された

(Fig. 5 A)。BD-17もB16F10細胞の増殖を抑制し、50%阻害濃度は約15 μ Mであった (Fig. 5 B)。BD-17の阻害作用は、比較対照として用いたベツリン (50%阻害濃度：約3.2 μ M) よりも弱かった。これらの結果から、BD-17は*Mitf*遺伝子の発現を抑制することでB16F10細胞の増殖を阻害していると考えた。

5. *Mitf*遺伝子の発現に及ぼす細胞増殖阻害剤の影響

BD-17による*Mitf*遺伝子の発現抑制は、細胞増殖

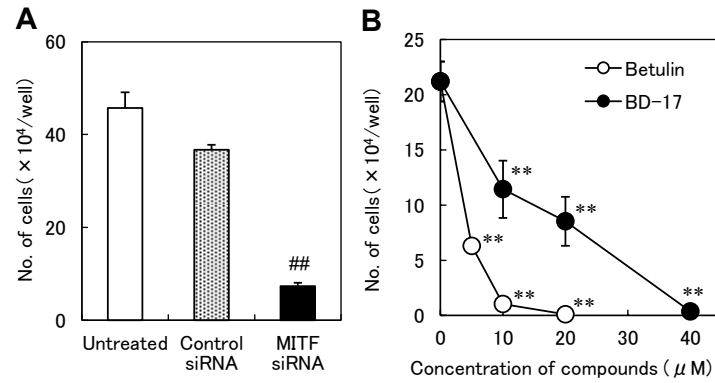


Fig. 5 Effects of MITF siRNA, BD-17 and betulin on B16F10 cell proliferation *in vitro*.

(A) B16F10 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 24-well plate with RPMI-1640 medium containing 10% FBS without antibiotics, and cultured overnight in an incubator. (37°C, 5% CO₂). Subsequently, the medium was replaced with fresh medium, and MITF siRNA transfection solution or control siRNA transfection solution prepared according to the manufacturer's instructions was added to each well. The cells were incubated for 3 days at 37°C. (B) B16F10 cells were seeded at a density of 1×10^4 cells per well in a 24-well plate with RPMI-1640 medium containing 5% FBS. Subsequently, compounds were added at various concentrations, and the cells were incubated for 3 days in an incubator (37 °C, 5% CO₂). Control cells were given vehicle in the same way. (A, B) After the incubation, cells from each well were harvested by trypsinization. Dead cells were excluded by trypan blue staining, and the number of viable cells was evaluated using a hemocytometer. ^{##}, $P < 0.01$ vs. control siRNA, ^{**}, $P < 0.01$ vs. vehicle.

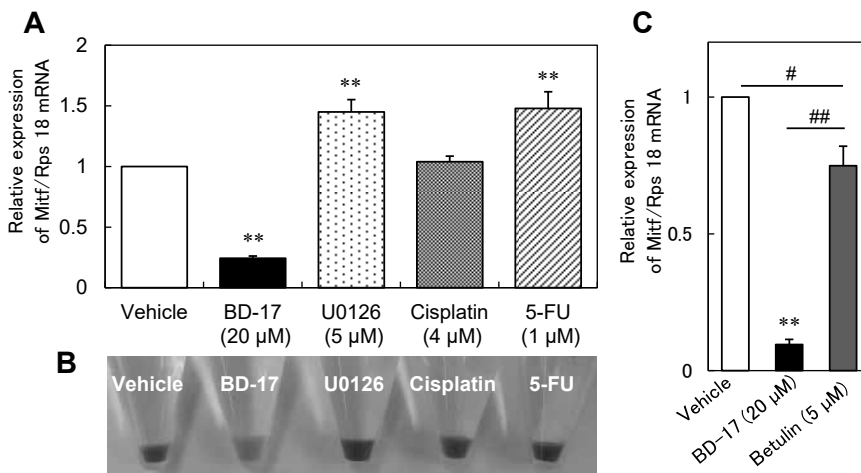


Fig. 6. Effects of cytotoxic agents on mRNA expression of *Mitf* gene and melanin level in B16F10 cells.

(A) B16F10 cells were treated with BD-17, cytotoxic agents, or vehicle for 3 days at 37°C at the indicated concentrations, then RNA of those cells was extracted. cDNA synthesis and real-time PCR were performed for *Mitf* gene as described in the Materials and Methods. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of triplicate wells. (B) B16F10 cells were treated with each agent indicated under the same conditions as in Fig. 6A. After the treatment, cells were harvested by trypsinization from each well, dead cells were excluded by trypan blue staining, and the number of viable cells was counted using a hemocytometer. Equal numbers of viable cells (1.2×10^7 cells) in each treatment group were pelleted and photographed. (C) B16F10 cells were treated with BD-17 or betulin and applied for the analysis of mRNA level of *Mitf* gene as described in Fig. 6A. ^{**}, $P < 0.01$ vs. vehicle. [#], $P < 0.05$, ^{##}, $P < 0.01$.

阻害作用の結果である可能性も考えられる。そこで、*Mitf*遺伝子の発現に及ぼす細胞増殖阻害剤の影響について検討した (Figs. 6 A and 6 B)。実験には、B16F10細胞の増殖をFig. 5 Bの処置条件下で50%以上阻害する濃度を用いた。その結果、U0126及び5-FU処置により*Mitf* mRNAの発現量は有意に上昇した (Fig. 6 A)。シスプラチンは発現量に影響を与えなかった。一方、BD-17は*Mitf* mRNAの発現量を有意に抑制した。

MITF分子は*Tyr*遺伝子の発現制御を介してメラニン合成を正に調節している⁵⁾。そこで、B16F10細胞をFig. 6 Aに示す条件下それぞれの化合物で処置した後、各々同じ生細胞数を含むペレットにして目視で確認した。その結果、黒色で判別できるメラニンの量はBD-17処置群では明らかに低下したが、U0126、シスプラチン及び5-FU処置群ではほとんど影響は認められなかった (Fig. 6 B)。これらのことから、BD-17に

よる*Mitf*遺伝子の発現抑制は、細胞増殖阻害作用には起因していないと考えられた。比較対照として用いたベツリンも僅かに*Mitf* mRNAの発現量を抑制したが、その抑制作用はBD-17の方が有意に強かった (Fig. 6 C)。

6. *Mitf*遺伝子の発現上昇に重要な転写因子群の遺伝子発現に及ぼす影響

*Mitf*遺伝子の発現は、転写因子であるSOX10, PAX 3, CREB, 及びLEF 1により正に制御されている⁷⁾。そこで、これら転写因子の遺伝子発現に対するBD-17の影響を検討した (Fig. 7)。その結果、BD-17は*Sox10* mRNAの発現量を対照群の約50%に抑制し、*Pax 3* mRNAの発現量も約75%に抑制した。*Creb 1* mRNAと*Lef 1* mRNAの発現量には影響は認められなかった。

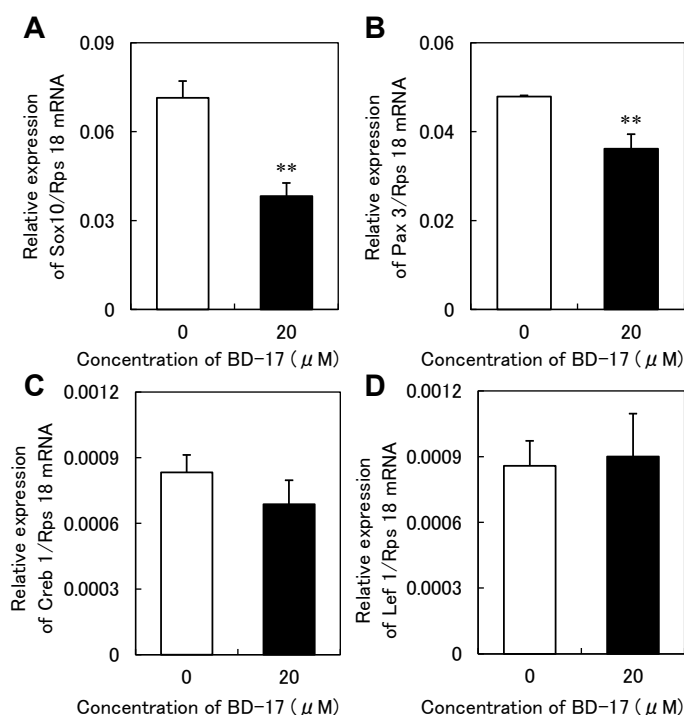


Fig. 7. Effects of BD-17 on mRNA expression of transcriptional factors crucial for upregulation of *Mitf* gene.

RNA was extracted from B16F10 cells treated as described in Figs. 4 (A, C). cDNA synthesis and real-time PCR were performed for mRNA of *Sox10* (A), *Pax* (B), *Creb1* (C) or *Lef1* (D) as described in the Materials and Methods. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. of triplicate wells. **, $P < 0.01$ vs. vehicle

考 察

我々はこれまでベツリン及びベツリン誘導体に関する一連の研究において、本研究と同様のがん移植マウスモデルを用いて抗腫瘍効果の評価を行ってきた²⁻⁴⁾。今回新たに開発したBD-17の抗腫瘍効果は、マウス当たり45 nmolの用量で一日一回腫瘍内に投与した場合、投与開始後11日目で腫瘍増殖を約74%抑制した ($p < 0.001$ vs 対照群)。この抑制効果は、既報で示したベツリンの抗腫瘍効果 (150 nmol/マウス, 同日での抑制率約68%, $p < 0.05$ vs 対照群)²⁾ よりも強かったが、カルバメート化誘導体 (45 nmol/マウス, 同日での抑制率約99%, $p < 0.001$ vs 対照群)³⁾ 及びアミノ酸付加誘導体 (15 nmol/マウス, 同日での抑制率約99%, $p < 0.001$ vs 対照群)⁴⁾ の抗腫瘍効果より弱かった。一方、BD-17はこれら誘導体で認められたような投与部位における明らかな発赤や腫脹などの炎症様症状を全く惹起せず、試験管内でのがん細胞増殖阻害作用 (50%阻害濃度) もベツリンの約3分の1に低下した。これらのことから、BD-17は副作用が大幅に改善された化合物であると考えられた。ところが、BD-17はTGF- β により抑制されたNK細胞の細胞傷害活性を回復させなかった。このことから、当初意図していたベツリンの免疫抑制解除作用を強化した誘導体の開発には繋がらないことが判明した。しかし、BD-17の低毒性と高い抗腫瘍効果は、従来の抗がん剤とは異なる新しい作用メカニズムで機能している可能性を示唆すると考えた。そこで、BD-17の作用メカニズムについて検討し、抗がん剤開発における有用性について考察した。

試験管内での検討から、BD-17はNK細胞に直接作用していないと考えられた (Fig. 2)。そこで、がん細胞に直接作用していると仮説を立て、DNAマイクロアレイによりがん細胞の遺伝子発現に与える影響を調べた。その結果、BD-17が*Mitf*遺伝子を中心とした遺伝子群の発現を大きく低下させることが分かった (Fig. 3)。*Mitf*遺伝子の発現抑制は、試験管内のがん細胞だけでなくマウスに移植した腫瘍内においても確認できた (Fig. 4 E)。これらのことから、BD-17の作用メカニズムに*Mitf*遺伝子の発現抑制が中心的な役割を担っていると考えた。

MITF分子は転写因子の一つであり、正常組織においては主に色素細胞 (メラノサイト)、骨形成細胞、視細胞、内耳の感覚細胞の発生や分化、機能に重要である⁸⁾。一方、がん組織では、とりわけメラノサイトから発生した悪性黒色腫の増殖及び転移に重要な分子として注目されている⁸⁾。実際、本研究で実施した

DNAマイクロアレイの検討では、細胞増殖に重要なBreast Cancer 1及びCyclin-Dependent Kinase 2の遺伝子発現がBD-17によりいずれも約75%抑制された (データ省略)。これらの遺伝子はMITF分子により発現制御を受けるため、BD-17の主な作用メカニズムは*Mitf*遺伝子の発現抑制とそれに伴う細胞増殖阻害であると考えられた。

では、BD-17はどのようにして*Mitf*遺伝子の発現を抑制しているか？*Mitf*遺伝子の発現は、主に細胞内cAMPをセカンドメッセンジャーとするシグナル経路及びWnt/ β カテニンシグナル経路の活性化に伴い誘導される転写因子 (CREB, LEF 1, SOX10, PAX 3) により正の制御を受けている⁷⁾。これまでに上記経路の阻害にもとづく*Mitf*遺伝子発現抑制作用としては、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤による*Sox10*遺伝子の発現抑制、また、HIV治療薬ネルフィナビルによる*Pax 3* 遺伝子の発現抑制を介した経路が報告されている^{9, 10)}。本研究では、これら転写因子の遺伝子発現に及ぼすBD-17の影響について検討したところ、BD-17が*Sox10*及び*Pax 3* 遺伝子の発現を有意に抑制することを見出した (Figs. 7 A and 7 B)。特に*Sox10*遺伝子の発現を強く抑制したことから、BD-17は主に*Sox10*遺伝子の発現抑制を介して*Mitf*遺伝子の発現を抑制していると考えられた。

一方、BD-17は、試験管内において、乳がん細胞 (マウス4T1細胞株) 及び結腸がん細胞 (マウスCT26細胞株) の増殖も阻害する (データ省略)。ところが、これらがん細胞の増殖におけるMITF分子の機能的な関与は報告されていない。このことは、BD-17がSOX10-MITF経路を特異的に阻害しているのではなく、がん細胞に普遍的に存在し機能する分子を標的としている可能性を示唆する。この点については、今後さらに検討が必要である。

ベツリンに関する一連の研究において、これまでに101個の誘導体を合成し有効性の評価を進めてきたが、ベツリンの免疫抑制解除効果を上回る化合物は見出せていない。一方で、がん移植マウスモデルにおいて強い抗腫瘍効果を示す化合物としてBD-17を見出した。さらに、予備的な検討ではあるが、BD-17がヒト悪性黒色腫の治療薬であるトラメチニブの抗腫瘍効果をB16悪性黒色腫移植マウスモデルにおいて顕著に増強することを認めている (データ省略)。また、BD-17はEG7 Tリンパ腫の皮下移植マウスモデルにおいて抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を増強することも明らかにした¹¹⁾。これまでにトラメチニブの抗腫瘍効果と抗PD-1抗体の抗腫瘍効果とともに増強する化合物は報告されていない。BD-17がどのようにしてこれら分子

メカニズムの異なるがん治療薬の作用を増強しているのか、その作用メカニズムを解明することはがん治療薬開発に資する可能性がある。この点においてBD-17は有用な化合物であると考え、今後、その分子メカニズムについて詳細な検討を進めたい。

文 献

- 1) 小笠原勝, 山崎思乃, 宮本朋美, 長井良憲, 松永孝之: がん細胞による免疫抑制を克服する天然物の探索 (2), 富山県薬事研究所年報, 39, 21-25 (2012)
- 2) Ogasawara M., Yamasaki-Yashiki S., Hamada M., Yamaguchi-Miyamoto T., Kawasuji T., Honda H., Yanagibashi T., Ikutani M., Watanabe Y., Fujimoto R., Matsunaga T., Nakajima N., Nagai Y., and Takatsu K.: Betulin Attenuates TGF- β 1- and PGE₂-Mediated Inhibition of NK Cell Activity to Suppress Tumor Progression and Metastasis in Mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 45 (3), 339-353 (2022)
- 3) 小笠原勝, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透, 長井良憲, 高津聖志: ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討, 富山県薬事研究所年報, 43, 17-21 (2016)
- 4) 小笠原勝, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透, 長井良憲, 高津聖志: アミノ酸付加ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討, 富山県薬事研究所年報, 44, 17-20 (2017)
- 5) Goding C.R.: Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage., *Genes Dev.*, 14 (14), 1712-1728 (2000)
- 6) Nakai N., Kishida T., Shin-Ya M., Imanishi J., Ueda Y., Kishimoto S., Mazda O.: Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf., *Gene Ther.*, 14(4), 357-365 (2007)
- 7) Shibahara S., Takeda K., Yasumoto K., Udono T., Watanabe K., Saito H., Takahashi K.: Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) : multiplicity in structure, function, and regulation., *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 6 (1), 99-104 (2001)
- 8) Goding C.R., Arnheiter H.: MITF-the first 25 years., *Genes Dev.* 33 (15-16), 983-1007 (2019)
- 9) Yokoyama S., Feige E., Poling L.L., Levy C., Widlund H.R., Khaled M., Kung A.L., Fisher D.E.: Pharmacologic suppression of MITF expression via HDAC inhibitors in the melanocyte lineage., *Pigment Cell Melanoma Res.*, 21 (4), 457-463 (2008)
- 10) Smith M.P., Brunton H., Rowling E.J., Ferguson J., Arozarena I., Miskolczi Z., Lee J.L., Girotti M.R., Marais R., Levesque M.P., Dummer R., Frederick D.T., Flaherty K.T., Cooper Z.A., Wargo J.A., Wellbrock C.: Inhibiting Drivers of Non-mutational Drug Tolerance Is a Salvage Strategy for Targeted Melanoma Therapy., *Cancer Cell.*, 29 (3), 270-284 (2016)
- 11) 小笠原勝, 榊崎浩亮, 濱田昌弘, 藤本亮太, 斎藤真冬, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透, 中島範行, 長井良憲, 高津聖志: EG7 Tリンパ腫皮下移植マウスモデルを用いたベツリン誘導体と抗PD-1抗体との併用効果の検討, 富山県薬事研究所年報, 45, 32-38 (2018)

培養細胞を対象とした相対定量プロテオーム解析

小島 理恵子, 渡邊 康春, 南谷 武春, 柳橋 努, 相川 幸彦, 富山県薬事研究会生物部会

Relative Quantitative Proteomic Analysis of Cultured Cells Treated with Tunicamycin and Peony Extract

Rieko KOJIMA, Yasuharu WATANABE, Takeharu MINAMITANI, Tsutomu YANAGIBASHI, Yukihiro AIKAWA, and The Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

本研究では富山県薬事研究会生物部会の活動において、プロテオーム解析の技術的可能性を理解し、実際にその手法を経験することを目的に、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンおよびシャクヤクエキスを添加したHeLa細胞を用いて、Tandem-mass tag (TMT) ラベルによる相対定量プロテオーム解析を実施した。ツニカマイシン処理により小胞体ストレス応答 (UPR) 関連タンパク質の発現が増加し、小胞体ストレス応答が誘導されたことが確認できた。一方、シャクヤクエキス処理では、脂質代謝およびリソソーム関連経路が顕著に変動し、特にコレステロールやガングリオシド代謝関連タンパク質の発現増加が認められた。また、スーパーオキシジスムターゼ2 (SOD2) の発現が増加したことから、シャクヤクエキ스가ミトコンドリアの酸化ストレス応答を介して抗酸化作用を示す可能性が考えられる。本研究により、プロテオーム解析が薬剤の新たな作用メカニズム解明に寄与し得ることが示された。

Summary

In this study, we performed TMT-labeled relative quantitative proteome analysis on HeLa cells treated with the endoplasmic reticulum (ER) stress inducer tunicamycin and peony extract, as part of the activities of The Biological Analysis Group in Toyama Pharmaceutical Research Association. Tunicamycin treatment increased the expression of proteins related to the unfolded protein response (UPR), confirming the induction of ER stress. Peony extract treatment suggested alterations in lipid metabolism and lysosome-related pathways, particularly by increasing the expression of proteins involved in cholesterol and ganglioside metabolism. Furthermore, peony extract upregulated superoxide dismutase 2 (SOD2) expression, suggesting that it may exert antioxidant effects by modulating the mitochondrial oxidative stress response. We believe that this study highlights the potential of proteome analysis in elucidating novel mechanisms of drug action.

キーワード：プロテオーム解析, TMT解析, 小胞体ストレス, シャクヤクエキス

Key words : Proteomic analysis, TMT analysis, ER stress, Peony extract

プロテオーム解析は、変動するタンパク質の発現量を直接的かつ網羅的に解析することが可能なため、新規薬標的分子や疾患バイオマーカーの探索、薬理作用の解明などに活用され、医薬品産業の発展に大きく寄与している。近年の質量分析計の進歩とともに、プロテオーム解析技術も飛躍的に発展しており、検出感度、定量再現性、網羅性が向上している。さらに、従来は複雑であったサンプル前処理についても、市販のプロテオーム解析用試薬やキットを利用することで簡便かつ迅速に実施可能となってきた。

薬事総合研究開発センターではこれまでに、創薬研究開発の県内振興を目指した研究活動の一環として、ナノ液体クロマトグラフィーオントラップ型質量分析

計を用いて、(1) 同位体標識試薬を用いた相対定量プロテオーム解析、(2) リン酸化プロテオーム解析、(3) 相互作用タンパク質解析、(4) バイオ医薬品中の不純物である宿主由来細胞タンパク質 (HCP) 解析について検討してきた。そこで令和6年度の富山県薬事研究会生物部会では、プロテオーム解析の技術的可能性を理解し、実際にその手法を経験することを目的として、(1) 同位体標識試薬を用いた相対定量プロテオーム解析の応用事例として、培養細胞を対象としたタンパク質の網羅的相対定量解析を実施した。本研究では、異なる質量のレポーター部位とバランサー部位とを組み合わせることで同一の質量を持たせた同位体標識試薬であるTandem-mass tag (TMT) を用いて、試

料中のタンパク質（ペプチド）を標識し、MSⁿスペクトルにおけるレポーター部のイオン強度を基に、異なる試料中のタンパク質発現量を相対的に定量する手法を用いた。今回の解析では、薬物処理を施した培養細胞を試料とし、非処理細胞との比較によりタンパク質発現量の変化を網羅的に調べ、プロテオーム解析の実践的な理解を深めた。

方 法

1. 使用した細胞と薬剤

本研究では、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞にツニカマイシンおよびシャクヤクエキスを添加し、それに伴うプロテオーム変化を解析することとした。HeLa細胞は汎用性および再現性が高く、さまざまな薬剤応答のモデルとして広く利用される細胞であること、さらに、ツニカマイシン添加によるプロテオーム変化が詳細に報告されていること¹⁾から、本研究におけるモデル細胞として選択した。ツニカマイシンは、小胞体内での翻訳後修飾であるN-結合型糖鎖修飾を阻害することにより小胞体ストレスを誘導し、タンパク質のフォールディング形成不全や不良タンパク質の蓄積を引き起こす²⁾。小胞体ストレスを受けた細胞では、小胞体ストレス応答（UPR, Unfolded Protein Response）が活性化され、シャペロンの転写誘導、新規タンパク質の翻訳抑制、不良タンパク質の分解促進を介して細胞の恒常性維持を図るが、ストレスが過剰になるとアポトーシスが引き起こされる²⁾。小胞体ストレスを受けたHeLa細胞におけるプロテオーム変化はItzhakらによって報告されており¹⁾、UPR活性化に必要な小胞体ストレス誘導剤の濃度や処理時間、さらに実際に発現が増加するタンパク質が明らかになっている。本研究では、プロテオーム変化が既知の薬剤として小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンを選択し、小胞体ストレスに関連するタンパク質の発現が実際に増加することを確認するための対照とした。

一方、プロテオーム変化が未知の薬剤として、富山県薬事研究会生物部会の参加者（10名）の意見や入手の容易さを考慮し、シャクヤクエキスを選択した。シャクヤク（*Paeonia lactiflora* Pallas）の乾燥根から抽出されるシャクヤクエキスは、鎮痛、鎮痙、鎮静、収れん作用を有し、抗炎症作用や抗酸化作用があると考えられている^{3, 4)}。また、マウスマクロファージRAW264.7細胞においてシャクヤクエキスを添加（最終濃度100~1000 µg/mL）すると、痛みの増強物質であるプロスタグランジンE₂（PGE₂）の産生を抑

制することが報告されている³⁾。エキスには主要成分としてペオニフロリン、アルビフロリン、ベンゾイルペオニフロリン、タンニンなどが含まれており、本研究では、これらの成分を含むシャクヤクエキスが細胞のプロテオームに与える影響を解析し、その薬理学的特性を明らかにすることを試みた。シャクヤクエキスは、富山県薬用植物指導センターで栽培されたシャクヤクの根から既報³⁾に従い調製した。なお、本研究で用いたシャクヤクエキス（200 µg/mL）中のエンドトキシン量は、日本薬局方の注射用水の規格値（0.25 EU/mL以下）を満たすことから、エンドトキシンがタンパク質発現に影響する可能性は極めて低いと考えられる。

2. 細胞培養と薬剤添加、細胞回収

ヒト子宮頸部癌由来細胞株HeLa細胞（HeLa S3 JCRB9010, JCRB細胞バンク（医薬基盤・健康・栄養研究所）は、10%非働化ウシ胎児血清（FBS, ニチレイバイオサイエンス）、100 U/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、292 µg/mL L-グルタミン、及び1 µM ピルビン酸ナトリウムを含むDMEM培地にて継代、維持した。HeLa S3細胞は12ウェルプレートに90,000 cells/wellとなるよう播種し、CO₂インキュベーターで37°C、20時間培養した後、ツニカマイシン（最終濃度5 µg/mL, n=3, 富士フイルム和光純薬）とシャクヤクエキス（最終濃度200 µg/mL, n=3）の存在下または非存在下（VehicleとしてDMSOを最終濃度0.4%（v/v）となるよう添加, n=3）で22時間培養した。細胞は氷冷したPBSで3回洗浄し、500 µLのPTS buffer（12 mM Sodium deoxycholate, 12 mM Sodium lauroyl sarcosinate, 50 mM Ammonium bicarbonate, Protease inhibitor Complete EDTA-free）を加えてピペッティングにより懸濁し、回収した。シャクヤクエキスの濃度は、RAW264.7細胞で抗炎症作用が確認されている濃度を参考に³⁾、最終濃度を200 µg/mLとした。

3. SP3法によるタンパク質抽出、還元アルキル化、タンパク質消化

本研究で実施したTMTラベルによる相対定量プロテオーム解析の流れを図1に示す。細胞からのタンパク質抽出、還元アルキル化、界面活性剤の除去、酵素消化は、SP3（single-pot solid-phase-enhanced sample preparation）法^{5, 6)}により行った。細胞は95°Cで5分間インキュベートして酵素類を失活させた後に、超音波破碎装置により破碎した（High出力, 30 sec × 15回, BIORUPTOR II, ソニック・バイオ）。



図1: TMTラベルによる相対定量
プロテオーム解析の流れ

細胞溶解液中のタンパク質量はBCAアッセイにより定量し (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific), タンパク質20 μg を計100 μL となるようPTS bufferで調製した. 0.5 M トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) を2 μL 加えて37° Cで1時間インキュベート後, 0.5 Mヨードアセトアミドを4 μL 加え37° Cで30分間インキュベートし, 還元アルキル化処理を行った. 還元アルキル化処理サンプルにSP 3 ビーズ懸濁液 (Sera-Ma SpeedBead Carboxylate-Modified [E 3] Magnetic ParticlesとSera-Mag SpeedBead Carboxylate-Modified [E 7] Magnetic Particles (Cytiva) を等量混合し, 蒸留水で平衡化したもの) を5 μL 加え, エタノールをサンプルと等量加えて室温で10分間, 750 rpmで振盪し, タンパク質をSP 3 ビーズに吸着させた. サンプルをマグネットスタンドに置き上清を除去後, 80%エタノールによるビーズの洗浄を3回行い, エタノールを除いたSP 3 ビーズに50 μL の消化酵素液 (4 ng/ μL トリプシン (シーケンシンググレード, Promega), 4 ng/ μL リシルエンドペプチダーゼ (質量分析グレード, 富士フイルム和光純薬), 50 mM Ammonium bicarbonate) を加えて攪拌後, 37° C, 750 rpmで一晩振盪し, タンパク質を消化した.

4. 脱塩とTMTラベル化, ペプチドの分画

サンプルは, C18固相抽出ディスク (CDS Analytical) から作製した逆相スピンカラム (C18 Stage Tip)^{7, 8)} を用いて脱塩後, 冷却遠心濃縮装置 (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) により乾燥した. 続いて,

TMT10plex Isobaric Label Reagents (Thermo Fisher Scientific) を用いて付属のプロトコルに従い TMTラベル化反応を行い, 全サンプルを混合して1つにまとめた. 混合後のサンプルは, 逆相-陽イオン交換スピンカラム (C18-SCX StageTips) を用いて, 表1に示す7種類の溶媒によりステップワイズ溶出を行い, 分画した^{7, 8)}. 分画後の各サンプルは, 冷却遠心濃縮装置により乾燥後, 10 μL のSC buffer (0.1% TFA, 2%アセトニトリル) に懸濁し, そのうち0.5 μL ずつをLC-MS³測定に供した.

TMT試薬は, 異なる質量のレポーター部位とバルンサー部位とを組み合わせることで同一の質量を持たせた同位体標識試薬である. また, TMT解析は, 複数のサンプルをそれぞれ異なるTMT試薬で標識し, 一括して測定することで高精度な相対定量を可能とするプロテオーム解析手法である. TMT試薬でラベルされたペプチドは, MS³測定において放出されるレポーターイオンの強度に基づいて定量される. 本研究では, TMTラベル化後に全サンプルを混合した後, サンプルの複雑性を低減してタンパク質同定数および定量精度を向上させるため, 逆相-陽イオン交換カラムを用いて7分画を行った.

5. LC-MS³測定

測定に用いたLC-MS³条件を図2に示す. 質量分析装置には, PAL-LSIオートサンプラー (AMR) を接続したUltiMate 3000 RSLCnano UHPLC (Thermo Fisher Scientific) と, ハイブリッド質量分析計Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific) から構成されるLC-MSシステムを使用した. トラップカラムにはPepMap Neo C18 (300 μm $\times$ 5 mm, Thermo Fisher Scientific) を, 分析カラムにはC18 NANO HPLC CAPILLARY COLUMN (75 μm $\times$ 120 mm, 日京テクノス) を使用し, カラムオーブンは40° Cに設定した. タンパク質100 μg 分を分画したサンプルをLC-MS³測定に供し, B液を5% (0分) $\rightarrow$ 35% (90分) までのリニアグラジエントによりペプチドを溶出した (A液0.1% ギ酸; B液100% アセトニトリル). 測定はSynchronous precursor selection (SPS) - MS³モードで行った.

6. 解析

取得したLC-MS³データは, 解析ソフトウェアProteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した. 各分画のLC-MS³データは統合し, 以下のパラメーター設定に基づいてタンパク質の同定および定量を行った. Protein Database,

表1: ペプチド分画に用いた溶媒

フラクション	Ammonium acetate (mM)	TFA (%)	アセトニトリル (%)
1	0	2	30
2	0	3	30
3	0	4	30
4	0	6	30
5	100	6	30
6	500	8	30
7	500	0	30

LC装置: PAL-LSIオートサンプラー (AMR) +
UltiMate 3000 RSLCnano UHPLC
(Thermo Fisher Scientific)

LC条件

- 流速: 0.28 $\mu\text{L}/\text{min}$
- カラム: C18 NANO HPLC CAPILLARY COLUMN (75 μm x 120 mm, 3 μm)
- (日京テクノス, NTCC-360/75-3)
- 移動相A: 0.1% ギ酸
- 移動相B: 100% アセトニトリル
- グラジエント
 - 0-90 min: 5-35% B
 - 90-91 min: 35-95 %B
 - 91-93 min: 95% B
 - 93-94 min: 95-5% B
 - 94-120 min: 5% B
- カラム温度: 40°C
- 注入量: 1 μL

MS装置: Orbitrap Fusion Lumos Tribid (Thermo Scientific)

MS条件 (SPS-MS³モード)

	Parameter	Value
ddMS2	Isolation Window (m/z)	0.7
	Activation Type	CID
	Collision Energy Mode	Fixed
	Collision Energy (%)	35
	Detector Type	Ion Trap
	Ion Trap Scan Rate	Turbo
	AGC Target	Standard
ddMS3	Synchronous Precursor Selection	On
	Number of SPS Precursors	10
	Activation Type	HCD
	HCD Collision Energy Type	Normalized
	HCD Collision Energy (%)	55
	Detector Type	Orbitrap
	Orbitrap Resolution	50000
	Scan Range Mode	Define m/z range
	Scan Range (m/z)	100-500
	AGC Target	Custom
	Normalized AGC Target (%)	300

図2: 測定に用いたLC-MS³条件

UniProt Homo Sapiens (Human) (UP000005640); static modification, TMT labeling of N-terminus and lysine, carbamidomethylation of cysteine; variable modification, N-terminal protein acetylation, methionine oxidation; mass tolerance, 10 ppm; Fragment ion mass tolerance, 0.6 Da; digestion parameters for enzyme, Trypsin; maximum false discovery rate (FDR) on protein, peptide and PTM-site level, 0.01; peptides to use, Unique+Razor; reporter abundance based on, Automatic; protein ratio calculation, Protein Abundance Based; hypothesis test, ANOVA (Individual Proteins); normalization mode, Total Peptide Amount. タンパク質の定量には, 特定のタンパク質にのみ存在するユニークペプチド (Unique peptide) と, 複数のタンパク質に共有されるが解析上最も妥当なタンパク質に割り当てられるレーザーペプチド (Razor peptide) の両方を用いた。また, サンプル間の測定誤差を補正するため, 全ペプチドの総シグナル値 (Total Peptide

Amount) による正規化を行った。ペプチドの同定結果のうち, 偽陽性率 (False Discovery Rate) を全体の1%未満に抑える基準に設定した。群間の統計的差異の評価には, 各タンパク質の発現量に対して分散分析 (ANOVA) を適用し, 群間に有意な変動を示すタンパク質をP値 (有意確率) に基づいて判定した。

結 果

ツニカマイシンを添加したHeLa細胞におけるプロテオームの発現量変化をボルケーノプロットに示した (図3)。計4,322のタンパク質が同定され, そのうち発現が1.3倍以上変動し, かつ統計学的に有意と判断された ($p < 0.05$) タンパク質は85 (同定タンパク質の約2%) であった。発現が増加したタンパク質が56, 発現減少したタンパク質が29であった。UPRの主要なマーカーとして知られる小胞体シャペロンのBiP/GRP78 (遺伝子名: HSPA5) は, 約3.8倍発現量が増加した。同様にUPRの活性化にともない発現量

が増加することが分かっているGRP94 (HSP90B1) やカルネキシン (CANX), カルレティキュリン (CALR) 等の小胞体シャペロンの増加も確認できた。一方で、転写因子としてUPR関連タンパク質の発現誘導を担うATF4やXBP1は同定されなかった。これらの転写因子は、小胞体ストレス刺激を受けて数時間以内に一時的に発現増加するが、その後はフィードバック機構により速やかに分解されるため²⁾、今回の長時間(22時間)のストレス誘導下では検出されなかったと考えられる。ツニカマイシン添加により発現増加した56のタンパク質をGene Ontology (GO) 分析した結果、“Protein folding in endoplasmic reticulum”をはじめ、UPRやERAD(小胞体関連分解, ER-associated degradation: 小胞体内でミスフォールドした異常タンパク質を細胞質へ移行させ、プロテアソーム依存的に分解する品質管理機構。小胞体ストレス応答の一環として機能する)等の小胞体ストレスと直接的に関連している経路が統計的に有意に濃縮された(すなわち、変動タンパク質がこれらの経路に偏って多く含まれていた)(図4)。続いてアミノ酸の合成や代謝、tRNAのアミノアシル化と関連した経路が濃縮された。前述の転写因子ATF4はアミノ酸代謝に関わるタンパク質の発現を調節していることや、UPR関連タンパク質の翻訳促進にはtRNAの適切な供給が重

要であることから²⁾、UPR機構の一環としてこれらの経路に関わるタンパク質の発現が増加したものと考えられる。以上の結果から、ツニカマイシン添加により小胞体ストレスが誘導され、UPRに関連するタンパク質の発現が増加し、細胞が恒常性維持に向けた適応応答を示していることがプロテオーム解析により確認できた。

シャクヤクエキスを添加したHeLa細胞において、発現量が1.3倍以上増減したタンパク質は117(約2.7%)あり、うち発現増加したタンパク質が89、発現減少したタンパク質が28であった(図5)。GO分析の結果、発現増加したタンパク質は脂質の輸送および代謝に関与する経路が顕著に濃縮され、次いでリソソーム関連の経路が濃縮された(図6)。さらに、発現が増加したタンパク質のうち脂質に関連する機能を持つものを解析したところ、コレステロールの合成・代謝、およびスフィンゴ脂質(ガングリオシド)の分解に関与するタンパク質がそれぞれ5つ確認された(表2)。加えて、リン脂質を含むその他の脂質の分解に関与するタンパク質の発現増加も認められた(表2)。これらのタンパク質の多くがリソソームに局在することから、脂質を含む多様な生体分子の分解の場として知られるリソソームにおいて、脂質代謝が大きく変化した可能性が示唆された。また、抗酸化

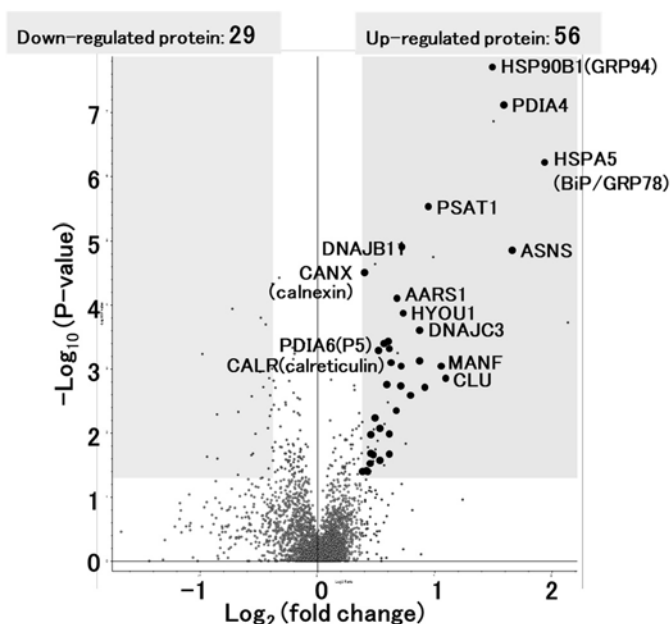


図3: ツニカマイシン添加によるプロテオームの発現量変化

ツニカマイシン(5 µg/mL)またはVehicle (DMSO)を添加したHeLa S3細胞におけるタンパク質発現レベルの差異を示したボルケーノプロット。各ドットは個々の同定タンパク質を表し、n = 3の測定結果に基づくLog₂ fold changeの中央値と対応するp値をプロットした。ツニカマイシン処理により発現が有意に変動したタンパク質 ($p < 0.05$)はグレーのエリアに示され、増加したタンパク質は右側、減少したタンパク質は左側に分布する。小胞体ストレスによる発現誘導が既知のタンパク質は、一回り大きなドットで強調表示した。

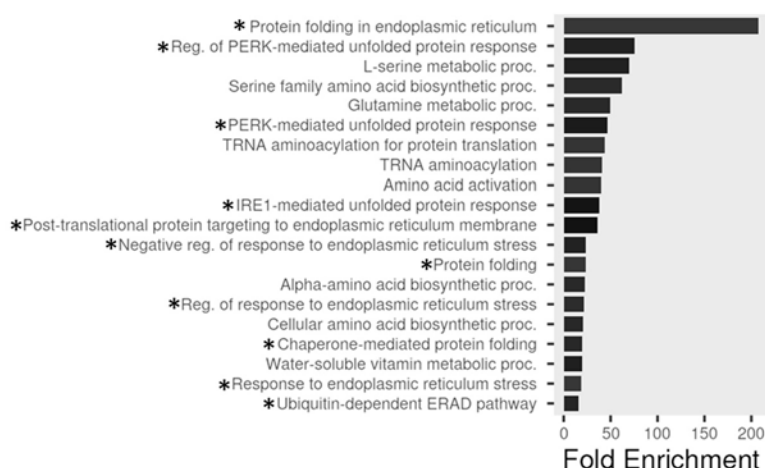


図4: ツニカマイシン添加により発現増加した56タンパク質のGO分析結果

Web上でGO分析が可能なShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>)を用いて、Biological Process (Gene Ontology Consortium: <https://geneontology.org>)に基づくGO分析を実施した。ツニカマイシン添加により発現が増加したタンパク質について、統計的に有意な関連が認められたBiological ProcessをFold Enrichmentの値で示した ($-\log_{10}(\text{FDR}) > 5$)。小胞体ストレスに直接的に関連するBiological Processには*を付した。

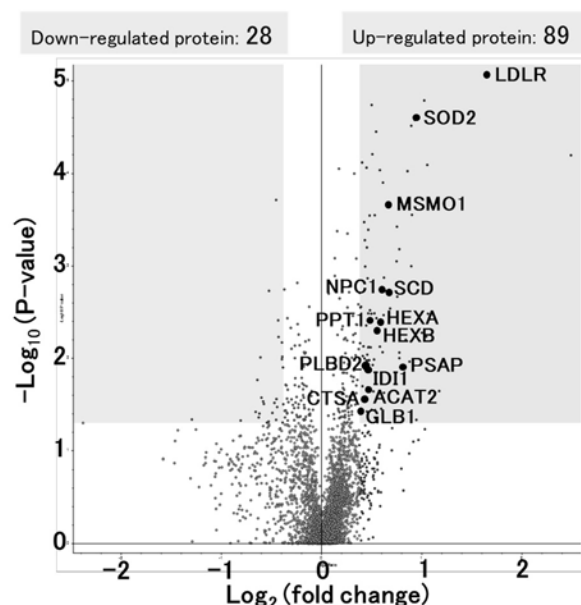


図5: シャクヤクエキス添加によるプロテオームの発現量変化

シャクヤクエキス (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) またはVehicle (DMSO) を添加したHeLa S3細胞におけるタンパク質発現レベルの差異を示したボルケーノプロット。各ドットは個々の同定タンパク質を表し、 $n = 3$ の測定結果に基づく Log_2 fold changeの中央値と対応するp値をプロットした。シャクヤクエキス添加により発現が有意に変動したタンパク質 ($p < 0.05$)はグレーのエリアに示され、増加したタンパク質は右側、減少したタンパク質は左側に分布する。シャクヤクエキス添加により発現が増加した脂質関連タンパク質(表2参照)ならびにSOD2を一回り大きなドットで強調表示した。

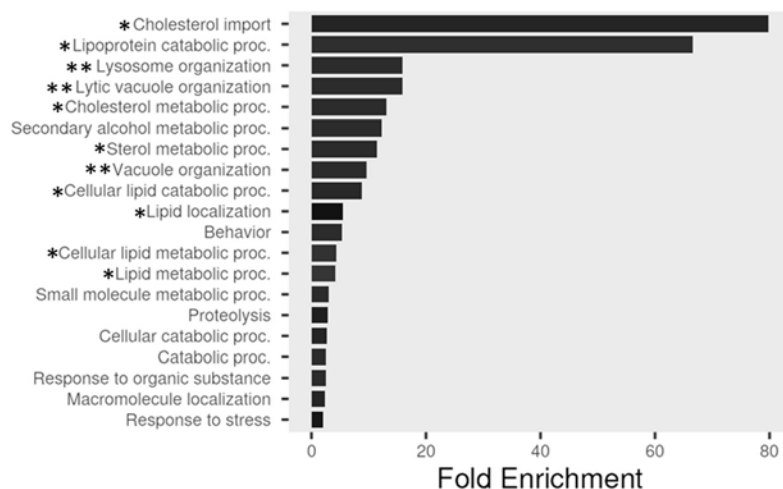


図6: シャクヤクエキス添加により発現増加した89タンパク質のGO分析結果

ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>)を用いて、Biological Processに基づきGO分析した結果を示す。シャクヤクエキス添加により発現が増加したタンパク質について、統計的に有意な関連が認められたBiological ProcessをFold Enrichmentの値で示した ($-\log_{10}(\text{FDR}) > 3$)。脂質に関連するBiological Processに*を、リソソームに関連するプロセスに**を付した。

作用を担う酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ2 (SOD2) の増加が認められた。一方、シャクヤクエキス添加により発現減少した28タンパク質についてGO分析したところ、Biological Processのカテゴリでは有意に濃縮された経路は認められなかったが、Cellular Componentのカテゴリにおいてミトコンドリア呼吸鎖複合体II (succinate dehydrogenase complex) およびChromatin accessibility complex (CHRAC)、リボソームに局在するタンパク質が有意に濃縮された (図7)。

考 察

本研究では、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンおよびシャクヤクエキスを添加したHeLa細胞に対し、TMTラベルによる相対定量プロテオーム解析を実施した。ツニカマイシン処理においては、UPRマーカーであるBiP/GRP78を筆頭に、UPR関連タンパク質の発現が増加した。またGO分析において小胞体ストレスと直接的に関連している経路が顕著に濃縮されたことから、本研究で得られたプロテオームデータは、既存の知見と整合性を有し、小胞体ストレス応答が誘導された結果を反映していることを示している。一方で、小胞体ストレスとの関連が報告されていないタンパク質もいくつか発現レベルの増加を示した。例えば、種々の癌において高発現し細胞接着や免疫応答に関与しているGalectin-3-binding protein (LGALS3BP)⁹⁾ や、イノシトールリン脂質代謝系

を介して細胞内のシグナル伝達を担いホロ脳症の原因遺伝子でもあるphospholipase C eta-1 (PLCH1)¹⁰⁾ などが該当し、それぞれ、Vehicle処理に対して、2.0倍と2.8倍発現量が増加していた。これらのタンパク質の発現増加がUPRと直接的に関連するのか、あるいはツニカマイシンによるオフターゲット効果として発現変動が生じたのかは明確ではないが、UPRの新たな側面を示唆する可能性もあり、プロテオーム解析の未知の分子機構を明らかにする手段としての有用性を示していると考えられる。

シャクヤクエキスを添加したHeLa細胞においては、GO分析の結果、脂質の輸送・代謝に関与する経路およびリソソーム関連のプロセスが顕著に変動し、中でもコレステロールやスフィンゴ脂質（特にガングリオシド）を含む脂質代謝関連タンパク質が発現増加していることが明らかとなった。これらの結果は、シャクヤクエキスが細胞内脂質代謝に広範に影響を及ぼし、特にリソソームを介した脂質の分解および再利用経路（オートファジー等）を活性化する可能性を示唆している。炎症応答において脂質代謝が動的に変化することが知られていることから¹¹⁾、この結果はシャクヤクエキスの抗炎症作用機序の一端を示している可能性がある。シャクヤクエキスの主要成分であるペオニフロリンをアテローム性動脈硬化症および脂質異常症のモデルラットに投与すると、コレステロールおよびその代謝物量の減少と抗炎症作用を示すことが報告されている^{12, 13)}。さらに、ペオニフロリンおよびアルビフロリンが、コレステロールに加えてリン脂質、スフィン

表2: シャクヤクエキス添加により発現増加した脂質関連タンパク質

遺伝子名	タンパク質名	機能	細胞内局在
LDLR	Low-density lipoprotein (LDL) receptor	LDL(悪玉コレステロール)の細胞内取り込みや代謝	リソソーム、エンドソーム、細胞膜
MSMO1	Methylsterol monooxygenase 1	コレステロールの合成・代謝	小胞体
NPC1	NPC intracellular cholesterol transporter 1	コレステロール、スフィンゴ脂質の輸送	リソソーム、エンドソーム
IDI1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	コレステロールの合成 (イソプレノイド生合成)	小胞体、サイトソル
ACAT2	Acetyl-CoA acetyltransferase	コレステロールエステルの合成	小胞体、サイトソル
HEXA	β -hexosaminidase subunit α	スフィンゴ脂質代謝 (GM2ガングリオシドの分解)	リソソーム
HEXB	β -hexosaminidase subunit β	スフィンゴ脂質代謝 (GM2ガングリオシドの分解)	リソソーム
PSAP	Prosaposin	スフィンゴ糖脂質の加水分解	リソソーム
GLB1	β -galactosidase	スフィンゴ脂質 (GM1ガングリオシド等)の分解	リソソーム
CTSA	Lysosomal protective protein	β -galactosidaseの活性に必須	リソソーム
PPT1	Palmitoyl-protein thioesterase 1	パルミトイル化タンパク質の分解	リソソーム
SCD	acyl-CoA desaturase	脂肪酸の不飽和化	小胞体
PLBD2	Putative phospholipase B-like 2	リン脂質の分解	リソソーム

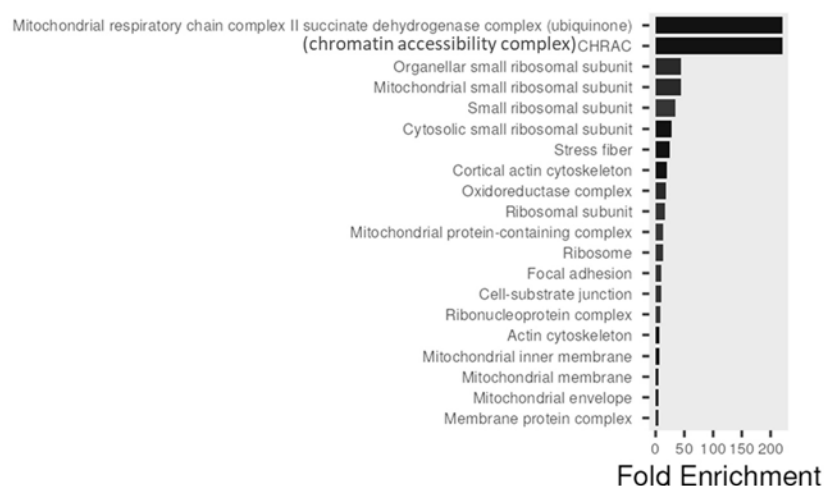


図7: シャクヤクエキス添加により発現減少した28タンパク質のGO分析結果

ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>)を用いて、Cellular Componentに基づきGO分析した結果を示す。シャクヤクエキス添加により発現が減少したタンパク質について、統計的に有意な関連が認められたBiological ProcessをFold Enrichmentの値で示した ($-\log_{10}(\text{FDR}) > 1.5$)。

ゴ脂質、脂肪酸などの脂質代謝を介して急性肝障害を改善する可能性が示されている¹⁴⁾。一方で、スフィンゴ脂質の一種であるガングリオシドの代謝に対するペオニフロリンの影響については、詳細な検討がなされていない。ガングリオシドは神経系におけるシグナル伝達や細胞間相互作用に重要な役割を果たすことが知られており、その異常蓄積はリソソーム病や神経変性

疾患の原因となるため、適切に代謝制御されることが重要であると考えられている^{15, 16)}。今後、シャクヤクエキスのガングリオシド分解に関わる、新たな薬理作用の解明が期待される。また、シャクヤクエキスには抗酸化作用を有することが知られており、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去能を用いた評価においても抗酸化活性が確認され

ている¹⁷⁾。シャクヤクエキスを添加したHeLa細胞では、ミトコンドリア局在型スーパーオキシドジスムターゼ (SOD 2) の発現が再現良く 2 倍程度増加することが確認された。SOD 2 はミトコンドリア内の内で活性酸素種 (ROS) のスーパーオキシド (O_2^-) を O_2 または H_2O_2 に変換する酵素で、ミトコンドリア内の酸化ストレスを低減させ細胞を保護する¹⁸⁾ ことから、シャクヤクエキスがミトコンドリアにおける酸化ストレス応答を調節する可能性が示唆される。今後、シャクヤクエキスがSOD 2 の転写活性や酵素活性に与える影響や、ミトコンドリア内の酸化ストレスを低減させるかを調べる等により、より詳細に関連性を検討していく必要があると考える。また、今回の解析ではシャクヤクエキス添加によりPGE₂ 産生に参与する酵素の発現変動は確認されなかったが、RAW264.7細胞ではPGE₂ 産生の抑制が確認されている³⁾。この結果は、細胞種の違いに加え、PGE 2 産生の抑制が酵素の発現変動を伴わずに生じる可能性を示唆しており、酵素活性や翻訳後修飾などを含む多角的な解析が今後の課題であると考えられる。一方、シャクヤクエキス添加により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IIやクロマチンリモデリング複合体の一つであるCHRAC、リボソーム関連タンパク質が発現減少していたこと (図 7) から、シャクヤクエキ스가エネルギー代謝、転写制御、タンパク質合成といった細胞内の基本的な機能に広範な影響を及ぼす可能性がある。炎症応答の抑制などの細胞機能制御に関連している可能性も考えられるため、今後、炎症刺激を加えた免疫系培養細胞を用いた検討により、シャクヤクエキスの薬理作用の機序をより詳細に調べる必要がある。

本研究により、相対定量プロテオーム解析が薬剤の新たな作用メカニズム解明に寄与し得ることが示され、その有用性を明確に認識することができたと考える。

文 献

- 1) Itzhak, D., Sacco, F., Nagaraj, N., Tyanova, S., Mann, M., and Murgia, M.: SILAC-based quantitative proteomics using mass spectrometry quantifies endoplasmic reticulum stress in whole HeLa cells, *Disease Models & Mechanisms*, 12 (11) , dmm040741 (2019)
- 2) Ron, D. and Walter, P.: Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8 (7) , 519-529 (2007)
- 3) 宮本 (山口) 朋美, 本田裕恵, 田村隆幸, 横田洋一, 松永孝之: 液体クロマトグラフィー/シャクヤクの品種別薬理試験 (4) シャクヤクエキスの Prostaglandin E2 (PGE2) 産生抑制作用, 富山県薬事研究所年報, 40, 33-38 (2013)
- 4) 本田裕恵, 宮本 (山口) 朋美, 横田洋一, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別薬理試験 (5) シャクヤクエキスの IL-6 産生抑制効果に関する検討, 富山県薬事研究所年報, 40, 39-45 (2013)
- 5) 足立淳: プロテオミクス前処理の迅速化・簡便化について, *日本電気泳動学会誌*, 62, 39-41 (2018)
- 6) 馬場健史, 松本雅記, 松田史生, 山本淳史: 決定版 質量分析活用スタンダード, p. 154-160, 羊土社, 東京 (2023)
- 7) 足立淳, 佐藤彩子, 朝長毅: ペプチド分画用陽イオン交換カラムの性能比較, *日本プロテオーム学会誌*, 1, 9-24 (2016)
- 8) Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y.: Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips, *Nature Protocols*, 2 (8) , 1896-1906 (2007)
- 9) Capone, E., Iacobelli, S., and Sala, G.: Role of galectin 3 binding protein in cancer progression: a potential novel therapeutic target, *J Transl Med.*, 19 (1) , 405 (2021)
- 10) Drissi, I., Fletcher, E., Shaheen, R., Nahorski, M., Alhashem, AM., Lisgo, S., Fernández-Jaén, A., Schon, K., Tlili-Graies, K., Smithson, SF., Lindsay, S., Sharpe, HJ., Alkuraya, FS., and Woods, G.: Mutations in phospholipase C eta-1 (PLCH1) are associated with holoprosencephaly, *J Med Genet.*, 59 (4) , 358-365 (2022)
- 11) 大石由美子: 脂肪酸代謝制御による炎症反応の収束, *生化学*, 89 (6), 907-910 (2017)
- 12) Hu, H., Zhu, Q., Su, J., Wu, Y., Zhu, Y., Wang, Y., Fang, H., Pang, M., Li, B., Chen, S., Lv, G.: Effects of an Enriched Extract of Paeoniflorin, a Monoterpene Glycoside used in Chinese Herbal Medicine, on Cholesterol Metabolism in a Hyperlipidemic Rat Model, *Medical Science Monitor*, 23, 3412-3427 (2017)
- 13) Li, H., Jiao, Y., and Xie, M.: Paeoniflorin Ameliorates Atherosclerosis by Suppressing TLR4-Mediated NF- κ B Activation, *Inflammation*, 40 (6) , 2042-2051 (2017)

- 14) Li, X., Xie, J., Li, Y., Cui, W., Zhang, T., Li, Q., Bi, K., Liu, R.: A comprehensive strategy of lipidomics and pharmacokinetics based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry of Shaoyao Gancan Decoction, *J Sep Sci.*, 47 (17) , 2400421 (2024)
- 15) 辻大輔, 伊藤孝司: リソソームの生理機能制御とリソソーム病における異常, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 90 (1), 60-68 (2018)
- 16) 井ノ口仁一: ガングリオシドファミリーの分子種選択的発現と生理活性脂質としての意義, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 87 (5), 560-572 (2015)
- 17) 川筋達, 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: シャクヤクの品種別薬理試験 (5) 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*, 43, 29-34 (2015)
- 18) Flynn, J.M. and Melov, S.: SOD2 in Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration, *Free Radic Biol Med.*, 62, 4-12 (2013)

ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討（第4報）

柚木 芳, 高山 信幸, 米田 哲也, 小笠原 勝, 薬事研究会分析部会

A basic study on the analysis of elemental impurities using inductivity coupled plasma mass spectrometry (the Fourth Report)

Kaori YUNOKI, Nobuyuki TAKAYAMA, Tetsuya YONEDA, Masaru OGASAWARA,
The Chemical Analysis Study Group in Toyama Pharmaceutical Research Association

要 約

医薬品中の元素不純物を正確に分析するため、誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）におけるキャリーオーバーの制御は非常に重要である。本研究では、日本薬局方の元素不純物試験で規定される24元素について、キャリーオーバーとその抑制について検討した。その結果、オスミウムと水銀のキャリーオーバーは試料への塩酸の添加やシステイン溶液の使用により抑制できることが分かった。さらに、システインを内標準ラインから導入することで簡便にオスミウムや水銀のキャリーオーバーを抑制できた。また、マイクロ波分解後にオスミウムが実際よりも高い値で検出される現象（過大な見積り）についてもサンプルへのシステイン添加によって抑制できることが明らかとなった。この結果は、オスミウムと水銀のキャリーオーバーおよびオスミウムのマイクロ波分解後の過大な見積りが、システインにより同時に抑制可能であることを示している。本研究の成果は、ICP-MS測定精度向上に貢献すると考えられる。

Summary

Suppression of carryover is essential for the accurate determination of elemental impurities in pharmaceuticals using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This study evaluated the carryover characteristics and reduction strategies for 24 elements specified in the elemental impurity test of the Japanese Pharmacopoeia. Our study demonstrated that the carryover of osmium and mercury was efficiently reduced by hydrochloric acid or cysteine solutions. Furthermore, the introduction of cysteine solution via the internal standard line enabled the suppression of carryover for these elements in a more practical manner. In addition, the addition of cysteine following microwave digestion mitigated the overestimation of osmium quantification. These results demonstrate that cysteine can simultaneously suppress the carryover of osmium and mercury and mitigate the overestimation of osmium quantification. The findings of this study are expected to contribute to improving the accuracy of ICP-MS measurements.

キーワード：元素不純物, 誘導結合プラズマ質量分析計, マイクロ波分解, キャリーオーバー, システイン

Key words：elemental impurity, inductively coupled plasma mass spectrometry, microwave decomposition, carryover, cysteine

医薬品における元素不純物の正確な定量は、製品の安全性を確保し、各国の規制要件を満たす上で極めて重要である。日本薬局方（日局）においても、元素不純物に関する管理が求められており、24の金属元素について規定されている¹⁾。

日局の元素不純物試験では、誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP-AES）または誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）の適用が認められている。ICP-MSは高感度で多元素同時測定が可能のため、最も一般的に採用されているが、一部の元素においてキャリーオーバーが発生し、測定結果の信頼性を低下させる場合がある。

キャリーオーバー対策としては、水銀を対象に添加剤を用いた抑制法が検討されており、Triton X-100や金、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、2-メルカプトエタノール、システインなどの有効性が報告されている²⁻⁴⁾。システインは、水銀のキャリーオーバーを抑制するだけでなく、食品添加物として広く用いられる安全性の高いアミノ酸であるため、分析現場においても取り扱いやすい。一方、システインの効果は水銀に関する報告が中心であり、オスミウムやその他の日局規定元素に対する検討は十分ではない。

オスミウムのICP-MS分析では、マイクロ波分解の過程で揮発性の四酸化オスミウムが生成し、濃度が実

際よりも高く見積もられることが課題である⁵⁻¹¹⁾。このマイクロ波分解に起因するオスミウムの過大な見積もりの抑制には、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸カリウムなどの還元剤が有効とされるが⁷⁻¹¹⁾、いずれもマイクロ波分解後に各サンプルへ個別に添加する必要があるため操作が煩雑である。

本研究では、日局で規定されている24元素のうち、どの元素がキャリアオーバーを引き起こしやすいのかについて調べた。その結果、オスミウムおよび水銀がキャリアオーバーしやすく、金属試料中に塩酸を添加することでキャリアオーバーが軽減されることを確認した。さらに、24元素に対してシステイン溶液のキャリアオーバー抑制効果を検討し、内標準ラインからシステインを導入する簡便法の実用性を評価した。併せて、システインにはオスミウムのマイクロ波分解後に生じる過大な見積もりを抑制する効果があることも明らかにした。

これらの結果は、内標準ラインを介してシステインを導入することで、水銀およびオスミウムのキャリアオーバーと、オスミウムのマイクロ波分解による見かけ上の高値の双方を同時に制御できる可能性を示唆している。本研究で得られた知見は、医薬品の安全性評価における信頼性向上に寄与するとともに、高精度かつ実用的な分析基盤の構築にも貢献し得るものである。

方 法

試薬

金属溶液および検量線溶液の調製には、SPEX社製標準原液 (XSTC-2071, 2072, 2073) を使用した。内標準液の調製にはアジレント・テクノロジー社製 Pharma Internal Standard 1 を用いた。添加回収試験に用いた標準溶液にはアジレント・テクノロジー社製 ICH/USP Oral Target Elements Standard A, B, C, D を用いた。また、塩酸と硝酸は富士フィルム和光純薬製の電子工業用グレードの試薬を、L-システインは富士フィルム和光純薬製の和光特級グレードの試薬を使用した。すべての溶液および試料は、Merck Millipore社製の Milli-Q システムで作製した超純水を用いて調製した。

溶液

- ・ **金属溶液**：イリジウム、オスミウム、パラジウム、白金、ロジウム、ルテニウム、水銀、金、銀、バリウム、コバルト、クロム、銅、リチウム、モリブデン、ニッケル、アンチモン、セレン、スズ、バナジ

ウムを600.0 ng/mL、カドミウム、鉛、タリウムを100.0 ng/mL、ヒ素を300.0 ng/mL 含有する。塩酸および硝酸を、それぞれ2% (v/v) と6% (v/v) となるように添加した。

- ・ **金属溶液 (塩酸なし)**：金属濃度は上記と同一とし、塩酸を含まず (0%)、硝酸のみ6% (v/v) とした。
- ・ **酸溶液 (ブランク)**：塩酸2% (v/v)、硝酸6% (v/v) 溶液。
- ・ **検量線用溶液**：各濃度レベルに応じたSPEX社製標準原液 (XSTC-2071, 2072, 2073) と0.5 mLの塩酸、1.5 mLの硝酸を約20 mLの超純水に添加し、超純水を用いて25 mLにした。各成分の濃度を以下に示す。
 - レベル7：イリジウム、オスミウム、パラジウム、白金、ロジウム、ルテニウム、水銀、金、銀、バリウム、コバルト、クロム、銅、リチウム、モリブデン、ニッケル、アンチモン、セレン、スズ、バナジウム：150.0 ng/mL、カドミウム、鉛、タリウム：25.0 ng/mL、ヒ素：75.0 ng/mL、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル6：金属元素：レベル7の3/5倍、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル5：金属元素：レベル7の1/5倍、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル4：金属元素：レベル7の3/50倍、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル3：金属元素：レベル7の1/10倍、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル2：金属元素：レベル7の1/100倍、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
 - レベル1：酸溶液と同一組成 (金属元素は非含有)
- ・ **内標準液**：0.25 mLのアジレント・テクノロジー社製 Pharma Internal Standard 1 と、0.5 mLの塩酸、1.5 mLの硝酸を約20 mLの超純水に添加し、超純水を用いて25 mLにした。各成分の濃度を以下に示す。テルル：2500 ng/mL、スカンジウム：1000 ng/mL、ゲルマニウム、インジウム、ルテチウム、ビスマス：各500 ng/mL、塩酸：2% (v/v)、硝酸：6% (v/v)。
- ・ **50%内標準液**：金属濃度が内標準液の50%になるように調製した。具体的には、0.125 mLのアジレント・テクノロジー社製 Pharma Internal Standard 1、0.5 mLの塩酸、1.5 mLの硝酸を約20 mLの超純水に添加し、超純水を用いて25 mLにした。各成分の濃度を以下に示す。テルル：1250 ng/mL、スカンジウム：500 ng/mL、ゲルマニウム、インジウ

ム、ルテチウム、ビスマス：各250 ng/mL、塩酸：2 % (v/v)、硝酸：6 % (v/v)。

- ・ **システイン溶液**：0.303 gのL-システインを超純水に溶解し25 mLとした（100 mmol/L）。これを超純水で希釈して、0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10 mmol/Lのシステイン溶液を調製した。なお、本溶液には塩酸および硝酸は添加していない。
- ・ **システイン含有内標準液**：0.212 gのL-システインを約20 mLの超純水に溶解し、0.5 mLの塩酸、1.5 mLの硝酸、0.25 mLのアジレント・テクノロジー社製Pharma Internal Standard 1を加え、超純水を用いて25 mLにした。各成分の濃度を以下に示す。L-システイン：70 mmol/L、テルル：2500 ng/mL、スカンジウム：1000 ng/mL、ゲルマニウム、インジウム、ルテチウム、ビスマス：各500 ng/mL、塩酸：2 % (v/v)、硝酸：6 % (v/v)。

装置

誘導結合プラズマ質量分析計は7900 ICP-MS（アジレント・テクノロジー社製）を、マイクロ波分解装置にはMultiwave PRO（Anton Paar社製）を用いた。

ICP-MSの測定および解析条件

日局規定の24元素（リチウム、バナジウム、クロム、コバルト、ニッケル、銅、ヒ素、セレン、モリブデン、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、銀、カドミウム、スズ、アンチモン、バリウム、オスミウム、イリジウム、白金、金、水銀、タリウム）および内標準元素（スカンジウム、ゲルマニウム、インジウム、ルテチウム、ビスマス、テルル）を測定対象元素とし、コリジョンモードで測定した。定量には検量線用溶液のレベル1から7の測定値により作成した検量線を用いた。測定は3回繰り返しを行い、それらの平均を測定値とした。グラフには3回の測定値の標準偏差をエラーバーとして記載した。データ解析にはアジレント社製のMassHunter 4.4 Workstation Softwareを用いた。ICP-MSの装置パラメーターを表1に示す。

表1. 装置パラメーター

項目名	設定値
RFパワー	1550 W
プラズマガス（アルゴン）	15 L/min
補助ガス（アルゴン）	0.9 L/min
ネブライザガス（アルゴン）	1.08 L/min
コリジョンガス（ヘリウム）	5 mL/min
スプレーチャンバー温度	2 °C
検出器	エレクトロンマルチプライヤー(EM)

金属元素のキャリーオーバーとその抑制に対する塩酸の効果

金属溶液の測定に続けて、金属元素を含まない酸溶液を7回測定した（図1 A）。金属溶液としては、塩酸を含む溶液と含まない溶液の2種類を調製した。金属溶液で検出された金属濃度に対する酸溶液において検出された金属濃度の割合（金属残留率）を算出した。

システインのキャリーオーバー抑制効果

金属溶液を測定した後、続けてシステイン溶液および酸溶液の順番で測定した（図2 A）。金属溶液で検出された金属濃度に対する酸溶液において検出された金属濃度の割合（金属残留率）を算出した。

試料導入ラインと内標準ラインの流量比の見積もり

試料導入ラインおよび内標準ラインから、酸溶液、内標準液もしくは50%内標準液を導入し、内標準元素をICP-MSで測定した。試料導入ラインに酸溶液を、内標準ラインに内標準溶液をそれぞれ導入した際のカウント数（cps）を1としたときの相対カウント数をシグナル比とした。

内標準ラインを用いたシステイン溶液の導入

内標準ラインからシステイン含有内標準液を、試料導入ラインから測定サンプルを導入した。測定サンプルには検量線用溶液のレベル1からレベル6までを用いた。

マイクロ波分解サンプルにおける添加回収試験

薬総研モデル製剤（表2）1錠に対し、表3に示す金属濃度となるようにアジレント・テクノロジー社製の標準溶液を添加し、超純水3 mL、塩酸1 mL、硝酸6 mLを加え、合計10 mLの分解溶液を調製し、マイクロ波分解を実施した。分解には、Anton Paar社製のテフロン容器（ライナー F100 TFN）および8本掛けローター（8NXF100）を用いた。

分解条件としては、350 Wで30分間保持後、700 Wまで30分間で増加させ、さらに700 Wで20分間保持し、終了後に50℃まで冷却するプログラムを使用した。このとき、最高温度は240℃に設定した。溶液が50℃となったのち15分以内に分解溶液に超純水を加えて最終体積を50 mLとし、分析用試料とした。システインを添加する際には、1 % (w/v) システイン溶液を0.25 mL加えたメスフラスコに分解液を添加し、同様に50 mLにした（終濃度8.3 mmol/L）。

表 2. 薬総研モデル製剤の成分組成 (1錠あたり 約0.3 g)

成分名	製剤0.3 gあたりの含有量 (mg)
乳糖	248
結晶セルロース	24.1
コーンスターチ	1.13
ヒドロキシプロピルセルロース	0.0328
赤色106号	少量

表 3. 添加回収試験における金属濃度

元素名	Li	V	Cr	Co	Ni	Cu	As	Se	Mo	Ru	Rh	Pd
濃度 (ng/mL)	412.5	75	8250	37.5	150	2250	11.25	112.5	2250	75	75	75

元素名	Ag	Cd	Sn	Sb	Ba	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb
濃度 (ng/mL)	112.5	3.75	4500	900	1050	75	75	75	75	22.5	6	3.75

結 果

1. 金属元素のキャリーオーバーとその抑制に対する塩酸の効果

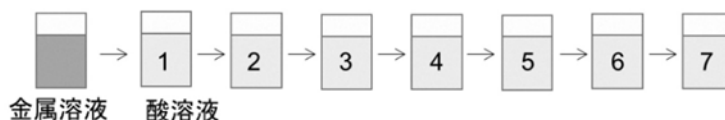
日局の元素不純物試験で規定されている24元素について、ICP-MSにおけるキャリーオーバーのしやすさを、金属残留率を指標に評価した。その結果、オスミウム、水銀、金、タリウムにおいて、高い金属残留率を示した (図 1 B (a))。塩酸を添加した試料では、オスミウムおよび水銀の金属残留率が抑制されたが、

金の残留率は大きく変化せず、タリウムでは金属残留率の増加が観察された (図 1 B (b))。それ以外の20元素については、塩酸の有無に関わらず、残留率は0.1%未満であった (図 1 B)。

2. システインのキャリーオーバー抑制効果

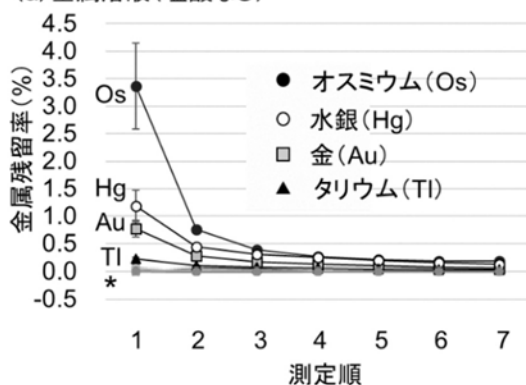
次に、システイン溶液によるキャリーオーバー抑制効果を、日局で規定される24元素を対象として評価した。その結果、水銀ではシステイン濃度の増加に伴い金属残留率が低下した (図 2 B, C (b))。また、オス

A 測定順番

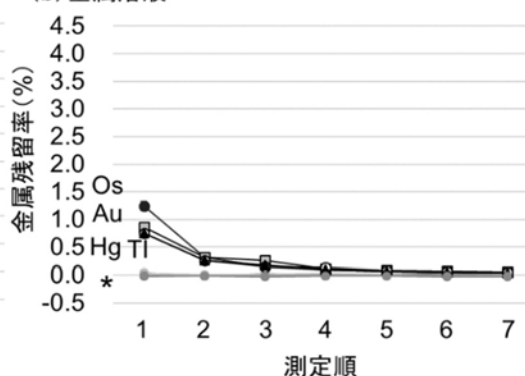


B 酸溶液における金属残留率

(a) 金属溶液 (塩酸なし)



(b) 金属溶液



* Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Ag, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, V, Cd, Pb, As

図 1. 金属元素のキャリーオーバーとその抑制に対する塩酸の効果

ミウムにおいては、より顕著に金属残留率の低下が認められた（図2 B, C (a)）。一方で、金とタリウムに関しては、システインによるキャリアオーバーの抑制効果が得られなかった（図2 B, C (c, d)）。それ以外の20元素については、システイン溶液測定の有無に関わらず、残留率は0.1%未満であった（図2 B）。

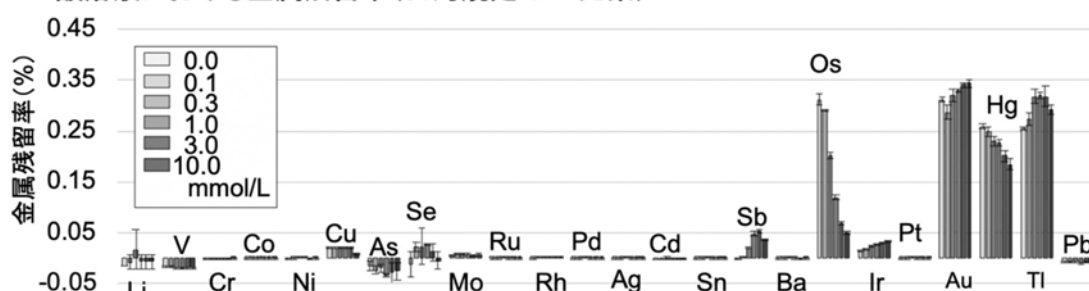
先の節で示した検討で、キャリアオーバーが顕著で

あったオスミウム、水銀、金、タリウムについては、個別にシステイン濃度に対して金属残留率をプロットし、濃度依存性について詳細に解析した（図2 C）。その結果、システイン濃度が3 mmol/Lを超えるとオスミウムおよび水銀の残留率はほぼ一定となり、10 mmol/Lまでは抑制効果が持続することがわかった（図2 C (a, b)）。

A 測定順番



B 酸溶液における金属残留率(日局規定の24元素)



C 金属残留率のシステイン濃度依存性

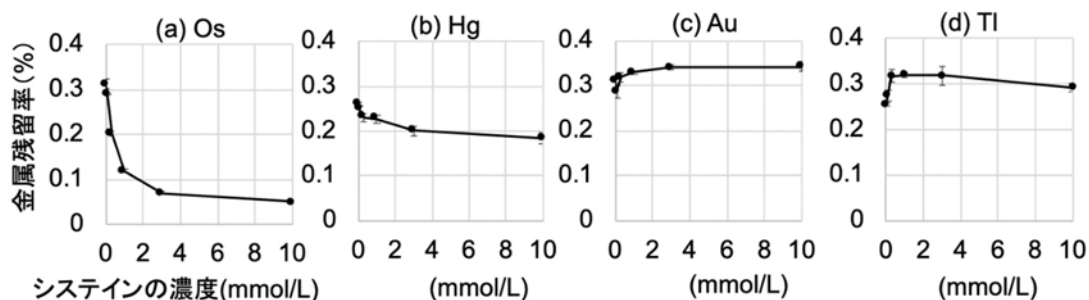


図2. システインによるキャリアオーバー抑制効果

3. 内標準ラインを用いたシステイン溶液導入法の構築

次に、内標準ラインからシステインを導入する方法の構築を試みた。はじめに、試料導入ラインと内標準ラインからの流量比を比較するため、両ラインに酸溶液または内標準溶液を導入し、ICP-MSを測定、内標準溶液に含まれるスカンジウム、ゲルマニウム、インジウム、ルテチウム、ビスマス、テルルのシグナル強度を比較した。内標準ラインのみから100%濃度の内標準溶液を導入した場合のシグナル強度を1としたとき、両ラインから同濃度の溶液を導入した場合のシグナル強度は約15であった（表4）。これにより、試料導入ラインの流量は内標準ラインの約14倍であると推定された。また、試料導入ラインに50%濃度の内標準

溶液を導入した際のシグナル比は8であり、この結果とも整合していた（表4）。

次に、70 mmol/Lのシステインを内標準ラインから添加し（混合時システイン濃度：4.7 mmol/L）、本測

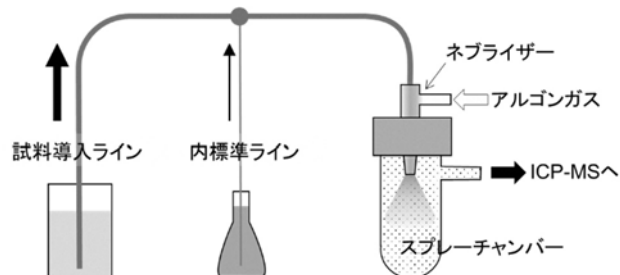


図3. 試料導入ラインと内標準ライン

表 4. 試料導入ラインと内標準ラインのシグナル比

試料導入ライン	内標準ライン	シグナル比						
		Sc	Ge	In	Te	Lu	Bi	平均
酸溶液	内標準液	1	1	1	1	1	1	1
内標準液		14	14	14	14	16	15	15
50%内標準液		8	8	8	8	8	8	8

定法の定量分析への影響を評価した。日局で規定される24元素について検量線を作成した結果、すべての元素において良好な直線性が得られ（相関係数は0.999以上）、原点付近を通過した（図4 A-X）。リチウムおよびセレンにおいては、検量線の傾きがわずかに増加したが（図4 A, H）、それ以外の元素においてはシステイン導入によるシグナル強度に大きな変化は認められなかった（図4）。

4. 内標準ラインからのシステイン導入法による元素別キャリアオーバーへの影響

次に、内標準ラインからのシステイン導入法を日局規定の24元素を用いて評価した（図5）。内標準ラインからシステインを導入した条件では、オスミウムおよび水銀については金属残留率が大きく低下した（図5 A (b)）。一方、金およびタリウムでは、むしろ金属残留率が増加する傾向が認められた（図5 A (b)）。それ以外の20元素については、内標準ラインからのシステイン導入の有無に関わらず、残留率は0.1%未満であった（図5 A (a, b)）。

さらに、図1の検討でキャリアオーバーが顕著であったオスミウム、水銀、金、タリウムについては、システイン導入の有無による残留状況を元素濃度で詳細に比較した（図5 B）。オスミウムおよび水銀に関してはシステイン導入により大幅な残留金属の濃度の低下が確認され、特に金属溶液の直後に測定した酸溶液での残留金属の濃度の低下が顕著だった（図5 B (a, b)）。一方、金およびタリウムに関してはシステインの導入により残留金属の濃度がむしろ増加した（図5 B (c, d)）。

5. ICP-MSにおけるオスミウムの高精度分析に向けたシステインの利用と日局規定24元素の添加回収率への影響

次に、日局規定の24元素の添加回収試験におけるシステインの効果について検討した。その結果、オスミウムについては、システインを添加しない条件では回収率が180%以上となったが、システイン添加の条件では約80%に低減し、日局の適合基準の70~150%

の範囲内に収まることが確認された（図6）。セレンについては、システインを加えることにより回収率が100%から120%へと増加した。その他の22元素では、システインの有無にかかわらず、回収率は90~110%の範囲であった（図6）。

考 察

日局の元素不純物試験で規定される24元素のうち、オスミウム、水銀、金、タリウムにおいて顕著なキャリアオーバーが認められた（図1 B (a)）。測定サンプルに塩酸を添加することで、オスミウムおよび水銀の残留率は低下したが、タリウムではわずかに増加した（図1 B (a, b)）。

金属溶液測定後にシステイン溶液を測定したところ、後続の酸溶液中への水銀の残留率が低下し（図2 C (b)）、他のグループからの報告と同様に^{2, 3)}、本実験条件下でもシステインが水銀のキャリアオーバーを抑制することが明らかとなった。また、このとき、オスミウムの残留率も低下し、その抑制効果は水銀よりも顕著であった（図2 C (a, b)）。

次に、ICP-MS測定におけるオスミウムおよび水銀のキャリアオーバーを簡便かつ効果的に抑制する手法として、内標準ラインを利用したシステイン溶液の導入を検討した。この方法により、洗浄用ボトルやバイアルを個別に準備したり、各サンプルにシステインを個別添加する手間が不要となる。図2の実験において、システイン溶液中のシステインの濃度が、1 mmol/L以下の場合よりも、3~10 mmol/Lの場合において、後続の酸溶液中のオスミウムと水銀の残留率が抑制された（図2 C）。この結果を踏まえ、内標準ラインからの導入におけるシステインの濃度を同様の範囲（3~10 mmol/L）で設定することにし、内標準ラインの希釈率（約15倍）を考慮して、本検討では70 mmol/Lのシステインを内標準ラインより導入した（混合時システイン濃度：4.7 mmol/L）。

この実験条件下で、日局規定の24元素について検量線を作成し、システイン導入の影響を評価した。その結果、良好な直線性が得られ、シグナル強度において

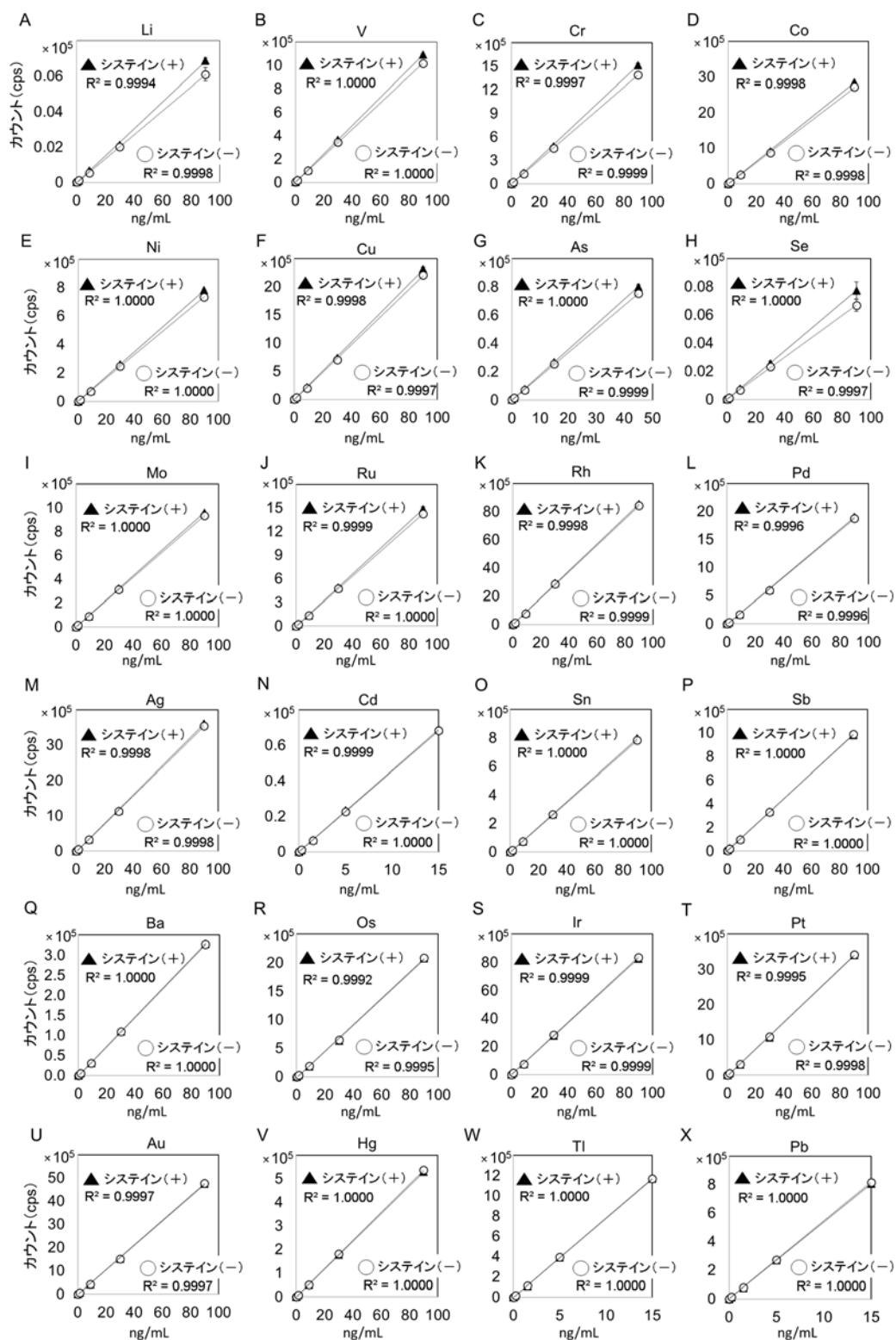
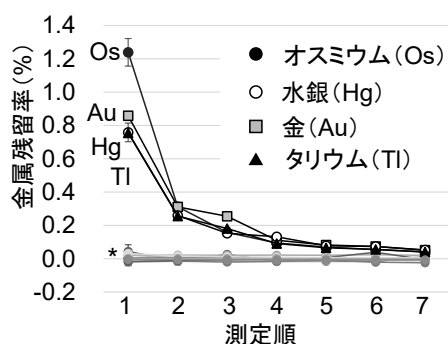


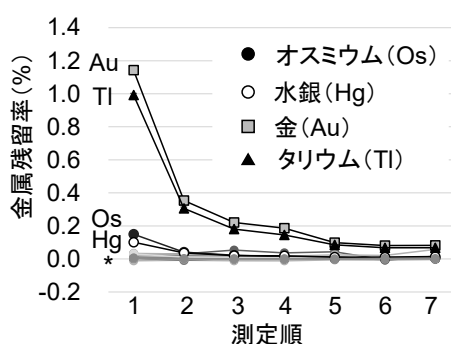
図 4. 内標準ラインからシステインを導入した際の検量線

A 酸溶液における金属残留率

(a) システインなし(図1A(b)と同データ)



(b) 内標準ラインからシステインを導入



* Ir, Pd, Pt, Rh, Ru, Ag, Ba, Co, Cr, Cu, Li, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, V, Cd, Pb, As

B 酸溶液における金属濃度

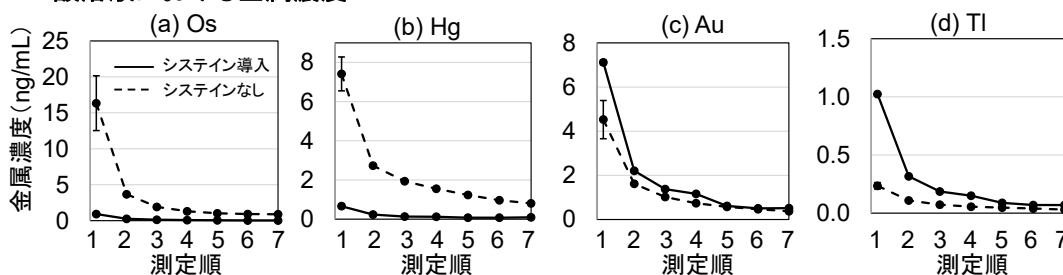


図5. 内標準ラインからシステインを導入した際のキャリアオーバー

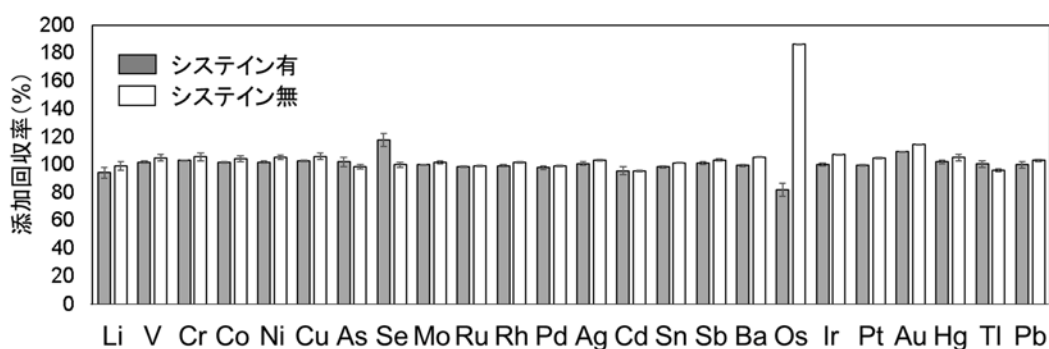


図6. 日局規定の24元素における添加回収試験結果(システインの有無)

も大きな影響は認められなかった(図4)。リチウムおよびセレンでは検量線の傾きにわずかな増加が認められたが、測定誤差が大きく、システインによる増感の有無について論じるにはさらなる検討が必要である(図4A, H)。セレンについては、有機物の存在下でICP-MSのシグナルが増感することが知られており¹²⁾、本実験条件下でもシステインの影響による増感の可能性は否定できない。ただし、本実験系ではシステインを内標準ラインから常時導入しているため、システインによる増感がある場合でも、影響は検量線によって補正され、実用上の問題は生じないと考えている。

以上の結果より、内標準ラインを用いたシステイン

導入法は、オスミウムおよび水銀のキャリアオーバー抑制に有効であることがわかった。また、定量性、感度への影響が少なく、安全かつ実用的に適用可能な手法であることが確認された。

次に、この内標準ラインからのシステインの導入法を用いて、金属残留率の抑制への効果を評価した。その結果、金属溶液測定後にシステイン溶液を測定した図2の実験の結果と同様に、内標準ラインからシステインを導入した場合でも、オスミウムおよび水銀の金属残留率が低下した(図2C(a, b), 5A(a, b))。

金属溶液後にシステイン溶液を測定した図2の実験では、酸溶液中の水銀の残留率は、システイン濃

度10 mmol/Lの条件で最も低く、約0.2%であった(図2B, C (b)). これに対し、システインを内標準ラインから導入した図5の実験では、対応する2本目の酸溶液における水銀の残留率は0.03%と、図2の実験の約1/7の値を示した(図5A (b)). 図5の内標準ライン導入系で水銀の残留率が大きく改善した理由として、金属溶液測定中にシステインが常時導入されたことで装置への初期吸着が抑制された可能性が考えられる。

以上の結果は、内標準ラインを用いたシステイン導入法を用いて、オスミウムおよび水銀のキャリアオーバーを効果的に抑制できることを示す。

オスミウムや水銀と同様、顕著なキャリアオーバーが認められた金とタリウムに対しては、システインによるキャリアオーバー抑制効果が認められず、むしろわずかに増加した(図2C (c, d), 5B (c, d)). このシステインによる金とタリウムのキャリアオーバーの増加は図2および図5に示す両実験において観察され、いずれもエラーバーの範囲を超えていたことから、実際の差異を反映している可能性が高い(図2C (c, d), 5B (c, d)). この原因は明確ではないが、システインによって流路や導入系に蓄積していた金属が溶出し、バックグラウンドが増加した可能性が考えられる。金、タリウムの微量分析の場合には、オスミウムおよび水銀に限定してシステインを使用し、金、タリウムとは別に測定を実施するなどの対応が必要となる。

図6の実験では、システインの還元作用に着目し、マイクロ波分解後に生じるオスミウムの過大な見積もりに対するシステインの抑制効果について検討した。マイクロ波分解後のサンプルにシステインを加え添加回収試験を行ったところ、オスミウムを含む日局規定の24元素全ての添加回収率が日局の適合基準(70~150%)内となった(図6)。本結果は、システインには、水銀とオスミウムのキャリアオーバーの抑制に加え、オスミウムの過大な見積もりを抑制する効果もあることを示す。今後は、内標準ラインからシステインを導入する方法を、オスミウムの過大な見積もりの抑制にも応用し、オスミウムと水銀のキャリアオーバーの抑制を合わせて同時に対応可能な簡便法として展開できればと考えている。

このとき、オスミウムの回収率が80%程度となった要因の一つとして、システイン添加前に四酸化オスミウムが空气中に揮散した可能性が考えられる。内標準ラインからシステインを導入する方法では、測定開始時と終了時でシステインとサンプルの混合のタイミングが数時間程度ずれる可能性がある。そのため、内標

準ラインからシステインを導入してマイクロ波分解後のオスミウムの過大な見積もりを抑制する際には、四酸化オスミウムの揮散による回収率の変動について考慮するべきである。連続測定の開始と最後で、オスミウムのシグナルの安定性が確保できない場合には、マイクロ波分解の溶液組成や条件を見直し、四酸化オスミウムの発生を最小限に抑える条件を検討する必要がある。

文 献

- 1) 厚生労働省：第十八改正日本薬局方，p.91~97，独立行政法人 医薬品医療機器総合機構，東京（2021）
- 2) 大澤桂，吉永淳：フローインジェクションICP-MSによる毛髪中水銀の検出，Agilent ICP-MS Journal, 24, 2（2005）
- 3) Li, Y., Chen, C., Li, B., Sun, J., Wang, J., Gao, Y., Zhao, Y., and Chai, Z. : Elimination efficiency of different reagents for the memory effect of mercury using ICP-MS, J. Anal. At. Spectrom, 21, 94~96 (2006)
- 4) 久保田領志，小峯宏之：家庭用品中の有害元素の試験法及びその事態に関する研究，厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書，57~72（2022）
- 5) International Labour Organization : Part IX. Chemicals, Metals: Chemical Properties and Toxicity, Osmium, Encyclopaedia of Occupational Health and Safety, Fourth Edition, ジュネーブ (2011)
<https://www.iloencyclopaedia.org/part-ix-21851/metals-chemical-properties-and-toxicity/item/178-osmium>（参照2025年5月14日）
- 6) Hoecke, K. V., Catry, C., and Vanhaecke, F. : Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceutical substances in compliance with USP guidelines, J. Anal. At. Spectrom., 27, 1909~1919 (2012).
- 7) 高山信幸，米田哲也，竹林憲司，小笠原勝，薬事研究会分析部会：ICP-MSを用いた元素不純物分析の基礎的検討，富山県薬事総合研究開発センター年報，47, 34~38（2020）
- 8) Venzago, C., Popp, M., Kovac, J., and Kunkel, A. : Pharmacopeial requirements for elemental

impurities a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilization, J. Anal. At. Spectrom, 28, 1125~1129 (2013).

- 9) Takayama, N., Yoneda, T., Takebayashi, K., Ogasawara, M., and Takatsu, K. : Stabilizers for osmium isotopes in microwave-irradiated acid digestion and inductively coupled plasma mass spectrometry analysis, Chem. Pharm. Bull, 70, 57~65 (2022)
- 10) 高山信幸, 高津聖志 : 第十八改正日本薬局方における2.66元素不純物試験法に基づいた分析方法, PHARM TECH JAPAN, 38, 13~18 (2022)
- 11) 高山信幸, 柚木芳, 高津聖志 : 第十八改正日本薬局方における元素不純物試験法の設定と評価, PHARMSTAGE, 23 (9), 55-60 (2023)
- 12) Kralj, P., and Vebe, M. : Investigations into nonspectroscopic effects of organic compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, Acta Chim. Slov., 50, 633~644 (2003)

富山シャクヤクのブランド化推進事業

—生産者の持続的な出荷を支援するための乾燥調製法の実証試験—

田村 隆幸, 高山 信幸, 渡会 三千代, 宮崎 有弘, 東 一彦, 小笠原 勝

Toyama Peony Branding Promotion Project

— Demonstration Studies on Drying Methods Aimed at Supporting sustainable Shipping by Farmers —

Takayuki TAMURA, Nobuyuki TAKAYAMA, Michiyo WATARAI, Arihiro MIYAZAKI,
Kazuhiko AZUMA, Masaru OGASAWARA

要 約

富山ブランドシャクヤク「春の粧」を栽培する生産者による高品質シャクヤクの安定的な出荷を支援するため、我々はこれまでに、平型乾燥機を使用した乾燥法を確立し効率化及び低コスト化を進めてきた。今回、これを更に改良し、生産者が「春の粧」を初出荷する際に使用する乾燥法を決定する目的で、平型乾燥機を用いた新たな3種類の低コスト乾燥法を検討した。その結果、「無加温15日間連続送風の後、30℃加熱送風7時間を4回実施」が最適であることが判明した。また、近い将来、乾燥機を有しない生産者施設においても実施可能な簡易な乾燥法が必要となることから、屋内施設で根をせいろうに並べて積み重ね、工場扇で送風する方法について検討した。その結果、「カット無」群でも約24日間で乾燥前重量の60%以下まで乾燥が進み、その後、低湿度環境下（湿度30～40% RH）で約2ヶ月間保管することにより生薬に乾燥調製できることが示された。

Summary

With a view to establishing stable farmed production of Peony Root from the Toyama-branded peony “Haru-no Yosooi”, a cultivar of *Paeonia lactiflora*, we explored a drying method using a flat-bed dryer, considering ways to reduce both production time and cost.

In this report, we introduce improvements to the drying method that minimize heating costs. The most cost-effective method that we tested involved using a flat-bed dryer to dry the roots with unheated air for 15 days, followed by exposure to air heated to 30 °C for 7 hours per day over four days. Because most peony farmers do not own a flat-bed dryer, we also investigated an alternative method in which roots were stacked in mesh-bottomed trays in an indoor facility and exposed to airflow from a factory fan. Although uncut roots require a longer drying time than cut ones, we found that 24 days of drying with a factory fan reduced even uncut roots to 60% or less of their original weight. Moreover, after storing the roots under low-humidity conditions (30%–40% relative humidity), the final product met the quality standards specified in the Japanese Pharmacopoeia.

キーワード：シャクヤク, 栽培, 乾燥, 生産者施設

Key words : Peony root, Cultivation, Drying, Farmer's facility

我々は、薬用植物指導センターで保有する230のシャクヤク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「富山シャクヤク」としてブランド化し、栽培普及と利用促進を図ることを目的に、平成22年度から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を実施し、優良品種「春の粧」を選抜した^{1), 2)}。一方、昭和40年代から富山県内で継続して栽培されている薬用品種「梵天」は、出荷先の生薬問屋で洗浄及び乾燥されるため生産者は生根（未乾燥）での出荷が可能であるが、「春の粧」は出荷先企業から乾燥した生薬としての出荷を求められる。乾燥の経験がない生産者が「春の粧」を

乾燥して出荷できる体制を整備するため、我々はこれまでに生産者が使用予定の平型乾燥機を用いた乾燥調製法を確立し、また、実生産規模での実証を行ってきた^{3), 4)}。さらに、根を長さ3cmにカットすることによる乾燥効率の向上と、コストの大幅な削減が可能となる自然乾燥と機械乾燥を併用した乾燥法についても報告した⁵⁾。

県内農家における「春の粧」の栽培は、実需者ニーズと富山県による苗の供給数の調整により平成30年から開始され、4年間の栽培を経て令和4年度から令和7年度までは毎年約1,000 kg、令和8年度以降は毎年約3,000 kgの生根を生産者側で乾燥して出荷すると

いう計画に沿って進められた。栽培が県内各地へ拡がりはじめ農家の数が増加すると、各農家の乾燥施設保有状況や乾燥法への要望は様々であることが分かり、全ての農家が低コストで高品質な生薬に乾燥調製するには既報⁵⁾の「平型乾燥機を用いて24時間ごとに30℃加熱送風と休止を繰り返す」という乾燥法だけでは不十分であった。すなわち、平型乾燥機を用いた乾燥における低コスト化と夜間に加熱稼働しない方法への改良に加えて、農家が自らの倉庫等を利用して簡易に乾燥できる方法の考案が必要であった。そこで、本研究では平型乾燥機を用いた新たな3種類の乾燥法を検討し、令和4年度の「春の粧」生産者による初めての収穫、乾燥及び出荷で実施する最適な乾燥法を決定することを目指した。また、出荷量が前年度までの約3倍が見込まれる令和8年度以降、「春の粧」を自ら乾燥出荷する予定であるアルプス農業協同組合の施設において、乾燥機を使用しない乾燥法を実証するために乾燥試験を実施した。

方 法

1. 乾燥試験

1-1. 材料

(1) シャクヤク試料

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4年間栽培したシャクヤク（品種名：「春の粧」及び「梵天」）の根を令和元年から令和4年の各年10月から11月に収穫し、試料とした。試料は、土付きの状態でガラ袋（PP袋）に約20 kgずつ入れ、日陰となる屋外の土の上に並べ、その上にビニールシートを被せて乾燥を防止し、次の「(2) 貯蔵後の再選別」の実施まで約3ヶ月間貯蔵した。令和元年、2年及び3年に収穫した試料は「1-2. 平型乾燥機による新たな低コスト乾燥法の検討」に、令和4年に収穫した試料は「1-3. 生産者施設における乾燥機を使用しない乾燥法の実証」に使用した。

(2) 貯蔵後の再選別

側根を分離（股割り）後、腐り、虫害、変色が認められる部分、皮の剥離の著しい部分、細根及び根茎部を除外し、第十八改正日本薬局方7）（以下、「JP18」という。）の医薬品各条「シャクヤク」における「生薬の性状」の記載を参考に、概ね次の規格に適合するものを選別した。

- ・太さ：直径1.0 cm～3.0 cm
- ・長さ：7 cm～30 cm

(3) 洗浄

選別後の試料は既報⁵⁾と同様に回転式洗浄機を用

いて水のみで洗浄した。洗浄によりわずかに根の表皮が剥がれた部分が見られたが、全体として根の表皮が残った状態で乾燥試験に供した。

【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：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秒の洗浄ごとに槽内の水を入換え）

(4) 根の切断

根をカットする群を設置した試験では、洗浄後、既報⁵⁾で乾燥期間の短縮が認められた長さである3 cmにカットし、乾燥期間及び生薬の品質を比較した。

1-2. 平型乾燥機による新たな低コスト乾燥法の検討

(1) 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1）を使用した。

熱源は灯油を燃料としたバーナーであり、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。

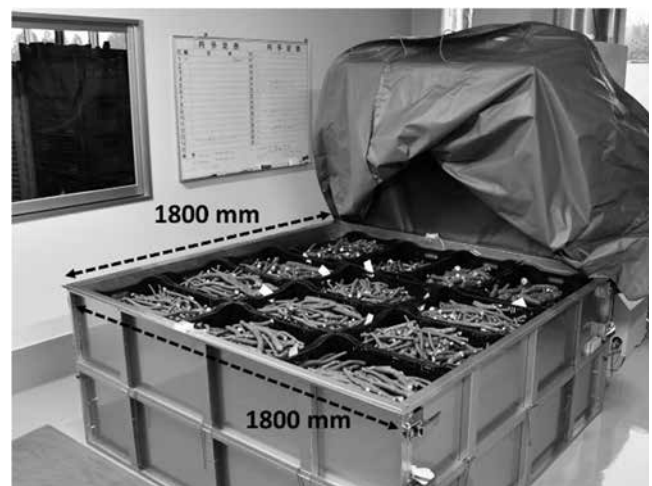


図1 平型乾燥機（大紀産業(株)製 HK-200-3.3C）

(2) 乾燥方法

【乾燥槽への設置方法】

底面が網目の容器（外寸 幅×奥行×深さ：595×399×229 mm）に洗浄済みの試料（カット無群又は3 cmカット群）を15 kgずつ入れ、この容器を乾燥槽

表 1 平型乾燥機による乾燥方法

乾燥方法	収穫・乾燥 年度	根のカット	乾燥機稼働方法	乾燥開始 年月
①	R 1	3 cm	乾燥前重量の50%に達するまで 30℃加熱送風7時間と17時間の休止を繰り返す。	R2年2月
②	R 2	3 cm	無加温32日間連続送風の後、乾燥前重量の50%に達するまで 30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。	R3年2月
③	R 3	カット無 3 cm	無加温15日間連続送風の後、乾燥前重量の60%に達するまで 30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。	R3年12月 R4年1月

内に1段当たり13個として2段に重ねて計26個を入れた。1回当たりに乾燥できる生根は合計390 kgであった。

【乾燥機の稼働方法、根の切断及び乾燥開始年月】

表1に示すとおり、乾燥方法①は「乾燥前重量の50%に達するまで30℃加熱送風7時間と17時間の休止を繰り返す。」、乾燥方法②は「無加温32日間連続送風の後、乾燥前重量の50%に達するまで30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。」及び乾燥方法③は「無加温15日間連続送風の後、乾燥前重量の60%に達するまで30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。」とした。試料を準備した後は速やかに乾燥を開始するため、全ての方法で17時に乾燥機を稼働させた。乾燥方法①については、急激な乾燥による表面硬化を和らげることを目的として、翌日の9時までの16時間は無加温で送風した。

また、農家による実生産においては乾燥機の容量を超える大量の根を一度に乾燥できず、12月から2月頃までの間に順次乾燥を繰り返すことになる。その際に、開始時期の違いによる乾燥経過や生薬の品質への影響を確認するため、乾燥方法①及び②では2月に、乾燥方法③では12月及び1月に乾燥を開始した。

その他の乾燥機の条件設定等は以下のとおりとした。

- ・風量：強（3段階の設定で最大）
- ・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

（3）乾燥中の重量測定

乾燥期間中は試料の重量を測定（1回/1～6日）した。また、乾燥槽内の容器の位置の違いによる乾燥の進行への影響の有無を確認した。

（4）乾燥方法①及び②の乾燥期間の判定方法

「春の粧」試料が乾燥前重量の50%に達するまでを乾燥期間（乾燥機の休止時間を含む）とした。JP18

ではシャクヤクの乾燥減量は14.0%以下と規定されており、本来はこの規格に適合したときをもって乾燥完了とし、乾燥完了までの期間を乾燥期間とする判定方法も考えられる。しかし、皮付シャクヤク根の乾燥では乾燥完了直前の状態（「春の粧」では乾燥前重量の約50%）から乾燥完了に達するまでは乾燥機を使用しても重量の減少は著しく緩慢で、この期間も乾燥期間に含めると乾燥期間の大半がこの期間となり、乾燥期間を指標とした乾燥効率の評価及び比較が不明確となる。よって、乾燥期間の判定方法を「乾燥前重量の50%に達するまでに要した期間」とし、その後の乾燥に乾燥機を使用すると燃料の消費が膨大になるため、除湿器を稼働させた室内（湿度30～40% RH）で1～2ヶ月間保管することにより乾燥を完了させた。この仕上げ乾燥法は、平成30年度から令和2年度までの検討で3回実施して問題なく乾燥を完了できることを確認し、農家による実生産でも活用している方法である。

（5）乾燥方法③の乾燥期間の判定方法

「春の粧」試料が乾燥前重量の60%に達するまでを乾燥期間とした。令和4年度から7年度までに農家が当センターの平型乾燥機を利用して乾燥するシャクヤク根は毎年約1,000kgの予定であったが、乾燥機の最大処理量が390kgであるため、乾燥時期である12月から2月末までに3回に分けて乾燥し、1回の乾燥を1ヶ月以内に終了する必要がある。しかし、乾燥後期（乾燥前重量の60%未満に達して以降）には乾燥が進みにくいことから、新たな乾燥法として「平型乾燥機で乾燥前重量の60%まで乾燥した後、除湿機稼働部屋で乾燥を完了」の実用化を目指して、乾燥方法③を検討することとした。この方法は、乾燥初期は灯油を消費せずに無加温連続送風を15日と定め、その後は30℃加温送風7時間/日を繰り返すもので、農家が実生産したシャクヤク根を低コストで期間内に確実に乾燥

できることを実証するために考案したものである。試料が乾燥前重量の60%に達した後は、前項と同様に除湿器稼働部屋で保管することにより乾燥を完了させた。

（6）乾燥方法②及び③の加熱送風回数

乾燥方法②については「春の粧」試料が乾燥前重量の50%に達するまでに、乾燥方法③については乾燥前重量の60%に達するまでに、それぞれ実施した「30℃加熱送風7時間/日」の回数を記録した。

（7）容器内混合の有無

既報^{4), 5)}における平型乾燥機を使用した乾燥法では、全体を均一に乾燥することを目指して48時間ごとに容器内の試料を混合した。今回、作業工程の省力化の可否を判断するため、方法①では容器内混合をする群としない群で乾燥経過及び生薬の品質への影響を検討した。方法②及び③では容器内混合は実施しなかった。

1-3. 生産者施設における乾燥機を使用しない乾燥法の実証

（1）乾燥施設

令和8年度に「春の粧」を自ら乾燥出荷する予定であるアルプス農業協同組合の乾燥調製施設（以下、「JA施設」という。）を使用した（図2）。比較のために、薬用植物指導センターの送風乾燥室でも乾燥を実施した。



図2 JAアルプス乾燥調製施設（JA施設）の外観

（2）乾燥方法

令和5年2月17日、せいろう4型（網皿、有効内寸：622×622×30 mm）に洗浄済みの試料（カット無群又は3 cmカット群）を広げ、JA施設ではせいろうを重ねて（図3）、薬用植物指導センターでは送風乾燥室内の棚にせいろうを重ねずに設置（図4）し、工場扇で送風した。工場扇とせいろうの端までの距離は1 mとした。せいろう1枚あたりの試料は、せいろうに試料を広げたときに概ね重ならない重量を設定し、カット無群は5 kg、3 cmカット群は5 及び 6 kgとし

た。乾燥期間中、乾燥施設内の温度及び湿度は制御せず、温度及び湿度をデータロガー（㈱ティアンドデイ、RTR-507）で記録した。「春の粧」のカット無群が乾燥開始前重量の60%を下回った後、3 cmカット群の試料を含む全ての試料を薬用植物指導センター内の除湿器稼働させた室内（湿度30～40% RH）へ移動し、乾燥完了まで仕上げ乾燥を実施した。



図3 JA施設での乾燥状況



図4 薬用植物指導センターでの乾燥状況

（3）平型乾燥機による追加乾燥の有無

工場扇による送風乾燥の後、平型乾燥機による追加乾燥の要否を判断するため、カット無群で30℃で7時間の乾燥を2回実施する群としない群で乾燥経過及び生薬の品質への影響を検討した。他の試験群（30℃加熱送風7時間を実施しない群）の試料は、この平型乾燥機の稼働開始時から除湿機稼働部屋へ移動した。

2. 乾燥試験で得られた生薬の品質評価

2-1. サンプル調製

各乾燥試験により得られた全ての試験群の生薬からそれぞれ500 g以上を無作為に採取し、全て細断後、粉碎し、均一な試料粉末とした。

2-2. 白色度による評価

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、ブランドイメージ形成のため「富山シャクヤク」を白く仕上げることも

目指し、生薬を白色度でも評価することとした。試料粉末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*値からハンター白色度を求めた。10回の測定値の平均を結果とした。目標値は、生薬問屋による評価を参考にし、外観で白色と認識できる65以上とした。

2－3．日本薬局方の規格試験

試料粉末について、JP18「シャクヤク」に規定される全項目の試験を実施した。定量法については、ペオニフロリンと同時にアルビフロリンも定量した。

結 果

1．平型乾燥機による新たな低コスト乾燥法の検討

乾燥方法①、②及び③により実施した乾燥試験の乾

燥期間等の結果を表2に、得られた生薬の白色度及び成分含量を図5及び図6に示す。

今回検討した乾燥方法①～③は、生薬粉末の白色度及びJP18全項目試験の全てで規格を満たし、品質に問題なく乾燥できる方法であることを確認した。乾燥開始時期の比較について、乾燥方法③における12月開始及び1月開始で得られた生薬は両者で差は見られず、また、2月開始の乾燥方法①及び②により得られた生薬の品質と同等であった。

乾燥期間中は容器ごとの重量変化について、乾燥槽内の上段と下段の比較及び水平方向の位置の比較を実施した（データ掲載なし）ところ、いずれも重量差は重量の2％未満であった。乾燥開始直後は全体として上段より下段の方が乾燥は早く進行したが、その後は全ての位置で同様に乾燥が進行し、容器の位置による乾燥への影響は見られなかった。

表2 各乾燥方法の試験結果

乾燥方法	乾燥機稼働方法	根の カット	30℃加熱送風 7時間/日 実施回数	乾燥期間 (休止期間を含む)	灯油消費量 (生根390kg/回)	生薬の局方試験 ペオニフロリン含量、純度試験、 乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分
①	乾燥前重量の50％に達するまで 30℃加熱送風7時間と17時間の休止を繰り返す。	3 cm	23回	23日 (うち休止18.3日)	158 L	適合
②	無加温32日間連続送風の後、乾燥前重量の50％に達するまで30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。	3 cm	2回	34日	16 L	適合
③	無加温15日間連続送風の後、乾燥前重量の60％に達するまで30℃加熱送風7時間/日を繰り返す。	カット無	4回	19日	30 L	適合
		3 cm	0回	15日	無し	適合

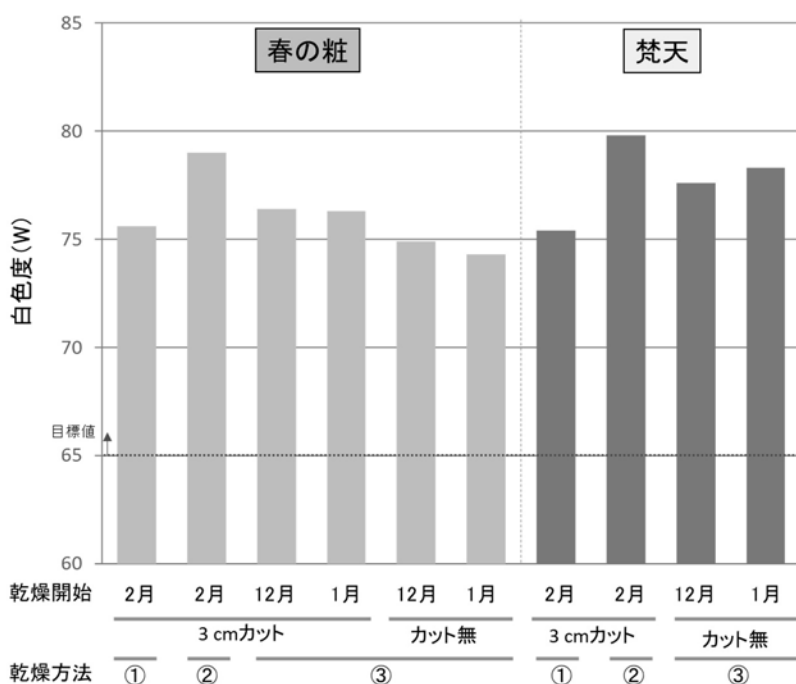


図5 乾燥方法①、②及び③により乾燥調製した生薬（粉末）の白色度

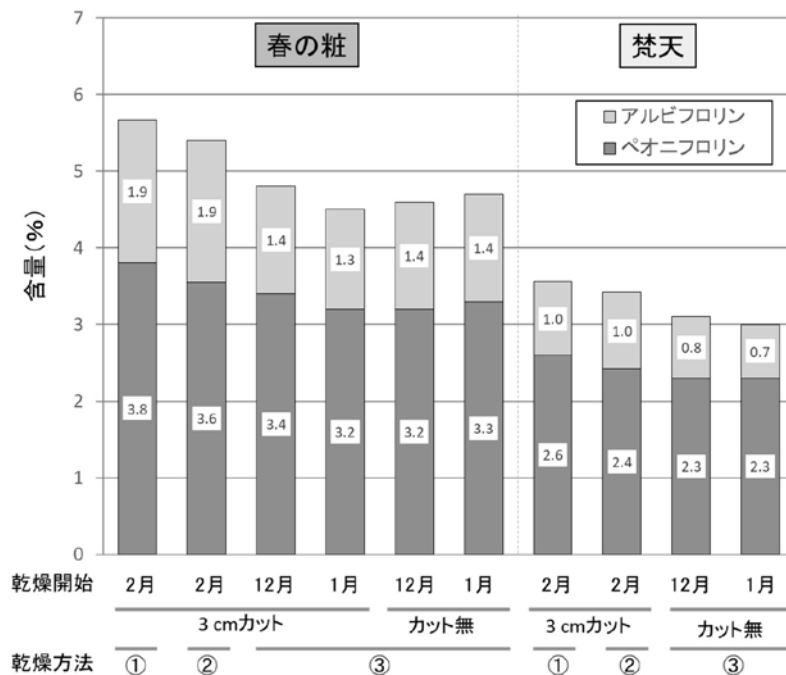


図6 乾燥方法①、②及び③により乾燥調製した生薬中の成分含量

また、乾燥方法①では48時間ごとに容器内混合を実施した群と実施しない群で乾燥の進行や生薬の品質について差は認められなかった（データ掲載なし）。乾

燥方法②及び③では容器内混合を実施しなかったが、得られた生薬の品質には問題はなく、省力化の観点から容器内混合の工程は不要と判断した。

2. 生産者施設における乾燥機を使用しない乾燥法の実証

乾燥期間中の重量変化を図7（A：JA施設を利用した乾燥試験，B：対照として全て薬用植物指導センターで実施した乾燥試験）に、乾燥施設の温湿度データを表3に示す。シャクヤクの生根を長さ3 cmに切断することにより乾燥が促進されることは既に報告⁵⁾したが、既報とは異なる乾燥施設及び乾燥方法でも「3 cmカット」の方が、「カット無」より乾燥期間が短くなることが改めて確認された。JA施設での乾燥について、乾燥前重量の60 %に達するまでの期間で比較すると、「カット無」の約24日に対し「3 cmカット」は約18日で乾燥が早く進行した。JA施設では薬用植物指導センターよりやや早く乾燥する傾向があったが、ほぼ同等に乾燥が進行した。「カット無」では34日目と35日目に30℃で7時間の加熱送風を実施したが、これは乾燥の進行にほとんど影響しなかった。3 cmにカットすると見かけ比重（かさ比重）が大きくなり、1枚当たり5 kgとした「カット無」より増量して乾燥が可能かどうかを確認するため、「3 cmカット」では6 kgで乾燥したところ、5 kgの場合と比較して乾燥の進行に差は見られなかった。

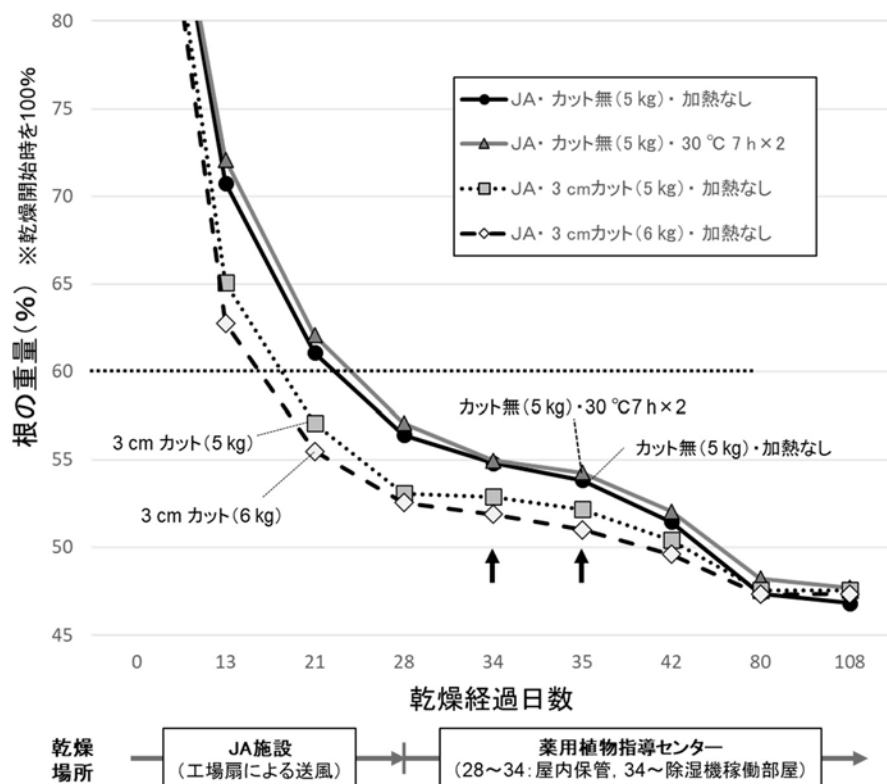
乾燥により得られた生薬の白色度及び成分含量を表4に示す。様々な条件で乾燥した「春の粧」の全ての試料について、白色度では目標値である65を大きく超え、成分含量ではJP18のペオニフロリン含量の規格（2.0 %以上）を満たし、各試料の品質は同等であった。

考 察

1. 乾燥機を使用した場合の乾燥期間と灯油消費量

既報⁵⁾の乾燥方法（24時間ごとに30℃加熱送風と休止を繰り返す方法）における「3 cmカット」の乾燥期間及び生根390 kgの乾燥に要する灯油消費量は、それぞれ12日及び225 Lであったが、今回検討した乾燥方法①（30℃で7時間の加熱送風と17時間の休止を繰り返す）は、乾燥期間が23日に増加したものの、灯油消費量は158 Lで30 %減となった。今後の生産者による乾燥出荷を持続的なものにするには乾燥コストをできる限り下げることが重要であるため、さらに灯油消費量を減らす方法として、無加温で連続送風してどこまで乾燥が進行するかを確認する意味も含めて乾燥方法②（無加温で連続送風の後、30℃加熱送風

A



B

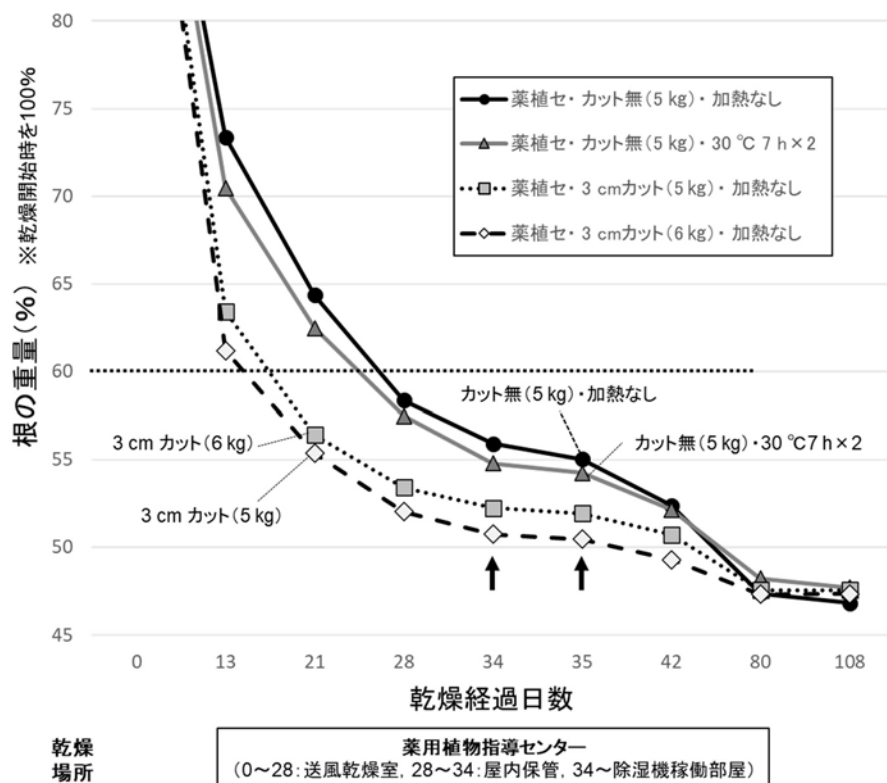


図7 乾燥機を使用しない乾燥法の検討における乾燥期間中の重量変化

A: JA施設を利用した乾燥試験

B: 対照として全て薬用植物指導センターで実施した乾燥試験

※↑は、追加乾燥する群で平型乾燥機を用いて「30℃加熱送風7時間」を実施した時期を示す。

表3 JA施設及び薬用植物指導センターにおける乾燥期間中の温湿度

	室温(℃)			湿度(%RH)		
	平均	最大	最低	平均	最大	最低
JA	10.2	24.1	0	59.2	100	16.1
薬植セ	9.3	18.3	1.7	57.8	92.4	32.3

表4 JA施設等で乾燥調製した生薬（粉末）の白色度及び成分含量

試料の乾燥条件					結果		
品種	乾燥施設	カット	生根量 /網皿	送風乾燥後の 追加乾燥	白色度 (目標値:65以上)	成分含量(%)	
春の粧	JA	なし	5 kg	なし	75.4	3.6	1.68
				30℃, 7 h×2	76.3	3.5	1.69
		3 cm	5 kg	なし	78.1	3.6	1.42
			6 kg		76.9	3.6	1.72
	薬植セ 送風乾燥室	なし	5 kg	なし	76.7	3.6	1.78
				30℃, 7 h×2	77.0	3.6	1.73
		3 cm	5 kg	なし	78.2	3.5	1.45
			6 kg		77.5	3.5	1.61
梵天	薬植セ 除湿部屋	なし	5 kg	—	73.4	2.4	0.97

7時間を2回実施)を検討した。

この方法は、灯油消費量が16 Lで既報の92 %減となったが、乾燥期間が34日となり、毎年約1,000 kgの生根を乾燥期間内(11月下旬～3月)に処理するために3回の乾燥を実施する上で、乾燥期間は20日程度が望ましいと考えられた。そこで、乾燥方法③(無加温15日間連続送風の後、30℃加熱送風7時間を4回実施)を考案し、乾燥試験した結果、乾燥期間は19日(無加温送風の終了直後から加熱送風を4日連続で実施した場合)で、灯油消費量は30 Lで既報の87 %減となった。その後は除湿器を稼働させた室内(湿度30～40 % RH)で約2ヶ月間の保管により仕上げ乾燥することでJP18の乾燥減量の規格(14.0 %以下)を十分に満たす乾燥状態となった。

2. 除湿機稼働部屋への移動時期

既報⁵⁾や乾燥方法①及び②では、試料が乾燥前重量の50 %に達してから除湿機稼働部屋へ移動していたが、乾燥方法③では乾燥期間の短縮のため「カット無」では乾燥前重量の60 %弱の状態除湿機稼働部屋へ移動し、仕上げ乾燥した。このとき、根は多くの水分を含んだ状態であったが、乾燥して得られた生薬の外観や白色度及び成分含量については、これまでの

乾燥方法により得られた生薬と同等であった。よって、この乾燥方法③、即ち「無加温15日間連続送風の後、30℃加熱送風7時間を4回実施」を最適な方法と判断し、令和4年度に生産者が初めて乾燥調製する方法として採用することにした。

3. 容器のローテーション及び容器内混合の必要性

既報³⁻⁵⁾では全体に均一な乾燥を目指して実施していた48時間ごとの容器のローテーションと容器内混合について、今回の乾燥試験において要否を検討した結果、乾燥の進行及び生薬品質への影響が見られなかったことから省略可能とし、乾燥調製マニュアルをできる限り簡易で省力的な方法とすることができた。

4. 生産者施設における乾燥機を使用しない乾燥法

「乾燥前重量の60 %」の状態のシャクヤク根が除湿機稼働部屋で問題なく生薬に乾燥調製できることは、平型乾燥機を使用した乾燥方法③の結果をもって確認済みであったことから、本乾燥試験でも、JA施設での工場扇の送風による乾燥は「乾燥前重量の60 %を下回るまで」とし、その後は薬用植物指導センターの除湿機稼働部屋に移動して乾燥を完了させた。令和8年度からJA施設を利用して乾燥調製する予定のアルブ

ス農業協同組合からの要望として、冬の時期は施設を使用していないものの、乾燥業務に従事する職員等の都合により1ヶ月程度以内にJA施設での乾燥を終了したい、とのことであったが、今回の結果から、「カット無」群でも約24日間で乾燥前重量の60%にまで乾燥が進んだことから、その要望に応えることができた。

5. 乾燥調製マニュアルの改訂

今回実証した低コスト乾燥法を掲載したマニュアルを「春の粧」栽培農家へ提供するとともに、今後の栽培拡大に応じて平型乾燥機を使用せずに生産者の施設を利用した簡易な乾燥法も現地実証することにより、生産者が持続的に出荷できる体制を整備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, 43, 29-34 (2015)
- 2) 渡会三千代, 田村隆幸, 東一彦, 高山信幸, 米田哲也, 小笠原勝, 本田裕恵, 宮本朋美, 小木曾英夫, 竹林憲司, 寺崎さち子, 川筋透, 大江勇, 横田洋一, 松永孝之, 高津聖志: 富山シャクヤクのブランド化推進事業 これまでの歩みと成果, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 50, 58-65 (2023)
- 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 (2014)
- 4) 田村隆幸, 東一彦, 大江勇, 横田洋一, 竹林憲司: 富山シャクヤクのブランド化推進事業 一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一, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 46, 13-19 (2018)
- 5) 田村隆幸, 東一彦, 大江勇, 寺崎さち子, 川筋透, 竹林憲司, 高山信幸, 米田哲也, 小笠原勝, 小木曾英夫: 富山シャクヤクのブランド化推進事業 一実生産規模乾燥調製法の効率化に関する検討一, 富山県薬事総合研究開発センター年報, 48, 19-30 (2021)
- 6) 田村隆幸, 高山信幸, 竹林憲司, 横田洋一, 小笠原勝, 東一彦, 渡会三千代: 富山県における実生産規模シャクヤク乾燥法の効率化に向けた検討, 日本生薬学会第69回年会講演要旨集, 172 (2016)
- 7) 厚生労働省: 第十八改正日本薬局方, 1956-1957 (2021)

V 資 料

「令和6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 2024

小笠原 勝, 米田 哲也, 高山 信幸, 柚木 芳

Masaru OGASAWARA, Tetsuya YONEDA, Nobuyuki TAKAYAMA, Kaori YUNOKI

2021年に県内医薬品メーカーによるGMP違反が相次いで発覚して以降、本県医薬品産業への信頼が大きく損なわれていたが、徐々に回復の兆しが見えてきた。本県における2023年の医薬品生産金額は前年比2.3%増の6221億円となり4年ぶりに増加した。都道府県別の順位は前年から一つ上がり4位となった。この回復基調を継続させるためには、県内薬業界を挙げて今まで以上に品質管理技術力の強化を進める必要がある。

本研究は、平成21年度より一般社団法人富山県薬業連合会と共同で、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、試験検査の技術力の強化及び県内医薬品産業の更なる活性化を目的として取り組んでいる¹⁻¹²⁾。具体的には、参加企業に同一の試料を配布し、同一の試験方法で分析を実施していただき、その結果をとりまとめて解析する。この結果を各社にフィードバックするとともに、期待する結果が得られなかった参加企業に対しては原因調査及び改善支援を行う。これにより、県内製薬企業の試験検査技術力の向上及びその水準の維持に寄与するものである。令和6年度は、要望の多い試験項目を中心に、定量（HPLC法）、pH測定、水分測定（容量滴定法）、定量（電位差滴定法）、確認（赤外吸収スペクトル測定法、KBr錠剤法）、定量（UV法）について実施し、結果解析、原因調査、及び改善支援を行ったので、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、ナテグリニドの定量（HPLC法）、マルトースー水和物のpH測定、アクリノール水和物の水分測定（容量滴定法）、ベタミプロンの定量（電位差滴定法）、グアイフェネシンの確認（IR法、KBr錠剤法）、イノシンの定量（UV法）とした（表1）。定量（UV法）は局外規に準じた試験方法（希釈方法を変更）とし、それ以外は日本薬局方に準じた試験方法とした。

表1 試験項目及び参加施設数等について

	試験項目	対象品目	主な使用機器	参加企業数
製剤試験	定量（HPLC）	試料A 日局ナテグリニド錠 (ファスティック錠30 mg)	高速液体クロマトグラフ、 pH計、乾燥機	26
原薬試験	pH測定	試料B (マルトースー水和物)	pH計	39
	水分測定 (容量滴定法)	試料C (アクリノール水和物)	カールフィッシャー水分計 (容量滴定法, 直接滴定)	30
	水分測定 (電量滴定法)	試料D (ベタミプロン)	電位差滴定装置	27
	確認 (赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法)	試料E (グアイフェネシン)	フーリエ変換赤外分光光度計、 錠剤成型器、減圧乾燥機	30
	定量 (UV)	試料F (イノシン)	分光光度計、pH計、乾燥機	37

(2) スケジュール

令和5年5月から新型コロナウイルス感染症が5類感染症に変更されたが、参加者の負担減の観点から結果報告会はオンライン形式で実施した。実施方法の説明資料等については、試験手順説明資料は電子メールにより、また試験試料は宅配便により参加者宛に配布した。配布時期は昨年度同様に例年よりも1か月程度早くし（令和6年10月18日発送）、各社ができるだけ試験に参加し易くなるよう努めた。当センターへの試験結果報告期限は令和6年12月26日とした。報告内容を取りまとめて下記(3)の方法により評価し、その評価結果に応じて原因調査、改善支援、及び再試験依頼等を実施した。結果報告会は令和7年3月10日に実施し、併せて外部講師による講習会（日本分析機器工業会、メトラ・トレード㈱、「はかり（天秤）に関する日局改正について」）を実施した。

(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

※Xi：各参加施設の報告値

(4) 評価結果に基づく対応

「不満足」及び「疑わしい」の施設に対しては、原因調査（聞き取り調査等）及び改善支援を実施するとともに、再試験を依頼した。さらに、再試験を実施した「不満足」及び「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) 日局ナフトピジル錠の定量試験（HPLC）

参加26施設のうち、1施設（以下、①）が棄却検定により外れ値と判定された（定量値が低値）。「疑わしい」及び「不満足」と判定された施設はなかった。試料溶液（n=3）の定量結果のバラつきが全体に少なかったことから、中央値±1%は「満足」とした（図1及び2）。

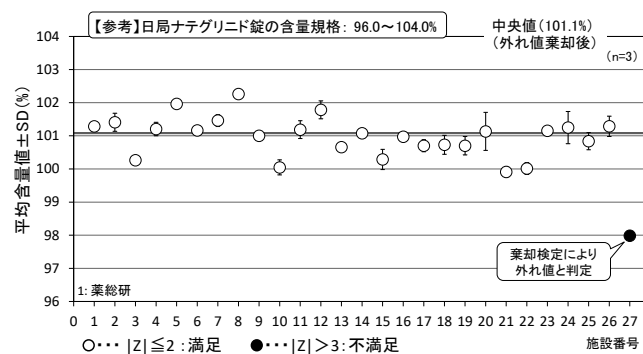


図1 日局ナテグリニド錠の定量試験（HPLC法）の報告値

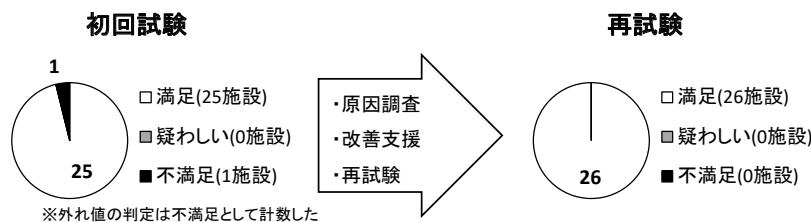


図2 日局ナテグリニド錠の定量試験（HPLC法）の評価結果

原因調査の結果、①の施設においては、標準溶液の調製にミスがあったと考えられた。具体的には、定量用標準物質の秤量、あるいは、内標準溶液の添加に問題があった可能性が考えられた。再試験では、ホールビペット操作などの基本操作に留意して実施していただいた結果、「満足」と判定される結果が得られた。その他として、システムの性能におけるナテグリニドと内標準物質の分離度について、規定された値を満たせないとの問い合わせが1件あった。状況を詳しく聞いたところ、カラムの劣化が疑われたため、劣化していないカラムでの実施をお願いした。

(2) マルトースー水和物のpH測定試験

参加39施設のうち、2施設（以下、①及び②）が棄却検定により外れ値（いずれもpH値が高値）と判定された。この2施設を除外した後、改めて統計解析を実施したところ、2施設（以下、③及び④）が「不満足」と判定され（いずれもpH値が高値）、3施設（以下、⑤、⑥及び⑦）が「疑わしい」と判定された（pH値が、⑤はやや低値、⑥及び⑦はやや高値）（図3～5）。

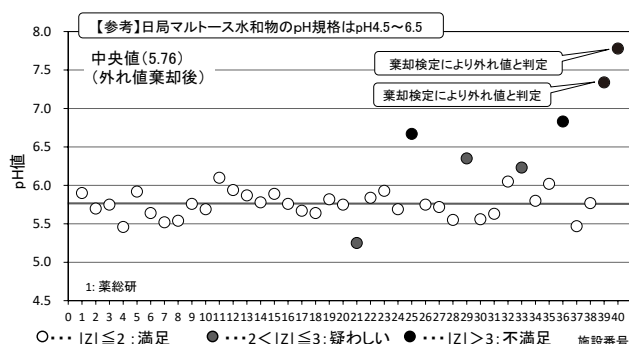


図3 マルトースー水和物のpH測定試験の報告値

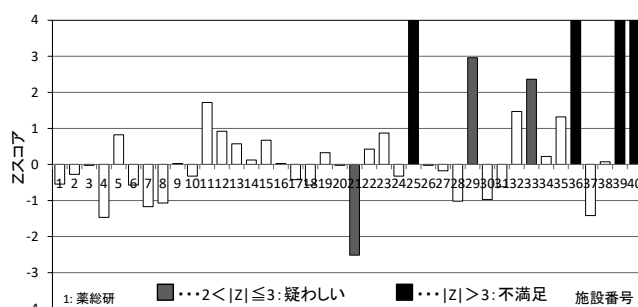


図4 マルトースー水和物のpH測定試験のZスコア

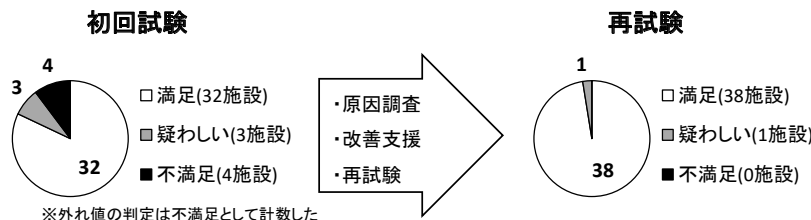


図5 マルトースー水和物のpH測定試験の評価結果

原因調査を実施したところ、①及び③の施設については、電極を交換したところpH値が改善したことから電極の異常が原因と考えられた。②の施設については、開封日が不明の標準溶液で校正したこと、電極内部液が劣化していた可能性、電極内部液補充口を開けない状態で測定した可能性が考えられた。再試験ではこれらに留意して実施していただいたが、「不満足」の判定となった。そこで、さらに電極の洗浄を実施してもらい再々試験を実施していただいたが、「疑わしい」の判定となった。これらについて、②の施設で使用したpH計のメーカーに確認したところ、電極の劣化の可能性が高いとの回答があった。そこで、今回は再々試験の結果を最終結果とし、電極の交換をお願いした。④の施設については、電極が試料溶液に十分に浸っていなかったこと、またpH値の安定化前に値を読み取った可能性が考えられた。⑤の施設については電極内部液の劣化、⑥の施設についてはpH値の安定化前に値を読み取った可能性、⑦の施設については電極の汚れあるいは内部液交換直後に測定したことが原因と考えられた。上記の点を踏まえて各々の施設において再試験を実施していただいたところ、いずれも「満足」と判定された（②以外）。

今回、⑤の施設から、pH値の測定結果が全体の値から外れたことについて、原因調査資料の提供があった。原因調査の進め方について、具体的な究明手順、検証データ、及び結論が記されており、同様の事例を経験した他の参加施設において大変有益な内容であった。当該施設に了解をいただき、結果報告会にて参加施設間で情報共有した。

(3) アクリノール水和物の水分測定試験（容量滴定法）

令和3年6月告示の第18改正日本薬局方の水分測定において、「測定の適合性」に関する検証が追加され、さらに18ヵ月の猶予期間が終了していることから、各施設での対応状況の確認も踏まえ試験を実施した。昨年度実施した際は1施設から測定の適合性の検証に関する問い合わせがあったが、今年度はなかった。参加施設から報告された「測定の適合性」に関する検証結果にも問題は認められなかったことから、当該検証項目には十分に対応できていると考えられた。

参加30施設のうち、1施設が「疑わしい」と判定された（水分含量がやや高値）。原因調査の結果、滴定液の劣化が原因と考えられた。この点に留意して再試験を実施していただいたところ、「満足」と判定された（図6～8）。

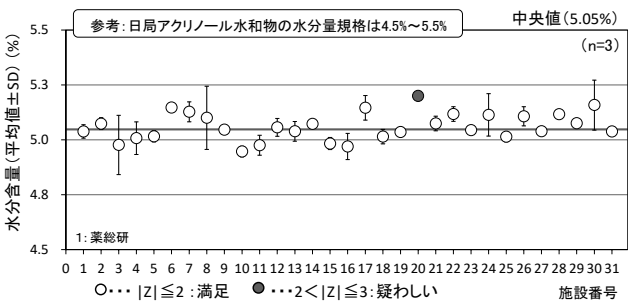


図6 アクリノール水和物の水分測定試験（容量滴定法）の報告値

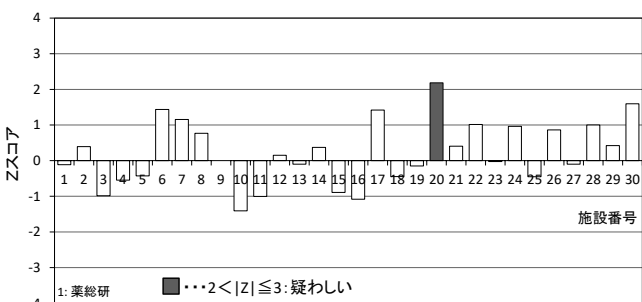


図7 アクリノール水和物の水分測定試験（容量滴定法）のZスコア



図8 アクリノール水和物の水分測定試験（容量滴定法）の評価結果

(4) ベタミプロンの定量試験（電位差滴定法）

参加27施設のうち、1施設（以下、①）が棄却検定により外れ値（定量値が高値）と判定された。この施設を除外した後、改めて統計解析を実施したところ、1施設（以下、②）が「不満足」（定量値が高値）と判定された（図9～11）。

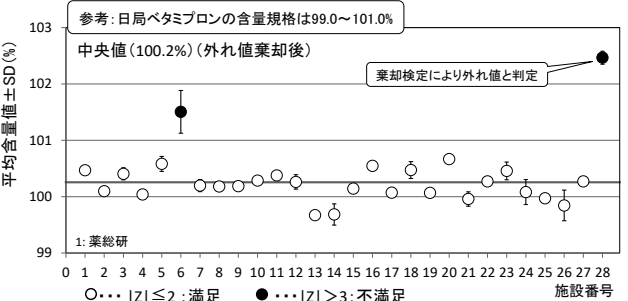


図9 ベタミプロンの定量試験（電位差滴定法）の報告値

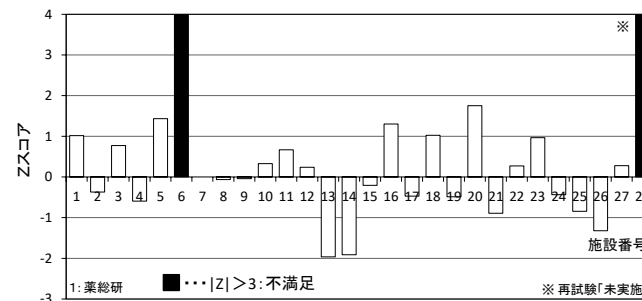


図10 ベタミプロンの定量試験（電位差滴定法）のZスコア

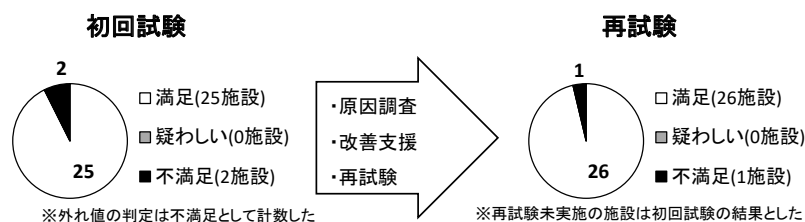


図11 ベタミプロンの定量試験（電位差滴定法）の評価結果

②の施設については、超音波処理の有無により定量値が改善したことから、超音波処理が原因との考察をいただいた。一方で、当センターにおいて超音波処理の有無が定量値に与える影響について検証したところ、ほとんど影響が認められなかった。このことから、超音波処理とは異なる操作が原因である可能性も考えられた。②の施設には結果報告会において当センターで実施した結果を示し、今後原因調査を行う際は協力する旨を伝えた。①の施設については、業務多忙のため再試験を実施できなかった。

(5) グアイフェネシンの確認試験（IR, KBr錠剤法）

毎年度参加者を対象に実施しているアンケート調査において、確認試験（IR）に対する実施希望が高かったことから、R4年度より3年続けて当該試験を取り上げた。昨年度同様に、試料のIRスペクトルのうち特徴的な2カ所の吸光度比を評価指標値として、報告されたデータを統計処理した。その結果、参加30施設のうち、2施設（以下、①及び②）が「疑わしい」と判定された。「不満足」と判定された施設はなかった（図12～14）。

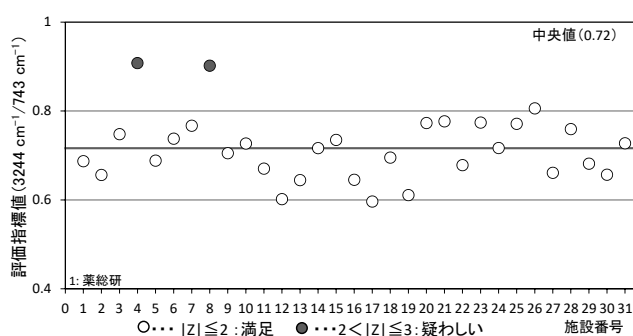


図12 グアイフェネシンの確認試験（IR, KBr錠剤法）の報告値

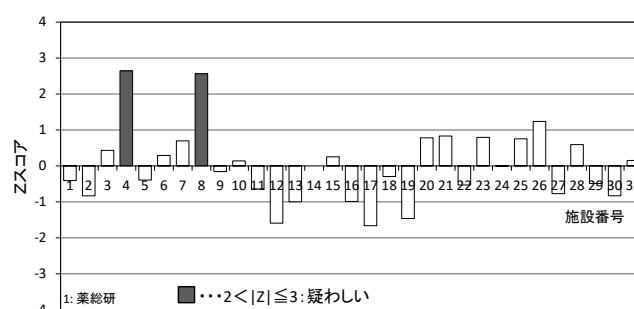


図13 グアイフェネシンの確認試験（IR, KBr錠剤法）のZスコア

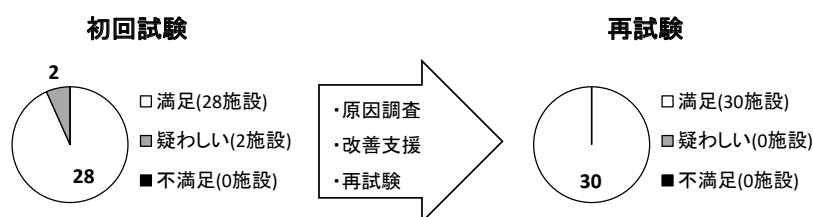


図14 グアイフェネシンの確認試験（IR, KBr錠剤法）の評価結果

IRスペクトルの形状について確認したところ、①の施設では日本薬局方で規定している透過率範囲を下回っていることが確認された。②の施設では全領域で透過率がやや低く、かつスペクトル形状がやや曲がっていた。原因調査の結果、①の施設については吸光度の値が高値（2.0以上）であったことから、KBr錠剤中の試料の濃度が高すぎるのが原因と考えられた。②の施設についてはKBr錠剤の作製不良（バックグラウンド錠剤と試料錠剤に曇りがあったとのこと）が確認された。このことから、試料の量が少なかったこと、KBr錠剤作製時のプレス強度が不十分であったことが原因と考えられた。これらの点を踏まえて再試験を実施してい

ただいたところ、いずれも「満足」と判定されるとともに、スペクトル形状も改善した。結果報告会では、バランスの良いスペクトルを得る上でのポイントとして、試料錠剤を作製する際のプレス強度にも留意が必要であることを当センターでの実施例も交えて示し参加施設間で情報共有した。

(6) イノシンの定量試験（UV法）

参加37施設のうち、1施設（以下、①）が棄却検定により外れ値（定量値が高値）と判定された。この施設を除外した後、改めて統計解析を実施したところ、「疑わしい」と判定された施設が3施設（以下、②～④）認められた。「不満足」と判定された施設はなかった。疑わしいと判定された②及び③の施設では、全体の値と比較して含量値がいずれもやや高値であった。一方、④の施設では含量値がやや低値であった（図15～17）。

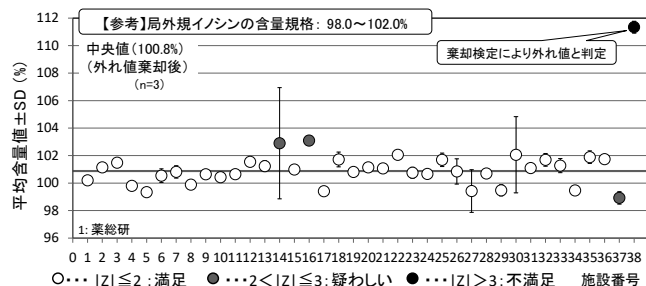


図15 イノシンの定量試験（UV法）の報告値

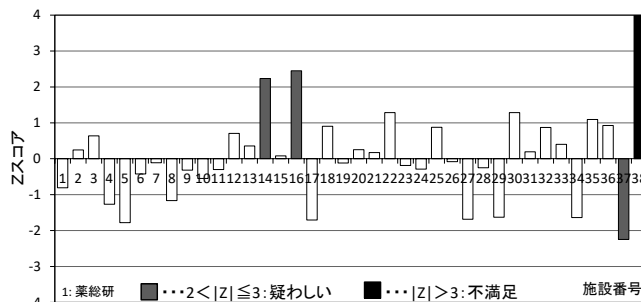


図16 イノシンの定量試験（UV法）のZスコア

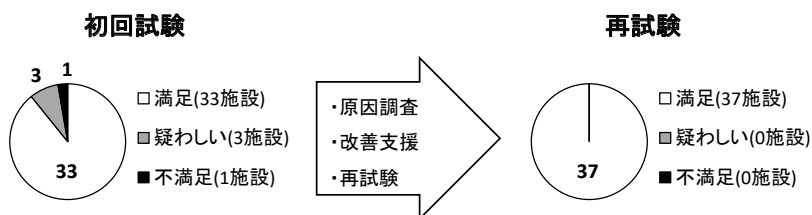


図17 イノシンの定量試験（UV法）の評価結果

原因調査の結果、①の施設では試験器具の汚れ、あるいは、試料秤量時の静電気による秤量誤差が原因と考えられた。②の施設については、試料溶液中に発生した気泡が原因と考えられた。③の施設については、セルの外側表面の汚れが原因と考えられた。④の施設においては、試料の溶解不足が原因と考えられた。これらの点を踏まえて再試験を実施していただいたところ、いずれも「満足」と判定された。

今回の原因調査において、全体の値から外れた原因として、試料溶液中やセルに付着した気泡の影響について考察があった。見落とし易い事象であり、当該考察は参加施設に共通する留意点であると考えられた。当センターで検証実験を行い、その結果も踏まえて結果報告会にて情報共有した。

3. まとめ

今年度6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96%（のべ189施設中181施設）であり、前年度の94%（のべ180施設中170施設）よりもやや高い値となった。要因は、pH測定試験及び定量試験（UV法）において不満足判定の割合がやや減少したためと考える。前年度とはいずれも試験品目は異なるもの、本事業の継続が一助になっていれば幸いである。今回、参加者からpH値の測定結果が全体の値から外れたことについて原因調査資料の提供があった。参加施設全体に共通する考え方の例示であり、期待とは異なる結果が得られ場合の原因究明の進め方を考察する貴重な機会となった。

本事業では、各施設で発生したミスの事例や対処法の考え方を参加者間で共有することが、個々の技術力の向上につながると考え、取り組んでいる。事業終了後に実施した参加者へのアンケートでは、「再試験を実施した参加施設の是正点やその考え方が大変参考になった」とのコメントが多数寄せられた。普段の業務では気

付きにくい問題点について、情報共有を通じて課題を明確化できたものとする。

また、今回のアンケート（回答数: 36施設）では、本事業への参加が業務にどのように役立ったか、具体的な事例を選んで回答いただいた（複数回答可）。その結果、「初任者等の研修材料に活用した」が42%で最も多く、次いで「規格外試験結果などが発生した際の検証プロセスや問題点の洗い出しに役立った」が39%、「機器管理や試験検査に関する手順書の改訂や作成に役立った」が28%、「特になし」が17%という回答が得られた。このことは、参加施設から提供された原因調査資料や再試験における是正箇所の詳細な報告、試験実施における懸念点の予備検討資料やコメントの提供など、多岐にわたる情報提供とその共有が参加企業全体の技術力向上に寄与しているものとする。本事業にご協力いただいたことに改めて感謝を申し上げますとともに、今後も県内製薬企業の試験技術力の向上及びその水準の維持に寄与し、県内医薬品産業の更なる発展に繋がるよう本事業に取り組んでいく。

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 (2012)
- 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 (2014)
- 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 (2015)
- 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 (2016)
- 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 (2017)
- 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 (2018)
- 7) 竹林憲司, 横田洋一, 小笠原勝, 「平成30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, 46, 39-43 (2019)
- 8) 小笠原勝, 米田哲也, 竹林憲司, 「令和元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, 47, 51-55 (2020)
- 9) 小笠原勝, 米田哲也, 竹林憲司, 「令和2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, 48, 65-70 (2021)
- 10) 小笠原勝, 米田哲也, 竹林憲司, 「令和3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, 49, 51-56 (2022)
- 11) 小笠原勝, 米田哲也, 高山信幸, 「令和4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, 50, 51-57 (2023)
- 12) 小笠原勝, 米田哲也, 高山信幸, 「令和5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, 51, 42-49 (2024)

Ⅵ 講演・学会発表など

1. 講演・学会等発表・誌上発表・共同研究論文

(学会等発表)

「ICP-MSを活用した医薬品の元素不純物分析法の確立」

高山信幸, 柚木芳, 米田哲也, 小笠原勝, 高津聖志

第84回分析化学討論会, 2024.5.19, (京都府)

【目的】医薬品には、原薬や添加剤、合成時の触媒などから元素不純物が混入することが考えられる。第十八改正日本薬局方（以下、「日局18」）では、医薬品中の元素不純物を適切に管理することが義務付けされた。当該試験のバリデーションを行ったところ、管理規定が求められている24元素のひとつであるオスミウム（Os）が添加回収試験において過剰に検出され、適合基準外となることが確認された。これは、マイクロ波分解時にOsが硝酸と反応し、揮発性の高い四酸化オスミウム（OsO₄）が生成することで、ICP-MS測定における感度変化を起こしていると考えられる。本研究では、Osを安定化させるために錯体形成剤もしくは還元剤を添加し、Osの過大評価を抑制し、正確にOsを測定する手法を見出した。

【方法】検体の前処理は、マイクロ波分解装置（Multiwave PRO, Anton Paar社製）を用い、ICP-MSは、7900 ICP-MS（Agilent社製）を用いた。日局18で規定されている全24元素を測定対象とした。Osを安定化させるための安定化剤には、錯体形成剤としてチオ尿素を用い、還元剤として、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸カリウムを用いた。

【結果及び考察】添加回収試験において、安定化剤を添加しない場合、オスミウムは回収率が258%となり、日局18における適合基準を満たすことができなかった。検体のマイクロ波分解後、安定化剤を添加したところ、適合基準内で回収することができた。よって、本法はOsの添加回収試験において、効果的な手法であることが分かった。

「自然免疫分子STING-TRIFを軸とした視床下部炎症：摂食調節の障害による過食性肥満の解析」

渡邊康春, 長井良憲, 高津聖志

第36回日本神経免疫学会学術集会, 2024.10.3-5 (富山県)

高脂肪食（HFD）によって誘導される視床下部の炎症反応が、摂食抑制ホルモンであるレプチンのシグナルを障害し、摂食が抑制できず過食になることが肥満の原因の1つであることがわかってきた。我々は、自然免疫シグナルのアダプター分子STINGとTLR3やTLR4のアダプター分子TRIFによるシグナル経路が、視床下部炎症に関与し、過性肥満の発症に深く関与することを見出した。

TRIF欠損マウスは、野生型マウスよりもHFD摂餌量が軽減し肥満が改善していた。さらに、TRIF欠損マウスの酸素消費量は、野生型マウスと同程度であったことから、TRIF欠損マウスにおける肥満の改善は、代謝能の亢進ではなく摂餌量の減少に起因すると考えられた。さらにTRIF欠損マウスでは、HFD摂餌による視床下部炎症が軽減し、レプチンシグナルの障害も改善していた。一方、TLR3欠損マウスは、HFD摂餌による肥満が軽減したが、摂餌量は減少しなかった。また、TLR4やTLR3/TLR4二重欠損マウスは、野生型マウスと同程度HFDを摂餌し体重も増加した。以上より、TRIFシグナルは視床下部炎症の発症に深く関与し、その上流にはTLR4及びTLR3とは異なる受容体が関与することが示唆された。一方、STING欠損マウスは、HFD摂餌が軽減し体重増加や視床下部炎症も軽減した。さらに、STING合成リガンドDMXAAの脳室内投与により、視床下部の炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加し、それはTRIF欠損マウスで顕著に軽減した。また、レプチンの脳室内投与によるSTAT3のリン酸化が、DMXAAの脳室内投与により障害された。

以上から、STING-TRIFシグナルは視床下部炎症を誘導し、レプチンシグナルを障害することが示唆された。

ICP-MSを活用した医薬品の元素不純物分析法

高山信幸, 柚木芳, 米田哲也, 小笠原勝, 合田幸広

第61回全国薬事指導協議会総会, 2024. 10.11 (富山)

製剤中には、原薬や添加剤、合成時の触媒や反応容器などから元素不純物が混入するケースが考えられ、これらの潜在的元素不純物の評価は重要な課題となる。オスミウム（Os）は、マイクロ波分解時に硝酸と反応して揮発性の高い四酸化オスミウム（OsO₄）を生成することで、ICP-MSの試料導入部のネブライザー内で感度変化を引き起

こし過剰に検出されることが知られている。本研究では、オスミウムの過剰検出問題に対する解決策について検討した。

添加回収試験を行ったところ、オスミウムが過剰に検出され、適合基準外となることが確認された。そこで、錯体形成剤や還元剤を添加することで、オスミウムを液中で安定化させ正確な測定を行う手法を検討した。具体的には、チオ尿素（錯体形成剤）、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム及びメタ重亜硫酸カリウム（いずれも還元剤）をそれぞれ独立して、分解液に添加したところ、オスミウムの回収率を規定された範囲内に収めることができた。一方、安定化剤の添加による他の元素の感度変化が懸念されたため、ヒ素とセレンについて添加回収試験を行った。その結果、チオ尿素及びアスコルビン酸はこれら元素の回収率にほとんど影響を与えなかったが、亜硫酸ナトリウム及びメタ重亜硫酸カリウムでは回収率が規定された範囲を超えることが確認された。このことは、全元素の同時測定を行う場合はオスミウム以外の元素の感度変化に注意が必要であることを示唆する。

オスミウム以外の元素を測定し、続いてオスミウムのみの測定を行うことで、正確な定量試験を実施できると考えられる。元素不純物試験法の実施には様々な要因が試験結果に影響しており、正確な分析を行うためには適切なバリデーションが不可欠である。

「トウキ栽培におけるキアゲハ及びトウキ斑点病に対する薬剤の防除効果」

田村隆幸，東一彦，川部眞登

薬用植物栽培研究会 第6回研究総会，2024.11.2（東京都）

【目的】トウキ（*Angelica acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag.）の栽培においてキアゲハ幼虫による葉の食害及びトウキ斑点病は減収の原因となり、国内生産拡大の障壁となっている。そこで、キアゲハに対するクロラントラニリプロール水和剤及びトウキ斑点病に対するアゾキシストロビン水和剤の薬効を評価した。

【方法】トウキを無処理区及び薬剤処理区で栽培し、下記試験を実施した。

（1）クロラントラニリプロール（5%）水和剤（1区13.6㎡，3連制）

令和元年9月28日、キアゲハ幼虫を各区に22頭（若齢15，中齢7）放虫し、その3時間後、薬剤処理区には薬剤を1回散布（2000倍，200L/10a相当量）した。調査は散布日の2日，4日，8日後の計3回で、各区30株に生存している虫数を計数し、無処理区を100とした密度指数を算出した。

（2）アゾキシストロビン（20%）水和剤（1区25.5㎡，3連制）

薬剤処理区に平成30年9月6日，14日，20日の計3回薬剤を散布（2000倍，300L/10a相当量）した。調査は初回散布直前及び最終散布7日後の計2回で、各区40株の中位3葉（計120葉/区）についてトウキ斑点病発病の有無及び病斑数を調査した。防除価は病斑数より算出した。

【結果及び考察】

（1）クロラントラニリプロール水和剤

無処理区に対する薬剤処理区の生存虫数の密度指数は、散布2日後に約27，同4日後に約6，同8日後には0であり、幼虫の若齢，中齢に関わらず高い殺虫効果が認められた。

（2）アゾキシストロビン水和剤

初回散布から調査までの3週間で無処理区では感染が拡大し、最終的には無処理区では発病葉率79.4%，平均病斑数9.3個/葉となった。薬剤処理区では発病葉率が26.7%と約3割に、病斑数も0.9個/葉と約1割にそれぞれ減少し、高い防除効果を示した。初期発病後の散布であったことも考慮すると、トウキ斑点病に対する実用性は高いと考えられた。

【謝辞】本研究の遂行に終始ご協力をいただきました、奈良県農業研究開発センターの小林甫氏、西川学氏及び米田健一氏に深謝いたします。

「自然免疫分子STING-TRIFによる視床下部炎症：摂食調節障害の解析」

渡邊康春，長井良憲

血管生物医学会特別集会，2025.2.22-23（東京都）

高脂肪食（HFD）によって誘導される視床下部の炎症反応が、摂食抑制ホルモンであるレプチンのシグナルを障害し、摂食が抑制できず過食になることが肥満の原因の1つであることがわかってきた。我々は、自然免疫シグナルのアダプター分子STINGとTLR3やTLR4のアダプター分子TRIFによるシグナル経路が、視床下部炎症に関与

し、過食性肥満の発症に深く関与することを見出した。

TRIF欠損マウスは、野生型マウスよりもHFD摂餌量が減少し肥満が改善していた。さらにTRIF欠損マウスでは、HFD摂餌による視床下部炎症が軽減し、レプチンシグナルの障害も改善していた。一方、TLR 3 欠損マウスは、HFD摂餌による肥満が軽減したが、摂餌量は減少しなかった。また、TLR 4 やTLR 3 /TLR 4 二重欠損マウスは、野生型マウスと同程度HFDを摂餌し体重も増加した。以上より、TRIFシグナルは視床下部炎症の発症に深く関与し、その上流にはTLR 4 及びTLR 3 とは異なる受容体が関与することが示唆された。一方、STING欠損マウスは、HFD摂餌が減少し体重増加や視床下部炎症も軽減した。さらに、STING合成リガンドDMXAAの脳室内投与により、視床下部における炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加し、レプチンシグナルが障害され、それはTRIF欠損マウスで顕著に軽減した。

以上から、STING-TRIFシグナルは視床下部炎症を誘導し、レプチンシグナルを障害することが示唆された。

（研究成果発表会）

ICP-MSを活用した医薬品の元素不純物分析

高山信幸

令和6年度薬事研究成果発表会，2024.11.8，薬事総合研究開発センター大会議室

製剤中には、原薬や添加剤、合成時の触媒や反応容器などから元素不純物が混入する可能性がある。安全安心な医薬品が求められていることから、これらの潜在的な不純物の評価は、製薬業界にとって重要な課題となっている。2022年4月26日付にて、新たに経皮吸収製剤においても許容被曝量：PDE値（ $\mu\text{g/day}$ ）が設定されたことを受け、軟膏剤や貼付剤などの経皮吸収製剤を分析対象として、元素不純物試験の検討を行った。貼付剤は、支持体に製剤が塗布されて製造されており、不織布や織布等の無機物質を多く含む原料が使用されている。そのため、これまでに確立した試料の分解方法では、貼付剤の完全分解を達成することができなかった。本検討では、標準的な分解液として使用される塩酸・硝酸にフッ化水素酸を加えることで、貼付剤の分解を可能とし元素不純物試験の構築を行った。

「県産ハトムギの薬用利用に向けた品質確保に関する調査」

田村隆幸

令和6年度薬事研究成果発表会，2024.11.8，薬事総合研究開発センター大会議室

国内最大のハトムギ産地である富山県では、生薬ヨクイニン（薏苡仁）の生産への関心も高い。本来、ハトムギのデンプンはモチ性であるが、栽培過程で近縁種ジュズダマと交雑した場合、その種子はウルチ性を示し、第18改正日本薬局方の確認試験で不適となる。そのため、ハトムギの薬用栽培においてはウルチ性の混入を防ぐ必要がある。そこで、県内ハトムギ産地においてウルチ性ハトムギの混入リスクが高い地域を調査した結果、特段高い地域はなかった。また、農研機構が開発した完全モチ性のハトムギ新品種「つやかぜ」の薬用栽培（モチ性維持）実証試験では、圃場内の33地点（各300粒）から得た全てのサンプルがJP18の確認試験に適合することを確認した。

（その他）

ファルマシア，60巻5号：438-439（2024）

「薬用植物園の花ごよみ（第11回）富山県薬事総合研究開発センター薬用植物指導センター」

田村隆幸

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
抗腫瘍剤【参考 ベツリン誘導体BD-23等】	特許第 6596624 号
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	特許第 6931884 号
自然免疫を活性化する粘膜ワクチン用アジュバント	特許第 6977206 号
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	特許第 7194951 号

(2) 特許出願

名 称	出 願 ・ 公 開 番 号
カンゾウエキス及びその製造方法、並びに、腸内細菌調整用組成物、腸管バリア機能増強組成物、抗肥満用組成物、抗糖尿病用組成物、及びNLRP3 インフラマソーム活性制御用組成物	特開2023-067303
粘膜アジュバント	国際公開番号WO 2024/204419

指 導 業 務 な ど

< 参 考 資 料 >

関 係 例 規

Ⅶ 指 導

A. 創薬研究開発センター・製剤開発支援センター

1. 講演会

- (1) 令和6年6月24日（月） パレブラン高志会館 嘉月の間 参加者63名
「第18改正日本薬局方第二追補 はかり（天秤）に関する一般試験法
及び新規参考情報と今後の見通し」
講師：富山県薬事総合研究開発センター所長
合田 幸広 氏
- (2) 令和6年11月8日（金） 創薬研究開発センター大会議室及びオンライン 参加者53名
「核酸医薬およびmRNA医薬の規制整備に向けた取り組み」
講師：国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部長
井上 貴雄 氏
- (3) 令和7年2月25日（火） オンライン 参加者41名
「超高感度リン酸化シグナル解析を用いた胃がんプロテオゲノム研究
－臨床に与えるインパクト－」
講師：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所
創薬デザインセンター 創薬標的プロテオミクスプロジェクト
プロジェクトリーダー 足立 淳 先生
- 「病態研究におけるオミクス解析の重要性」
講師：富山大学 学術研究部医学系 病態・病理学講座
准教授 山本 誠士 先生

2. 分析技術講習会

- (1) 「HPLCメンテナンス・トラブル対応等講習会」
- ①令和6年10月22日（火） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者6名
アジレント・テクノロジー株式会社
- ②令和6年10月23日（水） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者6名
アジレント・テクノロジー株式会社
- ③令和6年10月28日（月） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者12名
株式会社島津製作所
- ④令和6年10月29日（火） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者12名
株式会社島津製作所
- ⑤令和6年10月30日（水） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者12名
株式会社島津製作所
- ⑥令和6年10月31日（木） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者8名
日本ウォーターズ株式会社
- ⑦令和6年11月1日（木） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者9名
日本ウォーターズ株式会社

(2) 「分析技術講習会」

- ①令和6年7月24日（水） 薬事総合研究開発センター大会議室及びオンライン
「HPLCの基礎とUHPLCの活用」
株式会社島津製作所 参加者59名
- ②令和6年7月25日（木）及び26日（金） 薬事総合研究開発センター相談室3
「ガスクロマトグラフの操作ポイントとメンテナンスに関する講習会」
株式会社島津製作所 参加者24名
- ③令和6年9月26日（木）及び27日（金） 薬事総合研究開発センター大会議室及びオンライン
「ICH-Q3D元素不純物分析に関する講習会」
アジレント・テクノロジー株式会社 参加者53名
- ④令和6年12月2日（月） 薬事総合研究開発センター中会議室及びオンライン
「医薬品分野でのラマン分光法を用いた分析事例」
株式会社堀場製作所 参加者31名

(3) 「初任者向け打錠技術講習会」

令和6年12月24日（火）および25日（水） 薬事総合研究開発センター大会議室
モリマシナリー株式会社

(4) 「半固形製剤技術実習」

令和7年3月4日（火） 薬事総合研究開発センター大会議室 参加者9名
ニッコールグループ 日光ケミカルズ株式会社

3. 開放試験室、試験機器の利用

件数	399件
時間数	1,238時間
試験機器の利用	507件

主な試験機器等：旋光度計，赤外分光光度計，分光光度計，高速液体クロマトグラフ，ヘッドスペースオートサンプラー付きガスクロマトグラフ，液体クロマトグラフタンデム四重極型質量分析計,ICP質量分析計など

4. 製剤機器の利用

件数	500件
時間数	1,572時間

主な製剤機器：流動層造粒コーティング装置，攪拌造粒機，錠剤機（ロータリー式），半自動PTP包装機など

5. 相談者に対する指導

相談項目	件数
試験（方法，操作，機器等）に関すること	117件
製剤（方法，操作，機械等）に関すること	158件

6. 講習会等

開催日	事業名・依頼先	場所	演題等	担当
4/15, 16, 17	富山県立大学工学部医薬品工学科製剤実習	薬総研	製剤実習「顆粒及び錠剤の製造及びその物性評価」	製剤研究課
6/12	富山大学工学部PME養成プログラム講義	富山大学 五福キャンパス	「くすりの製造工程と製剤機械」	永井秀昌
6/5, 6, 17, 26, 28	富山県厚生部くすり政策課職員他	薬総研	新任GMP調査員教育訓練実習プログラム	製剤研究課 試験課
6/5, 19	「くすりの富山」エキスパート支援事業（滑川高校）	薬総研	分析試験，製剤試験による実習	製剤研究課 試験課
6/11, 18, 25, 7/29, 16	初任者分析技術レベルアップ研修	薬総研	HPLCコース	試験課
6/6, 13, 20, 27, 7/4, 11	初任者分析技術レベルアップ研修	薬総研	水分計・電位差滴定装置コース	試験課
7/31	薬剤師のお仕事体験学習（中学生）	薬総研	分析試験，製剤試験による実習	製剤研究課 試験課
8/1	薬剤師のお仕事体験学習（高校生）	薬総研	分析試験，製剤試験による実習	製剤研究課 試験課
8/24	次世代スーパーエンジニア養成コース 製剤工学特論	富山大学 五福キャンパス	「内服固形製剤の製剤試験法」	永井秀昌
8/4	ネクストファーマ・エンジニア養成コース	WEB配信	富山のくすり（行政編）	長谷川千佳
8/4～9/30	ネクストファーマ・エンジニア養成コース	オンデマンド配信	医薬品の品質試験と評価－溶出試験による品質の評価－	小笠原勝 米田哲也
8/4～9/30	ネクストファーマ・エンジニア養成コース	オンデマンド配信	内服固形製剤の製造工程－錠剤・顆粒剤を中心に－	永井秀昌
8/4～9/30	ネクストファーマ・エンジニア養成コース	オンデマンド配信	免疫制御と創薬：慢性炎症と生活習慣病	本田裕恵
8/4～9/30	ネクストファーマ・エンジニア養成コース	オンデマンド配信	免疫制御と創薬：感染・非感染性の免疫機構と創薬	渡邊康春
10/4	富山大学薬学部創薬科学科必修科目「富山のくすり学」	富山大学 杉谷キャンパス	「くすりの製造工程と製剤機械」	永井秀昌
10/7, 9, 10	富山大学薬学部創薬科学科2年生製剤実習	薬総研	製剤実習「顆粒及び錠剤の製造及びその物性評価」	製剤研究課
12/5, 6, 10, 11	「くすりの富山」エキスパート支援事業（富山北部高校）	薬総研	分析試験，製剤試験による実習	製剤研究課 試験課

B. 薬用植物指導センター

1. 栽培技術指導

栽培者に対する研修会	7 件
栽培者に対する現地指導	45件

2. 種苗の供給状況

品 名	種苗別	供給量	価 格
シャクヤク（薬用）	苗	460 株	40円／株
シャクヤク（ブランド）	苗	313 株	60円／株
シャクヤク（兼用）	苗	420 株	350円／株
シャクヤクポット苗	苗	1,019 株	650円／株
シャクヤクポット苗（その他）	苗	191 株	500円／株
トウキ	種子	1.2 リットル	4,500円／リットル
トウキ	苗	21,350 本	7円／本
ミシマサイコ	種子	0.7 リットル	5,000円／リットル

3. 薬草教室

開催日	テ ー マ	参加人員	場 所
9/28	野外で薬草を観察する会	19名	富山市 富山自然博物館「ねいの里」周辺
11/21	客員研究員による薬用植物講演会	19名	富山県民会館

4. 講習会等

月日	依 頼 先 等	場 所	演 題	派遣職員名
4/25	上市高校	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの 取組み	渡会三千代 宮崎有弘
5/1	南加積小学校	薬用植物指導センター	薬用植物について	宮崎有弘
5/14	富山大学薬学部 和漢薬コース	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの 取組み	田村隆幸
5/29～31	ふるさと町民学習	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの 取組み	渡会三千代
5/29	くすりの語り部受講生会	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの 取組み	渡会三千代
6/1, 8/31	日本薬剤師研修センター	薬用植物指導センター	漢方薬・生薬研修会 薬用植物園実習	田村隆幸
6/10	JA黒部	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの 取組み	渡会三千代
8/6	農林水産部農産食品課	薬用植物指導センター	令和6年度薬用作物生産 拡大研修会	渡会三千代 宮崎有弘 田村隆幸
8/22	薬用作物産地支援 協議会	薬用植物指導センター	薬用作物の栽培技術等について	田村隆幸

10/4	薬用作物産地支援協議会	長野県（松本市立博物館）	富山県におけるシャクヤク栽培の実際	田村隆幸
10/4	イトヒメハギの会	薬用植物指導センター	薬用植物について	渡会三千代
10/17	農林水産部農産食品課	小矢部市 栽培農家の農地	シャクヤク（薬用）収穫調製研修会	渡会三千代 宮崎有弘
11/7	商工企画課	県立滑川高校	きらめきエンジニア授業	渡会三千代
11/15	2024PMDA-ATC 漢方セミナー	薬用植物指導センター	薬用植物指導センターの取組み	渡会三千代 宮崎有弘 田村隆幸
1/8	農林水産部農産食品課	薬用植物指導センター	シャクヤク調製作業研修会	渡会三千代 宮崎有弘 田村隆幸
2/18	生産農家	薬用植物指導センター	トウキ湯もみ研修会	渡会三千代 宮崎有弘 田村隆幸

5. 生薬調製機械の利用

件数	0件
時間数	0時間

主な生薬調製機械：生薬原料洗浄機，減圧乾燥器，平型乾燥機，切断機

6. 見学者数

単位：人

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
一般見学者	269	8,572	95	30	70	90	150	160	30	52	24	141	9,683
団体見学者	24 (5)	275 (9)	43 (3)	16 (4)	70 (3)	3 (1)	15 (4)	25 (3)	4 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	475 (34)
合計													10,158

()：団体数

7. 相 談

相談項目	件数	備考
種子，苗の供給，注文	262	希望者数：250名
育苗，追肥，病虫害対策，肥培管理（各論）	33	栽培農家への指導
薬用植物の栽培方法（総論）	17	シャクヤク、トウキなど
薬用植物，民間薬の薬効，利用法，副作用	9	見学者らの質問
薬用植物の調製加工，掘り取り，出荷法	3	栽培農家の出荷
転作・休耕田・耕作放棄田の対策としての薬用植物	0	
植物工場・水耕に関すること	0	
その他（機械化，鳥獣被害，販売価格など）	8	
合計	332	

VIII 試 験

1. 一般依頼試験

検体品目数	0 品目
試験項目数	0 項目

試験項目内訳

試験項目	項目数
確認試験	0
定量試験	0
計	0

2. 行政依頼試験

検体品目数	23品目
試験項目数	23項目

内訳

検体品目	検体数
医療用医薬品	21
一般用医薬品	2
計	23

試験項目

試験項目	項目数
定量試験	2
溶出試験	21
計	23

3. 後発医薬品品質情報提供等推進事業

医療用固形製剤の溶出試験：富山県実施分 8 品目（抗ウイルス剤）の 4 液性による溶出曲線の作成

4. 登録試験検査機関における外部精度管理試験

対象品目：ベラパミル塩酸塩錠：定量法（HPLC法）

同 上 ：確認試験（紫外可視吸光度測定法）

IX 審 査

地方承認品目	審査件数
計	36 (83)

括弧内は再審査を含む件数

X そ の 他

1. 客員研究員招へい事業

秋田県農業試験場 野菜・花き部

上席研究員（兼）チームリーダー 横井 直人 先生

令和6年11月21日

講演（演題：「秋田県における薬用作物栽培の取り組みについて」）及び
薬用植物指導センター職員に対する薬用植物の栽培に関する技術指導・助言

2. 外部評価委員会の開催

開催日：令和6年10月1日

内 容：外部評価委員（5名委嘱）により4研究課題を評価

参 考 資 料

1. 条例・規則

(1) 富山県薬事総合研究開発センター条例（昭和60年 富山県条例第39号，最近改正 令和3年条例第33号）
（趣旨）

第1条 この条例は、富山県薬事総合研究開発センターの設置及び管理に関し必要な事項を定めるものとする。（平30条例38・一部改正）

（設置等）

第2条 薬事に関する研究開発，試験，分析，技術指導その他これらに附随する業務を行うことにより，医薬品等の品質，有効性及び安全性の確保を図り，もつて県内の薬業の振興と県民の保健衛生の維持向上に資するため，富山県薬事総合研究開発センター（以下「薬事総合研究開発センター」という。）を設置する。

2 薬事総合研究開発センターは，次の表の左欄に掲げる施設をもつて構成し，これらの施設の位置は，それぞれ同表の右欄に掲げるとおりとする。

富山県薬事総合研究開発センター創薬研究開発センター	射水市
富山県薬事総合研究開発センター製剤開発支援センター	
富山県薬事総合研究開発センター薬用植物指導センター	中新川郡上市町

（平30条例38・一部改正）

（利用又は依頼の承認）

第3条 薬事総合研究開発センターの施設を利用しようとする者又は薬事総合研究開発センターに試験，分析，検査，鑑定その他これらに類する行為（以下「試験等」という。）を依頼しようとする者は，あらかじめ，知事の承認を受けなければならない。

2 前項の承認には，薬事総合研究開発センターの管理上必要な条件を付することができる。

（平30条例38・旧第4条繰上・一部改正）

（使用料等）

第4条 前条第1項の承認を受けた者（以下「利用者」という。）は，別表に定める金額の範囲内において，施設又は試験等の所要経費を勘案して規則で定める額の使用料又は手数料を納めなければならない。

2 前項の規定にかかわらず，県内に住所又は事務所若しくは事業所を有する者以外の者に係る使用料又は手数料の額は，同項に定める額に100分の150を乗じて得た額（その額に10円未満の端数があるときは，これを切り捨てた額）とする。

（平30条例38・旧第5条繰上・一部改正）

（使用料等の徴収方法）

第5条 使用料及び手数料は，知事の発行する納入通知書により徴収する。ただし，これにより難い場合においては，口頭又は掲示の方法により現金で徴収する。

（令3条例33・全改）

（使用料等の減免）

第6条 知事は，特別の理由があると認めるときは，使用料又は手数料を減免することができる。

（平30条例38・旧第7条繰上）

（使用料等の還付）

第7条 既に徴収した使用料又は手数料は，還付しない。ただし，知事は，災害その他特別の理由により利用者が薬事総合研究開発センターの施設を利用できなかったとき，又は依頼された試験等ができなかったときは，使用料又は手数料の全部又は一部を還付することができる。

（平30条例38・旧第8条繰上・一部改正）

（承認の取消し等）

第8条 知事は，次の各号のいずれかに該当する場合は，第3条第1項の承認を取り消し，又はその利用を制限することができる。

(1) 利用者がこの条例又はこの条例に基づく規則の規定に違反したとき。

(2) 利用者が第3条第2項の規定による承認の条件に違反したとき。

(3) 利用者が正当な手続によらないで利用の目的，内容等を変更したとき。

(4) その他知事が薬事総合研究開発センターの管理上特に必要があると認めるとき。

(平30条例38・旧第9条繰上・一部改正)

(規則への委任)

第9条 この条例の施行に関し必要な事項は、規則で定める。

(平30条例38・旧第10条繰上)

別表 (第4条関係)

1 使用料

種別	単位	金額	備考
製剤機械	1台につき1時間	200円以上 4,500円以下	1 利用時間が単位に満たない場合又は単位未満の端数がある場合は、当該単位まで切り上げる。 2 製剤機械、生薬調製機械及び試験機器の利用に係る消耗品費及び原材料費は、実費を徴収する。
生薬調製機械	1台につき1時間	300円以上 600円以下	
試験機器（試験等の性質上1日単位で使用する機器を除く。）	1台につき1時間	100円以上 17,200円以下	
試験機器（試験等の性質上1日単位で使用する機器に限る。）	1台につき1日	3,100円以下	
開放試験室	1時間	200円以下	
動物実験室	1ケージにつき1日	500円以下	

2 手数料

種別	単位	金額	備考
日本薬局方医薬品又は日本薬局方外医薬品の適否試験	1検体	6,900円以上 19,600円以下	
日本薬局方の一般試験法又はこれに準ずる試験（細胞を用いる試験を除く。）	1検体につき1項目	2,700円以上 5,200円以下	
定性又は定量試験（細胞を用いる試験を除く。）	1検体につき1成分	2,700円以上 5,200円以下	
製剤中の共存成分の影響試験	1検体につき1項目	8,200円以下	
細胞を用いる試験	1検体又は10試料	65,500円以上 67,200円以下	試料の数量が単位に満たない場合又は単位未満の端数がある場合は、当該単位まで切り上げる。
その他の試験（細胞を用いる試験を除く。）	1検体又は1検体につき1検査	900円以上 11,100円以下	
機器操作技術指導	1時間	4,200円以下	
製品の規格及び試験方法の作成	1件	8,700円以下	
試験成績書の謄本の交付	1通	900円以下	
文献複写	1枚	100円以下	

(2) 富山県薬事総合研究開発センター条例施行規則（昭和60年 富山県規則第47号、最近改正 令和7年規則第28号）

（趣旨）

第1条 この規則は、富山県薬事総合研究開発センター条例（昭和60年富山県条例第39号、以下「条例」という。）の施行に関し必要な事項を定めるものとする。

（平30規則13・一部改正）

（利用の承認申請等）

第2条 条例第3条第1項の規定により、富山県薬事総合研究開発センター（以下「薬事総合研究開発センター」という。）の施設の利用の承認を受けようとする者は施設利用申請書（様式第1号）を、薬事総合研究開発センターに試験、分析、検査、鑑定その他これらに類する行為（以下「試験等」という。）を依頼しようとする者は試験等依頼書（様式第2号）を知事に提出しなければならない。

（平30規則13・一部改正）

（利用の承認等に付する条件）

第3条 条例第3条第2項の規定により利用の承認に付する条件は、次の各号に掲げる事項とする。

- (1) 利用の目的以外に利用しないこと。
- (2) 施設の現状を変更しないこと。
- (3) 利用する権利を他人に譲渡しないこと。
- (4) その他薬事総合研究開発センター所長（以下「所長」という。）が指示した事項を守ること。

2 条例第3条第2項の規定により依頼の承認に付する条件は、次の各号に掲げる事項とする。

- (1) 検体は、その成分の組成に変化が生じないようにすること。
- (2) 検体は、試験等を行つた後においても返還しないこと。ただし、所長が特別の理由があると認めるときは、この限りでない。

（平30規則13・一部改正）

（使用料等の額）

第4条 条例第4条第1項の規定による使用料及び手数料の額は、別表のとおりとする。ただし、同表に定める金額のうち範囲を定めたものについては、試験等の所要経費を基準として別に知事が定める。

（平30規則13・一部改正）

（試験等の結果の通知）

第5条 所長は、試験等を完了したときは、その結果を成績通知書により依頼者に通知するものとする。

（平30規則13・一部改正、令3規則20・旧第6条繰上）

（休所日及び利用時間）

第6条 薬事総合研究開発センターの休所日は、次に定めるとおりとする。ただし、知事は、特に必要があると認めるときは、これを変更し、又は臨時に休所日を定めることができる。

- (1) 日曜日及び土曜日
- (2) 国民の祝日に関する法律（昭和23年法律第178号）に規定する休日
- (3) 1月2日及び3日
- (4) 12月29日から同月31日までの日

2 薬事総合研究開発センターの利用時間は、午前9時から午後4時までとする。ただし、知事は、特に必要があると認めるときは、これを変更することができる。

（平元規則31・平4規則58・平30規則13・一部改正、令3規則20・旧7条繰上）

別表（第4条関係）

1 使用料

(1) 製剤機械

種別	単位	金額
超微粉碎機	1台につき1時間	230円
卓上型粉碎機		4,120円
振動ふるい機		360円
混合機（V型大型）		230円

容器着脱式回転混合機	1 台につき 1 時間	660円
押出造粒機（バスケット型）		370円
押出造粒機（スクリュウ型）		870円
かくはん 攪拌造粒機		970円
整粒機		520円
球型造粒機		360円
錠剤機（単発式）		230円
錠剤機（ロータリー式）		3,170円
流動層造粒コーティング装置		820円
複合型流動層造粒コーティング装置		4,420円
錠剤フィルムコーティング装置		2,700円
練合機		230円
乾式造粒機		1,860円
半自動PTP包装機		3,110円
造粒乾燥連続装置		4,330円
貼付剤試作機		2,670円
圧縮特性評価装置		2,000円
卓上走査型電子顕微鏡		1,400円
真空乳化分散装置		1,080円
比表面積測定装置		600円

(2) 生薬調製機械

種別	単位	金額
生薬原料洗浄機	1 台につき 1 時間	570円
減圧乾燥機		480円
平型乾燥機		380円
切断機		600円

(3) 試験機器

種別	単位	金額
屈折計	1 台につき 1 時間	230円
ECD及びFID付きガスクロマトグラフ並びにガスクロマトグラフ質量分析計		1,060円
ヘッドスペースサンプラ，オートサンプラ及びFID付きガスクロマトグラフ		500円
カールフィッシャー水分計（容量滴定法）		880円
カールフィッシャー水分計（電量滴定法）		670円
電位差滴定装置		970円
電気炉		360円
液体クロマトグラフ		1,130円
原子吸光光度計		1,050円
ICP質量分析計		4,990円

真空凍結乾燥機		2,130円
分光光度計		470円
赤外分光光度計		470円
顕微赤外分光光度計		2,210円
旋光計		1,260円
フォトダイオードアレイ検出器付き超高速液体クロマトグラフ		640円
蛍光検出器, 紫外可視吸光光度検出器, 示差屈折率検出器, 質量分析計, 蒸発光散乱検出器及びフォトダイオードアレイ検出器付き超高速液体クロマトグラフ		3,410円
液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析計		17,180円
ナノ液体クロマトグラフイオントラップ型質量分析計		15,300円
液体クロマトグラフタンデム四重極型質量分析計		6,590円
溶出試験器		1,060円
キャピラリー電気泳動装置		1,670円
融点測定装置		830円
口腔内崩壊錠試験器		600円
多機能型粉体物性測定器		1,250円
錠剤硬度計		210円
インビボイメージング装置	1 台につき 1 時間	3,080円
味認識装置		2,380円
共焦点レーザー顕微鏡		2,180円
フローサイトメーター		1,750円
セルソーター		6,230円
レーザー回折式粒子径分布測定装置		1,050円
ボックス型蛍光顕微鏡		800円
凍結切片作製装置		1,890円
リアルタイムPCR装置		1,070円
分子間相互作用解析装置		5,100円
ケミルミイメージングシステム		900円
大型オートクレーブ		550円
オートクレーブ		150円
安全キャビネット		260円
微量高速冷却遠心機		220円
超遠心機		3,690円
マイクロ天秤		220円
セミマイクロ天秤		150円
倒立型ルーチン顕微鏡		150円
セミドライプロットティング装置		130円
シーソーシェーカー		120円

恒温恒湿器	1台につき1日	120円
パーティクルカウンター		2,410円
校正用光学フィルター		780円
日本薬局方標準温度計		690円
CO ₂ インキュベーター		3,060円

(4) 開放試験室

種別	単位	金額
開放試験室	1時間	200円

(5) 動物実験室

種別	単位	金額
マウス飼育ケージ	1ケージにつき1日	430円

2 手数料

(1) 日本薬局方医薬品又は日本薬局方外医薬品の適否試験

種別	単位	金額
定量試験を含む日本薬局方又は日本薬局方外医薬品の適否試験	1検体	19,590円
定量試験を含まない日本薬局方又は日本薬局方外医薬品の適否試験		12,960円
定量試験を含まない生薬の日本薬局方又は日本薬局方外医薬品の適否試験		6,930円

(2) 日本薬局方の一般試験法又はこれに準ずる試験（細胞を用いる試験を除く.）

種別	単位	金額
特殊機械器具を使用する日本薬局方の一般試験法又はこれに準ずる試験	1検体につき1項目	5,110円
その他の日本薬局方の一般試験法又はこれに準ずる試験		2,700円

備 考

特殊機械器具とは、液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ、分光光度計、赤外分光光度計、顕微赤外分光光度計、分光蛍光光度計、原子吸光光度計、ICP質量分析計、色差計、電位差滴定装置、カールフイッシャー水分計、溶出試験器、旋光計、キャピラリー電気泳動装置及び融点測定装置をいう。

(3) 定性又は定量試験（細胞を用いる試験を除く.）

種別	単位	金額
特殊機械器具を使用する定性又は定量試験	1検体につき1成分	5,110円
その他の定性又は定量試験		2,700円

備 考

- 特殊機械器具とは、液体クロマトグラフ、ガスクロマトグラフ、分光光度計、赤外分光光度計、顕微赤外分光光度計、分光蛍光光度計、原子吸光光度計、ICP質量分析計、色差計、電位差滴定装置、カールフイッシャー水分計、溶出試験器、旋光計、キャピラリー電気泳動装置及び融点測定装置をいう。
- 液体クロマトグラフ又はガスクロマトグラフを使用する1試験で、多成分を同時に確認又は定量できる場合は、1成分とする。

(4) 製剤中の共存成分の影響試験

種別	単位	金額
製剤中の共存成分の影響試験	1 検体につき 1 項目	8,140円

備 考

液体クロマトグラフ又はガスクロマトグラフを使用する 1 試験で、多成分を同時に確認又は定量できる場合は、1 成分とする。

(5) 細胞を用いる試験

種別	単位	金額
細胞毒性試験	1 検体	65,570円
細胞機能解析試験	10試料	67,170円

(6) その他の試験（細胞を用いる試験を除く。）

種別	単位	金額
生薬の鑑定	1 検体	8,690円
容器又は包装材料の試験		8,550円
その他の試験	1検体につき 1 検査	980円以上 11,090円以下

(7) 機器操作技術指導

種別	単位	金額
機器操作技術指導	1 時間	4,140円

(8) 製品の規格及び試験方法の作成

種別	単位	金額
製品の規格及び試験方法の作成	1 件	8,690円

(9) 試験成績書の謄本の交付

種別	単位	金額
試験成績書の謄本の交付	1 通	850円

(10) 文献複写

種別	単位	金額
文献複写	1 枚	30円

様式第 1 号(第 2 条関係)

施 設 利 用 申 請 書

年 月 日

富山県知事 殿

住 所
申請者
氏 名
(法人にあつては、その名称及び代表者の氏名)
電話番号

富山県薬事総合研究開発センター条例第 3 条第 1 項の規定により、薬事総合研究開発センターの施設を利用したいので、次のとおり申請します。

施 設 の 名 称 (製剤機械、生薬調製機械若しくは試験機器の名称、開放試験室又は動物実験室)			
利 用 の 期 間 及 び 時 間	年 月 日 時 分から 年 月 日 時 分まで	日	時間
利 用 の 目 的			
県 内 の 事 務 所 又 は 事 業 所	所 在 地		
	名 称		
	電話番号		
その他必要な事項			

備考 「県内の事務所又は事業所」欄は、県外の申請者が県内に事務所又は事業所を有する場合に記入すること。

様式第2号(第2条関係)

試験等依頼書

年 月 日

富山県知事 殿

住 所
申請者
氏 名
(法人にあつては、その名称及び代表者の氏名)
電話番号

富山県薬事総合研究開発センター条例第3条第1項の規定により、試験等を次のとおり依頼します。

検 体 の 名 称 (文献複写にあつては、文献名)		
検 体 数 (文献複写にあつては、記入を要しない。)		
依 頼 の 内 容 (文献複写にあつては、複写の箇所及び枚数)		
依 頼 の 理 由		
県内の事務所又は事業所	所在地	
	名 称	
	電話番号	
その他必要な事項		

備考 「県内の事務所又は事業所」欄は、県外の申請者が県内に事務所又は事業所を有する場合に記入すること。

2. 富山県薬事総合研究開発センター年報投稿及び執筆規程（令和7年4月施行）

（構成）

第1条 年報の構成は、次のとおりとする。

組織・運営編

I 総括

A. 薬事総合研究開発センター

1. 沿革
2. 位置・交通
3. 土地
4. 建物
5. 組織・業務（薬用植物指導センターを含む）
6. 職員（薬用植物指導センターを含む）
7. 予算（薬用植物指導センターを含む）
8. 備品

B. 薬用植物指導センター

1. 沿革
2. 位置・交通
3. 土地
4. 建物
5. 主要備品

II 薬事総合研究開発センターこの一年

1. 各センターの取り組み
2. 視察・取材等

III 研究活動

1. 競争的外部資金等を活用した研究課題
2. 「くすりのシリコンバレー TOYAMA」創造コンソーシアム研究開発事業
3. 上記以外の研究課題

研究業績編

IV 研究報告

V 資料

VI 講演・学会発表など

1. 講演・学会・誌上発表
2. 共同研究論文リスト
3. 知的所有権

指導業務編

VII 指導

A. 創薬研究開発センター・製剤開発支援センター

1. 講演会
2. 分析技術講習会
3. 開放試験室・試験機器の利用
4. 製剤機器の利用
5. 相談者に対する指導
6. 講習会等

B. 薬用植物指導センター

1. 栽培技術指導
2. 種苗の供給状況
3. 薬草教室
4. 講習会等
5. 生薬標本、鉢植等の貸出
6. 見学者数
7. 相談

VIII 試験

1. 一般依頼試験
2. 行政依頼試験
3. 後発医薬品品質情報提供等推進事業
4. 登録試験検査機関における外部精度管理試験

IX 審査

X その他

1. 客員研究員招へい事業
2. 外部評価委員会の開催

参考資料編

1. 条例・規則

(研究報告)

第2条 研究報告の記載については、次のとおりとする。

1. 構成

研究報告の構成は原則として、課題、要約及びキーワード、緒言、方法（実験方法又は調査方法）、結果、考察並びに結論、謝辞、文献より構成し、各項目の通し番号を付けずに記述する。考察及び結論は、考察と結論に分けて記載してもよいし、考察のみを記載して結論を省略してもよい。謝辞のみだしは中みだしとし、緒言のみだしは記載しない。ただし、抄録は標題及び本文より構成し、本文は図表を含めてA4用紙1枚以内とする。

2. 標題

- (1) 2行以上の標題は原則として逆三角形とする。
- (2) サブタイトルは行をかえ、前後にハイフンをつける。
- (3) サブタイトルが二つ以上ある場合は、Ⅰ，Ⅱ，・・・とする。
- (4) シリーズの標題は標題の後に（第1報），（第2報）とする。
- (5) 著者名は標題の中央下に記す。
- (6) 著者が所外者の場合、著者の所属は著者の右肩に＊印をつけ、脚注に記す。ただし、脚注が2つ以上になる場合には、最初に出現したものから順次一連の通し番号を付けて＊1，＊2，・・・の順に列記する。
- (7) 論文には必ず英文標題（名詞、代名詞、形容詞等の頭文字は大文字）及びローマ字の著者名（フルネーム、姓は全部大文字、名は頭文字のみ大文字）を著者名の中央下に記す。
- (8) 原稿の最初に標題、著者名及び脚注（所外者の著者の所属）を、次に要約とキーワードを記載してから、本文を書き始める。

3. 要約及びキーワード

- (1) 要約は日本語及び英語で併記し、日本語は字数200～400とする。
- (2) キーワードは日本語及び英語で併記する。選定数はそれぞれ3個以上5個以内とする。

4. 文体・文字

- (1) 現代かなづかい、新送りがな、常用漢字を使用して、できるだけわかりやすい表現の口語体を用い、横書きとする。
- (2) 専門用語はなるべく文部省編「学術用語集」に準拠し、原語の使用はできるだけさける。
例：paper chromatography, glucoseなどは、ペーパークロマトグラフィー、ブドウ糖と書く。
- (3) 酵素名その他は国際化学連合酵素委員会報告「酵素名、酵素反応記号一覧」(田宮信雄訳、共立出版)による。
- (4) 動物名及び植物名はカタカナ、学名はイタリック体を用いる。
- (5) 本文中では物質名を化学式であらわさない。ただし、反応式で表す部分は化学式を用いてもよい。
例：CH₃COOH、NaOHは酢酸、水酸化ナトリウム (NaOH、EtOHは不可)
- (6) 物質名は原則として略号は用いないが、記載頻度の多い場合、または一般に使用されている場合は使用してよい。
- (7) 人名、地名は原語を用いる。

5. 区画及び行のとりかた

- (1) 本文の句読点は「,」と「.」を用いる。「(」、「。」は用いない)。「()」、「」などは全角文字とし、「,」「.」「()」「()」は行頭に記載しない。
- (2) 改行毎に1コマあける。
- (3) 英文字・数字は、2文字で1コマ、1字のみのときは、1文字1コマとする。
- (4) 大みだし(実験方法、結果等)は上下1行ずつあけ、行の中央に書く。中みだしは上1行のみをあけ、1コマあけて書き始める。小みだしは行をあけずに行をかえるだけで1コマあけて本文を書き始める。大、中、小のみだし文字はすべて太文字ゴシック体とする。
- (5) 式は必ず改行して書く。

6. 数字・数式・単位・記号

- (1) 数字は原則としてアラビア文字を用いる。
例：図1、表2、3 g
- (2) 文章中に数式を挿入するときは、 a/b 、 $(a+b)/(c+d)$ とし、文章中でないものは、以下のように表す。
$$\frac{a}{b} \qquad \frac{(a+b)}{(c+d)}$$
- (3) 単位は原則としてCGS単位を用い、温度は摂氏(または絶対温度)を用いる。必要に応じてMKSA単位を用いてもよい。
- (4) 記号は国際的に慣用されているものを用いる。
例：M, pH, %, m, cm, mm, g, mg, μ g, Rf, $^{\circ}$ Cを用いる。

7. 文献

- (1) 参考文献は、引用箇所の右肩に通し番号を右側片カッコをつけて小さく書き、本文の末尾に引用番号順に列記する。

- (2) 欧文雑誌の記号は、Chemical Abstractによる。
- (3) 文献の句読点は「,」と「.」を用いる。
- (4) 原則として著者名は省略しない。
- (5) 投稿中、未発表、私信による等の用語を用いる。
- (6) 雑誌からの引用形式は原則として著者名、標題、雑誌名、巻数、開始ページ～最終ページ、(発行年)の順に記載する。ただし、通巻ページのない場合のみ巻数の後に(号数)を挿入する。

(例)

ア. Consden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. P. : Determination of cholesterol in blood, *Biochem. J.*, 38, 224～330 (1944)

イ. 大谷 璋, 石橋富和: 車線変更の予告効果に関する研究, 大阪府立公衛研所報, 労働衛生編, 第3号, 21～30 (1974)

ウ. 小林義隆, 白井 正: PCBの対謝に関する研究, 食品化学, 19, 215～221 (1970)

- (7) 図書からの引用形式は原則として著者名、図書名、版数または巻数、ページ数、発行所、発行地、発行年の順に記載する。図書中の特定部分を引用したときは、その引用した箇所のページ数を記入しない。

(例)

ア. 赤堀四郎: アミノ酸及び蛋白質, p. 158, 共立出版, 東京 (1964)

イ. Kiver, M. S. : Color Television Foundmentals, McGrawHill Book Co., New York (1964)

- (8) 双書、シリーズもの等からの引用形式は原則として著者名、一部分の標題、図書名(編集名)、版数または巻数、開始ページ～最終ページ、発行所、発行地(発行年)の順に記載する。

(例)

ア. 佐藤佳一, 森高次郎: 生体成分 I, 生化学講座(赤堀四郎ほか編), 2, p. 1～10, 共立出版, 東京 (1958)

イ. Brown, G. B. and Roll, P. M. : The Nucleic Acid (ed. By Chargoff, E. and Davidson, J. N.), 2, p. 341～351, Academic Press Inc., New York (1955)

- (9) 講演からの引用形式

(例)

ア. Bonner, D. M. : 第6回核酸シンポジウム(大阪, 1956)

8. 謝辞

論文の末尾、文献の前に書く。

9. 脚注

- (1) 本文中の脚注は、挿入箇所の右肩に注1), 注2), …とし、脚注の内容は用紙の下部に記述する。ページが変わっても通し番号とする。脚注と本文との境界に横線を引く。
- (2) 図表の注は図表のすぐ下に記入し、記号はa), b), …を用いる。

10. 図・表・写真

- (1) 図・表・写真はそれぞれ一連番号をつけ、本文中の引用は番号による。
- (2) 図表は図1、Fig. 1、表1、Table 1、Photo. 1とする。
- (3) 写真は白黒とする。
- (4) 図、表、写真は、本文に組み込んだ形で提出する。

11. 用紙

本文の記載用紙は、A 4 サイズ 1 枚につき、1 行45字程度×47行程度とする。

12. 審査

- (1) 広報委員会は査読員に査読を依頼する。
- (2) 広報委員会は査読員の意見を著者に伝え、必要に応じ修正を求める。

13. 校正

原則として著者が校正を行い、広報委員が確認する。校正段階で内容の増加、行数の増加は認めない。

編集後記

「令和6年度 富山県薬事総合研究開発センター年報（第52号）」をお届けいたします。

巻頭言にもありますとおり、本誌（第52号）から「Ⅳ研究報告」において査読を採用いたしました。査読の際には必ず外部の査読者を加え、1課題につき2名の査読者による厳密な審査を行っております。

今年度も薬事総合研究開発センターで開催しております様々な実習や講義に多数の参加をいただき、また多くの皆様に各種機器をご利用いただきました。さらに、当センターでは毎年11月頃に研究の成果を製薬企業等の皆様や県民の方々に広くご紹介するため研究成果発表会を開催しています。皆様にはこの機会に会場となります当センターに足をお運びいただきご参加下さいますようお願い申し上げます。

なお、薬事総合研究開発センターでの様々な行事や取り組みについては、県のホームページで紹介していますのでぜひご覧ください。

今後ともより一層皆様のお役に立てるよう当センターの職員一同取り組んでまいります。引き続きご指導、ご協力くださいますようお願い申し上げます。

終わりに、年報の制作に関わってくださいました皆様にこの場をお借りして心から感謝申し上げます。また、年報の編集にあたり多岐にわたりご尽力いただきました広報委員の皆様、本当にありがとうございました。

富山県薬事総合研究開発センター広報委員長

浅井 直子

委員長	浅井 直子
副委員長	小笠原 勝
委員	渡会 三千代
	大西 裕子
	小島 理恵子
	永井 秀昌
	柚木 芳
	田村 隆幸

富山県薬事総合研究開発センター年報

令和 6 年度

2025年 9 月 4 日

発 行 者 富山県薬事総合研究開発センター

所長 合 田 幸 広

〒939-0363 富山県射水市中太閤山17-1

TEL (0766) 56-6026

FAX (0766) 56-7285

<https://www.pref.toyama.jp/1285/kurashi/kenkou/iryuu/1285/index.html>

印 刷 株式会社タニグチ印刷

〒933-0238 富山県射水市東明中町7-1

TEL (0766) 86-1376(代)

FAX (0766) 86-1578

