病理学的手法を用いた安全性評価と安全性研究

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長
松下　幸平

【はじめに】

「病理学」とは病（やまい）の理（ことわり）を読み解く学問ですので、本来その研究方法としては何でもアリな幅広い学問です。一方、これまで病理の診断あるいは研究の手法として、主に顕微鏡による生体組織の観察が用いられてきたため、現実的には「病理＝顕微鏡を見る」という意味合いで用語が使われることも多いかと思います。

病理学の中でも、化学物質によって引き起こされる病を扱う分野が毒性病理学です。毒性病理学には 2 つの側面があります。ひとつは毒性試験における病理組織検査などの検査的な側面、もうひとつは病理組織学的なアプローチによる病態メカニズム研究などの実験病理的な側面であり、それぞれ安全性評価と安全性研究を担っています。

今回の発表では、私がこれまで携わった試験や研究を事例として交えつつ、病理学的手法を用いた安全性評価と安全性研究についてご紹介したいと思います。

【病理による安全性評価：毒性試験における病理検査】

一般毒性試験における病理検査では、被験物質を投与したラットなどの全身臓器の標本を作製し、一つ一つの細胞の形や色を目で見るという（とても地味な）作業を行います。そして何かおかしなものを見つけた場合は病理所見（細胞が壊死している、小さくなっているなど）として挙げていきます。

ここで重要なポイントの一つは、見られた所見が毒性影響かどうかを判断することです。例えば見られた所見が生体の恒常性を保つための変化、つまり適応性の反応であった場合は毒性影響ではないと判断します。この事例として 2 つの食品添加物の毒性試験をご紹介します。

香料であるバニリンプロピレングリコールアセタール（バニリン PGA）と 2-エチルブタナール（2-EB）のラットを用いた 90 日間毒性試験において、ともに肝臓の肝細胞が大きくなる「肝細胞肥大」が認められました（図 1）。

この「肝細胞肥大」は多くの場合、被験物質を代謝・排泄するための反応、いわゆる酵素誘導です。その場合は適応反応と考えられ、毒性所見とは判断されません。バニリン PGA でみられた「肝細胞肥大」は毒性所見ではないと判断されました（Matsushita K. et al., Food Chem. Toxicol., 2019）。

一方、2-EB の「肝細胞肥大」は様子が少し異なっており、肝細胞が赤くなっていました。電顕で調べたところ、この赤みの原因はミトコンドリアの増加であることが分かりました。これは酵素誘導とは異なる反応であり、最終的に血液検査の結果も併せて、この「肝細胞肥大」は毒性所見であると判断されました（Matsushita K. et al., Regul. Toxicol. Pharmacol., 2018）。

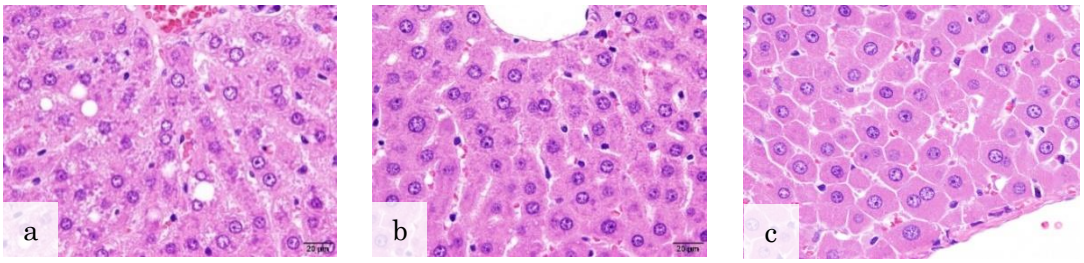


図 1. a: 対照群のラット肝臓、b: バニリン PGA 投与ラット肝臓、c: 2-EB 投与ラット肝臓

このように、毒性試験における病理検査は結果を出すのみでなく、得られた結果の考察においても重要な情報を提供することができます。

【病理による安全性研究：腎毒性の可逆性に関する研究】

毒性試験で得られた所見を考察する際には他にもいくつか重要なポイントがあり、生じた毒性が治るかどうか、つまり可逆性を見極めることもそのひとつです。

腎臓は化学物質による毒性の影響を受けやすい臓器であり、中でも尿細管上皮細胞はよく毒性標的になります。近年、尿細管障害による急性腎障害（AKI）から慢性腎臓病（CKD）へ移行する AKI to CKD という現象が疫学的に明らかとなり、臨床現場では尿細管障害は必ずしも治る病態ではないと認識が改められるようになりました。

一方、毒性病理学分野では未だに尿細管障害による腎毒性は多くのケースで可逆性であると判断されます。その根拠として、尿細管には障害後に再生する能力があるということが挙げられます。しかしながら、近年の研究により尿細管の再生に異常が生じた場合、不可逆的な線維化が生じて CKD に移行することが分かりました（図 2）。

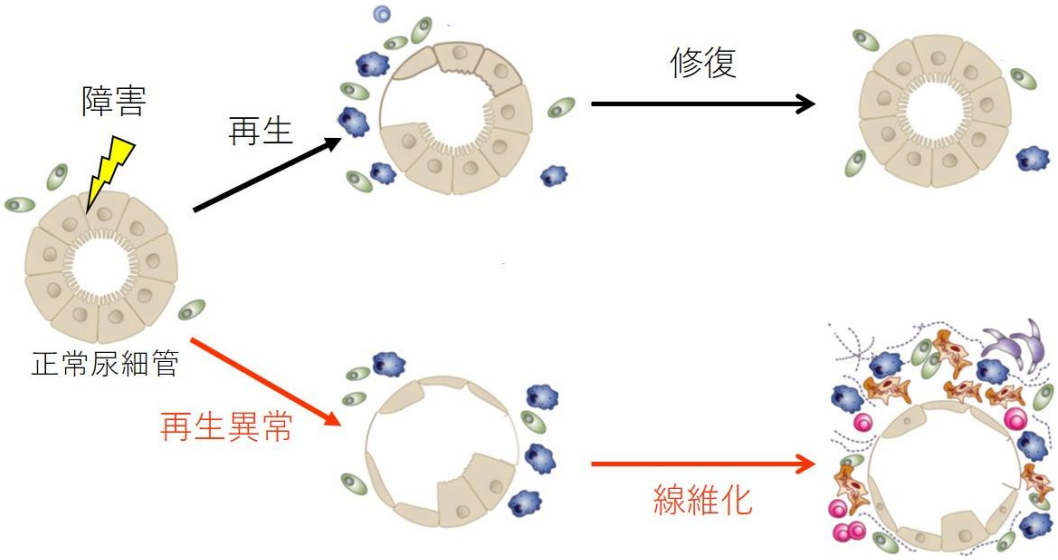


図 2. 尿細管の障害後の転帰（Kidney Int., 2018; 93: 27-40. 一部改変）

私たちはこの尿細管の再生異常は AKI to CKD の早期のイベントであることに着目し、再生異常の生じた尿細管に発現する因子は腎毒性の可逆性マーカーになるのではないかと仮説を立て、腎毒性の可逆性評価手法の開発に着手しました。

研究を進めるにあたり、まずは病理学的なアプローチとして再生異常の生じた尿細管は形態的に判別できるかどうかを確認したいと思いました。そこでラット CKD モデルを作製し、線維化病変を顕微鏡で観察したところ、再生異常の生じた尿細管は形態的に拡張あるいは萎縮していることが分かりました。

レーザーマイクロダイセクション（LMD）とは組織標本から特定の細胞をレーザーで切り取って採取する装置です。この LMD を使って拡張/萎縮尿細管を採取してマイクロアレイを行い、高発現している遺伝子のうち CD44 という因子に着目しました（図 3）。

図 3. a: LMD による拡張/萎縮尿細管の採取。b: Volcano plot（マイクロアレイ）。

次に免疫染色にてラット AKI to CKD モデルにおける CD44 の発現動態を調べたところ、CD44 は拡張あるいは萎縮尿細管において AKI の直後から CKD へ至るまで持続的に発現していることが分かりました（図 4）。また血清中 CD44 値も尿細管での発現を反映して上昇していました。

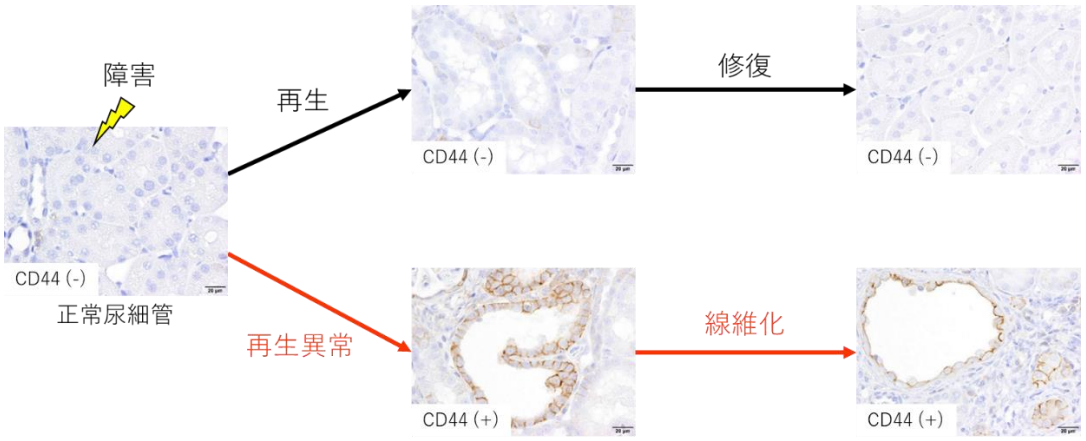


図 4. 再生異常の生じた尿細管における CD44 発現（Matsushita K. et al., J. Appl. Toxicol., 2024; Matsushita K. et al., J. Toxicol. Pathol., 2024; Matsushita K. et al., J. Appl. Toxicol., 2021）。

現在、引き続き CD44 の腎毒性の可逆性マーカーとしての有用性を検証しており、さらにマーカーとしての妥当性を支持するためのデータを得る目的で、AKI to CKD における CD44 の病態生理学的な機能についても検討を進めています。これらの研究成果を腎毒性の可逆性評価法の開発に繋げ、化学物質の安全性評価の高度化に貢献したいと考えています。

【終わりに】

病理の検査と研究をバランスよく行い、安全性評価と安全性研究に貢献することが国立衛研の病理研究者の使命と考えています。また病理の研究手法は生体組織のみでなく培養細胞にも応用できるため、汎用性が高く様々な分野と共同研究ができる可能性があります。顕微鏡を黙々と見ているイメージの病理の人は外部からは近寄りがたい印象を持たれてしまう事も重々承知してはおりますが、もし病理にご興味のある方は気軽にご連絡をいただければと思います。

MEMO

生殖サイクルに着目した化学物質の毒性評価法の開発と今後の RS 研究を考える

安全性生物試験研究センター毒性部　第二室 室長
横田　理

【はじめに（学生時代～入所まで）】

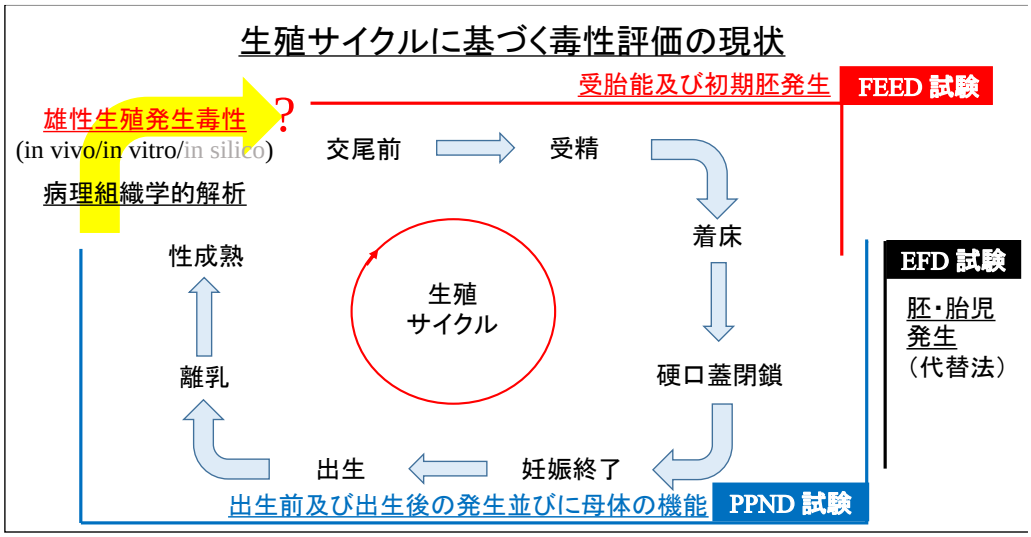
学生時代（薬学部）に、生物物理化学・薬剤学・薬理学等、様々な学問分野に触れた私は、これらの知識を包括的に活用できる衛生化学（毒性学）研究室への配属を決めた。当時の研究室では、「大気中に存在する新しいタイプの内分泌撹乱物質」として大気由来浮遊粒子状（ナノ）物質の吸入曝露に焦点を当て、胎盤や子どもの内分泌器官への影響について解明しようと研究が進められていた。私は、生体の内分泌機能を制御する上位中枢である脳神経系に興味を持っており、教授の指導の下、発達神経毒性研究を開始した。当時、胎児期環境と脳神経発達との関連が様々な分野で注目を浴びており、自分の研究内容は日本学術振興会・特別研究員として国からの支援を受けることができ、結果として、学位取得にも繋がった。

その後ポスドクでは、神経発生生物学的手法を用いた網膜神経回路の基礎研究を、助教時代には、内分泌として重要な雄性生殖機能（精子形成・成熟）の基礎研究にも従事してきた。さらには、環境要因による生殖細胞のエピゲノム変化が次世代へと継承され得ることも知り、これらの研究経験は現職の RS 研究の礎となっている。このように、私は入所する前より、下図に示すような生殖サイクルに着目した毒性研究の一部を実施してきた。

今から数年前、国立衛研毒性部からナノ物質を含む新規物質の安全性評価を行うための研究職公募が出され、上述の吸入曝露実験の経験が契機となり、主任研究官として採用されることとなった。毒性部ではすでに、①トキシコゲノミクスによる安全性評価技術の開発、②ナノ物質及び③気体・液体の吸入曝露による安全性評価に関する研究と、3 つの研究の柱が走っていた。私もその中で②③の研究に従事させて頂き、今日まで吸入毒性実験の重要性について再認識させられた。

他方で、毒性部の先人達が築き上げた歴史ある研究と併行して、私は一研究者としてオリジナリティのある新たな RS 研究を企画・提案できないものか、さらには自身の開発研究を通じて毒性部の試験業務にも貢献できないものかと、入所 1 年目によく考えて（悩んで）いたものである。部長に相談の上、私はこれまでに成果を積み上げてきた生殖サイクルに関する毒性評価を RS に貢献できるような形に発展させたいとの考えに至り、この 5 年間研究を主体的に進めさせて頂いた部長はじめ多くの方々に深く感謝申し上げる。

本例会では、これら研究内容の一部について概説する。



【研究開始”当初”の背景】

図に示す通り、医薬品の生殖発生毒性評価に係るガイドライン ICH S5 (R3) には、生殖サイクルのステージに合わせて、1. 受胎能及び着床までの初期胚発生試験（FEED 試験）、2. 胚・胎児発生に関する試験（EFD 試験）、3. 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（PPND 試験）の 3 種類が生殖発生毒性試験に組み込まれている。これら試験法は、主に妊娠前～妊婦（化学物質曝露の対象は”雌”）の化学物質曝露による次世代影響について動物（in vivo）試験により評価しようとするものが中心となっている。

一方で、化学物質曝露の影響を受けた”雄”動物を介して次世代に対する影響を評価するものとして雄受胎能試験が実施されるが、当該手法はハザードの感度が低いため、評価に多くの実験動物数を要することから、私は動物の Reduction・Replacement・Refinement に資する新たな評価系（NAMs : New Approach Methodologies）の開発が必要と考えるに至った。

【目的】

本研究では、小動物用磁気共鳴画像法（MRI）を用いた in vivo 非侵襲的イメージングと、先行研究で確立したヒト精子診断法（特願 2022-39134）を用いた新たな生殖毒性評価法の開発を行うことを目的とした。また、精巣器官培養法の毒性実験への適用を開始しており、動物実験代替としての本評価法の適用範囲を明確化することを目的に、産官学の共同研究として現在取り組んでいる。本発表では、これら NAMs 開発の一部について紹介する。

【方法】

実験には、小動物用 MRI (M7^{TM} compact MRI system, 1T, Aspect Imaging, Shoham, Israel) を用い、イソフルラン麻酔下にてマウス精巣を撮像した。MRI で従来用いられるスピンエコー法では、90°パルスを与えてからすぐに磁気モーメントの位相分散が生じるため、180°パルスを与え位相を再収束させてからエコー信号をとる必要がある。このため、各スライス間の Gap（撮像できない時間）が必要となり撮像枚数が極端に少なくなってしまうため、小動物を対象とした小さな臓器においては三次元再構築が困難となる。そこで、パルスを当ててから直接信号をとる断続的に撮像可能なグラジエントエコー（GRE）法（スライス厚は 0.5 mm）を採用し、精巣組織とその周辺領域を高いコントラストにて判別することにした。この工夫により、これまでに動物が生きた状態での撮像が困難とされたマウス精巣の観察に初めて成功した。

次に、本法を用い、抗がん剤によるマウス精巣毒性の非侵襲的評価を試みた。まず、C57BL/6J マウス（6 週齢）に対し、抗がん剤 Busulfan を 40mg/kg の用量で腹腔内に単回投与し、雄性不妊モデルを作製した。投与 4 週経過後に、小動物用 MRI を用い、イソフルラン麻酔下にてマウス精巣を撮像した。各スライスの精巣領域を囲み T1 強調画像を得た。また、これらを三次元再構築し、精巣体積を算出した。MRI の撮像後にマウスを解剖し、精巣や精巣上体の重量を測定した。臓器はブアン液に浸漬固定し、アルコール系列で脱水後パラフィン包埋し、作製した切片は PAS 染色により病理組織学的解析に供した。

さらに、精巣と精巣上体組織は、アガロース電気泳動により目的のバンド帯のみから精製した Reactive Blue 2 とアルカリ性条件下で 10 分間常温にて反応させ、マウス雄性生殖細胞系列への染色特異性を調査し、毒性評価への適用を行った。

【結果・考察】

小動物用 MRI を用いた in vivo 非侵襲的イメージングにより、Busulfan 群マウス精巣の萎縮 (Busulfan: 17.6±1.8 mm^3 .vs Control: 61.5±7.8 mm^3; $P<0.001$) と T1 強調画像の高信号 (Busulfan: 7799.6±441.5.vs Control: 6906.3±101.7; $P<0.01$) を認めた。実際に、解剖にて採取した精巣の重量は、Busulfan 群で有意な減少を認めた。さらに病理組織学的解析により、Busulfan 群の精巣間質では浮腫がみられ、PAS 染色により陽性に染色される浸出成分が検出された。このことより、MRI で観察された T1 強調像での高信号は、間質で認められた浸出

成分による高分子水和効果によるものと推察された。
　一方、野生型マウス精巣と精巣上体組織に対し、Reactive Blue 2 をアルカリ性条件下で反応させると、精子形成過程で核凝縮が劇的に変化する伸長精子細胞に対し染色特異性が認められた。この染色特異性は、native-page 等の生化学実験や組織学的解析により男性妊孕能に必須のプロタミンであることを明らかにした。対照的に、Busulfan 群精巣と精巣上体においては、Reactive Blue 2 による染色性は全く認められなかったことから、投与により精子細胞のプロタミネーションに影響が生じた可能性が示唆された。この結果は、MRI での Busulfan 群精巣体積の減少や精巣重量の低下の原因を支持する結果とも考えられた。以上の結果を踏まえ、本法は医薬品開発の中止を余儀なくされる雄性生殖毒性を迅速かつ高精度に検出するものと考えられ、既存の毒性評価を補強する基盤技術となることが見込まれる。

【将来展望】
・<u>試験業務（行政対応）</u>
　これまでに毒性部第三室の室員として食品添加物の安全性評価に携わってきた。この春からは心機一転、毒性部第二室長として、①毒劇調査、及び、②内分泌かく乱物質の海外動向調査とその in vivo 短期スクリーニング評価（子宮肥大試験、ハーシュバーガー試験）、等の行政対応業務に主担当として従事することとなり、生殖毒性等のさらなる高次試験（確定試験）を実施する際に利用可能な化学物質優先リストの作成に努めていく所存である。
　そのためには、室員の協力がとても重要と考えている。

・<u>研究業務</u>
　引き続き、生殖細胞系列に着目した化学物質の毒性評価法（NAMs）の開発研究を行う。その過程で新たな RS 研究への展開を探索し、厚生労働行政への貢献を果たしたい。（例 1 や例 2 等）

（例 1）抗悪性腫瘍薬の非臨床評価（ICH S9）及び、小児用医薬品開発の非臨床試験（S11）
　生命を脅かすような抗がん剤の開発においては、リスク&ベネフィットの点から生殖毒性が回避できないケースが多く存在している。また、抗がん剤使用後の生殖機能回復に要する期間を明らかにすることは、発生毒性回避の点から重要であり、避妊の要否を説明する基礎資料ともなりえる。近年、小児がんサバイバーの数は増加傾向を示し、わが国の少子化事情を考慮すると小児の妊孕性確保の問題は避けては通れない。特に、小児における妊孕性温存療法は未確立であるため、発生毒性リスク回避の点から抗がん剤投与後の避妊期間の設定は不可欠と考える。
　今年度より、生殖毒性の回復性に関する NAMs の開発研究を開始しており、科学的エビデンスの集積に尽力する。また、本計画は抗がん剤に限らず広く医薬品開発の迅速化にも貢献する。

（例 2）内分泌かく乱物質等、化学物質の生殖毒性評価
　上述の試験業務と併行して、研究業務として生殖毒性評価法を開発したい。

その他：
吸入毒性評価
小動物用 MRI 等を用いた非侵襲的毒性評価（毒物劇物関連等）

MEMO

「脂質膜」を起点としたレギュラトリーサイエンス研究の実践

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・室長
原矢　佑樹

国立衛研に所属して以降、約 9 年間、薬品部での試験・研究業務に従事してきましたが、今年度 4 月より生化学部第 4 室の室長として勤務しております。これまでに私は、細胞の主要場として種々の生物学的現象に関与し、細胞膜モデルやバイオセンシング、薬物送達システム（DDS）の要素など、幅広い分野で重要な役割を担う「脂質膜」を起点とした研究を行っております。

基盤的研究では、大学院生・大学教員時代から現在に至るまで、物質の有効性・安全性に深く関わる「細胞膜の摂動機構」を解明することを目的に、物質と生体成分の相互作用に関する研究に取り組んできました（図 1）。この研究において、分光学的手法、クロマトグラフィー法、質量分析法、多核核磁気共鳴法、等温滴定熱量測定法、示差走査熱量測定法、共焦点レーザー顕微鏡法など、多岐に渡る分析科学的手法を応用する生物物理化学の方法論を実践的に体得してきました[1-5]。生物物理化学は、生物学が扱う生体物質や生命現象について研究する学際的研究分野であり、国内外の異なる専門家との積極的な交流と協力を行いながら、脂質代謝に重要な高密度リポタンパク質の機能指標を定量する分析法の開発や、食品由来の脂肪酸による脂質代謝への影響分析など、生化学分野での研究も行ってきました[6-7]。今後もこのような学際的な研究方法によって、生化学部での新たな成果創出に尽力して参ります。

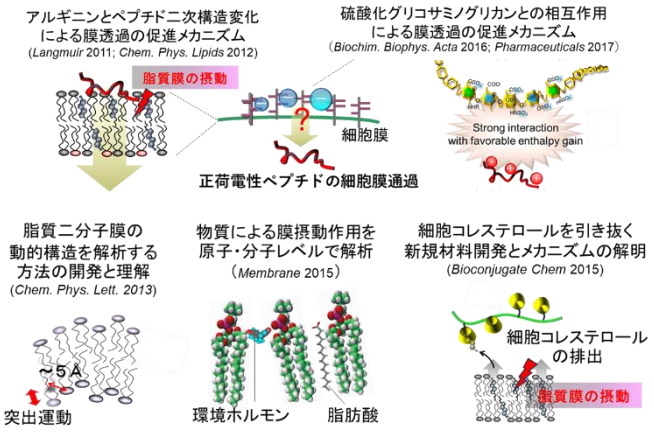


図 1.　物質と生体成分の相互作用に関する研究

現在、生化学部第 4 室の主要な任務である「食品や医薬品等（業務関連物質）と生体成分との相互作用等について、より精緻な分析科学的試験・研究を実施することで、規制に関連する分析評価法の開発・標準化や業務関連物質が与える生体機能への影響に関する科学的知見の提示により、厚生行政を支援する」ことに取り組んでいます。その一環として、令和 5 年度に国立衛研に導入された最先端分析機器であるクライオ電子顕微鏡を活用した分析法の開発、及び当該機器の管理と共同利用/研究の促進にも注力しています。また、クライオ電子顕微鏡法をはじめ、絶えず進化を続けている多種多様な分析科学的手法をこれまで以上に駆使・統合し、業務関連物質と生体成分との相互作用に関する精緻な分析科学的試験を実施するための研究基盤を確立することを目指しています。これにより、同室が主体的に取り組む研究課題への取り組みに加えて、各所掌部や所外からの協力依頼に応じた分析支援や共同研究を行い、国立衛研の基礎支援部としてレギュラトリーサイエンスの推進に貢献していくことを構想しています。

本発表の冒頭では、「細胞膜の摂動機構」に関連した基盤研究の概要とともに自身を簡単に紹介させていただきます。そして、薬品部時代に主として取り組んだ人工脂質膜小胞（リポソーム）や脂質ナノ粒子を応用した高機能性 DDS 製剤の品質評価のための原子間力顕微鏡法（AFM）の開発と、それを活用した製品の最適化や薬事規制を目的とした研究[8]（図 2）

について発表した後、薬品部と協力しながら現在も継続しているこれら研究へのクライオ電子顕微鏡法の活用例を紹介します（図 3）。また、クライオ電子顕微鏡法の現状を踏まえて、自身が中・長期的な視点で考えている同法を活用した研究展開についても話をさせていただきます。本発表を契機として、今年度 4 月より新たに活動を開始した生化学部第 4 室へのご助言・ご指導、共同研究に向けた議論の機会をいただけると幸いです。

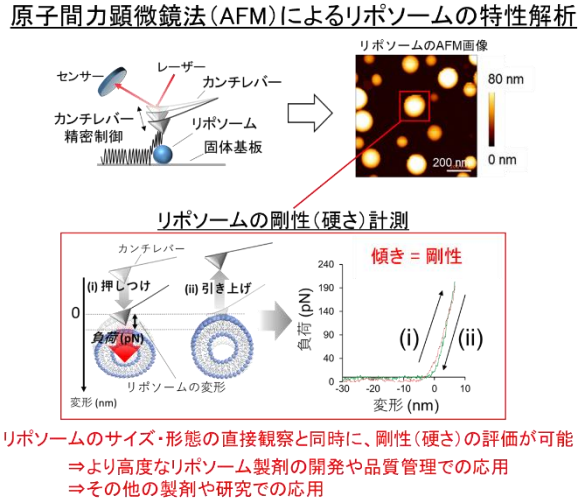


図 2. AFM を活用したレギュラトリーサイエンス研究

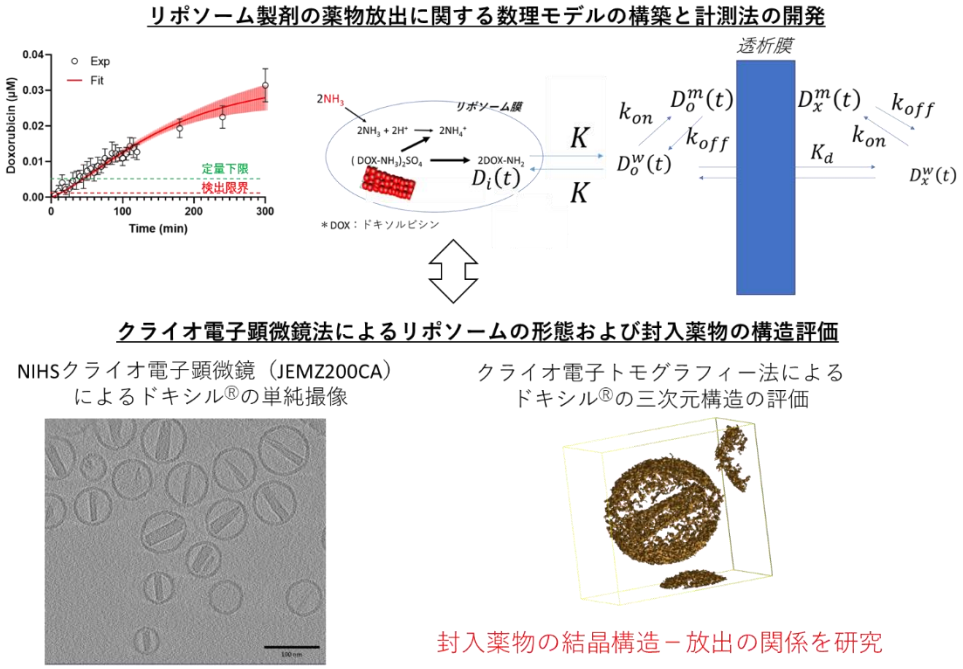


図 3. クライオ電子顕微鏡法の活用例

【参考文献】

1. Takechi-Haraya, Y. et al., *Sci. Rep.*, **13**, 19396, 2023
2. Takechi-Haraya, Y. et al., *Sci. Rep.*, **12**, 4959, 2022
3. Takechi-Haraya, Y. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 1339-1349, 2016.
4. Takechi-Haraya, Y. et al., *Bioconjug. Chem.*, **26**, 572-581, 2015.
5. Takechi, Y. et al., *Membrane*, **40**, 38-45, 2015.
6. Yang Z., Nill K., Takechi-Haraya, Y. et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8385, 2022.
7. Handa, D., Kimura, H., Oka, T., Takechi, Y. et al., *Biochemistry*, **54,** 1123-1131, 2015
8. 原矢佑樹, *Yakugaku Zasshi*, **144**, 511-519, 2024.

MEMO

天然物由来製品の安全性・有効性確保に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・生薬部・室長
増本 直子

【はじめに】

院生時代や研究員に採用されて間もない頃，指導教官含め複数の先生から，「〇〇のことといえば△△さんだよね」と言われる研究者になりなさい，といった旨のご指導があった．私自身も「スペシャリスト」に大きな憧れがあったが，もともと好きも嫌いも得意分野もなかったので，語弊を恐れずにいうとモラトリアム期間延長を目論み，理系の枠に留まらない，文系領域まで世界が広がる学問であると感じた生薬学を専攻した．それだけ範囲が広ければ何か見つかるのではと，今も縁のある事柄に取り組んでいる．

私のこれまでの研究はすべて，天然物由来製品に関わることには違いないが，初めての研究は「タネまき」，本例会で成立するようなまとまった話しは難しいと感じている．苦し紛れではあるが，今回は，天然物由来製品の「品質」確保にとって重要な 1）原料である天然物の基原，2）製品における有用成分の定量法，の 2 つについて紹介したい．

【原料である天然物の基原】

天然物由来製品の原材料には正しい基原種を用いることが肝要だが，その正しい原材料と，形態や性状の類似した近縁種が存在する場合がある．このようなとき，誤った原材料を用いると思わぬ健康被害をもたらす恐れがあるが，組織形態学的観点に基づいて両者を鑑別することは困難である．このようなときに有用なのが，分子生物学的手法を用いた基原種の推定や簡易的な鑑別である．

たとえば，日本薬局方（局方）生薬「ハッカ」の基原は *Mentha arvensis* var. *piperascens* とされているが，ヨーロッパ薬局方収載のハッカ関連品目の基原は *M. canadensis* とされている．植物分類学的には両者はシノニムとされているが，薬局方のハーモナイゼーションを見据えたとき，我が国で現在流通している「ハッカ」が *M. canadensis* であるか否かを明らかにする必要がある．市場流通品を収集し，その「ハッカ」の遺伝子（*rpl16*）を解析したところ， *M. canadensis* 由来のものがほとんどであることが判明したが，一部，種が不明のものもあった．本成果は今後の局方「ハッカ」改正根拠のひとつとなると思われる．

一方で，「ハッカ」の特徴でもある精油成分を分析したところ，メントールを主成分とするものがほとんどであったが，組成比にはばらつきがあった．同一種であるにも関わらず，精油成分組成比にばらつきがあるのは，精油型が異なるためである．図 1 は「ハッカ」と同じシソ科のうち，シソ属植物に含まれる精油成分の推定生合成経路である（*Mentha* 属の精油成分は，これとは異なる生合成経路を有している）．同一種とはいえ，有する生合成酵素が異なれば，精油中の主成分が異なる．いくら正しい基原種を用いても，精油型の異なるものを原料として用いては，その品質に影響が生じることは想像に難くない．

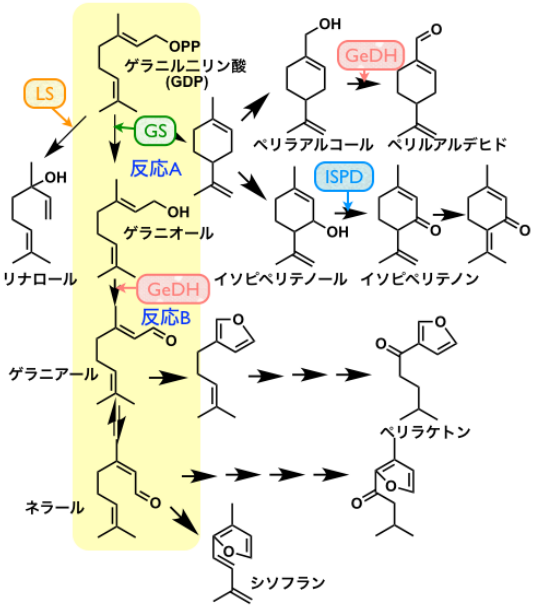


図 1 シソ属植物精油成分推定生合成経路

正しい基原種及び精油型由来の製品を生産し続けるには，原材料の遺伝資源維持が必須である．先述のシソの場合，遺伝資源維持はタネのかたちで保管することで行われ，一定

期間ごとにタネの更新が求められる．そこで私は，シソのタネについて保存期間と発芽率の関係などの発芽特性を調べ，遺伝資源維持には 7 年ごとのタネの更新が妥当であることを示した．

余談だが，これが先述の「タネまき」研究であり，大学の友人からは理学部か農学部かに転部したのかといぶかしがられた．実際，発芽率に関する研究は理学部でも農学部でも実施されており，その目的や考察は，発芽率低下の法則や発芽率上昇への解決策を見いだすために行われていることが多い．私にとっては，同じ実験をしても立場によって考察の多様性があること，そして薬学的考察は実にレギュラトリーサイエンスに寄ったものであることを体感した研究であった．

【製品における有用成分の定量法（相対モル感度法）】

生薬や食品添加物（既存添加物）などの天然物由来製品に期待される有効性や機能性は，含まれる有用成分によるものだが，その含有量によって薬にも毒にもなり得るため，製品の品質確保には有用成分の精確な定量が求められる．天然物のような多成分系試料における定量には，主にクロマトグラフィーが採用されるが，相対分析の一種であるため定量対象と同一で純度既知の定量用標品を用いた検量線の作成が不可欠である．しかし，定量対象が天然由来成分の場合，そのような定量用標品の入手は困難なことが多く精確な定量ができないという課題がある(図 2A)．この解決策のひとつが，相対モル感度（RMS）を用いた定量法（以下，RMS 法）である．RMS は「任意の検出器における、単位モルあたりの定量対象物質の基準物質（RR）に対する応答比」であり，クロマトグラフィー（LC や GC）と定量 NMR（^{1}H qNMR）を組み合わせて算出する．分析条件と RR に対する定量対象物質の RMS が明らかなとき，高価な NMR 装置も対象物質の定量用標品も用いず，LC や GC のみで精確な定量値を得られる（図 2B）．

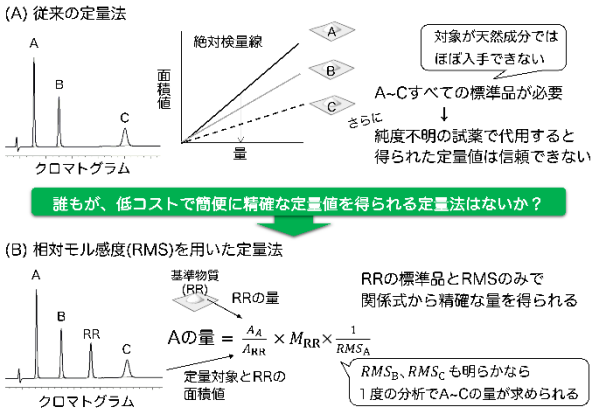


図 2 従来法と相対モル感度を用いた定量法の比較

私が従事した RMS 法研究のひとつが，局方生薬「ソヨウ」の指標成分であるペリルアルデヒド（PA）の定量法の確立である．「ソヨウ」の成分規格では PA の定量が求められており，その定量用標品も市販されているが，揮発性かつ易分解性のため精確な定量が困難である．そこで，より安定なジフェニルスルホンを RR として選択し，「ソヨウ」中の PA の RMS 法を確立した．HPLC を用いた「ソヨウ」中の PA 定量はすでに局方に収載され現場で用いられていたため，規制側の利点と現場の利点を両立させるために，分析条件を変更しないという方針で RMS 法を検討した．現場でも受け入れられやすく，検討した手法は第十八改正日本薬局方に収載されている．RMS 法については，より世間で一般的な手法として認識されることを目指してその標準化（日本農林規格(JAS) 化）に寄与した．7 月 1 日現在，JAS 案についてパブリックコメントが募集されている．

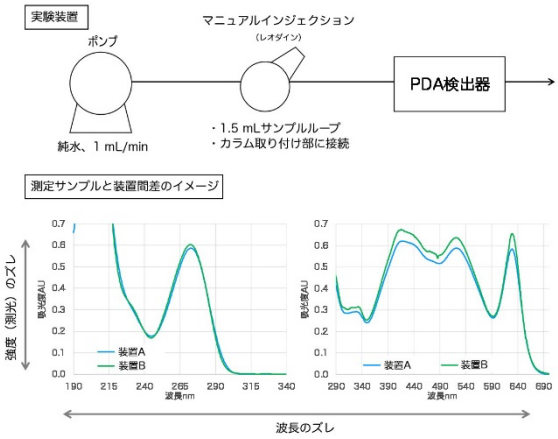


図 3 PDA 装置間差を調べた実験と装置間差のイメージ

一方で，RMS 法を公定法として広く採用するには課題もある．HPLC/PDA で定量する場合は装置間差があり，設定した分析条件によって装置間で定量値に 3〜5%のズレが生じる．そこで，カラムを装着しない 5 つの異なるメーカーの HPLC/PDA を用意し，PDA のフローセルに直接サンプルを満たすという実験をしたところ，同一サンプルを測定したにもかかわらず得られるスペクトルの波長ズレや吸光度の強さに数%の違いが見られた（図 3）．通常，HPLC/PDA では測定対象と同一の化合物を用いて検量線を作成し定量することを想定しているため，波長校正・測光調整機能がなくとも定量値に影響はない．しかし，RMS 法では異なる化合物の感度比を用いるため，PDA 検出器の性能の差が定量値のばらつきとして顕れてしまうと考えられた．

また，異なる装置での RMS 法も検討している．GC/FID では別の留意点があり，メイクアップガス種として He と N_2 のどちらを採用するかで定量値に 3%程度の違いがある場合があることを見出した．違いが生じるかどうかは，定量範囲（濃度）の影響が大きく，ガス種を変更する際には改めて RMS を検証する必要がある．

【おわりに】

衛研に限らず，ほかの先生がたはみな高い専門性を持って研究に取り組んでいるように見え，「スペシャリスト」はやはり今でも私の憧れである．一方で，冒頭で触れた私にとっての「〇〇」は今も不明である．それでも，さまざまな分野に少しずつでも触れて経験と見識を深めていけば，少しは役に立てる人間になれるかなと思うようにしている．

蛇足だが，先日退官した数学者である私の父（66）は，今人生で一番数学が楽しいらしい．何歳になっても研究は楽しいと感じる瞬間があるのかなと，それも楽しみにしながら，目の前のことに取り組んでいきたいと思う．

MEMO