

## この調査の内容、方法について

### (対象)

20 歳以上の体質虚弱な女性で肩がこり、疲れやすく、精神不安などの精神神経症状、ときに便秘の傾向のある方の次の諸症：

冷え症、虚弱体質、更年期障害、血の道症、月経不順、月経困難

\* 血の道とは、本来血液の通る血管のことで、月経時、更年期、産後などの女性に見られる頭痛、めまい、精神不安などの諸症状を血の道症といい、子宮関係の病気の俗称としても使われています。

### (この調査に参加いただけない方)

- ・ 以前に加味逍遙散に対してアレルギー症状（発疹・発赤、かゆみ等）をおこしたことがある方
  - ・ 医師の治療を受けている方で重い症状の方
  - ・ 今の症状について既に医師の治療を受けている方
  - ・ 妊婦又は妊娠していると思われる方、又は授乳中の方
  - ・ その他、調査薬剤師が調査に参加することが不相当と判断した方
- 参加できるかどうかよく分からない方は遠慮なくお尋ね下さい。

### (調査使用薬)

調査使用薬としては、あなたにご購入いただいた加味逍遙散(小太郎漢方株式会社製)を使用します。これは1箱に漢方製剤 180錠(20日分)が添付文書とともに入っています。調査期間全体では1箱分を使用します。

### (方法)

- ① この調査への参加の意志を伺い、同意をいただきます。
- ② 調査薬剤師があなたの現在の症状や健康状態についてうかがいます。
- ③ 調査への参加が適切と判断された方について、登録作業を行います。
- ④ 調査方法を説明いたします。
  - \* 調査使用薬は1回3錠を1日3回(朝・昼・夕)各食前(又は食間)にコップ一杯の水又は白湯とともに服用していただきます。1回に4錠以上飲んだり、3錠を2回以上に分けて飲むことのないようにして下さい。また、調査期間中はなるべく毎日同じタイミングで服用して下さい。
  - \* 調査使用薬を服用していただく期間は最長20日間(180錠分)です。20日間あるいは現在の症状がおさまるまで連続して服用して下さい。
  - \* 調査使用薬の服用の有無と体調について、調査協力者日誌に毎日記録して下さい。
  - \* 調査使用薬の全体的な効果と満足度について、調査終了日に調査協力者日誌に記録して下さい。
  - \* 調査が終了したとき(服用開始20日後又は20日以内に症状がおさまったとき)は、調査協力者日誌を持ってもう一度必ず来店して下さい。

(調査への参加の中止について)

あなたが以下の項目に該当する場合は、調査薬剤師はあなたの調査を中止させていただきます。これらの項目は、あなたの健康および権利を守るために定められたものです。

- ① あなたからこの調査への参加をやめる旨の申し出があった場合
- ② あなたにこの調査使用薬による副作用など、何らかの異常が認められた場合で調査薬剤師が調査使用薬の継続使用をやめたほうがよいと判断した場合
- ③ 調査使用薬の使用を始めてから、症状が改善せず、調査薬剤師が調査使用薬の使用をやめたほうがよいと判断した場合
- ④ 調査使用薬の使用を始めてから、調査の参加条件に合っていないことが分かった場合
- ⑤ その他、何らかの理由により調査薬剤師が調査使用薬の継続使用をやめたほうがよいと判断した場合

この調査であなたにお願いしたいこと

調査期間中は、調査使用薬の使用方法、来店日などについて、調査薬剤師の指示に従って下さい。また、次の場合は全て日誌にその内容を記録し、速やかに調査薬剤師にお知らせ下さい。

- ・ 他の薬局で購入した薬、買い置き薬、特定保健用食品、あるいは健康食品を使用する場合
  - ・ 新たに医師から処方された薬を使用する場合（あなたがこの調査使用薬を使用していることを医師にお話し下さい）
  - ・ 理学療法・はり・お灸・マッサージなどを行った場合
- 何か気になることがあった場合には、遠慮なく調査薬剤師にご相談下さい。

予想される効果と副作用について

予想される効果と副作用については、ご購入いただいた調査使用薬の箱に同封された添付文書に記載されていますので、よくご確認下さい。添付文書と同一の内容のものがこの冊子の最終ページにも記載されています。

本調査に使用する薬は安全性について既に充分確かめられたものではありませんが、万一健康被害が発生した場合、その治療及び保障に関しては、通常の市販薬を使用して健康被害が発生した場合と全く同様に製薬会社が対応します。

また、今までにわかっていないからだによくない作用が発現する可能性もあります。この調査使用薬を使用中に異常を感じた場合には、調査薬剤師へお申し出下さい。

### プライバシーの保護について

調査の結果は、この研究をしている公的な研究班へ報告され、厚生労働省へ提出する資料の一部として使用されます。また、医学薬学に関連する学術雑誌や学会で発表されることがありますが、いかなる場合も、あなたのお名前やご住所などプライバシーにかかわる事項は一切公表されることはありません。

また、調査結果をまとめるため、調査を依頼した AUR 実行委員会の関係者があなたの調査記録表や調査協力者日誌を閲覧いたします。ただし、これらの書類にはあなたのプライバシーに関する事柄は記載されず、あなたのプライバシーは完全に守られます。なお、この同意文書に署名されることにより、閲覧についてもご了承いただいたことになります。

### 調査参加に伴う負担の軽減について

調査にご参加いただくことで、調査終了時の再来店や質問事項への対応などあなたにご協力とお時間をいただくこととなります。これらの負担を軽減する目的で調査終了時に 7000 円分の金券（図書券あるいはパスネット）をあなたにお渡しいたします。

### 新たな情報の提供について

調査にご協力いただいている間に、効果や副作用などについて新たな情報が得られた場合、こうした情報によりあなたが調査への参加をやめるという判断をされるかもしれません。そのような重大な情報は速やかにお伝えし、あなたの調査への参加継続の意志を再度確認させていただきます。

説明の中で、わからない言葉、疑問、もう一度お聞きになりたいことなど、また、調査期間中に何か気がかりなことがありましたら、いつでも調査薬剤師がお答えしますので、遠慮なくご相談下さい。

この調査への参加についてご了解・ご了承がいただけましたら、次のページの「調査参加への同意文書」にご署名をお願いいたします。

もし、この調査薬を使用中に異常を感じた場合には、まず、調査薬剤師にご相談下さい。

<連絡先>

調査薬剤師名：\_\_\_\_\_

薬局名：\_\_\_\_\_

連絡先：\_\_\_\_\_ TEL \_\_\_\_\_ FAX \_\_\_\_\_

緊急連絡先：\_\_\_\_\_

## 調査参加への同意書

調査薬剤師

\_\_\_\_\_  
殿

加味逍遙散の使用実態研究調査に参加するにあたり、この調査の目的と方法、副作用などについて、「一般用漢方処方加味逍遙散のパイロット使用実態研究調査参加についての説明書および同意書」という文書により十分な説明を受け、いつでも中止の申し出ができることも理解し、その文書を受領した上で、この調査への参加に同意致します。

平成        年        月        日

同意者

氏名 \_\_\_\_\_

上記同意者に、この調査について十分に説明し、またこの調査の詳細について質問する機会と、この調査に参加するか否かを判断するのに十分な時間をもうけた上で、同意を取得しました。

平成        年        月        日

調査薬剤師

氏名 \_\_\_\_\_

(調査薬剤師 保管)

調査参加への同意書（写）

調査薬剤師

\_\_\_\_\_  
殿

加味逍遙散の使用実態研究調査に参加するにあたり、この調査の目的と方法、副作用などについて、「一般用漢方処方加味逍遙散のパイロット使用実態研究調査参加についての説明書および同意書」という文書により十分な説明を受け、いつでも中止の申し出ができることも理解し、その文書を受領した上で、この調査への参加に同意致します。

平成 年 月 日

同意者

氏名 \_\_\_\_\_

上記同意者に、この調査について十分に説明し、またこの調査の詳細について質問する機会と、この調査に参加するか否かを判断するのに十分な時間をもうけた上で、同意を取得しました。

平成 年 月 日

調査薬剤師

氏名 \_\_\_\_\_

(本人写)

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

一般用漢方処方の有用性評価（EBM 確保）のための実証的研究

分担研究者 名古屋市立大学大学院 薬学研究科 生薬学分野講師 能勢充彦

漢方処方の現代に即する代表的な効能効果として、アトピー性皮膚炎がある。実際にアトピー性皮膚炎治療に用いられている頻用処方に「十全大補湯」があるが、本処方の効能・効果には、対応する症状表現がない。本研究では、これらの処方の作用の客観的な解明を目指し、ヒトアトピー性皮膚炎様モデルへの影響を検討した。すなわち、NC マウスを用いたハプテン反復塗布慢性皮膚炎モデルにおいて、十全大補湯は再現性よく、その症状の軽減ならびに進展を有意に抑制した。また、血中総 IgE 濃度の上昇も抑制し、アトピー性皮膚炎への有効性が推定された。さらに、十全大補湯の作用点を明らかにするために、炎症部位の組織学的解析、所属リンパ節における免疫細胞組成、さらには炎症部位や所属リンパ節における cytokine や chemokine mRNA 発現などについて検討したところ、十全大補湯の作用点は、病変部に於ける、IL-4/Th2 細胞浸潤の系や、その後の eotaxin/好酸球浸潤といった系にあることが推定された。

A. 研究目的

漢方処方の現代に即する代表的な効能効果として、アトピー性皮膚炎や、不定愁訴が上げられる。実際にアトピー性皮膚炎治療に用いられている頻用処方に「十全大補湯」があるが、本処方の効能・効果には、対応する症状表現がない。本研究では、これらの処方の作用の客観的な解明を目指し、同処方が効能・効果に従い一般用医薬品として適正使用されるための実証的研究を行う。

アトピー性皮膚炎（AD）は、増悪・寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患であり、その患者の多くはアトピー素因を持つと定義されている。その治療方針については、日本皮膚科学会の「アトピー性皮膚炎治療ガイドライン」にあるように、ステロイド外用療法を中心に、皮膚

の乾燥やバリア機能異常など皮膚の生理学的機能異常には保湿剤などスキンケアを行うこと、また掻痒に対しては抗ヒスタミン剤や抗アレルギー剤を補助療法として併用すること、さらに食餌アレルギーやダニ、ハウスダストといった環境アレルギーなどの悪化因子を可能な限り除去することを基本とするとされている。また最近では、免疫抑制剤の外用療法も使用可能となっているが、本疾患については遺伝的要因も含んだ多因子性の疾患であるため、西洋医学的治療では疾患そのものを完治させうる薬物療法はなく、対症療法を行うしかないとされる。

一方、臨床ではこれら西洋医学的な治療法に不安を持ち始めた患者が多くなってきたこと、また少しでも症状を改善したいと

いう気持ちや『体質改善』の目的から、漢方方剤をはじめとする東洋医学に寄せられる期待は高い。しかしながら、これら漢方方剤は臨床で奏効することがあっても、その効果には『証』と呼ばれる responder, non-responder が存在し、必ずしも一定の効果を示さないこと、また複数の生薬の混合物であるため多種多様な成分が含まれており、それ故多彩な作用が期待されるが、その半面科学的な解析が難しいことなどから、その薬理学的基盤は未だ十分ではない。

また、本疾患においては、数種の漢方方剤が臨床応用されているにもかかわらず一般用の 210 処方の中には、適応症としてアトピー性皮膚炎が謳われているものはなく、それぞれの処方の薬理学的基盤を整備するためにも、実際の治療現場を反映した基礎解析が必要だと思われた。

これまでに、我々は臨床で汎用される 8 種の漢方方剤（消風散、温清飲、治頭瘡一方、黄連解毒湯、十味敗毒湯、当帰飲子、十全大補湯、補中益気湯）のアトピー性皮膚炎に対する有効性を実験的に解析することを目的に、種々のマウス遅延型アレルギーモデルや compound48/80 誘導搔痒モデル等を用いて、それぞれの抗アレルギー特性を明らかにしてきた。本研究では、ヒトアトピー性皮膚炎様の慢性皮膚炎を発症する NC/Jic マウスのハフテン反復塗布慢性皮膚炎への十全大補湯の影響ならびにその作用点の解明を目的に検討を行った。予備実験により、これら 8 種の処方のうち、十全大補湯に著名な症状の軽減、進展抑制が観察されたので、その再現性と作用機序の解析を免疫化学的、組織化学的、分子生物学的手法を用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1. 十全大補湯の調製

常法に従い、十全大補湯の構成生薬（黄耆 3g、桂皮 3g、熟地黄 3g、芍薬 3g、川キュウ 3g、蒼朮 3g、当帰 3g、人参 3g、茯苓 3g、甘草 1.5g）を計りとり、600 mL の精製水にて 1 時間、熱水抽出した。この抽出液を凍結乾燥し、乾燥エキスを得た ( $8.06 \pm 0.09$  g/day)。

### 2. ハフテン反復塗布慢性皮膚炎

実験動物として、本学実験動物飼育施設で繁殖・維持している NC/Jic マウス 6 週齢を用いた。マウスの腹部を剃毛して、2 日後に 5%TNCB (in acetone) 100  $\mu$ L を塗布して感作し、7 日後に 1%TNCB (in olive oil) 20  $\mu$ L を両耳介に塗布してチャレンジを行った。チャレンジ直前(0 時間)とチャレンジ後 4, 8, 24, 48 時間の耳介の腫脹についてダイヤルシクネスゲージを用いて測定した。また、毎週のチャレンジ直前に臨床症状をスコア化して記録した。ハフテンの塗布は 7 日毎に繰り返し、8 週間後に採血して屠殺し、各種臓器を得た。十全大補湯 (JTT) は、感作時よりヒト一日常用量の 10 倍量を自由飲水にて投与した。

採取した耳介は、中性ホルマリン溶液で固定後、ハラフィン抱埋した後薄片し、ヘマトキシリン-エオジン染色した。

また、所属リンハ節は、リンハ球組成の検討を行うため、CD90、CD45R、CD8、CD4 抗体を用いて T 細胞、B 細胞、さらに CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞の比率を FACSSort にて測定した。

さらに、炎症局所や所属リンパ節の各種サイトカイン及びケモカイン mRNA 発現については、採取したマウスの所属リンパ節および耳介から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により比較検討した。

また、発現の異なる遺伝子の探索を行うため、Fluorescent Differential Display(FDD)法を用いたトランスクリプトーム解析を行った。すなわち、マウスの所属リンパ節及び耳介から total RNA を抽出し、1<sup>st</sup> strand の cDNA を合成した後、蛍光アンカープライマー3 種と任意配列プライマー20 種を用いてフィンガープリントを得、それぞれを比較することで、目的の遺伝子を検索した。

### C. 研究結果

実験動物として、本学動物施設で繁殖・維持している雄性 NC/Jic マウス (6 週齢) を用いた。あらかじめ剃毛した腹部に 5%TNCB (2,4,6-trinitrochlorobenzene) アセトン溶液を塗布して感作を行い、1 週間後に 1%TNCB オリーブ油溶液をマウスの両耳介に塗布してチャレンジを行った。このチャレンジを 1 週間ごとに繰り返し、その後の耳介浮腫や生じる皮膚炎の臨床症状を観察した。実験終了時には血清や耳介組織、所属リンパ節などを採取し、血清総 IgE 濃度や病理組織標本の作製、フローサイトメトリーを用いたリンパ球組成の解析、さらに各種サイトカインなどの mRNA 発現を RT-PCR 法にて比較検討した。漢方方剤は、ヒト常用量の 10 倍量をそれぞれ飲水に混合し、感作時より自然投与した。

その結果、検討した処方のうち、十全大補湯投与群に著しい皮膚炎の軽減、その進

展抑制が認められた。すなわち、水を投与した対照群において、耳介浮腫は 2 週目より寛解せず、塗布回数に依存して増悪し、4 週目以降直線的に浮腫が増大した。また、4 週目以降種々の皮膚炎症状が出現し、紅斑、浮腫に引き続き擦創、出血、びらん、潰瘍形成、痂皮形成、乾燥など様々な AD 様病変へと進行した。一方、十全大補湯投与群では、浮腫ならびに生じる皮膚炎症状の軽減、さらにその進展を著しく抑制した (Fig. 1(A), (B))。また、実験期間中の体重変化、飲水量については各群で差は認められなかった (Fig. 1(D), (E))。さらに屠殺時に採血して測定した血清総 IgE 濃度についても、十全大補湯は強い上昇抑制効果を示した (Fig. 1(C))。

次に、各群の耳介の組織標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色して観察したところ、対照群では炎症性細胞の浸潤を伴う、表皮・真皮の著しい肥厚が認められた。表皮では単核球の著しい浸潤が認められ、真皮では単核球に加え、好酸球や好中球などの浸潤や線維芽細胞の増生や活性化、さらにトルイジンブルー染色により、基底層を中心にマスト細胞の増多、脱顆粒像が観察された。一方、十全大補湯投与群では、これらの組織変化に関して軽微なものであった。そこで、各個体の真皮・表皮について、ランダムに 5 視野ずつ選び、表皮内に浸潤しているリンパ球と、真皮内に浸潤している好酸球をそれぞれ計数し、半定量的な解析を試みた。その結果、十全大補湯投与群では対照群に対し有意に各細胞浸潤を抑制していた (Fig. 2)。さらに、所属リンパ節である頸部リンパ節における細胞組成について、フローサイトメトリーにより検



討したところ、対照群ではT細胞が約40%、B細胞が45%とその組成が正常群に比較して逆転するのに対し、十全大補湯投与群ではT細胞が約47%、B細胞が38%とその組成変化が若干抑えられていた。また、CD4/CD8陽性細胞比も対照群では減少するのに対し、十全大補湯投与群では有意にその減少を抑えており、炎症局所の皮膚への細胞浸潤の結果と比較して相関のある結果を示している。

また、耳介や頸部リンパ節における各種サイトカインやケモカイン、ケモカインレセプターmRNA発現についてRT-PCR法を用いて検討したところ、耳介において十全大補湯投与群ではTNF $\alpha$ 、IL-4、eotaxin、CCR3などのmRNA発現の上昇が抑制されており、また頸部リンパ節においてもIFN $\gamma$ やIL-4、eotaxin、CCR3などの

mRNA発現の上昇が抑制されており、組織レベルで観察された作用を支持する結果となった。これらの結果は、十全大補湯の作用点がT細胞ならびに好酸球にあることを示唆するものではないかと考えている。

さらに、耳介や所属リンパ節において発現の異なる遺伝子を探索する目的で、蛍光ディファレンシャルディスプレイ法を用いて解析を行っており、これまでに頸部リンパ節で対照群により発現が上昇し、十全大補湯投与によりその発現上昇が抑制されたものとして、MRC OX-2 antigen geneとMHC classII beta geneのcDNA断片が同定されており、抗原提示細胞も十全大補湯の作用点の一つになっていることが推定されている。

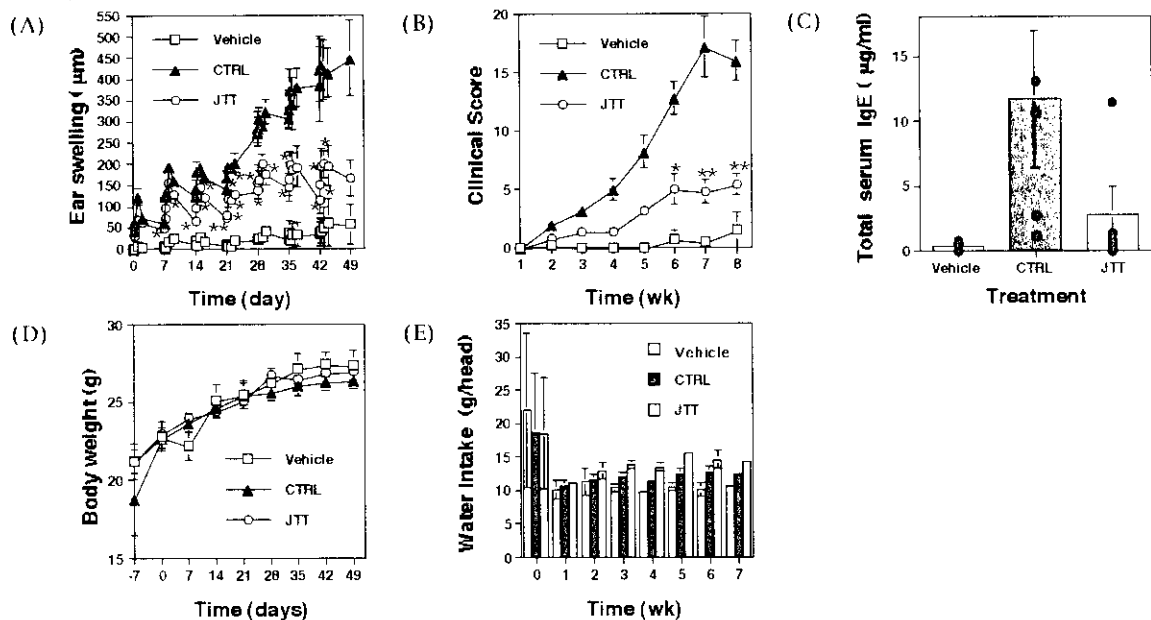


Fig. 1 NC/Jic マウス TNCB 反復塗布慢性皮膚炎への十全大補湯の効果

(A): 耳介浮腫, (B): 臨床スコア, (C): 血清総 IgE 濃度, (D): 体重, (E): 給水量.

Vehicle: オリーブ油塗布群, CTRL: 1%TNCB 塗布+水投与, JTT: 1%TNCB 塗布+十全大補湯. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

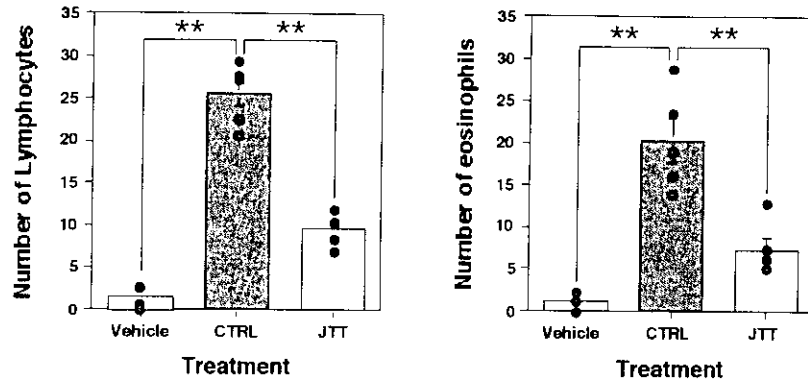


Fig. 2 アトピー様皮膚炎病変部における細胞浸潤への十全大補湯の効果  
 Vehicle : オリーブ油塗布群, CTRL : 1%TNCB 塗布 + 水投与, JTT : 1%TNCB 塗布 + 十全大補湯.  $**p < 0.01$ .

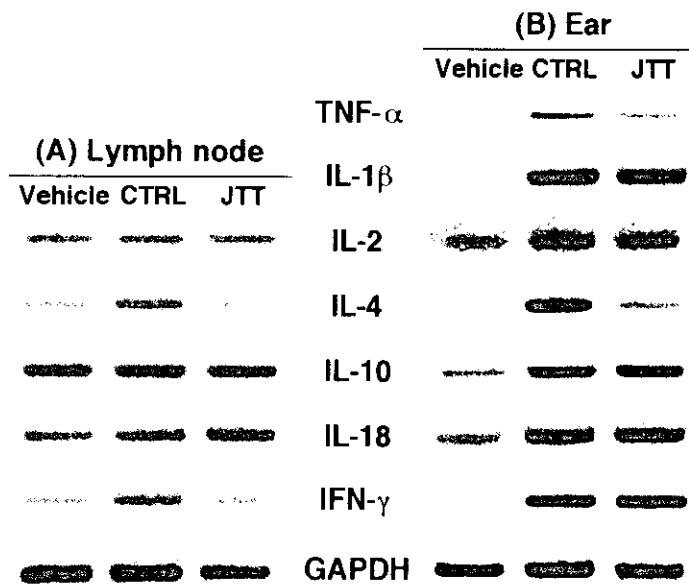


Fig. 3 アトピー様皮膚炎病変部や所属リンパ節における各種 cytokine mRNA 発現  
 に及ぼす十全大補湯の効果  
 Vehicle : オリーブ油塗布群, CTRL : 1%TNCB 塗布 + 水投与, JTT : 1%TNCB 塗布 + 十全大補湯.

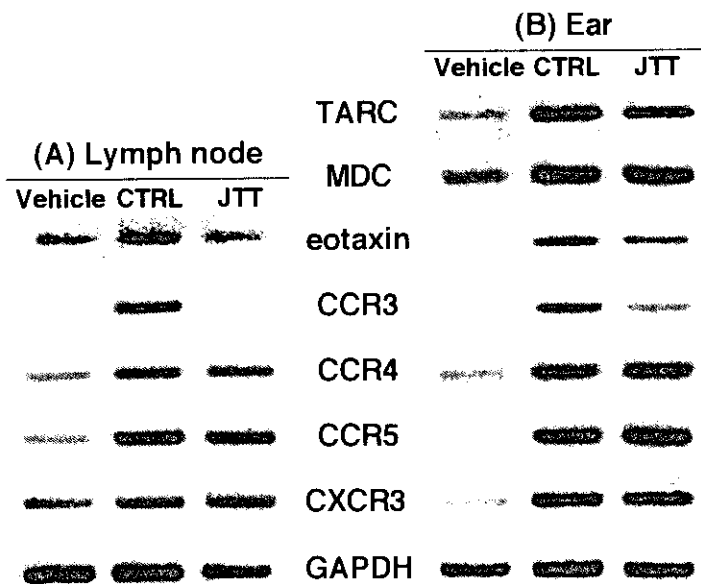


Fig. 4 アトピー様皮膚炎病変部や所属リンパ節における各種 chemokine 及び chemokine receptor mRNA 発現に及ぼす十全大補湯の効果

Vehicle: オリーブ油塗布群, CTRL: 1%TNCB 塗布+水投与, JTT: 1%TNCB 塗布+十全大補湯

#### D. 考察

ハフテンの反復塗布により、遅延型アレルギー反応以外に、様々な免疫反応が生じることは、1970年代後半より知られている。DNCB や DNFB の塗布を繰り返すことで、抗原特異的な IgE や IgG 産生が誘導されることが最初に報告された。また、ハフテンによる接触性皮膚炎が、ツベルクリン反応のような典型的なIV型アレルギー反応（遅延型アレルギー反応）とは異なることが明らかになってきている。しかしながら、この反応は、Th1 (Tc1) タイプの反応であり、それを繰り返すことで IgE 産生量が誘導されるように、Th2 タイプの反応に移行するという点は、アレルギー疾患を理解する上でも興味深い事象である。

1995年、Kitagakiらは、TNCB や oxazolone を48時間ごとにBALB/cマウスの耳介に塗布することで、持続性の浮腫

を生じ、再感作後に観察される浮腫の経時変化が、塗布後24時間をピークとする典型的な遅延型アレルギー反応のハターンから、塗布開始から48日後には、塗布後30分後、あるいは6~10時間をピークとするI型アレルギー反応の経過を示すようになるなど、抗体産生のみならず、腫脹反応もTh2反応へと移行することを報告した。

本研究で用いたNC/Jicマウスでも、TNCBの反復塗布により、血清総IgE濃度は著しく上昇し、また、浮腫の経時変化についても、そのピークが塗布後24時間から、反復回数に伴い、8~10時間後へと移行する。

結果に示すように、3,4週目以降、7日目に認められていた浮腫の寛解が認められなくなり、以後ほぼ直線的に増大した。これに対し、十全大補湯は、腫脹の経時変化についてもピークが、塗布後24時間から

8 時間へと移行する時期を遅らせ、塗布開始後 6 週目においても、7 日後の寛解が観察された。また、十全大補湯は、Control 群における 4 週目以降の腫脹の増大に対して抑制を示した。

浮腫や臨床スコアの結果を見る限り、4 週目以降、Control 群と JTT 群との間に、何らかの大きな差異が生じ、その後の症状の進展が異なると考えられる。

耳介の病理組織学的検討から、NC/Jic ハフテン反復塗布モデルの Control 群では、表皮の肥厚、過形成、過角化症のような像を呈し、慢性皮膚炎に見られる、苔癬化に類似した臨床像を生じているかに見えるが、リンパ球や形質細胞、好酸球などの炎症性細胞の浸潤が観察され、それに伴う細胞間浮腫（海面状態）といった急性湿疹や亜急性皮膚炎に近い臨床像も呈している。また、真皮において、その上層および中層には、リンパ球や形質細胞、好酸球、好中球、マクロファージなどの炎症性細胞の中程度から高程度の浸潤や海綿状の浮腫も観察された。一方、JTT 群では、表皮へのリンパ球浸潤、真皮への好酸球浸潤を有意に抑制し、表皮・真皮に見られた炎症像も抑制傾向にあることが確認された。

AD の皮膚症状は、病理組織学的には、急性湿疹の症状を呈する部位では、表皮の細胞間浮腫（海面状態）とリンパ球の浸潤および真皮のリンパ球、マクロファージ、好酸球の浸潤が見られ、慢性湿疹の症状を呈する部位では表皮は肥厚しているが、海面状態は見られないか、見られたとしても軽微である。一方、真皮は、リンパ球、マクロファージ、好酸球の浸潤が見られるが、好酸球の浸潤は目立たないことが多く、好

酸球が脱顆粒を起こしていることがあると言われている。

以上のことを考え合わせると、病理組織学的所見においても、この皮膚炎が、AD に見られる急性湿疹と慢性湿疹の混在した炎症像を呈すると考えられ、十全大補湯投与により、表皮へのリンパ球浸潤、真皮への好酸球浸潤を有意に抑制したことが、本系に於ける皮膚炎を抑制している一つの要因ではないかと考えられる。

さらに、耳介や頸部リンパ節でのサイトカイン・ケモカイン等の mRNA 発現の比較により、本モデルは、炎症局所ならびにその所属リンパ節は、Th1/Th2 混在型である事が判明した。

また、最近いくつかのケモカインレセプターが、Th1/Th2 に選択的に発現していることが明らかにされつつある。まだ *in vitro* での成績が多いが、現在までの報告によれば、Th1 に選択的なケモカインレセプターとして CXCR3、CCR5 などが挙げられ、Th2 に選択的なものとしては、CCR3、CCR4、CCR8 が挙げられている。これらのレセプターのうち、CXCR3、CCR5、CCR3、CCR4 の mRNA 発現は、本モデルの Control 群に於いて上昇しており、これらの結果からも Th1/Th2 混在型の変化を遂げていることが推察された。

一方、JTT 群では、まず耳介に於いて、炎症性サイトカインの 1 つである TNF- $\alpha$  の発現が、Control 群に比較して低下しており、また、IFN- $\gamma$  の発現には影響せず、IL-4 mRNA 発現を顕著に抑制していた。また、ケモカイン及びそのレセプターに関しては、eotaxin mRNA の発現ならびに CCR3 mRNA の発現を抑制した。CCR3

cDNA が、好酸球に優先に発現しているレセプター蛋白を code していることや、eotaxin がそのリガンドであり、好酸球の選択的な浸潤において CCR3/Eotaxin 系が中心的な役割を果たしていることを考えると、これらの結果は、真皮への好酸球浸潤を十全大補湯が有意に抑制したことを強く支持するものである。

また、CCR3 の発現が、末梢血中の IL-4 産生 T 細胞の一部に認められるという報告があることから、この十全大補湯の耳介での IL-4、CCR3 mRNA 発現の抑制は、表皮へのリンパ球浸潤の抑制をも支持しているかもしれない。これらの点については、今後、各細胞、各サイトカイン、各ケモカイン及びそのレセプターの局在を、免疫染色などにより検証していかなければならない。

次に、頸部リンパ節においては、十全大補湯は、IL-4、IFN- $\gamma$ 、CCR3 mRNA 発現を抑制し、また、CCR5 mRNA の発現に若干の抑制が観察された。これらの結果と、フローサイトメトリーでの結果の関連性については、現時点においては不明である。今後、細胞内サイトカインの染色などを行い、解析していかなければならない。

#### E. 結論

本研究により、十全大補湯は NC マウスを用いたハプテン反復塗布慢性皮膚炎モデルにおいて、再現性よく、その症状の軽減ならびに進展を有意に抑制した。また、血中総 IgE 濃度の上昇も抑制し、アトピー性皮膚炎への有効性が推定された。

さらに、十全大補湯の作用点として、病変部に於ける、IL-4/Th2 細胞浸潤の系や、

その後の eotaxin/好酸球浸潤といった系が推定された。

しかしながら、今回の結果は、反復塗布開始から 7 週間後、さらに、最終塗布後 7 日目に採取したサンプルを基に解析した結果、得られたものであるため、作用機序と言うよりは、結果的に影響を受けた細胞およびその後の種々の反応が抑制されたと捉える方が妥当である。

今後、Control 群と JTT 群で大きな差異が生じ始めた時点、つまり、本研究内では、4 週目の塗布以降の挙動について、経時的に検討を重ねる必要があると思われる。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

(学会発表)

1. 能勢充彦：モーニングセミナー12 アトピー性皮膚炎の漢方治療－アトピー性皮膚炎に用いられる漢方方剤の科学的評価－(招待講演) 第 102 回日本皮膚科学会総会 (千葉、2003 年).
2. Mitsuhiro Nose: Scientific Evaluation of Kampo Medicines Clinically Used in Atopic Dermatitis (招待講演) 9<sup>th</sup> Southeast Asian-Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists (釜山、2003 年).
3. 崔 愛華、能勢充彦、水上 元、荻原幸夫：アトピー性皮膚炎に有効な漢方方剤の評価ならびに基礎解析 第 20 回和漢医薬学会大会 (熊本、2003 年).  
(論文発表)
1. Nose, M., Tamura, M., Ryu, N.,

Mizukami, H., Ogihara, Y.: Sho-saiko-to and Saiko-Keisi-to, the traditional Chinese and Japanese herbal medicines, altered hepatic drug-metabolizing enzymes in mice and rats when

administered orally for a long time. J. Pharm Pharmacol., 55 (7) 141 (2003).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

一般用漢方処方品質及び安全性確保のための研究

一 生薬ブシの日本薬局方収載に向けたワーキンググループの取り組み

分担研究者 関田 節子 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場

一般用漢方処方「210 処方」設定時の際に、特に附子製剤については、配合される生薬ブシの毒性に対する安全性が充分確保されない恐れがあったことより、その多くが採択されなかった経緯がある。医療現場では、「210 処方」以外で用いられている処方の3割程度が附子含有処方である。従って、一般用漢方処方の見直しの際には、附子製剤の追加等が議論となる。そこで、第15改正日本薬局方調査会生薬等委員会のメンバーが中心となって、生薬ブシの有用性、安全性確保を念頭に局方に収載する作業を行なった。本研究は、附子製剤等の漢方処方の品質並びに安全性確保のための分析法の確立、分析標品の確保等について検討を行うもので、生薬ブシについて、品質が規格化され、局方等で情報が公開されれば、附子製剤について、安全性確保が容易となり、一般用漢方処方としての採用が可能となる。そこで、安全性の評価方法として HPLC 法による純度試験法の設定を検討し、有効性を定量法で、品質を確認法、その他の項目で検討した。

日本薬局方調査会生薬等委員会「ブシ」検討ワーキンググループメンバー

関田節子	国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場
渋谷裕之	(同 上)
川原信夫	国立医薬品食品衛生研究所生薬部
佐竹元吉	お茶の水女子大学
岡田 稔	東京生薬協会
寺林 進	(同 上)
滝 昌則	(同 上)
川崎武志	(同 上)
藤田正雄	(同 上)
近藤誠三	日本漢方生薬製剤協会
政井久美	(同 上)
岡田浩明	(同 上)
須藤雅夫	(同 上)
有本恵子	日本生薬連合会

協力研究者

木内文之	国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場
高橋真理衣	(同 上)
菊地祐一	東京生薬協会

A. 研究目的

生薬ブシは重要生薬であるがその毒性から今まで局方には収載されていなかった。そのため多くの重要漢方処方が 210 処方に採択されなかった経緯がある。そこでブシの第14改正日本薬局方第2追補収載に関するワーキンググループで検討を行った。

現在流通しているさまざまなブシ製品はその製法、減毒法などが異なり、また基原なども異なるため、その定義等の整備が必要となる。特に本生薬を議論するには安全性の確保が重要となるので安全性の評価方法として HPLC による純度試験法の設定の検討を行った。また、品質に関しては従来の日本薬局方に則り、確認試験、定量法、乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分について規定すべく検討を行った。ワーキンググループの検討内容は、随時生薬等 A 及び B 委員会で討議され、第14改正第二追補収載案としてまとめた。

B. 研究方法

1. 品目の分類についての検討

検討対象とするブシ及びブシ末は、生薬または生薬製剤のいずれかに分類することが必要である

ので、生薬等委員会で討議した

## 2. 生薬名、基原植物の検討

本品目は、アコニチン型アルカロイドの毒性を弱めるための加工法を施したものであり、加工前の生薬との違いを明確にする名称を討議した。また、加工法の違いに従い規格値に違いを設置した。そのため使用者が購入時に加工法を理解できるような名称とすべく討議した。

生薬「ブシ」の基原植物として、文献調査、市場調査、局方調和の観点から海外の局方を調査した。また、ラテン名の適否について検討した。

## 3. 性状の検討

局方検討用に準備したブシ 25 種類、およびブシ末 7 種類を対象に、加工法の違いによる性状の特徴を外部形態、顕微鏡を用いた内部形態について討議した。

## 4. 確認試験法の検討

含有成分のうちブシに特異的で代表的とみなされるアコニチン型アルカロイドの検出を目的として討議した。

## 5. 純度試験法の検討

安全性の確認を純度試験で表記することとし、最も毒性の強いアコニチンタイプのジエステル型アルカロイド成分について HPLC による試験法を討議した。

試料調整方法：(ブシ) 本品の粉末約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、水 3.0 mL を加えてよく振り混ぜた後、アンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はアンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を用いて、更にこの操作を 2 回行う。全抽出液を合わせ 40℃以下で溶媒を減圧留去した後、残留物にブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液 (1 : 1) 10 mL を正確に加えて溶かし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。試料溶液及び純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 20  $\mu$ L につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液のアコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコ

ニチンに対応する各ピーク高さ、 $H_S$  及び  $H_{SA}$ 、 $H_T$  及び  $H_{TJ}$ 、 $H_{TH}$  及び  $H_{SH}$ 、 $H_M$  及び  $H_{SM}$  を測定し、次式により換算した生薬の乾燥物 1 g に対し、各ジエステル類の量を求めた。

$$\text{アコニチン (C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{11}) \text{ の量 (}\mu\text{g)} = \frac{C_{SA}}{W} \times \frac{H_{TA}}{H_{SA}} \times 10$$

$$\text{ジェサコニチン (C}_{33}\text{H}_{46}\text{NO}_{12}) \text{ の量 (}\mu\text{g)} \\ = \frac{C_{SJ}}{W} \times \frac{H_{TJ}}{H_{SJ}} \times 10$$

$$\text{ヒバコニチン (C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}) \text{ の量 (}\mu\text{g)} \\ = \frac{C_{SH}}{W} \times \frac{H_{TH}}{H_{SH}} \times 10$$

$$\text{メサコニチン (C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{11}) \text{ の量 (}\mu\text{g)} \\ = \frac{C_{SM}}{W} \times \frac{H_{TM}}{H_{SM}} \times 10$$

$C_{SA}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用アコニチンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{SJ}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ジェサコニチンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{SH}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ヒバコニチンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{SM}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用メサコニチンの濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )

$W$  : 乾燥物に換算した本品の秤取量 (g)

試験条件：検出器 紫外吸光度計 (アコニチン、ヒバコニチン、メサコニチンは 231 nm、ジェサコニチンは 254 nm)。カラム：内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5  $\mu\text{m}$  の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。カラム温度：40℃付近の一定温度移動相：ブシ用リン酸塩緩衝液/テトラヒドロフラン混液 (183 : 17)。流量：メサコニチンの保持時間が約 31 分になるように調整する。

ブシ末に関してもブシとほぼ同様な方法で行った (別紙参照)。



## 6. 乾燥減量、灰分、酸不溶性灰分、エキス含量の検討

局方検討用に準備したブシ 25 種類、およびブシ末 7 種類を対象に実測し、その結果について討議した。

## 7. 定量法について

ブシは他の生薬と同様に多様な成分を含有しているが、これまでに報告されている論文から判断した場合、有用性に関与するとみなされる最適な成分としてはアルカロイドの存在が大きい。そこで、総アルカロイド定量法について討議した。

## C. 研究結果

### 1. 品目の分類についての検討

生薬は、薬用植物を収穫後多くの場合調整加工を施すが、通常は洗浄、防菌、整形で含有成分への影響を極力避ける方法を講じている。ブシの加工は成分の変換を目的とした加工法であるので製剤とも考え得るが、単品の製剤として用いられる例はないこと、類似の加工を行なったものに「コウジン」が存在することから生薬に分類すると決定された。

### 2. 生薬名、基原植物の検討

トリカブトを基原植物とする生薬は歴史的に漢字名で呼称されてきた。そこで、加工を施した局方品はカタカナ名とすることにより区別を図った。これに伴い、局方の体裁に合わせて、ラテン名、英名を命名したが、漢字名は採用しないことを決定した。

更に「ポビドン」の例にならい、別名として「ブシ1」、「ブシ2」、「ブシ3」(末についても同様)の名称を並記することにより本質に標記した加工法を認識することを可能にした。

また、ブシ末についても加工法の異なる 2 種類を定義した。

基原植物について調査した結果、ハナトリカブト *Aconitum carmichaeli*、オクトリカブト *A. japonicum*、*A. kusnezoffii*、ヤマトリカブト *A. kobusiense* について検討した。中国薬典に記載されている種はハナトリカブト *Aconitum carmichaeli* 1 種であったが、日本の市場ではハ

ナトリカブト以外にオクトリカブト *A. japonicum* などの利用も認められた。検討の結果、現在、将来共に確保される種としてハナトリカブト *Aconitum carmichaeli*、オクトリカブト *A. japonicum* が決定した。ヤマトリカブトはオクトリカブトの変種であることから敢て記名しないこととした。なお、*Aconitum carmichaeli* の和名にカラトリカブトの採用が提案された。これについて討議した結果、ハナトリカブト、カラトリカブトどちらの名も用いられているが、“カラ”の接頭語は生薬名に使用されることが多いため混同を避けるために植物の和名にはハナトリカブトが相応しいと結論した。

### 3. 性状の検討

加工法の異なる試料についてその特徴を記載した。鏡検の結果、ブシ末にトウモロコシデンプンまたは乳糖を賦形剤として加えている試料が確認されている。

### 4. 確認試験法の検討

薄層クロマトグラフ法による試験を提案し、指標化合物をベンゾイルメサコニン、展開溶媒を酢酸エチル/エタノール (99.5) /アンモニア水 (28) 混液 (40 : 3 : 2) と決定した。薄層板の種類として NH-シリカゲル、順層シリカゲル、ODS を検討したが、最も検出に適している順層シリカゲルに決定した。検出は、噴霧用ドラージェンドルフ試液を噴霧した後、亜硝酸ナトリウム試液を噴霧する方法を採用した。

### 5. 純度試験法の検討

HPLC 法による試験法作成においては解決すべき諸問題が推察された。そこで、これらの問題点の収集及び対応策を検討するために共通試料として市販ブシ、ブシ末合わせて 6 種類を準備した。これらを用いて試料調整法、カラムの選択、展開溶媒、試薬、標準化合物の選定、検出波長等を検討して試験法を作成後、流通している市販ブシ 25 種類、およびブシ末 7 種類を測定した。その結果、修治方法により結果に大きな差があった。いずれのジエステルも最も値の大きいものを限度値とした。また、その安全性を考慮し 4 成分の総量としては、試験試

料中での最大合計値以下とした。ブシにおいては前式により換算した生薬の乾燥物 1 g に対しアコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチンの量を求めるとき、それぞれ 60 µg 以下、60 µg 以下、280 µg 以下及び 140 µg 以下で、更にこれら 4 成分の総量は 450 µg 以下であるとした。

また、ブシ末においては前式により換算した生薬の乾燥物 1 g に対し、アコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチンの量を求めるとき、それぞれ 55 µg 以下、40 µg 以下、55 µg 以下及び 120 µg 以下で、更にこれら 4 成分の総量は 230 µg 以下であるとした。

#### D. 考察および E. 結論

「ブシ」及び「ブシ末」を日本薬局方第二部に収載する目的で、収載にあたって解決すべき諸問題を検討し、収載案を作成した。まず、ワーキンググループが問題点を抽出し、実測、実験を重ねて試験法原案ならびに規格原案を提出し、定期的に行われる生薬等 A 及び B 委員会を経て収載案を作成した。本品目は「生薬」であることを確認した上で、生薬名、本質を定義した。古来、トリカブト塊根の生薬には「烏頭」、「附子」の名称が知られている。この呼称の本質はあいまいで、加工処理を行っているか否かは明確ではない。そこで、加工処理を施した意味を強調するためにカタカナによる「ブシ」を採用した。したがって、日本薬局方におけるトリカブト生薬は本質の 1～3 に記述した加工処理がなされたものである。性状、規格値はこの加工方法にしたがって区分した。確認試験法については、展開溶媒を酢酸エチル/エタノール (99.5) /アンモニア水 (28) 混液 (40 : 2 : 1) とした条件の方がジエステル 4 アルカロイド群とモノエステル 4 アルカロイド群の区別が明確であったが、指標化合物とベンゾイルヒバコニチンの R<sub>f</sub> 値が近似しているため、重複する可能性もあることから前者に決定した。また、対象アルカロイド類と R<sub>f</sub> 値が離れていて検出しやすいネオリンも指標化合物の候補になったが、化合物の入手方法が確立していないため採用しなかった。純度試験法では、ブシは毒性の強いジエステルアルカロイドであるアコニチン、メサコニチン、エサコニチン、

ヒバコニチンを含み、修治を行うことにより低毒性のモノエステル体に変換することが知られているので、安全性の確認として HPLC での定量試験法を検討したが、前処理法を含め、いかなる条件で検討しても、夾雑物との分離が困難でありジエステル体 4 成分の正確な同時定量は困難であることから、HPLC 法によるジエステル体の純度試験法として検討した。試料にアンモニア試液及びジエチルエーテルを加えて振り混ぜると、しばしば“ダマ”を生じることがある。そこで水を加えることにより改善を図った。2ヶ所以上の機関で測定を行なったが、溶媒、試薬の鮮度が測定結果に影響していることが推定されたので、用時に開栓したものを用いた。それでも測定値にばらつきを生じるのは夾雑物のピークの重なりがあるものと考え、LCMS、GCMS による補足実験を行なった。試料調整時に、共栓遠心沈殿管に試料を入れた後、溶媒を加えると固塊物が生じ、抽出効率が悪くなることが判明したため、加える水とエーテルの量を検討し調整したが、水の量を増やすことによりアルカロイドの抽出効率が若干落ちることが判明した。その点について再検討する予定である。規格値は、実測結果に基づき妥当と考えうる値に設定した。なお、有用性の全てを示すものではないが、「ブシ」、「ブシ末」の品質はアルカロイドに帰することが可能であると推測し、確認試験、純度試験、定量法により確立されているので、エキス含量については収載しなかった。また、確認試験に用いる指標化合物ベンゾイルメサコニチン、純度試験に用いる標準試薬アコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン、メサコニチンの規格を設定した。また、供給機関等については検討中であるが、純度試験用標準試薬は混合希釈液として供給する予定である。

収載案は、現在 JP フォーラムに掲載中であり（後述）パブリックコメントを収集し対応していく予定であるが、その後局方第二追補に収載する。

#### F. 健康危機情報

特に問題はなし

#### G. 研究発表

誌上報告

1. Nakamura, Y., Yomura, K., Kikuchi, Y.,

Ishimatu, M., Nitsu, K., Sakakibara, I., Higuchi, M., Amagaya, S., Aburata, M., Okada, M., Sekita, S. and Satake, M., Quality Evaluation of Natural Compound, Isolated from Crude Drugs (Part 2), Aristolochic Acid II, *Iyakuhinkenkyu*, 34 (8), 485-492 (2003).

2. 日本薬局方フォーラム 13 (1) 37-42 (2004).

#### 学会報告

1. 瀧野裕之、高橋真里衣、川原信夫、木内文之、関田節子、近藤誠三、須藤雅夫、政井久美、有本恵子、岡田稔、寺林進、滝昌則、藤田政雄、川崎武志、佐竹元吉「ブシ（加工ブシ）の局方収載モノグラフへの検討」 日本薬学会第 124 年会（大阪）2004. 3

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

#### 局方収載案（参考）

##### ブシ

Processed Aconite Root

PROCESSI ACONITI RADIX

加工ブシ

ブシ 1

ブシ 2

ブシ 3

本品はハナトリカブト *Aconitum carmichaeli* Debeaux 又はオクトリカブト *Aconitum japonicum* Thunberg (*Ranunculaceae*) の塊根を 1, 2 又は 3 の加工法により製したものである。

- 1 高压蒸気処理により加工する。
- 2 食塩又は岩塩の水溶液に浸せきした後、加熱又は高压蒸気処理により加工する。
- 3 食塩の水溶液に浸せきした後、石灰を塗布することにより加工する。

ブシ 1、ブシ 2 及びブシ 3 は換算した生薬の乾燥

物に対し、それぞれ総アルカロイド 0.7 ~ 1.5%, 0.1 ~ 0.6%及び0.5 ~ 0.9%を含む。

本品はその加工法により、それぞれブシ 1、ブシ 2 及びブシ 3 がある。

本品はその加工法を表示する。

#### 性状

ブシ 1 本品は径 5 mm 以下の不整な多角形に破碎されている。外面は黒褐色～暗灰褐色を呈する。質は堅く、切面は平らで、暗褐色～淡褐色を呈し、通常角質で光沢がある。

本品は弱い特異なおいがある。

本品の横切片を鏡検するとき、道管は孔紋、階紋、網紋又はらせん紋道管である。柔細胞中のでんぷん粒は通例のり化しているが、ときにでんぷん粒が認められるものもある。でんぷん粒は径 2 ~ 25  $\mu\text{m}$ 、円形若しくはだ円形の単粒又は 2 ~ 10 数個の複粒として認められる。でんぷん粒のへそは明らかである。

ブシ 2 本品はほぼ倒円錐形で、長さ 15 ~ 30 mm、径 12 ~ 16 mm、又は縦ときに横に切断され、長さ 20~60 mm、幅 15 ~ 40 mm、厚さ 200 ~ 700  $\mu\text{m}$ 、又は径 12 mm 以下の不整な多角形に破碎されている。外面は淡褐色～暗褐色又は黄褐色を呈する。質は堅く、通例、しわはなく、切面は平らで、淡褐色～暗褐色又は黄白色～淡黄褐色を呈し、通常角質、半透明で光沢がある。

本品は弱い特異なおいがある。

本品の横切片を鏡検するとき、外側から擬上皮、一次皮層、内皮、二次皮層、形成層、木部が認められる。一次皮層には短径 30 ~ 75  $\mu\text{m}$ 、長径 60 ~ 150  $\mu\text{m}$ 、だ円形～だ円状四角形の厚壁細胞があり、内皮は接線方向に長い一層の細胞からなっている。形成層輪は星形又は不整の多角形～円形であり、木部の道管群は V 字形を呈する。二次皮層及び髄中に独立した形成層輪が認められるものもある。道管は孔紋、階紋、網紋又はらせん紋道管である。柔細胞中のでんぷん粒はのり化している。

ブシ 3 本品は径 5 mm 以下の不整な多角形に破碎されている。外面は灰褐色を呈する。質は堅く、切面は平らで、淡灰褐色～灰白色を呈し、光沢がない。

本品は弱い特異なおいがある。

本品の横切片を鏡検するとき、道管は孔紋、階紋、網紋又はらせん紋道管である。柔細胞中のでんぷん粒は径 2 ~ 25  $\mu\text{m}$ 、円形若しくはだ円形の単粒又は

2 ~ 10 数個の複粒として認められる。でんぷん粒のへそは明らかである。

**確認試験** 本品の粉末3 gを共栓遠心沈殿管に入れ、ジエチルエーテル 20 mL 及びアンモニア試液 2 mL を加え、10 分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取する。この上澄液を減圧下で蒸発乾固し、残留物をジエチルエーテル 1 mL に溶かし、試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフ用塩酸ベンゾイルメサコニン 1 mg をエタノール (99.5) 10 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び標準溶液 10  $\mu$ L ずつを、薄層クロマトグラフ用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/エタノール (99.5) /アンモニア水 (28) 混液 (40 : 3 : 2) を展開溶媒として約 10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用ドラーゲンドルフ試液を均等に噴霧し、風乾後、亜硝酸ナトリウム試液を均等に噴霧するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得た黄褐色のスポットと色調及び  $R_f$  値が等しい。

**純度試験** ブシジエステルアルカロイド (アコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチン) 本品の粉末約 0.5 g を精密に量り、共栓遠心沈殿管に入れ、水 3.0 mL を加えてよく振り混ぜた後、アンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を加えて 30 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を分取する。残留物はアンモニア試液 1.0 mL 及びジエチルエーテル 20 mL を用いて、更にこの操作を 2 回行う。全抽出液を合わせ 40°C 以下で溶媒を減圧留去した後、残留物にブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液 (1 : 1) 10 mL を正確に加えて溶かし、この液を遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。試料溶液及び純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 20  $\mu$ L につき、次の条件で液体クロマトグラフ法により試験を行う。試料溶液及び純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液のアコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチンに対応する各ピーク高さ、 $H_{TA}$  及び  $H_{SA}$ 、 $H_H$  及び  $H_J$ 、 $H_{SH}$  及び  $H_M$ 、 $H_{SM}$  を測定し、次式により換算した生薬の乾燥物 1 g に対し、アコニチン、ジェサコニチン、ヒバコニチン及びメサコニチンの量を求めるとき、それぞれ 60  $\mu$ g 以下、60  $\mu$ g 以下、280  $\mu$ g 以下及び 140  $\mu$ g 以下で、更にこれら 4 成分の総量は 450  $\mu$ g 以下である。

$$\text{アコニチン (C}_{33}\text{H}_{47}\text{NO}_{11}) \text{ の量 (}\mu\text{g)} = \frac{C_{SA}}{W} \times \frac{H_{TA}}{H_{SA}} \times 10$$

ジェサコニチン (C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>12</sub>) の量 ( $\mu$ g)

$$= \frac{C_{SJ}}{W} \times \frac{H_{TJ}}{H_{SJ}} \times 10$$

ヒバコニチン (C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>10</sub>) の量 ( $\mu$ g)

$$= \frac{C_{SH}}{W} \times \frac{H_{TH}}{H_{SH}} \times 10$$

メサコニチン (C<sub>35</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>11</sub>) の量 ( $\mu$ g)

$$= \frac{C_{SM}}{W} \times \frac{H_{TM}}{H_{SM}} \times 10$$

$C_{SA}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用アコニチンの濃度 ( $\mu$ g/mL)

$C_{SJ}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ジェサコニチンの濃度 ( $\mu$ g/mL)

$C_{SH}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用ヒバコニチンの濃度 ( $\mu$ g/mL)

$C_{SM}$  : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液中の純度試験用メサコニチンの濃度 ( $\mu$ g/mL)

$W$  : 乾燥物に換算した本品の秤取量 (g)

#### 試験条件

検出器 : 紫外吸光光度計 (測定波長 : アコニチン、ヒバコニチン、メサコニチンは 231 nm、ジェサコニチンは 254 nm)

カラム : 内径 4.6 mm、長さ 15 cm のステンレス管に 5  $\mu$ m の液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充てんする。

カラム温度 : 40°C 付近の一定温度

移動相 : ブシ用リン酸塩緩衝液/テトラヒドロフラン混液 (183 : 17)

流量 : メサコニチンの保持時間が約 31 分になるように調整する。

#### システム適合性

システムの性能 : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 20  $\mu$ L につき、検出器の測定波長を 254 nm として、上記の条件で操作するとき、メサコニチン、ヒバコニチン、アコニチン、ジェサコニチンの順に溶出し、それぞれの分離度は 1.5 以上である。

システムの再現性 : 純度試験用ブシジエステルアルカロイド混合標準溶液 1 mL を正確に量り、ブシ用リン酸塩緩衝液/アセトニトリル (1 : 1) を加えて正確に 10 mL とする。この液 20  $\mu$ L につき、検出器の測定波長を 231 nm として、上記の条件で試験を 6 回繰り返すとき、メサコニチンのピーク高さの相対標準偏差は 1.5% 以下である。

乾燥減量 15.0% 以下 (6 時間)

灰分 ブシ1 4.0% 以下