

眼内注入を行なったが、すべて5日間を1クールとし、2日間休薬して2カールの治療を行い、眼内病変や幼虫の脳内移行を検討した。

### 抗マラリア薬開発の動向

ホームページの閲覧や電子メールでのやり取りにて、種々の製薬企業、Medicine for Malaria Venture、Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) からの情報収集を行った。特にノバルティス社についてはスイス本社を訪問し、抗マラリア薬 Riamet の臨床試験担当者と直接の意見交換を行なった。

### 倫理面への配慮

各薬剤保管機関においては普段から倫理審査委員会より、研究班保管薬剤の使用に関する承認を得ている。実際の症例で薬剤を使用するに当たっては、研究班が作成した説明文書を患者に示し、所定の承諾書用紙に患者の署名を得ている。その後に必要な使用登録書、有害事象報告書、治療報告書では、患者氏名はイニシャルのみを記載している。さらに、それらの書類の保管は厳重に行ない、研究班関係者以外が閲覧することは不可能となっている。

動物実験に際しては、各分担研究者の機関で実施の承認を受け、動物実験ガイドラインを遵守している。

## C. 研究結果

### 薬剤の購入、保管、供給体制

本研究班の薬剤輸入（小田原）については、旧研

究班の担当者（木村）から交替したため、当初混乱も予想されたが、多くの薬剤を購入しているロンドンの John Bell & Croyden 社との強固な関係が確立されていたので、大きな混乱は避けられた。ただし、薬監証明の取得に際しては円滑に行われるまでに何度かのやり取りを必要とした。

今年度の輸入薬剤としては最近の数年間と同様に、抗マラリア薬、および赤痢アメーバ症の治療薬メトロニダゾール注射薬とパロモマイシンの多いことが目立った（表1）。さらに今年度は狂犬病ヒト免疫グロブリン（1,500 IU/バイアル）を新規導入した。また、今年度の薬剤使用では従来通りマラリアでの使用が多かったが、赤痢アメーバ症での使用も多く、少ないながらもトキソプラズマ肺炎での使用もみられた（表2）。さらに、熱帯病・寄生虫症の範疇に入らない偽膜性大腸炎におけるメトロニダゾール注射薬の使用も目立った。治療報告書の回収率については、本報告書をまとめた時点の集計では低値であった。なお、有害事象報告としては、トキソプラズマ症でスルファジアジンとピリメタミンを併用した1例において、下痢と抑うつ等の報告がみられたが、薬剤関連の重篤な副作用とは考えられなかった。

なお、従来の硫酸クロロキン（Nivaquine）は入手不可能となり、代わりにリン酸クロロキン（Avloclor）を輸入することになった。また、アーテスネート坐薬およびアーテメター/ルメファントリン合剤は製造段階での有効期限が短く、前者で3年、後者で2年であり、研究班が購入した

表 1. 研究班による薬剤輸入実績(2007年6月～2008年3月)

商品名	一般名	規格	輸入量
Avloclor	リン酸クロロキン	250 mg 錠剤	20 錠 x 28 箱
Primaquine	リン酸プリマキン	7.5mg 錠剤	100 錠 x 20 箱
Riamet	アーテメター/ルメファントリン合剤	20 mg/120 mg 錠剤	24 錠 x 20 箱
Plasmotrim-50	アーテスネート	50 mg 坐薬	6 個 x 20 箱
Rectocaps			
Plasmotrim-200	アーテスネート	200 mg 坐薬	6 個 x 50 箱
Rectocaps			
Flagyl IV Minibags	メトロニダゾール	500 mg/100 ml 注射薬	20 バッグ x 35 箱
Humatin	パロモマイシン	250 mg カプセル	28 カプセル x 100 箱
Sulfadiadine	スルファジアジン	500 mg 錠剤	56 錠 x 40 箱
Daraprim	ピリメタミン	25 mg 錠剤	30 錠 x 15 箱
Pentostam	スチボグルコン酸ナトリウム	10 g/100 ml 注射薬	10 本
Alinia	ニタゾキサニド	500 mg 錠剤	30 錠 x 12 箱
Berirab P	狂犬病ヒト免疫グロブリン	1500 IU/10 ml 注射薬	5 本

表 2. 研究班保管薬剤の使用実績(2007年1~12月)

使用薬剤	疾患	症例数 (のべ)	治療報告の 回収	有害事象 報告
硫酸クロロキン	三日熱マラリア	8	1	0
	卵形マラリア	1	0	0
プリマキン	三日熱マラリア	17	6	0
アトバコン/プログアニル合剤	熱帯熱マラリア	3	2	0
	三日熱マラリア	1	0	0
アーテメター/ルメファントリン合剤	熱帯熱マラリア	5	2	0
アーテスネート坐薬	熱帯熱マラリア	4	1	0
キニーネ注射薬	熱帯熱マラリア	1	0	0
メロニダゾール注射薬	赤痢アメーバ症	14	7	0
	偽膜性大腸炎	6	0	0
パロモマイシン	赤痢アメーバ症	17	2	0
	偽膜性大腸炎	1	0	0
スルファジアジン	トキソプラズマ肺炎	2	0	1*
ピリメタミン	トキソプラズマ肺炎	2	0	1*
トリクラベンダソール	肝蛭症	1	1	0
イセチオン酸プロバミジン点眼薬	アカントアメーバ角膜炎	1	0	0

\*同一症例

時点では1年程度の有効期限のものもみられた。そこで、前者については製造元の Mepha 社と交渉し、有効期限の長い製品の入手に成功したが、後者については分担研究者草野を介して製造元の Novartis 社と交渉中である。

薬剤の品質検査

パロモマイシン製剤の Humatin は医薬品品質の国際調和 (ICH) 会議で中心的役割を果たしている EU 加盟国のドイツで製造されており、国際基準での製造所査察による医薬品の製造管理及び

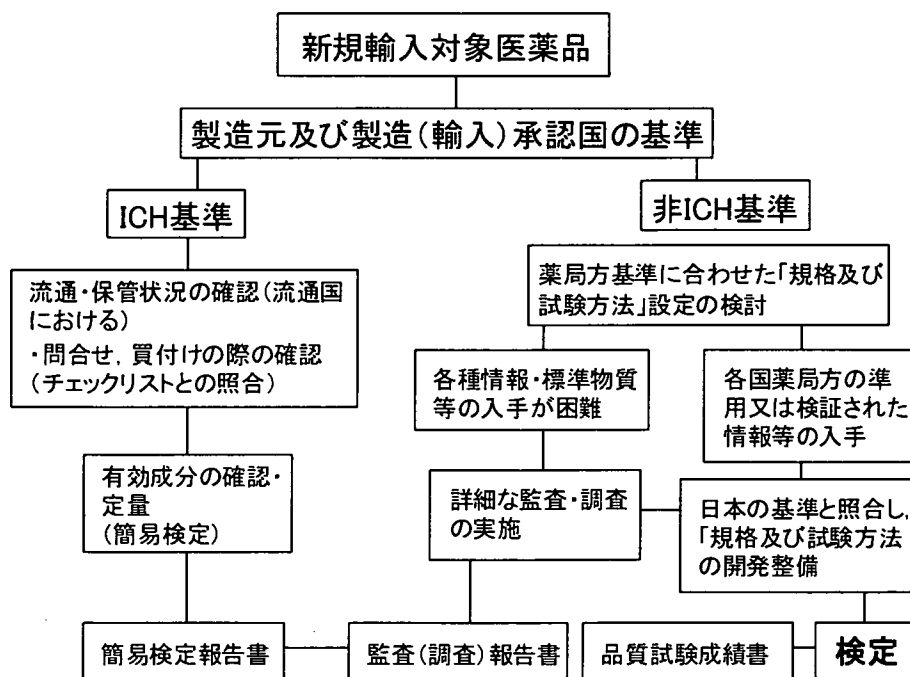


図 1. 流通医薬品の品質確保に関する提案

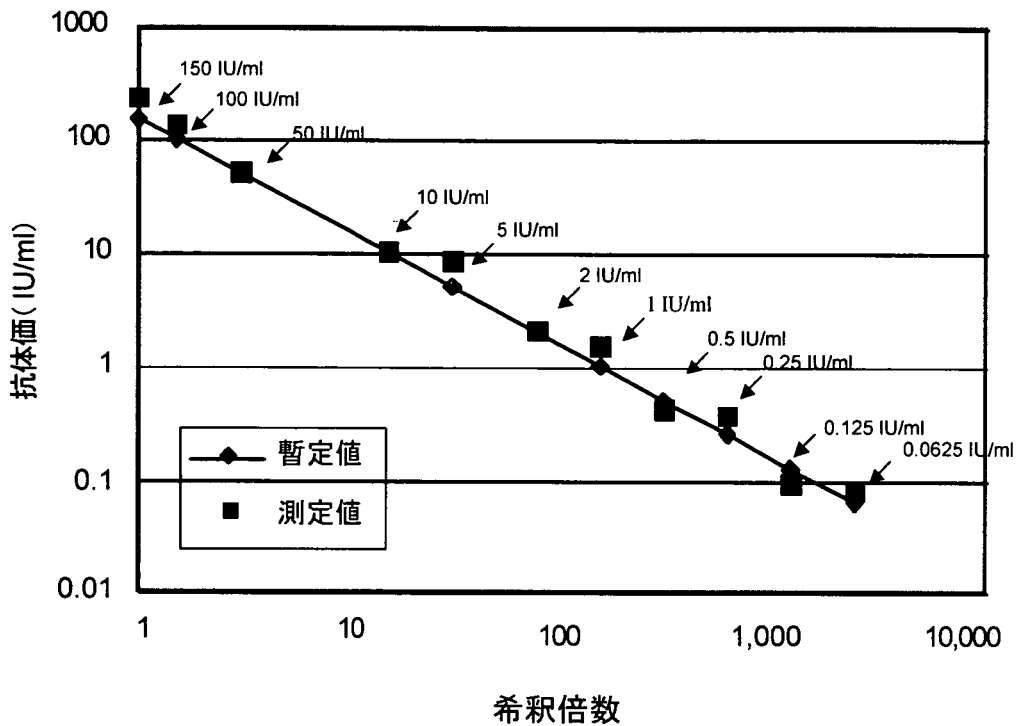


図2. Berirab Pの希釈系列における中和 抗体価

品質管理基準に適合しているものと推察した。以上のことから図1に添付した流通医薬品の品質確認に関する提案（新規輸入製剤における品質確保の基準とそのあり方に関する提案例）に基づき、簡易検定による方法を採用した。

定性的確認では NIRS 法を採用し、カプセル内容物とパロモマイシン標準物質を拡散反射測定により比較した。標準物質から得られた NIR 拡散反射スペクトルの二次微分スペクトルからパロモマイシンの化学構造に由来する9つの特徴的吸収を検出した。これに対してカプセル内容物から得られたスペクトルの二次微分スペクトルでは、6つの吸収が標準物質と一致した。スペクトルの測定波数範囲及び吸収強度についての両者の比較から、カプセル内容物はそのほとんどが主薬成分であるパロモマイシンから構成されていることが推察された。一方で、標準物質から得られたスペクトルと完全な一致性を認めないことについては、パロモマイシンが微生物産生化合物であり、製造ロットや精製操作により化学的純度に相違が生じる可能性があることから、これらの相違が NIR スペクトルに影響を与えているものと推定した。以上の結果から、再現性に影響を与えない4つの吸収を選定した定性的確認法を設定した。

UPLC/MS による定量的方法については、電子衝撃により生じる質量断片を用いて構造が酷似する類縁化合物を分離・定量する新規定量法を開発整備した。

有効期限から2年経過している狂犬病ヒト免疫グロブリン Berirab P を希釈し、暫定値として最大 150 IU/mL、最小 0.0625 IU/mL の希釈系列を11段階作成し、それぞれについて中和抗体を測定したところ、実際の抗体価はそれらの暫定値と非常に良く一致した（図2）。

#### 熱帯病・寄生虫症の治療

赤痢アメーバ症においてメトロニダゾール注射薬を使用した症例として28例を解析した。アメーバ性大腸炎単独の19例のうち、HIV陽性と判明したのが5例、イレウス、大腸穿孔、腹膜炎、DIC、MOFなどの合併症を有していたのが18例を占めた。大腸切除を行ったのが12例、メトロニダゾール経口薬の投与も行ったのが13例であった。メトロニダゾール注射薬の投与量は殆どの例で1,500 mg/日（分3）であり、期間は3日～4週間であった。アメーバ性肝膿瘍単独の6例のうち、基礎疾患を有しているものはなかったが、合併症が4例に見られた。メトロニダゾール経口薬の投与は全例で行われていた。メトロニダゾール注射

表 3. トリクラベンダゾールを使用した肝蛭症例

症例	投与開始日	年齢	性別	主な症状	治療効果	医療機関
1	11/21/02	83	M	発熱・食欲低下	著効	岐阜
2	1/21/03	64	M	発熱・心窩部痛	著効	熊本
3	1/31/03	71	F	心窩部痛	著効	鹿児島
4	1/28/03	66	M	心窩部痛	著効	長野
5	2/13/03	62	F	なし	著効	大分
6	3/26/03	56	F	心窩部痛	著効	鹿児島
7	2/3/04	82	M	発熱・咳	著効	熊本
8	2/24/04	65	M	なし	著効	長崎
9	5/13/04	65	F	発熱・季肋部痛	著効	鹿児島
10	8/9/04	72	F	なし	著効	大分
11	8/24/04	68	M	心窩部痛	著効	大分
12	10/12/04	76	M	季肋部痛	著効	鹿児島
13	5/23/05	56	F	なし	著効	島根
14	9/19/05	78	M	発熱・心窩部痛	著効	長崎
15	10/21/05	61	F	心窩部痛	著効	長野
16	10/20/05	63	F	心窩部痛	著効	大分
17	12/3/05	77	M	肝異常陰影	著効	島根
18	12/8/05	61	M	なし	著効	東京
19	2/28/06	78	M	季肋部痛	著効	京都
20	12/26/06	77	M	心窩部痛	著効	大分
21	4/6/07	71	M	肝機能障害	著効	島根
22	4/11/07	49	M	右側腹部痛	著効	東京

薬の投与量は全て 1,500 mg/日 (分 3) で、期間は 6~14 日であった。アメーバ性大腸炎と肝膿瘍を合併した 3 例のうち、2 例に基礎疾患が見られ、合併症は全てにみられた。1 例は大腸切除を受け、全例がメトロニダゾール経口薬の投与も受けた。メトロニダゾール注射薬の投与量は全て 1,500 mg/日 (分 3) で、期間は 10~14 日であった。

メトロニダゾール注射薬の効果については、アメーバ性大腸炎単独の 19 例のうち、治癒が 5 例 (26%)、軽快が 8 例 (42%)、死亡が 6 例 (32%) であった。死亡 6 例のうち 4 例については、主治医の評価として、本薬剤は赤痢アメーバ症自体に対しては有効と記載されていた。アメーバ性肝膿瘍単独の 6 例のうち、治癒が 4 例 (67%)、軽快が 2 例 (33%) であった。アメーバ性大腸炎と肝膿瘍を合併した 3 例のうち、軽快が 2 例 (67%)、死亡が 1 例 (33%) であった。死亡例については、主治医の評価として、本薬剤は赤痢アメーバ症自体に対しては大変有効と記載されていた。

メトロニダゾール注射薬の副作用として報告された症例は 9 例 (32%) であった。うち 4 例については薬剤中止後に軽減あるいは消失したので、薬剤関連と考えられたが、その 1 例目は多形

滲出性紅斑、2 例目は振戦、不眠、協調運動障害、骨髄抑制、3 例目は意識障害、4 例目は暗赤色尿、下痢と記載されていた。死亡例の死因はすべてにおいて、赤痢アメーバ症の合併症あるいは基礎疾患の悪化と考えられた。

トリクラベンダゾールを使用した肝蛭症の 22 例につき、解析を行なった (表 3)。患者が受診した医療機関の殆どは西日本であった。用法・用量としては全て 10 mg/kg を選択したが、全例が著効を示した。また、薬剤と関連する重篤な副作用はみられなかった。

また、京都府立医科大学では顕著な血小板減少、DIC を示した重症の三日熱マラリアで、抗マラリア薬としてキニーネとドキシサイクリン、支持療法としてメシル酸ガベキセート投与と血小板輸血で治癒した 1 例を経験した。

2003~2007 年の期間に研究班から供与された抗マラリア薬の使用動向では、薬剤毎の特別な傾向を見いだすのは困難であったが、毎年数例にアーテスネート製剤が使われており、また 2007 年にはアーテミシニン系薬を含むアーテメター/ルメファントリン合剤の使用が増加した (表 4)。首都圏の医療機関 5 カ所を対象とした重症マラリア

表 4. 最近数年間における抗マラリア薬の使用状況

薬剤	年				
	2003	2004	2005	2006	2007
硫酸クロロキン	19	38	21	11	9
リン酸プリマキン	20	34	25	22	17
アトバコン/プログアニル合剤	10	6	5	11	4
アーテメター/ルメファントリン合剤	1	0	1	0	5
アーテスネート(経口薬+坐薬)	4	8	6	4	4
キニーネ注射薬	2	6	5	1	1

の治療方針に関する調査では、初期治療薬としてキニーネ注射薬とアーテスネート坐薬を併用する機関が多く（3 機関）、キニーネ塩として 20 mg/kg の loading dose を使用する機関はなく、初期治療薬からスイッチする経口薬としてはメフロキン（4 機関）が多く選ばれていた。

#### 熱帯病・寄生虫症の診断

宮崎大学では 2007 年に寄生虫症検査の受託が 617 件あり、検査依頼した医療機関は 41 都道府県に上った。617 件のうち新規受付が 416 件で、その中の 168 件で寄生虫症の診断が得られた。他の検査依頼の殆どは、既に寄生虫症の診断が確定していて経過観察を目的とするものであった。依頼された検査としては免疫診断が 95%以上を占め、残りが病理組織での診断、虫体の同定であった。2007 年の診断確定例では幼虫移行症の一種であるイヌ回虫・ブタ回虫症が 91 例で最も多く、次いで肺吸虫症の 46 例であった（表 5）。臨床的検討では、幼虫移行症の症状・所見としては咳嗽、喀痰、呼吸困難、胸痛、胸部異常陰影など、胸部の異常が目立ったが、陰影から寄生虫種を推定するのは困難であった。また、2007 年の肺吸虫症症例では、関東地区に居住する外国人（中国、タイなど）で飲食店勤務の人が多く目立った。

京都府立医科大学では平成 19 年、下痢の診断のための便検体の検査依頼が 12 件あり、赤痢アメーバが 5 件、ランブル鞭毛虫が 3 件で検出された。また、蠕虫同定の依頼（17 件）では日本海裂頭条虫が多いことから（7 件）、類似の広節裂頭条虫も含めてゲノタイプ解析も行なっているが、スイスで感染したと考えられる日本人の 1 条虫症例における原因寄生虫は、スイスで多い広節裂頭条虫でなく日本海裂頭条虫と決定された。

#### 動物感染モデル

イヌ回虫卵を投与した後に無治療の群では、投与 1 週間後より眼底出血、網膜深層部の出血斑、幼虫によると思われる跛行跡などが観察され、感染モデルとして適切であることが再確認された。ABZ 投与では眼内炎症所見の改善はみられず、投薬後に新しい病変の出現もみられた。ステロイド投与では出血斑の改善には効果が高かったが、眼球内を移行する幼虫がみられ、明らかな殺虫効果はみられなかった。DEC 投与では眼内所見に改善がみられず、併用効果も観察されなかった。

一方、剖検により脳内および筋肉内幼虫数をみると、ABZ あるいは DEC の投与で脳内移行幼虫数の有意な減少がみられ、両者の併用ではその効果が特に顕著であった。

#### 抗マラリア薬開発の動向

世界レベルにおける抗マラリア薬の開発状況では、アーテミシニン系薬と他の抗マラリア薬との合剤が主流であり、アーテスネートではアモデリアキンとの合剤、クロルプログアニル・ダブソンとの合剤、ピロナリジンとの合剤、ジヒドロアーテミシニンではピペラキンとの合剤の開発が行われている。そして、これらの殆どは研究班保管薬剤であるアーテメター/ルメファントリン合剤 (Riamet) を対照薬として比較が行われていた。

#### D. 考察

今年度より新研究班となり、研究班の薬剤輸入担当者も替わったが、概ね大きな混乱もなく薬剤輸入を行なうことができた。以前の研究班の時代から既にロンドンの一薬品会社との強固な関係を樹立し、後払いにより研究費入金の前に薬剤購入が可能となり、従来の薬剤が製造中止や入手不可能となったときには、代替えの薬剤の情報が速やかに入手できる体制となっている。この様な関係を維持するため、今後新規の研究班参加申請を

表 5. 宮崎大学で寄生虫症と診断された症例の原因寄生虫

疾患	年次						
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
イヌ回虫・ブタ回虫	68	67	78	100	87	57	91
アニサキス	6	6	6	0	4	4	6
イヌ糸状虫	6	4	4	7	1	5	1
顎口虫	13	10	11	11	0	0	6
イヌ鉤虫	6	2	3	0	1	0	1
マンソン孤虫	4	8	6	5	4	3	6
有鉤囊虫	2	4	2	4	0	0	0
幼虫移行症総計	105	101	110	127	97	69	111
(%)	63.6	60.8	64.3	65.5	65.1	54.8	66.1
肺吸虫	37	36	32	45	30	37	46
肝蛭	1	1	8	5	6	2	3
日本住血吸虫	0	0	1	5	5	6	6
肝吸虫	1	3	1	1	0	0	0
糞線虫	8	21	11	11	2	1	1
回虫(成虫)	3	3	4	0	1	1	1
広節・日本海裂頭条虫	0	0	2	1	0	2	0
ヒトで成熟する寄生虫	50	64	59	68	44	49	57
(%)	30.3	38.6	34.5	35.1	29.5	38.9	33.9
計	165	166	171	194	149	126	168

する場合、今までの活動を引き継ぐことができる研究者が参加すべきである。

国内で発生する輸入熱帯病・寄生虫症の動向は絶えず変化している。以前の研究班の時代には使用薬剤の殆どは抗マラリア薬であったが、最近では赤痢アメーバ症での使用が増加しており、しかも本研究で示された如く、中等症～重症の症例が目立っている。これらの症例の一部には基礎疾患として HIV 感染症の記載があったが、他にも、個人情報に対する配慮から明示されていない HIV 感染症例が含まれると思われる。海外では HIV 感染症に伴う赤痢アメーバ症は余り大きな問題となっていないが、我が国では重症化する症例に十分な注意が必要である。本研究で示された如くメトロニダゾール注射薬の効果は高いので、医療従事者に対して、経口投与不可能な症例では遅滞なく、むしろ積極的に使用するよう啓発する必要がある。一方、メトロニダゾールなどによる急性期治療の後に投与する luminal drug (研究班ではパロモマイシンを導入) については、欧米の熱帯病教科書に書かれているのに関わらず、その必要性を示した最近の論文は見当たらない。旧研究班のときに、本薬剤の使用を HIV 感染症などの免疫不全を有する症例などに限定することにしたが、今後、その使用基準をより明確にする必要がある。

我が国の感染症発生動向調査でも、マラリア症例数は 2000 年以降は着実に減少している。その一因として、2001 年末にメフロキンが治療薬としてのみならず、予防薬としても国内で認可され、マラリアの高リスク渡航者が予防として服用するようになったことが考えられる。しかし、メフロキン耐性熱帯熱マラリア原虫は種々の流行地で確認され、日本人渡航者でも報告されており、今後さらに増加することが危惧される。本研究班は薬剤耐性の最新状況を絶えず把握し、国内で最適な治療を行なえるように準備しておく必要がある。

マラリア流行地における熱帯熱マラリアの治療薬としては、アーテミスニン系薬あるいはそれを含む合剤の評価が高まりつつある。特に、熱帯熱マラリアによる重症マラリアの治療には、従来のキニーネ注射薬に比べてアーテスネート注射薬の方が致死率低下の点で優れていることが報告された。また、本研究班で導入しているアーテスネート坐薬が、重症マラリアの初期治療として使用価値があることが示されている。本研究においても、国内でアーテミスニン系薬あるいはその合剤が少なからず使われていることが明らかとなった。しかし、渡航者のマラリアは流行地のマラリアとは異なる面もあり、キニーネ注射薬とアー

テミシニン系薬との使い分けについては、今後明確にして行く必要がある。

本研究班は我が国で初めて、狂犬病ヒト免疫グロブリンを正式に導入した。狂犬病はインドのみならず途上国に広く分布しており、感染する可能性のある日本人渡航者は多い。しかし、導入した量はわずかであることから、その有効利用も考えなければならない。今後、世界保健機関や欧米の保健機関が示している免疫グロブリンの使用基準を検討し、我が国での使用基準を確立する必要がある。また一方では、狂犬病罹患の高リスク者に対して渡航前のワクチン接種（曝露前接種）の必要性を啓発する必要がある。それでも免疫グロブリンが不足する場合、有効期限を過ぎていても力価が維持されている製品を緊急避難的に使用することも考慮すべきであろう。

寄生虫としては宮崎大学や京都府立医科大学での診断症例にみるごとく、相変わらず国内での感染例も多くみられた。なかでもイヌ回虫・ブタ回虫を中心とする幼虫移行症が多いことが注目される。これらは治療抵抗性のことが多く、重要臓器に迷入して重篤な症状を示すことがあり、動物実験も含めて治療法の進展を図る必要がある。また、アジアの国から日本に来て働き、仲間同士でサワガニなどを買って郷土料理を作って食し、肺吸虫症に罹ったと思われる症例がみられた。国内においても海外の生活習慣が持ち込まれ、それによる疾患が発生することも考えなければならない。逆に、スイスで日本海裂頭条虫に感染したと思われる症例も示された。島国日本ではあっても、今や一国だけの問題では済まされず、人、食物、生活習慣、文化などが世界中で入り交じりつつある現状のなかで、熱帯病・寄生虫症の臨床対応を適切に行なう必要がある。

本研究班では従来からホームページや「寄生虫症薬物治療の手引き」を介しての国内医療機関への支援を行い、実際の症例に関する診断や治療の相談に対応してきた。また、欧米の熱帯病・寄生虫症専門機関との交流を密にし、旅行者感染症のサーベイランスを行なっている TropNetEurop（ヨーロッパ）や GeoSentinel（国際旅行医学会）から最新情報の提供を受け、日本人渡航者の診療に生かしてきた。これらの対外的活動は今後もより積極的に行なう必要がある。また、中等症～重症

の赤痢アメーバ症に対するメトロニダゾール注射薬、肝蛭症に対するトリクラベンダゾールの優れた効果と安全性を示したように、他の導入薬剤についても日本人患者における効果と安全性の臨床的検討を行い、その成果を世界に示すとともに、国内での治療に生かすべきである。特に新規導入薬剤の場合、品質検査の面からも効果と安全性を確実にする必要がある。

## E. 結論

輸入感染症や寄生虫症の疫学、薬剤耐性、診断や治療の方法などは時とともに変化しており、本研究班にも柔軟かつ適切な対応が求められている。本研究班での臨床経験を蓄積し、欧米の関連機関からの情報提供も受け、我が国においてこれらの疾患の治療が最先端のレベルで行なえるようにする必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Kimura M, Nakamura T, Nawa Y. Experience with intravenous metronidazole to treat moderate-to-severe amebiasis in Japan. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:381-385.
- 木村幹男, 高崎智彦, 狩野繁之. 特集 感染症の新しい検査法と最近のトピックス. II. 各論. マラリア, デング熱. *小児科診療* 2008;71:137-144.
- Maeda T, Yamada H, Akao H, Iga M, Endo T, Koibuchi T, Nakamura T, Odawara T, Iwamoto A, Fujii T. Unusual radiological findings of *Fasciola hepatica* infection with huge cystic and multilocular lesions. *Intern Med* 2008;47:449-452.
- 小田原隆. 海外で罹る危険性のある感染症 ③ マラリア. *公衆衛生* 2007;71:561-565.
- Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int* 2007;56:87-93.
- 太田伸生. 駆虫薬-小児の寄生虫駆除の問題点-. *小児科臨床* 2007;60:2367-2372.
- Arizono N, Nakanihshi K, Horii T, Tanabe K. Progress in the molecular biology of malaria and the immunology of nematode infections. *Trends Parasitol* 2007;23:175-181.

- Inoue K, Kanemasa H, Inoue K, Matsumoto M, Kajita Y, Mitsufuji S, Kataoka K, Okanoue T, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Arizono N. Obstructive jaundice with fever and eosinophilia. *Gut* 2007;56:1542 & 1571.
  - Arizono N, Fukumoto S, Tademoto S, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Kuramochi T. Diplogonoporiosis in Japan: Genetic analyses of five clinical isolates. *Parasitol Int* 2007 (5 ページ, online 出版)
  - 丸山治彦. 巨大寄生虫が宿主から排除される仕組み. 「生体防御医学事典」, 鈴木和男監修, pp. 28-32, 朝倉書店 (2007)
  - Maruyama H, Nawa Y. Immunology of the Infection. In: 'Food-Borne Parasitic Zoonoses' World Class Parasites, Vol. 11, (Murrell, K. Darwin; Fried, Bernard Eds.), pp. 337-381, Springer Science, Newark (2007)
  - 丸山治彦. 幼虫移行症. 「今日の治療指針 2008」, 朝倉書店 (2007)
  - 丸山治彦, 名和行文. 肺吸虫 (特集 呼吸器と寄生虫), 日本胸部臨床 2007;66:269-275.
  - 丸山治彦. 寄生虫疾患と好酸球・好塩基球 (今月の主題 白血球). 臨床検査 2007;51:1047-1052.
  - 奥村さやか, 成澤恵理子, 藤田明, 丸山治彦. 感染から発症まで長期を要し, 胸水からの虫卵検出で診断されたウエステルマン肺吸虫症の 1 例. *Clinical Parasitology* 2007;18:35-37.
  - Yamauchi-Kawaura C, Watanabe H, Nishimaki A, Maruyama H, Yoshida A, Ohta N. Goblet cell hyperplasia elicited by infection with an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*, is not protective against goblet cell-sensitive *Nippostrongylus brasiliensis* in mice. *Nagoya Medical Journal* 2007.
  - Sakamoto T, Hiyama Y. Rapid method for determining of nitazoxanide in tablets using reversed-phase ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and high-performance liquid chromatography, *Pharmazie*, in press.
2. 学会発表
- Kimura M, Nakamura T, Nawa Y. Recent experiences of the Japanese research group that enables the use of unlicensed medicines for treating tropical and parasitic diseases. 10th Conference of the International Society of Travel Medicine, Vancouver, 2007.
  - Haruki K, Kimura M. Country in Focus Session. Japan - What would you like to enjoy eating in Japan? Sushi, Sashimi, or bear meat? 7th Asia Pacific Travel Health Conference, Melbourne, 2008.
  - 遠藤宗臣, 藤井毅, 小田原隆, 木村幹男, 名和行文, 中村哲也, 岩本愛吉. 希少病治療薬を用いた日本におけるマラリア治療の現状. 第 81 回日本感染症学会総会, 2007 年.
  - 前田卓哉, 藤井毅, 小田原隆, 岩本愛吉, 赤尾信明. 移動する肝囊胞性病変を呈し、無症状で経過した肝蛭症の一例. 第 18 回日本臨床寄生虫学会, 2007 年.
  - 有菌直樹, 福本宗嗣, 蓼本早百合, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也. 大複殖門条虫 4 症例の遺伝子解析. 第 76 回日本寄生虫学会, 2007 年.
  - 阪上順一, 谷口浩也, 片岡慶正, 長谷川弘人, 鈴木教久, 信田みすみ, 馬場武彦, 土佐正俊, 泰井敦子, 十亀義生, 保田宏明, 光藤章二, 岡上 武, 山田 稔, 有菌直樹. カプセル内視鏡を用いた小腸寄生虫診断の試み. 第 18 回日本臨床寄生虫学会, 2007 年.
  - 清水博之, 川勝秀一, 清水恒広, 有菌直樹, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也. スイスで感染した日本海裂頭条虫症の一例. 第 18 回日本臨床寄生虫学会, 2007 年.
  - 大野博司, 土井朝子, 有菌直樹, 山田 稔, 内川隆一, 手越達也. 著名な血小板減少、播種性血管内凝固をきたした三日熱マラリアのケース. 第 63 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2007 年.
  - Yoshida T, Tanaka M, Syafruddin D, Yamada M, Arizono N, Tokoro M. Genotyping of *Cyclospora cayentanensis*: an assessment of zoonosis potential. 2007 Open Science Meeting, Indonesia, 2007.
  - 米田頼晃, 城井啓, 廣瀬哲, 西浦亮子, 木下輝樹, 大浦元, 高木地孝, 山田哲, 石井望人, 西尾福真理子, 守屋圭, 福井博, 丸山治彦, 吉



川正英. イヌ回虫幼虫 ES 抗原に対して高い抗体価を示した幼虫移行症の一例 - ウシ生肝を食した焼鳥店勤務者のケース -. 日本臨床寄生虫学会, 2007 年.

- ・ 奥村さやか, 成澤恵理子, 藤田明, 丸山治彦. 感染から発症まで長期を要し、胸水からの虫卵検出で診断されたウエステルマン肺吸虫症の一例. 日本臨床寄生虫学会, 2007 年.
- ・ 丸山治彦. 寄生虫病の皮膚病変. 第 59 回日本皮膚科学会西部支部学術大会, 2007 年.
- ・ Doanh PN, Yoshida A, Horii Y, Nawa Y, Maruyama H. Serological determination of the causative species of human paragonimiasis in Vietnam. 13th Japan-Korea Parasitologists' Seminar (Forum Cheju), Korea, 2007.
- ・

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

塩基配列登録 (DDBJ)

*Diplogonoporus grandis*

18S rDNA: AB353272

ITS1: AB298510 - AB298514

cox1: AB298515 - AB298519

nd3: AB298520 - AB298522

## 西洋ハーブ及び新一般用漢方処方構成生薬の品質確保 と評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部  
研究者 合田 幸広

研究要旨 西洋ハーブの品質確保と評価を目的として、ブラックコホッシュ、チェストツリー、イチョウ葉の確認試験法、分析試験法等について検討するとともに各種製品分析を行った。また、刺五加、ガジュツ、車前子に関し遺伝子情報による基原種鑑定法等を検討した。

### 分担研究者

- (1) (株) ツムラ生薬研究部 近藤 健児
- (2) 三栄源エフ・エフ・アイ(株)品質保証部  
検査課 荒川史博
- (3) アサヒビール未来技術研究所 庄司俊彦
- (4) (株) 栃本天海堂品質管理部 山本 豊
- (5) (株) ウチダ和漢薬研究開発部 藤田正雄
- (6) (株) 島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス研究所 西村直行
- (5) 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野教授 水上 元
- (6) 富山大学和漢医薬学総合研究所資源開発研究部門生薬資源科学分野教授 小松かつ子
- (7) 国立医薬品食品衛生研究所生薬部室長 袴塚高志
- (8) エスエス製薬株式会社ライフサイエンスインスティテュート製剤研究部製剤二課 井藤正人
- (9) 興和株式会社富士研究所 稲木俊男
- (10) 佐藤製薬株式会社製剤研究部分析研究課 長沢泰司
- (11) ゼリア新薬工業株式会社中央研究所コンシューマヘルスケア研究部 小林正治郎
- (12) 大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所分析研究室 日向野太郎
- (13) 湧永製薬株式会社ヘルスケア研究所分析科学研究室 市河 誠
- (14) 麻布大学獣医学部准教授 森田英利

### A. 研究目的

本研究は、一般用医薬品承認審査合理化等検討会の中間報告に対応し、欧州で医薬品として実績のある西洋ハーブについて、諸外国の承認規格を参考にしつつ、現代の科学水準に基づき、分析化学的、植物化学的に評価並びに品質規格に関し検討を行う。また、新一般用漢方処方構成生薬では、生薬の特性を考

慮しながら、遺伝子情報を利用した生薬の基原種鑑別法を開発し、医薬品である生薬の品質確保のための純度試験法、確認試験法等に応用することを目的として行う。このように、本研究は西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究と新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究に二分される。前者の研究は、既に通知（「外国において一般用医薬品として汎用されている生薬製剤を一般用医薬品として製造販売承認申請する際の取扱について」（薬食審査発第 0322001 号平成 19 年 3 月 22 日）に基づき承認申請がスタートした西洋ハーブ類並びに本通知に基づき今後承認申請が為される可能性のある西洋ハーブ類について品質確保を目的として行われるものである。また、後者の研究は、最終的に、本研究で確立された方法について日本薬局方等公的な試験法への応用まで視野にいたったものである。

### B. 研究方法

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

#### B-1 チェストツリー

材料 チェストツリー6 製品（食品）はインターネット経由で購入した。生薬蔓荊子は、ウチダ和漢薬、栃本天海堂及び大晃生薬より購入した。また、欧州において一般用医薬品として流通するチェストツリー7 製品は現地の薬局で購入したものをを用いた。さらに、チェストツリー及びその近縁植物 6 種（ニンジンボク、タイワンニンジンボク、ハマゴウ、シロバナハマゴウ、ミツバハマゴウ及びヤエヤマハマゴウ）の葉あるいは果実は独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部飯田修氏より提供を受けた。

#### TLC による確認試験

植物原体粉末、乾燥エキス粉末、生薬粉末あるいは粉碎した錠剤の一定量にメタノール

を加え、超音波下で抽出し、濃縮・乾固させた後、再びメタノールに溶解して（推奨）1日最大摂取量の1/750が4 $\mu$ L中に含まれるように試料濃度を調製し、その4 $\mu$ LをTLC分析に供した。液状製品の場合は、メタノールで希釈することにより固形試料と同様の濃度に調製して分析した。HPLCによる成分分析

TLC分析に供した試料を0.22 $\mu$ m孔のPVDF膜でろ過した後に逆相HPLCで分離し、258nmの検出波長において観察した。移動相としてMeOH及び0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を用い、グラジエント条件で分離を行った。

#### 遺伝子配列の解析

チェストツリー及びその近縁植物の葉あるいは果実を磨砕し、Qiagen社のDNeasy Plant Mini Kitを用いてDNA抽出を行った。このDNA溶液を鋳型に、核ゲノムリボソームRNAのITS領域及び葉緑体DNAのtrnK領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、その増幅断片の遺伝子配列をダイレクトシーケンシング法により決定した。

#### PCR-RFLP法による遺伝子鑑定法

チェストツリー及びその近縁植物遺伝子のITS1領域の一部を、ITS-S1: GGCGAGCGTGCTCC (5' → 3') 及び ITS-AS1: CGATGCGAGAGCCGAGATをプライマーとして増幅し、その遺伝子断片をMontage-PCRにより精製した後、その一定量を制限酵素 *Bbe* I により消化した。この反応液を3%アガロースゲル電気泳動により分離した後、SYBR Gold染色を施して紫外線照射下に観察した。また、trnK領域の一部を、trnK-S1: CTTACTAGAATACCTTGTTTTGG 及び matK-AS1: GATATGATTTGAGAATACAAATTC により増幅し、その遺伝子断片の一定量を制限酵素 *Bgl* II により消化し、上記と同様にバンドパターンを観察した。

#### B-2 ブラックコホシュ

##### 材料

ブラックコホシュ6製品（食品）をインターネット経由で購入した。また、医薬品候補についても試料を入手した。

##### TLCによる確認試験

植物原体粉末、乾燥エキス粉末あるいは粉砕した錠剤の一定量に50%メタノールを加えて還流抽出し、抽出液をメタノールで希釈して推奨1日最大摂取量の1/1000が17 $\mu$ L中に含まれるように試料濃度を調製し、その17 $\mu$ LをTLC分析に供した。液状製品の場合は、メタノールで希釈することにより固形試料と同様の濃度に調製して分析した。

#### HPLCによる成分分析

植物原体粉末、乾燥エキス粉末、あるいは粉砕した錠剤の一定量にメタノールを加え、超音波下で抽出し、これにメタノールを加えてTLC分析の試料と同様の濃度に調製し、0.22 $\mu$ mのPVDF膜でろ過した後に分析に供した。逆相HPLCで分離し、ELSDを検出器として観察した。移動相として1% Formic acid 及び Acetonitrile を用い、グラジエント条件で分離を行った。

#### *Lactobacillus reuteri* の培養及びブラックコホシュエキス処理

*L. reuteri* (JCM1112株)は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより購入した。嫌気性雰囲気下、MRS培地(Oxoid社、0.05% L-cysteine、pH5.5)で一晩培養した。*L. reuteri*を100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)で洗浄した後、MRS培地(pH7.0)に戻し、そこにフィルター滅菌したブラックコホシュエキスの水溶液(最終濃度10mg/ml)を加え、37°Cでさらに培養した。対照試料はMRS培地(pH7.0)に戻した後に滅菌水を加えたものとした。ブラックコホシュ処理細胞及び対照細胞を5分、15分及び60分培養した後収穫した。収穫した菌体からRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてtotal RNA抽出を行った。抽出したRNAの品質はAgilent 2100 バイオアナライザによりチェックした。

#### マイクロアレイ解析

*L. reuteri*の全ゲノム配列情報(全長2,039,414 bp、1,820 ORF)を元に、ジーンフロンティア社が設計作成したマイクロアレイを利用して、ブラックコホシュエキス処理を施した*L. reuteri*における遺伝子発現変動を解析した。ブラックコホシュ処理細胞等から調製したtotal RNAサンプルより2本鎖cDNAを合成し、これを鋳型にCy3標識ランダムプライマーによる増幅を行い、マイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた。これを洗浄した後に蛍光信号のスキャンを行い、発現データを取得した。データの解析は解析ソフト「Nandemo Analysis」を用いて行った。

#### B-3 イチヨウ葉

##### 材料

イチヨウ葉6製品（食品）をインターネット経由で購入した。このうち1製品はイチヨウ葉をそのままフリーズドライしたものであった。また、ドイツで一般用医薬品として流

通している 1 製品を現地で購入して用いた。

#### TLC による確認試験

乾燥エキス粉末あるいは粉碎した錠剤の一定量をメタノール中で振とう抽出した。植物原体粉末は、メタノール中で還流抽出した。製品中のイチョウ葉エキスの含有量を基準として、エキス 0.05mg に相当する量が 5  $\mu$ L 中に含まれるように試料濃度を調製したものを分析した。

<新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究>

#### B-4 刺五加

刺五加は極東アジアで強壮薬として用いられている民間薬で、近年健康食品としての需要が増えている。これまでの研究で、市場に流通する刺五加には、正品である *Eleutherococcus senticosus* (エゾウコギ) の他に、*E. sessiliflorus* (マンシュウウコギ) などの近縁植物を基原とするものが存在していることが、明らかになっている。そこで、今年度は、核 rDNA, ITS1 領域の塩基配列の違いを利用した PCR-RFLP 法による純度試験法の検討を行った。また、*E. senticosus* には *trnK* 遺伝子に多型性が見られることが、明らかになっていることから、主産地の中国黒龍江省で本格的な調査を実施し、遺伝子多型と産地との関連を検討した。また、*E. sessiliflorus* も含めて、薬理作用が報告されている eleutherosides B、E 及び isofraxidin の含量を根茎と茎で定量し、種、部位及び産地による成分含量の差異を調べた。

#### 1) PCR-RFLP 法による純度試験法の検討

実験材料には、昨年度までの塩基配列解析から、エゾウコギ (type 1) 及びマンシュウウコギ類 (type 2) と判断された試料各 4 個体を選んだ。

各試料をナイフで細かく削った後、25 mL 容のステンレス製粉碎ジャー (Retsch) に入れ、粉碎器 MM-300 (Qiagen) で粉末化した。粉末は、ディスポのメッシュクロス (目開き 305  $\mu$ m: JP15 中末相当; 東京スクリーン) を通し、粒子径を揃えた。各粉末を 95% type 1、5% type 2 となるように混合し、シーソーシェーカー上で終夜攪拌した。各 100% 同一個体試料及び混合試料 20 mg を量り取り、SNET buffer (20 mM Tris/HCl pH8.0, 5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS, 200  $\mu$ g/mL Proteinase K) 400  $\mu$ L を加えた。このものを、55°C、1 時間、インキュベーションし、続いて、95°C、5 分間加温し、Proteinase K を失活させた。遠心

後、上清を取り、これを DNA 試料溶液とした。このもの 1  $\mu$ L を鋳型とし、Nova Taq Hot Start DNA polymerase (Merck)、AmpDirect Plus (Shimadzu) を用いて、PCR を行い、目的の核 DNA, ITS1 領域を含む、約 300 bp の DNA 断片を増幅した。PCR は、各プライマー濃度 0.5  $\mu$ M、PCR 酵素 1.25 unit を用い、全量 50  $\mu$ L の系で、以下の温度プログラムに従って行った: 95°C 10 min; 95°C 15 sec, 60°C 15 sec, 72°C 30 sec, 40 cycle; 72°C 7 min。Montage-PCR (Millipore) により、PCR 産物を約 15  $\mu$ L に濃縮、精製後、*Nco*I (New England BioLabs) による制限酵素処理に供した。

制限酵素処理は、以下のように行った: PCR 産物 400 ng、制限酵素 10 unit、酵素に添付の 1 x 反応緩衝液からなる全量 15  $\mu$ L の反応液を調製し、37°C 1 hr のインキュベーションの後、72°C 10 min 加温し、酵素を失活させた。制限酵素処理断片の解析は、4% アガロースゲル電気泳動 (100V、20 min) により行った。DNA 断片の発色は、SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) あるいは、GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Wako) を用い、シーソーシェーカー上で、30-60 min の浸出により行った。

#### 2) 葉緑体 DNA, *trnK* 遺伝子領域の配列解析

全塩基配列の決定は次の材料で行った。*E. senticosus* エゾウコギ 90 検体 (中国吉林 4、黒龍江 74、遼寧 1; ロシア 4; 日本 7)、*E. sessiliflorus* マンシュウウコギ 18 検体 (吉林 3、黒龍江 11; カナダ 1; 日本 3)、日本産同属植物 4 種 7 検体、刺五加市場品 41 検体 (黒龍江 27、吉林 7、遼寧 1; 日本 3; 産地不明 3)。各検体の葉または根茎から全 DNA を抽出し、*trnK* 遺伝子領域を 2 分割または 4 分割して、PCR 法で増幅した。PCR 産物を精製後、塩基配列を決定し、比較した (2005 年度の報告書参照)。

#### 3) LC/PDA 分析

実験材料には、下記の各試料を用いた。*E. senticosus* 36 検体 (吉林 5、黒龍江 30、遼寧 1)、*E. sessiliflorus* 7 検体 (吉林 3、黒龍江 4)、市場品 5 検体、健康食品 4 検体。

各検体の粉末約 500 mg を 50%MeOH 20 mL で抽出し、HPLC 法 (2005 年度の報告書参照) で分析した。

#### B-5 ガジュツ

これまでの研究で、日本に流通するガジュツには、*Crucuma phaeocaulis* Val. に由来す

る四川省産、主として *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang (gl タイプ) でその他多様な *trnK* 遺伝子の塩基配列を示す個体が混入する広西壮族自治区産、及び *C. zedoaria* Rosc. に由来する日本産があった。これらのうち四川省産である *C. phaeocaulis* の根茎メタノールエキスは、アジュバント関節炎モデルマウスを用いた実験で抗炎症作用を示すことを報告した。今回、抗炎症作用を COX-2 阻害活性で調べる *in vitro* の実験系を用いて、活性成分を明らかにした。また、活性成分によるガジュツの品質評価を行った。

実験材料としては、*C. phaeocaulis* の根茎に由来する中国四川省産ガジュツ 4 検体、*C. zedoaria* に由来する日本産ガジュツ 4 検体を用いた。GC-MS、LC/MS 分析には、それぞれ島津 QP-5000GC-MS、島津 LCMS-IT-TOF を用いた。COX-2 阻害活性試験は、以下のように行った。検体 20 g にメタノール 50 mL を加え、3 時間加熱環流し、同様の操作を 3 回繰り返した。抽出液を合わせ、溶媒を留去してメタノールエキスを得た。このエキス 500 mg にヘキサン 25 mL、メタノール 20 mL を加え、分配抽出して、ヘキサン画分とメタノール画分を得た。メタノールエキス、ヘキサン画分及びメタノール画分について、Cayman 社製 Colorimetric COX Inhibitor Screening Assay キットを用いて活性を測定した。

#### B-3. 車前子

車前子は日本薬局方ではオオバコ科のオオバコ (*Plantago asiatica*) の種子であると規定されている。一方、中華人民共和国薬典では、オオバコに加えてムジナオオバコ (*P. depressa*) も基原植物として規定しているほか、セイヨウオオバコ *P. major*、エナガオオバコ (*P. hostifolia*)、*P. erosa* を基原とする生薬も市場に流通しているとされている。

昨年度の研究において、各種オオバコ属植物の標本についてリボゾーム遺伝子の ITS 領域の塩基配列を解読し、その配列がいくつかのタイプに分かれること、配列タイプに基づいて種の同定が可能であることを明らかにした。さらに、この DNA 鑑別法を市場で入手した車前草に適用し、有用性を示した (Sahin et al. 2007)。

そこで、本年度は生薬としてより重要な車前子に本法が適用可能であるかどうかを検討した。

実験材料は、日本生薬連合会より提供された中国市場入手品を使用した。

#### 1) 核 rDNA, ITS 領域の増幅と塩基配列の決定

各検体より調製した genomic DNA を鋳型に用い、18S-rDNA の 3' -側、ITS1、5.8S rDNA、ITS2、28S rDNA の 5' -側末端を含む約 600bp の大きさからなる領域を PCR で増幅した。実際には、内部プライマーを用いて ITS1 と 5.8S rDNA の 3' -側を含む断片と 5.8S rDNA の 5' -側を含む断片にわけて増幅し、それらの配列を重ね合わせた。得られた PCR 産物は、ExoSAP-IT (GE Healthcare Bio-Sciences) で処理後、Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare Bio-Science) でシーケンス反応を行い、DSQ-2000L (Shimadzu) を用いて塩基配列を解読した。

(倫理面への配慮) 本研究では、ヒト由来サンプル及び実験動物を使用していないため、該当する事由はないと考える。

#### C. 研究結果

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

##### C-1 チェストツリー

##### TLC による確認試験

日本で健康食品として流通するチェストツリー 2 製品及び欧州で一般用医薬品として流通する 7 製品を対象として、(推奨) 一日最大摂取量を基準に標準化して試料を調製し、American Herbal Pharmacopoeia (AHP) のモノグラフを参考にして親水性フラボノイド化合物を標的とした TLC 分析を行った。成分スポットのパターンはいずれの製品も非常に良く似ていたが、成分含量には著しい差異が観察された。また、チェストツリーの近縁植物であるハマゴウあるいはミツバハマゴウを基原とする生薬蔓荊子との成分比較を行ったところ、AHP の分析条件ではチェストツリーと蔓荊子の成分を見分けることができなかった。

##### HPLC による成分分析

TLC 分析に供した試料と同じものを対象として、AHP の条件を参考にして主に親水性フラボノイド化合物及びイリドイド化合物を標的とした HPLC 分析を行った。いずれの製品も全体的なピークプロファイルは良く似ていたが、UV 258nm での吸収パターンを精査すると、大きく 3 つにグループ分けすることが可能であった。本邦健康商品 6 製品と欧州一般薬 7 製品はほぼ偏りなく 3 つのグループに振り分けられた。主要な成分ピークの面積を比較したところ、欧州一般用医薬品のうち 6 製品は

ほぼ同等の成分含量を示し、1 製品がその約 10 倍の成分含量を有していた。さらに、日本の健康食品のうち 2 製品は、欧州一般薬 6 製品の約 100 倍に達する含量を示した。チェストツリーと蔓荊子の識別は HPLC をもってしても困難であった。

#### PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定

チェストツリー及びその近縁植物 6 種について、分子系統学的鑑定に良く利用される核ゲノムリボソーム RNA の ITS 領域及び葉緑体 DNA の trnK 領域の配列を決定した。それぞれの領域にチェストツリー特異的な変異部位が見出され、*Bbe* I 及び *Bgl* II の制限酵素認識配列と重複していたため、PCR-RFLP 法による遺伝子鑑定法を確立した。本 PCR-RFLP 法は蔓荊子の基原植物であるハマゴウ及びミツバハマゴウとチェストツリーを明確に識別し、成分分析では見分けが困難であったチェストツリーと蔓荊子を簡便に鑑別することが可能となった。

#### C-2 ブラックコホシュ

##### TLC による確認試験

日本で健康食品として流通するブラックコホシュ 6 製品を対象として、推奨一日最大摂取量を基準に標準化して試料を調製し、Pharmaeuropa vol. 14 No. 2 (2002) 及び AHP モノグラフを参考にしてトリテルペン配糖体を標的とした TLC 分析を行った。アニスアルデヒド-硫酸試薬により配糖体を発色させつつ観察したところ、3 製品に指標成分であるトリテルペン配糖体 Actein 及び 27-Deoxyactein のスポットが明確に観察された。他の 1 製品にも Rf 値の近いスポットが観察されたが、二次元 TLC の結果も合わせて、Actein 及び 27-Deoxyactein とは異なる成分であると結論された。また、残りの 2 製品には、Actein 及び 27-Deoxyactein に限らず、目立ったスポットがほとんど検出されなかった。

##### HPLC による成分分析

TLC 分析に供した試料と同じものを対象として、AHP のモノグラフ等を参考にして、HPLC による成分分析を行った。主要成分であるトリテルペン配糖体は紫外線吸収が弱く、Photo Diode Array (PDA) 検出器では観察することが困難であったが、蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattered Detector: ELS D) により感度よく検出することができた。TLC で Actein 及び 27-Deoxyactein のスポットが観察された 3 製品については HPLC-ELSD でもピークが明確に観察され、さらに TLC に

いてスポットが観察されなかった 1 製品についても、前述の 3 製品の 1/10 程度の Actein 及び 27-Deoxyactein が観察された。Rf 値の異なるスポットを有する 1 製品については、HPLC においても成分パターンの異なることが示された。また、残りの 1 製品については、HPLC の検出感度においても目立ったピークは観察されなかった。

#### 腸内細菌 *Lactobacillus reuteri* に対する影響

*L. reuteri* はヒト腸内に常在するいわゆる善玉菌であり、その全 ORFs をカバーする 1,866 遺伝子を搭載したマイクロアレイを用い、ブラックコホシュエキスの遺伝子発現に及ぼす影響について解析した。投与後 5 分、15 分及び 60 分において有意水準 0.05 以下の動きを見せる遺伝子は 597 個、820 個及び 866 個であり、そのうち対照試料の 2 倍以上に発現が上昇するものは、0 個、8 個及び 16 個観察され、また、1/2 以下に発現が抑制されるものは、5 個、17 個及び 57 個観察された。このうち、糖代謝に関与する sucrose phosphorylase、gluconate transporter、 $\alpha$ -galactosidase 等の遺伝子発現が投与初期 (5~15 分) に上昇していた。また、プリン塩基合成に関与する phosphoribosylformylglycinamide synthase、phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase、phosphoribosylglycinamide formyltransferase 等の一連の酵素の発現が投与初期 (5~15 分) に抑制され、60 分後には定常状態に戻るのに対し、ピリミジン塩基合成に関与する uracil transporter、cytosine transporter、orotate phosphoribosyltransferase、dihydroorotate dehydrogenase 等のタンパク質の遺伝子発現が投与初期 (5~15 分) にはほとんど動きを見せず、60 分後に揃って上昇していることが特徴的であった。さらに、いくつかのリボソーム遺伝子 (50S ribosomal protein L33、30S ribosomal protein S19 及び 50S ribosomal protein L15) の発現が投与初期 (5~15 分) に上昇し、その他の多くのリボソーム遺伝子 (30S ribosomal protein S15、50S ribosomal protein L34、30S ribosomal protein S18 等) の発現が投与後 60 分に下降することが特徴的であった。また、*L. reuteri* は低分子の抗生物質ロイテリンを glycerol より生産するが、ブラックコホシュはロイテリン生合成遺伝子に対して影響を及ぼさなかった。

#### C-3 イチョウ葉

## TLCによる確認試験

日本で健康食品として流通するイチヨウ葉 6 製品及びドイツで一般用医薬品として流通するイチヨウ葉を対象として、AHP のモノグラフ等を参考にして、主にフラボノイドを標的とした TLC 分析を行った。すべてのサンプルに標準品のルチン及びクロロゲン酸のスポットが観察された。基本的にすべての試料の TLC パターンは類似していたが、健康食品 6 製品はドイツ一般用医薬品の成分パターンと近い 2 製品とその他の 4 製品に分類することができた。イチヨウ葉をフリーズドライした製品は後者に属したが、他の製品と異なるスポットがいくつか観察された。テルペンラクトンを標的とした TLC 分析においても同様の結果が得られた。

<新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究>

### C-4 刺五加

#### 1) PCR-RFLP 法による純度試験法の検討

各試料からの PCR 産物の収量を DNA 濃度で示したところ 100% 同一個体の試料では、収量は、55.3-87.7 ng/μL の範囲であり、平均 70.6 ng/μL であった。一部の資料は、明らかな低収量を示し、また混合試料の結果は、同一個体試料の収量から予想されるものと一致した。

次に、各混合試料からの PCR 産物を制限酵素処理し、ゲル電気泳動を行ったところ、約 300 bp に未消化の DNA 断片が認められるものの、いずれの試料においてもその量は、約 150 bp に認められる制限酵素処理断片の量と比べると、ごくわずかであり、制限酵素反応に供した 400 ng の DNA 断片の大部分は、消化されていることが確認出来た。従って、少なくとも 5% のマンシュウウコギ類が混入した刺五加市場品を本試験法により検出出来ることが確認された。

電気泳動における蛍光核酸発色試薬別の比較では、SYBR Gold が、最も検出感度に優れていた。ただし、GelRed においても、全ての混合試料で、制限酵素処理断片を検出しており、使用可能であった。なお、GelRed は、先染め法の適用が可能であるとされているが、本分析法では、ゲルへ負荷する DNA 量が多いため、バンドパターンが乱れ、先染め法の適用は困難であった。エチジウムブロマイドを使用する場合には、制限酵素処理に供する PCR 産物の量を増やし、また電気泳動の際の well 幅を小さくするなどの工夫を要し、試験

法への利用に際しては、さらなる条件検討が必要であることが判明した。

#### 2) 葉緑体 DNA, *trnK* 遺伝子領域の配列解析

*E. senticosus* の *trnK* 遺伝子の塩基配列は 2563 bp または 2576 bp、他種では 2563 bp で、*matK* 遺伝子領域は全て 1518 bp であった。*E. senticosus* は同種由来の市場品を含め、種内多型が顕著であり、19 箇所の塩基置換と 1 箇所の挿入が認められ、15 タイプの遺伝子型が存在した。ただし、最節約法で構築した系統樹では、*E. senticosus* は独立したクレードを形成した。さらに、1001 番目の塩基がともに Guanine (G) であるタイプ VII と VIII、1013 番目の G と 2352 番目からの 13 塩基の挿入が共通したタイプ X と XI、1472 番目と 1555 番目が Thymine (T) であったタイプ XII~XV でそれぞれサブクレードを形成した。主産地の黒龍江省においては 12 タイプの遺伝子型が認められ、タイプ I 及び II は広範囲に、タイプ III 及び VI は中央部、タイプ VII と VIII は西北部、タイプ X は北部、タイプ XIV は東部に分布している傾向があった。一方、*E. sessiliflorus* の遺伝子型は 2 タイプのみで、*E. senticosus* との間に 10 箇所の塩基置換が認められた。したがって、これらの位置の塩基配列を決定することにより、2 種を区別することが可能であった。

#### 3) LC/PDA 分析

Eleutheroside B が *E. senticosus* の基部近くの根茎に 0.01 % 以上、多いものでは 0.25 % 検出されたのに対し、*E. sessiliflorus* の根茎からは検出されなかった。一方、eleutheroside E はそれぞれの種に 0.01-0.13 %、0.01-0.07 % 検出された。産地別には、吉林省、黒龍江省の北安、海倫、綏化産の *E. senticosus* の根茎に 2 成分が 0.05 % 以上含有されていた。Isofraxidin は、大多数の検体の基部近くの根茎から検出され、黒龍江省海倫産で高い傾向を示したが、その他では微量もしくは検出限界以下であった。一方、*E. sessiliflorus* からは検出されなかった。*E. senticosus* では茎にも eleutherosides B、E、さらに黒龍江省産の検体では isofraxidin も検出され、吉林省産の検体で eleutheroside E が 0.05-0.08 % を示した。ただし、全般に根茎の含量より少なかった。

刺五加を原料とする健康食品 4 検体中 1 検体、刺五加市場品 4 検体中 2 検体に eleutheroside B 及び isofraxidin が検出されなかったことから、これらについて 2006

年度に報告した制限酵素 *Ase I* を用いる PCR-RFLP 法を行った結果、*E. senticosus* でないことが確認された。

#### C-5 ガジュツ

*C. phaeocaulis* 由来ガジュツのヘキササン画分に強い COX-2 阻害活性が認められた。GC-MS 及び LC-MS による分析から、主要成分として curzerenone、furanodienone 及び curcumenol を同定した。さらに、LC-MS 分析により得られた TIC と COX-2 阻害活性から主成分回帰分析を行い、活性成分は furanodienone と curcumenol であることを明らかにした。2 成分の COX-2 阻害活性の IC<sub>50</sub> 値は、furanodienone が 4.55 μM、curcumenol が 34.52 μM であった。また、COX-1 阻害活性の IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 52.62 μM、159.89 μM であり、両者の比 [IC<sub>50</sub>(COX-1)/IC<sub>50</sub>(COX-2)] で求められる選択指数はそれぞれ 11.56、4.63 であり、furanodienone が COX-2 阻害活性、選択性ともに高かった。対照とした indomethacin は、IC<sub>50</sub>(COX-2) が 2.08 μM、選択指数が 0.04 であり、furanodienone が選択性に勝っていた。Furanodienone の含量は、*C. phaeocaulis* 由来ガジュツで 2.63~3.33 mg/g であった。日本産の *C. zedoaria* 由来ガジュツにもこれと同程度含まれるものが 2 検体あったが、他の 2 検体は低含量であった。

#### C-6 車前子

##### 1) オオバコ属植物の ITS1 及び ITS2 領域の塩基配列解析

昨年度の研究においてオオバコ属植物 8 種 22 個体の標本から DNA を調製し、約 600bp からなる rDNA 領域を増幅して、その塩基配列を比較した。その結果、12 の配列タイプがあり、配列タイプから種の同定が可能であることが明らかになった。そこで、市場で入手された生薬について、ITS1 および ITS2 領域の塩基配列に基づく基原植物の鑑別を試みた。

##### 2) 車前子の遺伝子鑑別

栃本天海堂、山本博士から提供された車前子の市場品 14 検体について、ITS1 および ITS2 領域の塩基配列を解読し、基原植物の同定を試みた。その結果、Shas12 が type A1、Shas1~5 および Shas8、9、11、14 が type A2、Shas7 が type A3 の配列を示し、これらはオオバコ (*P. asiatica*) を基原とするものであることが明らかになった。一方、Shas6、10、13 の 3 検体は type M2 の配列を有しており、いずれもセイヨウオオバコ (*P. major*) を基原とするものであった。中華人民共和国薬典で車前子

の基原植物として規定されているムジナオオバコ (*P. depressa*) を基原とするものは見出せなかった。

#### D. 考察

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

##### D-1 チェストツリー

チェストツリーの主要成分であるフラボノイド配糖体の検出には Diphenylboric acid aminoethylester の MeOH 溶液である NP 試薬と Macrogol 400-6000 の MeOH 溶液である Macrogol 試薬の組み合わせが極めて有効であり、チェストツリーの確認試験として優れた方法であることが確認できた。

TLC 及び HPLC 分析の結果より、日本市場で健康食品として流通しているチェストツリーと欧州で一般用医薬品として流通しているチェストツリーの含有成分は良く似ているものの、そのピークプロファイルから 3 つのグループに分類される事が判明した。今後これらの差異が、収穫時期やエキス調製方法の違いにより生じたものであるのか、基原が異なることに起因するのか明らかにする必要がある。今後 HPLC における特徴的なピークの同定を行い、化合物の構成について植物化学的及び生合成的考察を加えることにより上記 3 つのパターンの出現要因を明らかにできるものと考えている。

TLC 及び HPLC のプロファイル分析の結果、生薬蔓荊子とチェストツリーの成分パターンには明らかな差異がないことが判明した。しかしながら、本研究で開発した遺伝子情報に基づいた基原種の鑑定では、問題なく両者を区別できることが明らかになった。

西洋の伝統医学ではチェストツリーが主に婦人科系統の疾患に応用されるのに対して、東洋医学において蔓荊子は主に鎮静、鎮痛、消炎等の目的で処方に配合されている。従って、その薬効の違いを特徴付ける成分が含有されている可能性も否定できず、両者を識別できる特異的化合物の発見とそれを指標とした化学的鑑別法の確立についても、引き続き検討する予定である。

欧州一般用医薬品 7 製品の中で、成分含量が他の約 10 倍を示す製品が存在したが、この製品はスイス製であり、欧州薬局方とは異なる規格で標準化されているためと考えられる。一方、健康食品由来の製品では、ヨーロッパで医薬品として販売されている製品の約 100 倍に濃縮された形態で日本で流通しているも



のがあることも判明した。健康食品の場合、適切な用法・用量の表示が薬事法で禁止されている上、安全性情報の蓄積も義務づけられていない。従って、使用者の安全性の観点から考えると、このような製品は、積極的に一般用医薬品として流通させていく必要があるものと考えられる。

#### D-2 ブラックコホシュ

ブラックコホシュの主要成分であるトリテルペン配糖体の検出にはアニスアルデヒド-硫酸試薬の噴霧/加熱が有効であり、確認試験として優れた方法であることが確認できた。また、二次元 TLC を行うことにより、さらに確認の確実性が増し、一次元において見分けが困難な場合は有効な手段となり得ることが分かった。一方、HPLC においてトリテルペン配糖体を通常の UV 検出器において測定することは難しかったが、ELSD 検出器によって感度良く検出することが可能であった。

ブラックコホシュはヒト腸内細菌 *L. reuteri* に対して一過性に核酸及びタンパク質合成を上昇させる効果を示した。これが単に *L. reuteri* の増殖を促進させるものであるか、特異的な成分の生産につながるものであるか検討が必要である。

近年ブラックコホシュに起因する肝障害発生の事例が複数の国で報告されたことから、米国薬局方ダイエタリーサプリメント情報専門家委員会はブラックコホシュ製品の表示に関連する注意書きを要請し、欧州医薬品庁も肝障害の兆候があればブラックコホシュの摂取を止めて医師に相談するように声明を発表している。日本ではブラックコホシュまたはこれを含む食品を摂取したことによる健康被害事例は報告されていないが、2006年8月に厚生労働省食品安全部基準審査課新開発食品保健対策室からも「海外におけるブラックコホシュの利用に関する注意喚起について」という声明が発表されている。このような点を考慮すると、安全性確保の観点からブラックコホシュも、チェストツリーと同様積極的に一般用医薬品として流通させていく必要があるものと考えられる。

日本で健康食品として流通するブラックコホシュ6製品のうち1製品は明らかに異なる植物を基原とし、別の1製品は何も成分を含まないものであった。米国で Dietary Supplement として流通するブラックコホシュにおいて、11種類中4種がアジア産の *Cimicifuga* 属植物に由来していたという報

告もあり、ブラックコホシュは比較的誤用代用が多い西洋ハーブであると考えられる。また、ブラックコホシュの近縁種は我が国でも升麻(ショウマ)として流通し、ブラックコホシュの用途とは異なる使われ方をしている。引き続き成分プロファイル分析や遺伝子情報の解析を行うことで、品質確保の基本であるブラックコホシュの基原の確認法を確立する予定である。

#### D-3 イチョウ葉

イチョウ葉は、脳血管循環の改善効果をするという報告があり、その有効性に関しての臨床試験も数多く行われ、その試験にイチョウ葉エキスの規格基準品(EGb761)が主に用いられている。EGb761を配合したドイツ製一般用医薬品と我が国で流通する健康食品の化学成分をTLC分析により比較したが、フラボノイド、テルペンラクトン共に成分パターンは良く似ていた。ただし、健康食品のうち1製品はイチョウ葉のフリーズドライ製品であり、実際に他の製品とは若干異なる成分も観察された。EGb761等のイチョウ葉エキス原料は高度に規格設定されており、ギンコール酸などの有害物質の除去に注意が払われている。製法やエキスの由来が異なるものは有害物質の純度試験等を通じて、安全性について十分な注意を払う必要があると思われる。〈新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究〉

#### D-4 刺五加

今回、PCR-RFLP法の検討に用いた試料は、外皮を除去するなどの特別な処置を行わなかったが、いずれの試料においても Nova Taq Hot Start DNA Polymerase-Ampdirect plus の系を用いた PCR により、その後の分析に十分な量の DNA 断片が得られており、実際の試験の現場においても機械的な粉碎作業を用いる事が可能であると思われた。一部の試料において、PCR 産物の収量が特に低い値を示した。これは、原料植物の採集後に起きる DNA の断片化の程度の違いか、あるいは、これらの試料に特に PCR 酵素を阻害する物質が多く含まれていたことなどによるものと考えられるが、真相は不明である。

また、各混合試料の分析結果において、約 150 bp の制限酵素処理断片のバンド強度に大きな違いが見られた。この結果は、一部の試料の DNA の品質が低いと仮定することで、説明が可能となる。

本研究で確立された分析法は、各試料の組

み合わせにより制限酵素処理断片のバンド強度が大きく変化するため、マンシュウウコギ類の混入率に対する定量性は認められない。しかし、少なくとも 5% 以上の混入を検出するに十分な感度を有していることは明らかであった。

蛍光核酸発色試薬の比較では、SYBR Gold 及び GelRed が、上記条件で使用可能であった。両者は、ethidium bromide に比べ、非常に高価である点が難点である。今回の比較試験では、ethidium bromide による検出の可能性も示されており、今後は、その点の検討が有意義であると思われる。

葉緑体 DNA, *trnK* 遺伝子領域の配列解析では、刺五加の正品である *E. senticosus* には *trnK* 遺伝子に関して種内多型が存在し、植物と市場品を含めた全 131 検体で 15 タイプの遺伝子型が認められた。これらの遺伝子型を示す植物の産地との関連性を検討したところ、広域に分布するタイプ、北部に分布するタイプ、西北部に分布するタイプなど大まかに分けることができた。刺五加市場品中に、分布が局在する遺伝子型を見出した場合、産地の範囲を推測することが可能であると考えられた。

抗疲労、抗酸化、抗認知症作用などが報告されている eleutheroside E は、黒龍江省西北部の北安、海倫及び吉林省産の *E. senticosus* の根茎に 0.05~0.13% 含有されていた。一方、*E. sessiliflorus* の根茎においても 0.07% に達するものが見出された。中国東北地方で刺五加として *E. sessiliflorus* の根茎も使われている理由は、eleutheroside E を含有することにあるとも考えられる。また、吉林省の *E. senticosus* では茎にも 0.05% 以上の eleutheroside E が含有されていたことから、同種の資源を枯渇させないためには茎の利用も考える必要があろう。

#### D-5 ガジュツ

2006 年度に行った SPME-GC 法による分析では、*C. phaeocaulis* 由来ガジュツと *C. zedoaria* 由来ガジュツはともに、curzerenone 及び curcumenol を主成分とする A タイプに属した。一方、抗炎症作用を調べる *in vivo* 実験の結果では、*C. phaeocaulis* 由来ガジュツにのみ活性が認められた。今回 *in vitro* 系の活性試験とエキス等の LC-MS 分析を組み合わせることにより、*C. phaeocaulis* の抗炎症活性成分として、furanodienone と curcumenol を同定した。2

成分の含量は、*C. phaeocaulis* 由来ガジュツが平均して高く、*C. zedoaria* 由来ガジュツでは低いものが認められた。2 種類のガジュツで抗炎症活性が異なったのは、特に furanodienone の含量が異なったためと考えると合理的に説明が可能となった。

#### D-6 車前子

本実験で用いた車前子の形態学的、化学的形質と遺伝子鑑別の結果を 14 検体について比較検討した。その結果、セイヨウオオバコ (*P. major*) の種子と同定された 3 検体は、100 粒重がやや小さい傾向が見られた。また、確認試験と純度試験はいずれも「適合」と判定されていた。また、いずれも plantagoside を主ピークとする HPLC パターンを示し、TLC 分析でも Rf=0.7 付近に plantagoside の可能性が高い明瞭な赤いスポットを有する点でオオバコを基原とする車前子とは明瞭に異なっていた。

今後さらに多数の検体について DNA プロファイリングによる基原種の同定と表現形質の分析を組み合わせることで、基原種同定により適切な表現形質を選択していくことが可能と考えられる。なお、本研究の成果は、第 16 改正日本薬局方に収載される薄層クロマトグラフィー用シャゼンシ標準品に反映されている。

#### E. 結論

〈西洋ハーブの品質確保と評価に関する研究〉

チェストツリーの品質確保のための科学的並びに遺伝子情報に基づく確認試験法を確立した。また本研究での分析結果より、チェストツリー製品では、成分パターンに紛れは少ないものの、成分含量に大きな差異があり、欧州一般用医薬品を基準として 100 倍以上の含量を有する製品が日本で食品として流通していることが判明した。ブラックコホシユでは、二次元 TLC 及び ELSD を利用した確認試験法が有効なことを確認した。また、各種製品の成分分析の結果、一部の製品では、異なる基原の植物の使用が確認された。イチョウ葉では、各種製品の成分分析の結果ドイツ一般用医薬品の成分パターンと近いものと、それ以外の 2 種に分類することができた。これらの製品は、成分パターン及び成分含量に紛れが少なく、高度に規格化された少数のエキス原料に由来しているものと推測された。なお、ここで上げたもの以外の西洋ハーブについても良好な研究結果が得られているが、承認申

請との関係上、次年度以降に報告する予定である。

<新一般用漢方処方構成生薬等の品質確保と評価に関する研究>

今年度の研究により、刺五加の PCR-RFLP 法による鑑別が、純度試験に適用可能である事が、確認出来た。また、*trnK* 塩基配列の解析により、いくつかの遺伝子型については、産地を推定する事が可能である事が明らかになった。またガジュツに関する検討では、四川省産ガジュツ *Curcuma phaeocaulis* の根茎の抗炎症活性成分として furanodienone と curcumenol を同定した。この内、furanodienone が、Cox-2 阻害活性が強く、かつ選択性も高かった。*C. zedoaria* 由来日本産ガジュツもこれら 2 成分を含有していたが、通常含量は低かった。車前子では、核 rDNA, ITS 領域の塩基配列解析により、基原種鑑別が可能である事を確認することができた。さらに、基原種と各性状との比較を行い、基原種同定への利用が期待出来る表現形質が存在する可能性が示唆された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表等

- 1) 合田幸広：天然物の基原と品質. *Food & Food Ingredients Journal of Japan*, **212** (5), 343-344, (2007).
  - 2) 小松かつ子、佐々木陽平、東田千尋、田中 謙：鬱金類生薬の基原と品質. *Food & Food Ingredients Journal of Japan*, **212** (5), 345-356, (2007).
  - 3) Sahin, F. P., Yamashita, H., Guo, Y., Terasaka, K., Kondo, T., Yamamoto, Y., Shimada, H., Fujita, M., Kawasaki, T., Sakai, E., Tanaka, T., Goda, Y., Mizukami, H., DNA authentication of *Plantago* herb based on nucleotide sequences of 18S-28S rRNA internal transcribed spacer region, *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 1265-1270 (2007).
  - 4) Maruyama, T., Sugimoto, N., Kuroyanagi, M., Kim, I. H., Kamakura, H., Kawasaki, H., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Tada, A., Yamazaki, T., Goda, Y., Authentication and chemical study of *Isodonis Herba* and *Isodonis extract*, *Chem. Pharm. Bull.*, **55**(11), 1626-1630 (2007).
  - 5) 丸山卓郎：レギュラトリーサイエンスにおける天然物の基原種鑑別と成分分析, *Food & Food & Ingredients Journal of Japan*, **212** (5), 374-379 (2007).
  - 6) Uchiyama, N., Kim, I. H., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Konishi, T., Goda, Y., HPLC separation of naringin, neohesperidin and their C-2 epimers in commercial samples and herbal medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **46**, 864-869 (2008).
  - 7) Maruyama, T., Kamakura, H., Miyai, M., Komatsu, K., Kawasaki, T., Fujita, M., Shimada, H., Yamamoto, Y., Shibata, T., Goda, Y., Authentication of the traditional medicinal plant, *Eleutherococcus senticosus* by DNA and chemical analyses, *Planta Med.*, submitted.
- #### 2. 学会発表等
- 1) 久場良亮、田中 謙、ZHU Shu、魏 勝利、合田幸広、渡邊裕司、小松かつ子. ガジュツの精油成分による品質評価. 日本薬学会第 127 年会、2007 年 3 月、富山。
  - 2) 合田幸広、遺伝子情報を利用した生薬試験法とその背景. 大阪生薬協会特別講演会、2007 年 4 月、大阪。
  - 3) 大家真由子、Shu ZHU、田中謙、丸山卓郎、合田幸広、川崎武志、藤田正雄、小松かつ子. *trnK* 遺伝子の塩基配列に基づく刺五加の同定 (2)、第 24 回和漢医薬学会大会、2007 年 9 月、富山。
  - 4) 宮井美穂、丸山卓郎、合田幸広、小松かつ子、中島育美、川崎武志、藤田正雄、嶋田宏志、山本豊、柴田敏郎. ITS 塩基配列によるシゴカの基原種鑑別 (2)、日本生薬学会第 54 回年会、2007 年 9 月、名古屋。合田幸広
  - 5) 中島育美、川崎武志、藤田正雄、丸山卓郎、川原信夫、合田幸広、小松かつ子、柴田敏郎、山本豊. エゾウコギ及び近縁植物 (マンシュウウコギ) の成分について. 日本生薬学会第 54 回年会、2007 年 9 月、名古屋。
  - 6) 丸山卓郎. 遺伝子情報を利用した生薬の純度試験- 朮類生薬及び刺五加を例に-. 生薬分析シンポジウム、2007 年 11 月、大阪。
  - 7) 大沼美貴、袴塚高志、合田幸広、小林進. 「LC-ELSD によるブラックコホシュ含有成分の分析」. 日本食品化学学会第 13 回総会・学術大会、平成 19 年 6 月。
  - 8) 末永恵美、丸山卓郎、袴塚高志、合田幸広. 「西洋ハーブの有効性・安全性及び品質評価に関する研究 (2) チェストツリーの遺伝子鑑定について」. 第 51 回日本薬学会関東支部大会 (東京)、平成 19 年 10 月。

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### G. 知的財産権の出願登録状況

特になし

## 先端技術を応用した製剤の品質確保と評価に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部  
研究者 川西 徹

### 研究要旨

機能性製剤の品質確保の方策の策定にむけて、(1)リポソーム製剤、ナノ粒子製剤、難溶性製剤等の製剤機能評価法；(2)超難溶性薬物の可溶化法として注目されている非晶質化製剤、ナノ微粒化製剤、Cocrystal 製剤における可溶化に関する物性評価法；(3)医薬品製造工程のオンラインリアルタイムモニタリングへの応用を視野にいたした分析法に関する研究を行った。

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 四方田千佳子
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所 伊豆津健一
- (3) 星薬科大学薬学部 米谷芳枝
- (4) 国立がんセンター 松村保広
- (5) 大阪大学大学院薬学研究科 中川晋作
- (6) アステラス製薬 北村 智
- (7) 大鵬薬品 馬場一彦
- (8) 埼玉第一製薬 山内仁史
- (9) ヤンセンファーマ 中島辰巳
- (10) 富山産業 中川知秀
- (11) 国立医薬品食品衛生研究所 吉岡澄江
- (12) 国立医薬品食品衛生研究所 阿曾幸男
- (13) 千葉大学大学院薬学研究院 山本恵司
- (14) 塩野義製薬 村主教行
- (15) 第一製薬 中上博秋
- (16) 中外製薬 小川 裕
- (17) 武田薬品 池田幸弘
- (18) 国立医薬品食品衛生研究所 檜山行雄
- (19) 東邦大学薬学部 寺田勝英
- (20) 国立医薬品食品衛生研究所 小出達夫
- (21) ファイザー 山田清孝
- (22) パウレック 高嶋武志
- (23) 参天製薬 木村章男
- (24) 塩野義製薬 片岡隆博
- (25) 武田薬品工業 松永浩和
- (26) 日揮 渡辺恵市郎
- (27) 田辺三菱製薬 浮田辰三

### A. 研究目的

ゲノム創薬時代を迎え、標的分子へ強力に作用する薬物の分子設計あるいは分子選別が可能になり

つつある現在、製剤に機能を持たせ、生体内での放出性、標的性、体内動態、あるいは生体内安定性等を変えることにより、生体内での作用を空間的、時間的に調節し、有効性、安全性を高める製剤技術が注目されている。このような製剤レベルの医薬品開発手法は、ゲノム創薬により極めて強力な医薬品シーズが発見されたにもかかわらず、通常の投与方法では有害作用がみられて医薬品として使用しにくい場合、あるいは難溶性で通常の製剤としてはヒトに投与しがたい場合、さらには既存の医薬品資源についても、新たな有用性を創り出す技術として、重要性が増している。このような機能性製剤は、DDS製剤あるいはリポソーム製剤など既に開発の歴史が刻まれているが、近年バイオテクノロジー、あるいはナノテクノロジーなどの周辺技術の進展を背景に、さらに研究・開発が活発化し、画期的医薬品として既に市販された製品も出現している。

しかしながら、このような機能性製剤については、最新の材料科学、高分子化学、タンパク質化学、微細加工技術等が結集されて開発・製造されることもあり、製品としての品質確保の方策についての規準は明確にされていない。すなわち、通常の製剤の場合は、原薬、添加物等の成分、物性試験を中心とした規格、および製造工程管理によって製剤の一定性が確認され、品質の確保がなされているが、機能性製剤の場合、製剤機能の評価法が定まっておらず、品質の確保の方策は確立していない。本研究は、このような機能性製剤の品質確保の方策を策定するための基礎データを得ることを目的に実施する。

研究は以下の三つの方向からの検討から構成される。第一はいくつかの機能性製剤について生体と