

● 沈殿は生成しない  
● 加水分解は進行しない

□ : Baicalin □ : Baicalein  
( ) \* =  $\frac{\text{Baicalin} \cdot \text{Baicalein}}{\text{Baicalin} + \text{Baicalein}}$

図9 黄芩粉末の抽出工程における抽出前放置時間と Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及び加水分解の関係 [H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>CNで抽出した場合]

表1 黄芩粉末の抽出工程において抽出前に120分間室温放置した場合の Baicalin/Baicaleinの沈殿生成及びBaicalinの加水分解

抽出溶媒	H <sub>2</sub> O	含水メタノール			H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /CH <sub>3</sub> CN
		30%MeOH	50%MeOH	70%MeOH	
沈殿	大量生成	生成	生成せず	生成せず	生成せず
残存率* (%)	(8.2)	(95.2)	(99.9)	(99.9)	(99.1)
加水分解	著しく進行	著しく進行	少し進行	進行せず	進行せず
組成変化**	0.19→0.74	0.12→0.62	0.08→0.18	0.06→0.07	0.07→0.07

\* 残存率： 試料溶液中に溶解状態で残存するBaicalein・Baicalin総量の割合

\*\* 組成変化： 懸濁直後と比較した[Baicalein]/[Baicalein + Baicalin] の変化

分担研究課題 漢方処方同等性並びに品質確保等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

甘露飲構成生薬のトランスポーター遺伝子発現への影響に関する研究

これまで我々は、漢方処方の安全性及び有効性に関する研究の一環として、小腸培養細胞のトランスポーター遺伝子の発現に対する影響を検討し、漢方処方「甘露飲」が薬物排出トランスポーターであるMRP2及びMRP3のmRNA量を著しく低減させることを見出し、この活性には甘露飲構成生薬のうち、黄芩及び茵陳蒿が大きく寄与していることを明らかにしている。本研究でさらに検討を進めた結果、黄芩及び茵陳蒿の主要成分のうち、Wogonin、Baicalein及びCapillarisinに当該活性を見出した。また、WogoninにおけるMRP2及びMRP3のmRNA量低減活性に対するKm値は、それぞれ3.63及び3.85 $\mu$ Mであり、Capillarisinについてはそれぞれ126.1及び46.5 $\mu$ Mであった。さらに、20 $\mu$ M Wogoninに対する小腸培養細胞の応答を経時的に追跡したところ、MRP3のmRNA量は30分後から低減させるのに対して、MRP2のmRNA量は1時間を過ぎてから低減させることが分かり、MRP2及びMRP3にWogoninに対する感受性の違いが観察された。

A. 研究目的

一般用医薬品を利用したセルフメディケーションの考え方が国民の間に広く浸透しつつある。昨今、一般用漢方製剤においても国民のニーズに合わせた見直しが進められている。現代の日本では、生活様式の欧米化と共に、人口分布の高齢化が進み、社会構造が大きく変化している。これに伴い、生活習慣病や痴呆の増加など疾病構造も変化し、既に市場で流通している一般用漢方処方の積極的利用に加え、現代社会の要求に対応し得る新しい処方の育成が待望されている。

厚生労働省は、平成14年に一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を発表し、その具体的な方策の一つとして、一般用漢方処方の見直しとその積極的な活用を提言している。また、厚生労働科学研究費補助金による

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価（EBM確保）手法及び安全性確保等に関する研究（H16-医薬-39）」において「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究班」が組織され、従来の一般用漢方処方「210処方」の見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規処方の追加が検討され、平成17年度末に「新一般用漢方処方の手引き案」として報告されている。さらに、平成19年度末には本手引き案の改訂版が報告される予定である。

「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」に収載された新規追加候補処方、長年の臨床使用経験により有効性・安全性を担保されているが、この経験的な保証に加え、現代科学的視点による評価を付与することが必要と思われる。そこで本研究では、経口摂取した食物・薬物の吸収に重要な役割を果たすトランスポーター分子に着目し、

体内の主な吸収の場である小腸上皮細胞のモデル系を利用して、漢方処方「甘露飲」がトランスポーター遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。甘露飲は、先の「新一般用漢方処方の手引き案」において追加収載を提案された処方であり、口内炎、舌の荒れや痛み、及び歯槽膿漏に効果があるとされ、一般用医薬品として理想的な効能・効果を有している。前年度において、甘露飲処方エキスが薬物排出トランスポーターであるMRP2及びMRP3のmRNA量を著しく低減させることを見出し、甘露飲構成生薬のうち黄芩及び茵陳蒿の寄与が大きいことを簡単に報告した。本年度は、その詳細について述べると共に、黄芩及び茵陳蒿に含まれる活性成分の主なものを特定し、その活性成分の特性を解析した結果について報告する。

## B. 研究方法

### 生薬及び試薬

甘露飲構成生薬（黄芩、茵陳蒿、麦門冬、天門冬、乾地黄、熟地黄、甘草、石斛、枳実及び枇杷葉）はウチダ和漢薬より購入した。石斛以外は日本薬局方規格のものである。ヒト腸上皮細胞様細胞株 Caco-2 及び Non Essential Amino Acids (NEAA) は大日本住友製薬より購入した。DMEM 培地、Penicillin-Streptomycin 溶液、Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin、1 mM EDTA・4Na)、逆転写酵素 SuperScript III、及び oligo dT primer は Invitrogen より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は、カナダ Cansera 社製の CCT-Fetal Bovine Serum を三光純薬より購入した。Realtime PCR は、Takara の SYBR Premix Ex Taq を用いて行った。Wogonin、Baicalin、Baicalein 及び Esculetin は和光純薬より購入した。また、Capillarisin は CHROMADEX INC より、Scoparone は CALIBOCHEM より購入した。その他の試薬は、いずれも各試薬メーカーの特級品を用いた。

### 機器

生薬の煎出には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎

を用い、煎出液の溶媒留去は、佐久間製作所の遠心エバポレータ EC-57CS 及び冷却トラップ CT-110 を用いて行った。

細胞は SANYO の CO<sub>2</sub> インキュベーター MCO-5AC で培養し、SANYO のクリーンベンチ MCV-91BNF 内で無菌操作を行った。逆転写反応は TAITEC 社の恒温バケツ EHB、あるいは ANATECH 社の Cool Stat II を用いて行った。Realtime Polymerase Chain Reaction (PCR) は、Takara SmartCycler II を用いて行った。

### 検体試料の調製

甘露飲煎出液：10 種類の甘露飲構成生薬を 2.5 g ずつポット（らくらく煎）に取り、600 mL の水で半量になるまで煎じることにより調製した。

甘露飲構成生薬単味煎出液：甘露飲構成生薬 2.5 g を独立にらくらく煎に取り、600 mL の水で半量になるまで煎じた。

甘露飲及び単味煎出液の乾燥エキス：上述の甘露飲煎出液等をろ紙でろ過した後、その 0.5 mL を 1.5 mL マイクロチューブに取り、減圧下、溶媒を留去させ、使用時まで -20°C で保管した。

細胞投与試料：上記の乾燥エキスに 0.5 mL の Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS) を加えて溶解させた。さらにこれを HBSS で 5 倍希釈した後、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターによりろ過したものを細胞への投与検体とした。これは、経口で服用した煎出液が消化管内で約 5 倍に希釈されるものと想定した措置である。

### 細胞培養

Caco-2 細胞の培養は、DMEM 培地 (10% FBS、1% NEAA、100 units/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin) で、37°C、5% CO<sub>2</sub>、暗黒下に行った。継代する際は、Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin、1 mM EDTA・4Na) により 5 分間処理して細胞を浮遊・分散させ、新鮮培地に 1/5~1/20 の希釈倍率で播種した。

Caco-2 細胞の上皮細胞への分化誘導は、

Invitrogen 社の BD BioCoat 腸上皮分化エンバイロメントキットを用い、フィブリコラーゲンマトリックスをコートしたメンブレンインサート上で行った。24 穴タイプのフィブリコラーゲンコートインサートに  $2 \times 10^5$  cells/Insert の濃度で細胞を播種し、24 時間培養した後、分化誘導培地に交換し、さらに 48 時間培養して上皮細胞へ分化させた。

#### 検体投与及び収穫

上皮細胞へ分化した Caco-2 細胞が培養されているフィブリコラーゲンコートインサートにおいて分化誘導培地を HBSS と交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 15 分間インキュベートした後、インサートの HBSS を除去し、HBSS に溶解させた検体を投与した。対照インサートには HBSS のみを投与した。37°C、5% CO<sub>2</sub> で一定時間インキュベートした後、HBSS 溶液を除去し、QIAGEN 社の RNeasy Mini Kit を用いて細胞を収穫し、total RNA を抽出した。実験は、異なる日に異なるプレートを用いて合計 2 回行った。

#### トランスポーター遺伝子発現の定量

上記の要領で調製した total RNA を鋳型にして cDNA を調製した。すなわち、逆転写酵素 SuperScript III を用い、Oligo dT をプライマーとして、45°C で 60 分間逆転写反応を行った。この cDNA 溶液を鋳型として、各トランスポーターに特異的なプライマーを用い、SYBR Green 法による Realtime PCR を行った。内部標準として  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量を定量した。PCR はすべての検体について 2 回ずつ行い、その平均を測定値として用いた。

#### 倫理面への配慮

本研究はで用いるヒト培養細胞はいずれも株化されて全世界で汎用される細胞であり、倫理面を考慮すべき研究材料ではない。

### C. 研究結果

#### 黄芩及び茵陳蒿の含有する活性成分の特定

図 1 に示す通り、甘露飲には薬物排出 ATP 結合カセットトランスポーターの MRP2 及び MRP3 の mRNA レベルを著しく低減させる活性があり、その活性発現には黄芩及び茵陳蒿が大きく寄与している (図 2)。これらは既に前年度の報告書で述べたが、本年度はその活性成分の特定を試みた。図 3 に示す通り、黄芩の主要成分は Wogonin、Baicalin 及び Baicalein 等のフラボノイドであり、茵陳蒿の主要成分は Scoparone 及び Esculetin 等のクマリン類や Capillarisin 等のクロモン類である。図 3 に示す 6 種類の化合物が市販品として入手できたため、これらの Caco-2 細胞に対する影響について検討した。まず、黄芩含有の主要成分を 40  $\mu$ M の濃度で Caco-2 細胞に投与し、MRP2 及び MRP3 の mRNA レベルを RealTime PCR により定量したところ、Wogonin に著しく強い活性が、そして Baicalein にも弱い活性が観察された (図 4)。Baicalein の配糖体である Baicalin には活性が見出せなかった。次に茵陳蒿の主要成分について検討したところ、クマリンの Esculetin 及び Scoparone は MRP2 及び MRP3 の mRNA 量に影響を及ぼさなかったが、Capillarisin が弱いながら両トランスポーターの mRNA 量を低減させることが分かった (図 5)。

#### 活性物質の特性の検討

Wogonin 及び Capillarisin の濃度依存性について検討した。Wogonin は低濃度で MRP2 及び MRP3 の双方に強い活性を示し、Hanes-Woolf プロットより導いた mRNA 量低減活性の  $K_m$  値はそれぞれ 3.63  $\mu$ M (MRP2) 及び 3.85  $\mu$ M (MRP3) であった (図 6)。一方、Capillarisin は Wogonin と比較するとやや活性は弱く、また、MRP2 及び MRP3 への作用に若干の差があり、それぞれの  $K_m$  値は、126.1  $\mu$ M (MRP2) 及び 46.5  $\mu$ M (MRP3) であった (図 7)。さらに、Wogonin については 20  $\mu$ M の濃度において活性発現の経時変化を追跡した (図 8)。MRP2

及びMRP3は共に最終的に同じレベル(約20%)まで mRNA レベルの降下が観察されるが、MRP3 の mRNA 量は30分後から降下し始めるのに対して、MRP2 の mRNA 量は1時間を過ぎるまで降下しないことが分かり、MRP2 及び MRP3 遺伝子に Wogonin に対する感受性の違いが観察された。

#### D. 考察

甘露飲は長年の臨床経験により安全性が確保されている処方であるが、これは東洋の地において東洋医学が発展する過程で経験的に獲得された知見であり、近代に新しく出現した合成新薬、あるいは近代に新しく西洋より東洋へ持ち込まれた食物及び薬物との相互作用は未知数である。生活様式の西洋化を一因とする疾病構造の変化に対応するべく一般用漢方処方が見直された経緯を鑑みると、西洋由来の食物及び薬物との相互作用について検討することは、新規処方の安全性を考える上で重要と思われる。

薬物間、あるいは薬物と食物における相互作用は、化合物同士の直接の複合体形成等を除くと、主に代謝、吸収、及び排出の場で起こる。薬物の代謝は主に肝臓及び小腸における cytochrome P-450 (CYP) 等の薬物代謝酵素が担当し、吸収及び排出は主に小腸におけるトランスポーターが担当する。本研究ではトランスポーターに着目し、甘露飲煎出液が薬物排出トランスポーターである MRP2 及び MRP3 の遺伝子発現を強く抑制することを見出した。これらは薬物排出トランスポーターの代表格である MDR1 (P-glycoprotein) や栄養素吸収トランスポーターの遺伝子発現には影響を及ぼさず、選択性が高い活性を有していた。漢方処方あるいは生薬が小腸上皮細胞に発現する特定のトランスポーターの遺伝子発現に影響を及ぼすという知見は、我々が知る限り今回初めて得られたものである。小腸上皮細胞は扱いが難しいため、トランスポーター関連の研究分野でも限られた研究室で検討されている状況である。これと比較して肝細胞におけるトランスポーター研

究は盛んに行われており、漢方処方の影響についてもいくつか報告がある。例えば、筑波大のグループより、茵陳蒿、山梔子及び大黄から構成される茵陳蒿湯、あるいはその含有成分の Genipin を経口投与したラットの肝臓及び腎臓において、MRP2 の mRNA レベル及びタンパク質レベルが上昇するとの報告がある<sup>1)</sup>。Genipin は茵陳蒿湯に配合されている山梔子の主要成分 Geniposide が腸内細菌により分解されて生じると言われており、ラット肝臓・腎臓における MRP2 mRNA レベル上昇活性の本体は茵陳蒿ではなく山梔子であると推測される。山梔子の発現増強活性が、我々が Caco-2 細胞で見出した茵陳蒿の発現抑制活性を充分上回るほど強いものであるのか、あるいは肝臓・腎臓と小腸の器官の違いによるものなのか興味深い問題である。

さて、図9に示す通り、MRP2の小腸での機能は、吸収された薬物を小腸管腔側へ戻す(排出する)ことであり、一方、MRP3は門脈血管側へ透過させることである。MRP2及びMRP3の輸送極性は反対方向であるため、甘露飲処方が両トランスポーターの遺伝子発現を同時に抑制したときの効果を予測することは難しい。しかし、例えばMRP2による排出が耐性発現の一因となる Cisplatin や Vincristine 等の場合、甘露飲の併用が耐性克服に有効となる可能性がある。一方、MRP3により血管側へ輸送される Etposide 等の場合は、甘露飲の併用が血中濃度の低下を招く可能性が考えられる。また、今回は甘露飲処方の構成生薬のうち黄芩及び茵陳蒿に MRP2 及び MRP3 の遺伝子発現抑制活性を見出したため、上記の現象は甘露飲に限らず黄芩含有処方及び茵陳蒿含有処方に共通して起こる可能性を忘れてはならない。現段階では遺伝子レベルでの抑制活性のみを観察しており、黄芩あるいは茵陳蒿を含有する処方の有効性・安全性に対する結論を出すのは時期尚早である。また、前述の茵陳蒿湯での例のように、茵陳蒿の活性が共存生薬により打ち消される可能性も考えられる。今後、タンパク質レベルでの活性及び in

vivo での活性について注意深く観察することが必要である。

今回の研究において、黄芩に関しては、その主要成分のうち、フラボノイドの Wogonin 及び Baicalein に抑制活性を見出した。特に Wogonin の活性は強烈であり、Km 値は  $3.83 \mu\text{M}$  (MRP2) 及び  $3.85 \mu\text{M}$  (MRP3) であった。フラボノイドは広く植物界に分布する二次代謝産物であるが、黄芩に含まれるフラボノイドは 4' 位に酸素置換基を持たず、特徴的な構造を有している。甘露飲構成生薬中にも枳実及び甘草にはフラボノイドが多く含まれており、これらの生薬に活性が見られないことから、Wogonin 及び Baicalein の有する特徴的な構造が活性発現に重要な役割を果たしていると考えられる。ところで、黄芩の主成分は Baicalein が配糖化された Baicalin であり、糖が結合している以外は Baicalein と全く同じ構造を持ち、さらに Baicalin の含量は Baicalein 及び Wogonin のその 10 倍近くと言われている。それにも関わらず Baicalin には活性が全く見られなかった理由は、配糖体であるために脂溶性が弱く、Caco-2 細胞内に吸収されなかった可能性や、糖が結合することにより嵩高くなり、反応部位に対して立体障害が発生した可能性を考えている。

一方、茵陳蒿の主要成分のうち活性が見られたのはフラボノイドの変形と言えるクロモン類の Capillarisin であった。Capillarisin も特徴的な構造を有しており、フラボノイドの A 環と C 環が炭素-炭素結合ではなく、エーテル結合となっており、この構造が抑制活性に寄与する可能性が高いと考えられる。ただし、Capillarisin による抑制活性は、茵陳蒿エキスの抑制活性と比較して弱く、また、茵陳蒿中の Capillarisin の含量は決して多い方ではないため、この成分だけで茵陳蒿エキスの有する強い抑制活性を説明することは難しいと思われる。主成分であるクマリン類には活性が見られなかったことも勘案して、おそらく、茵陳蒿中に含まれるクロモン類化合物のいずれかに強い活性が見出されるものと考えてい

る。

ところで、漢方処方では複数の生薬による混合製剤であるが、これはそれぞれの生薬の単独の作用を相加的に集めるだけではなく、「君臣佐使」の概念にも示されている通り、構成生薬同士の相互作用により処方全体の薬効を高める目的があると言われている。つまり、黄芩及び茵陳蒿に由来する成分が MRP2 を抑制することにより、他の生薬由来の成分の排出を緩和し、甘露飲処方全体としての薬効を増強させるという仮説を立てることも可能である。本研究の成果を踏まえ、今後、甘露飲処方、あるいは黄芩及び茵陳蒿含有処方の有効性について、さらに詳細な検討が進むことを期待する。

#### E. 結論

一般用漢方処方の安全性に関する研究の一環として、ヒト小腸上皮細胞モデルを用い、新規収載候補処方の甘露飲について、物質の吸収及び排出に関与するトランスポーターに与える影響を検討した。その結果、甘露飲は、薬物排出担体である MRP2 及び MRP3 の遺伝子発現を強く抑制することが分かった。また、構成生薬個別投与の結果から、甘露飲処方の上記の活性には、黄芩及び茵陳蒿が大きく寄与しており、さらに活性成分として Wogonin 及び Capillarisin が特定された。Wogonin の活性は非常に強く、Km 値は MRP2 及び MRP3 のいずれに対しても一桁の  $\mu\text{M}$  オーダーであった。今後、タンパク質レベルでの抑制活性、及び可能であれば *in vivo* での抑制活性について注意深く観察することが必要と思われる。

今回、甘露飲の小腸上皮細胞への影響を検討し、医薬品あるいは食品の吸収・排出に重要な役割を果たすトランスポーターの発現に対して、漢方処方成分が影響を及ぼし得ることを明らかにした。今後、様々な漢方処方及び構成生薬に関する検討が重ねられ、漢方処方の安全性及び有効性に関して、トランスポーターを中心とした小腸の吸収・排出の観点から多くの科学的根拠が得られるこ

とを期待する。

F. 参考文献

- 1) Inchinkoto, a herbal medicine, and its ingredients dually exert MRP2/MRP-2 mediated choleresis and Nrf2-mediated antioxidative action in rat livers., Okada K., *et. al.*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **292**, G1450-63 (2007).

G. 研究発表

1. 学会発表

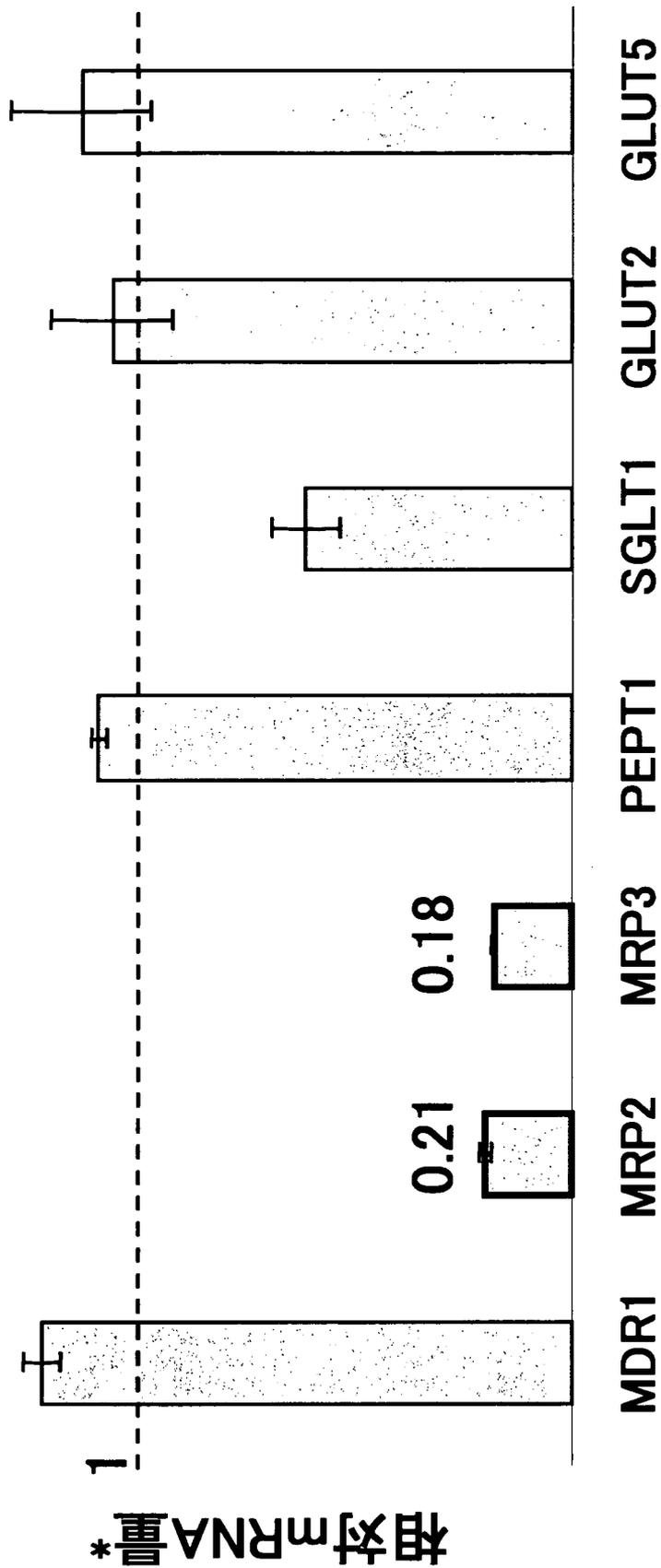
- 1) 石田真理, 袴塚高志, 合田幸広, 小林進 : 新規漢方処方 の品質規格に関する基礎的検討 (5), 小腸上皮細胞のトランスポーターに与える甘露飲の影響. 日本生薬学会第 54 回年会, 2007 年 9 月 (名古屋).
- 2) 石田真理, 袴塚高志, 合田幸広, 小林進 : 新規漢方処方 の品質規格に関する基礎的検討 (6), 小腸上皮細胞のトランスポーターMRP2 および MRP3 の遺伝子発現を抑制する甘露飲含有成分, 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 (横浜).

2. 誌上発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し



\* HBSS処理細胞 (Control) での発現量に対する相対値

図1 甘露飲によるCaco-2細胞のトランスポーター遺伝子発現変動

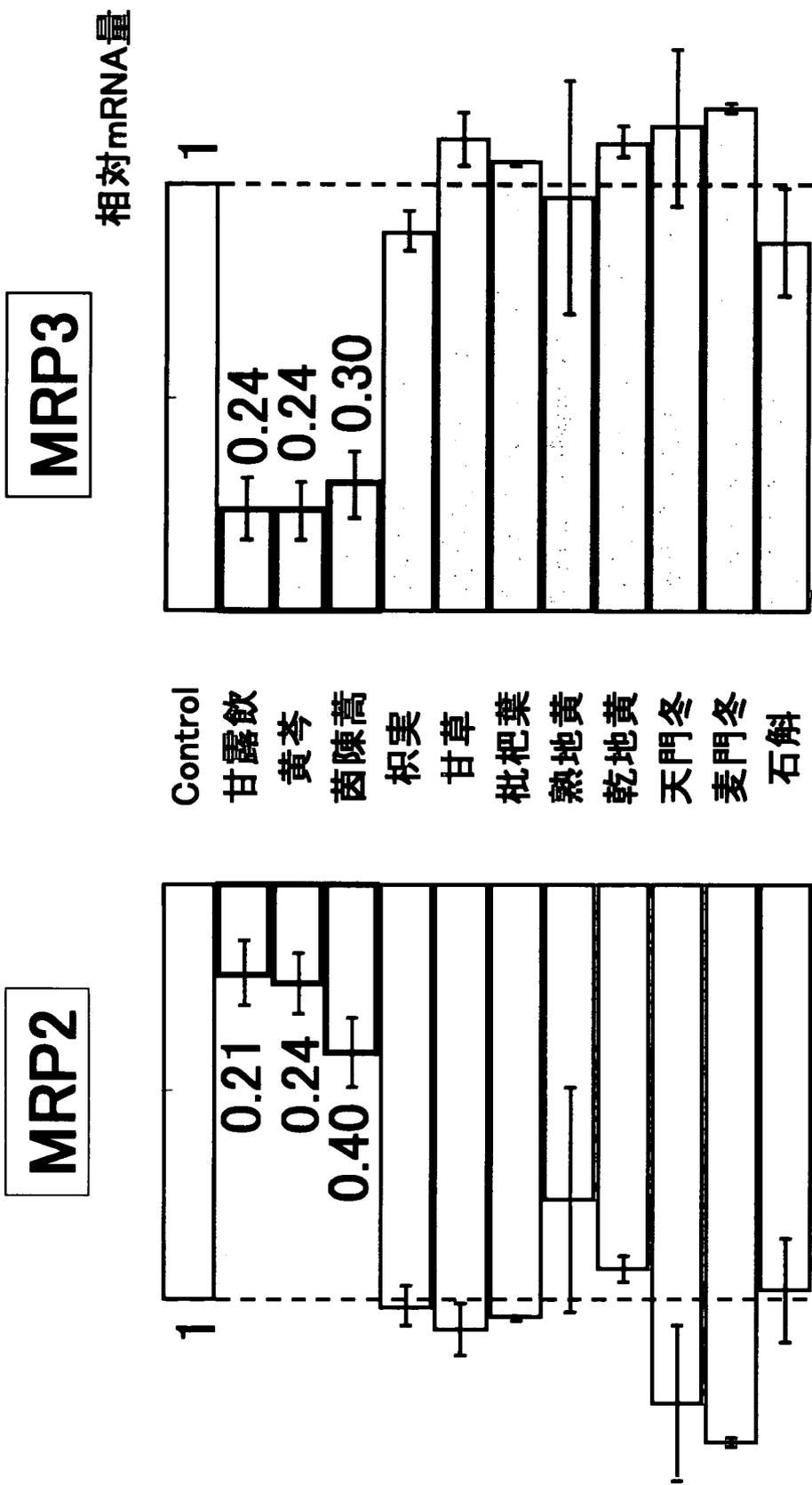
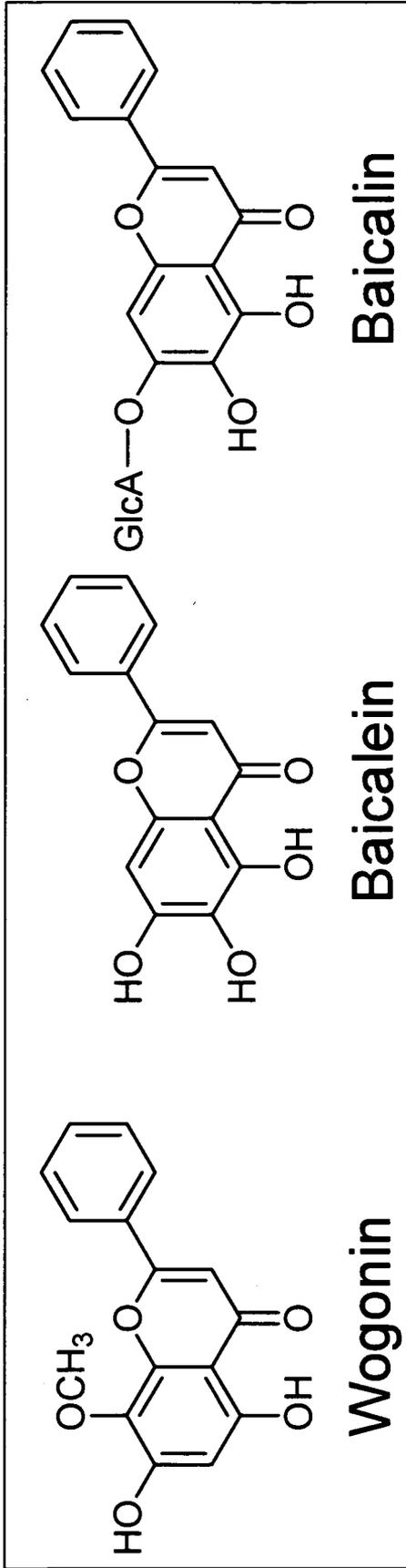


図2 甘露飲構成生薬におけるMRP2及びMRP3の遺伝子発現変動

黄芩



茵陈蒿

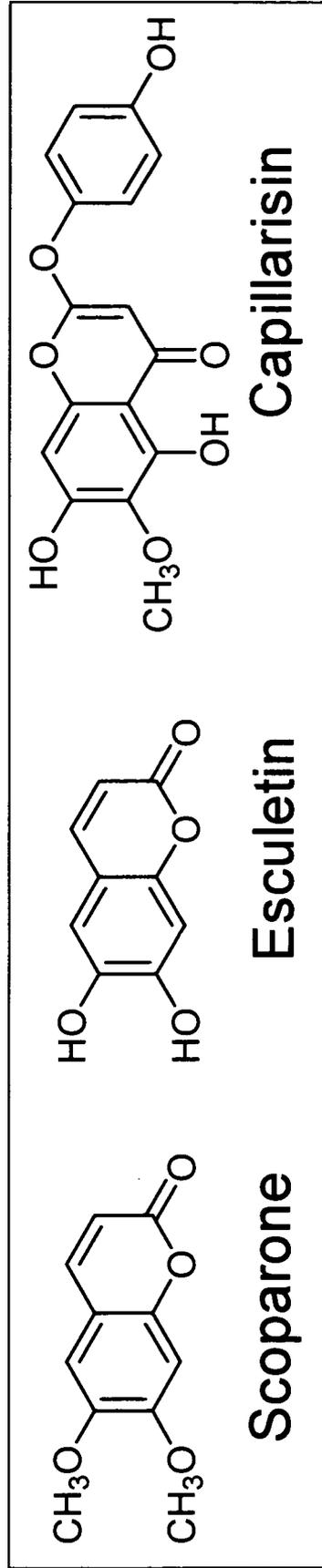


图3 黄芩及び茵陈蒿の主要成分

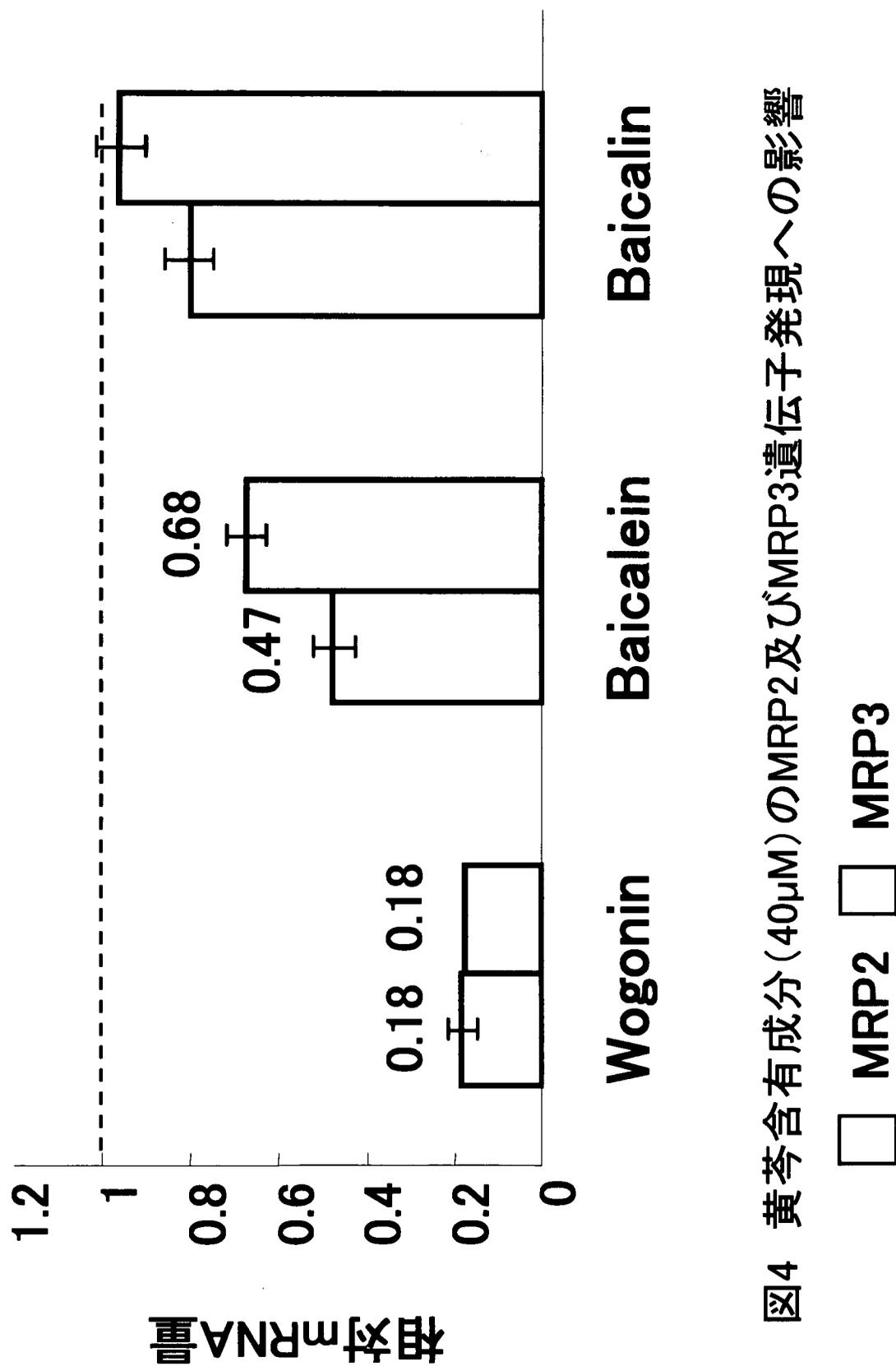


図4 黄芩含有成分(40 $\mu$ M)のMRP2及びMRP3遺伝子発現への影響

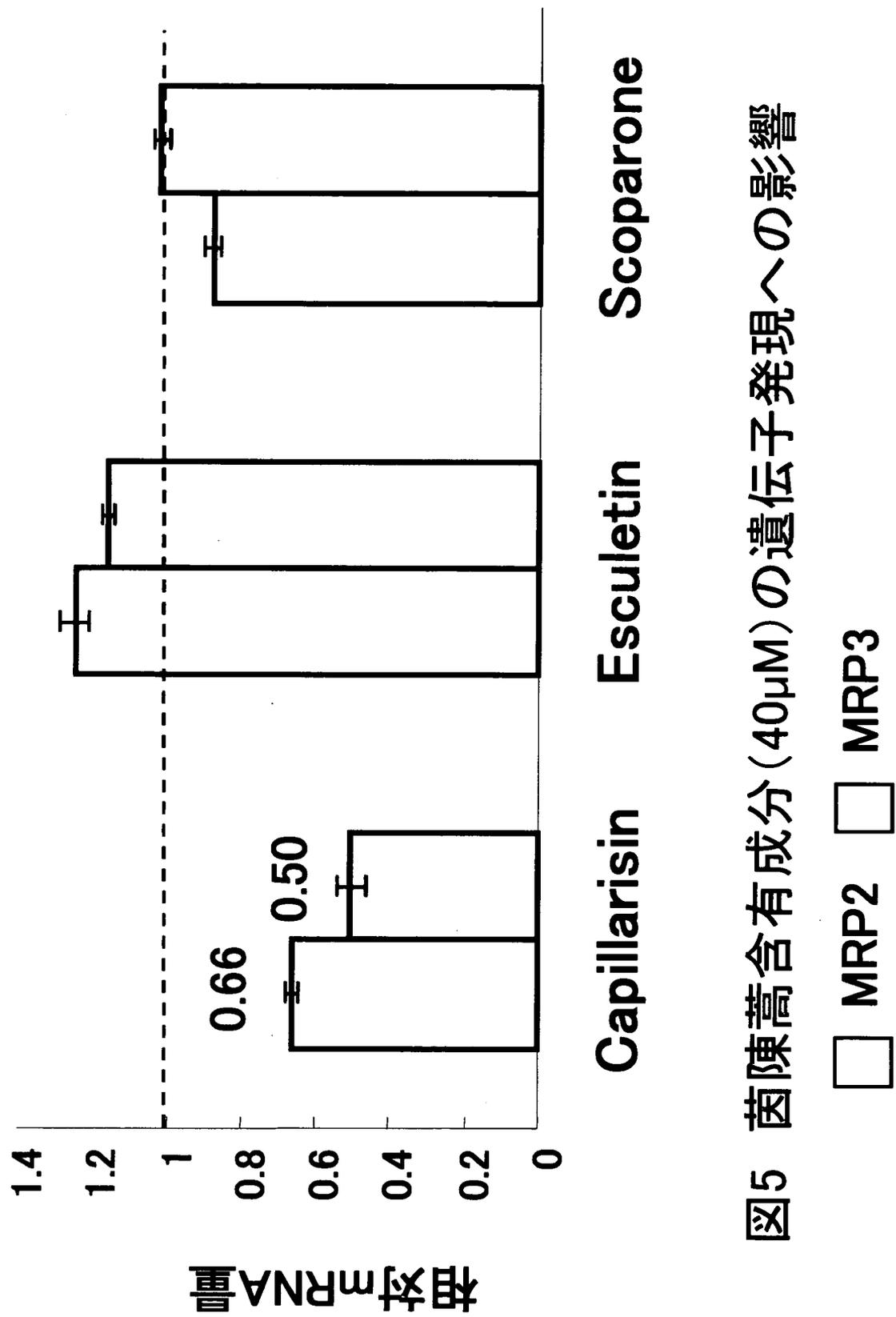


図5 茵陳蒿含有成分(40 $\mu$ M)の遺伝子発現への影響

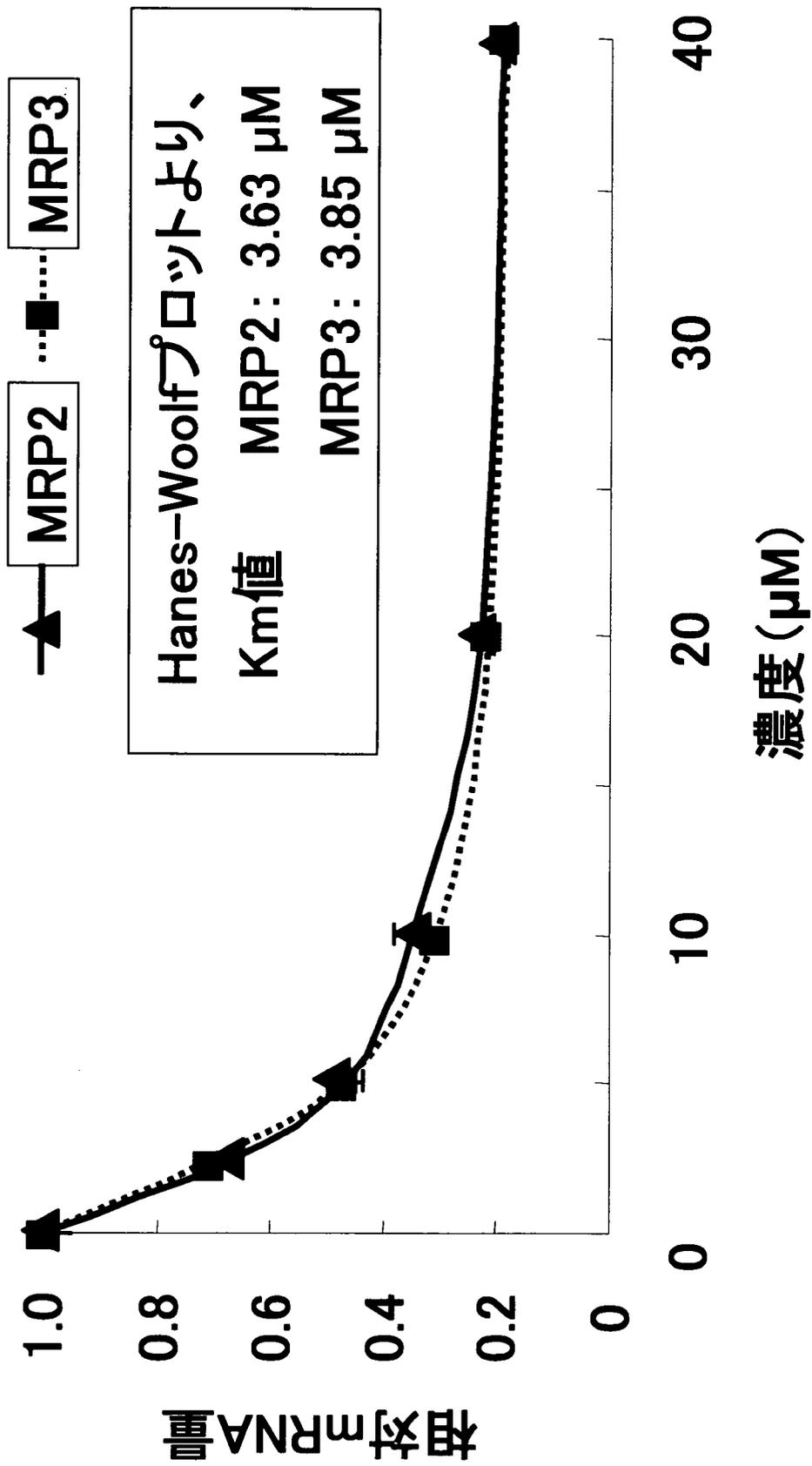


図6 WogoninのmRNA発現抑制における濃度依存性

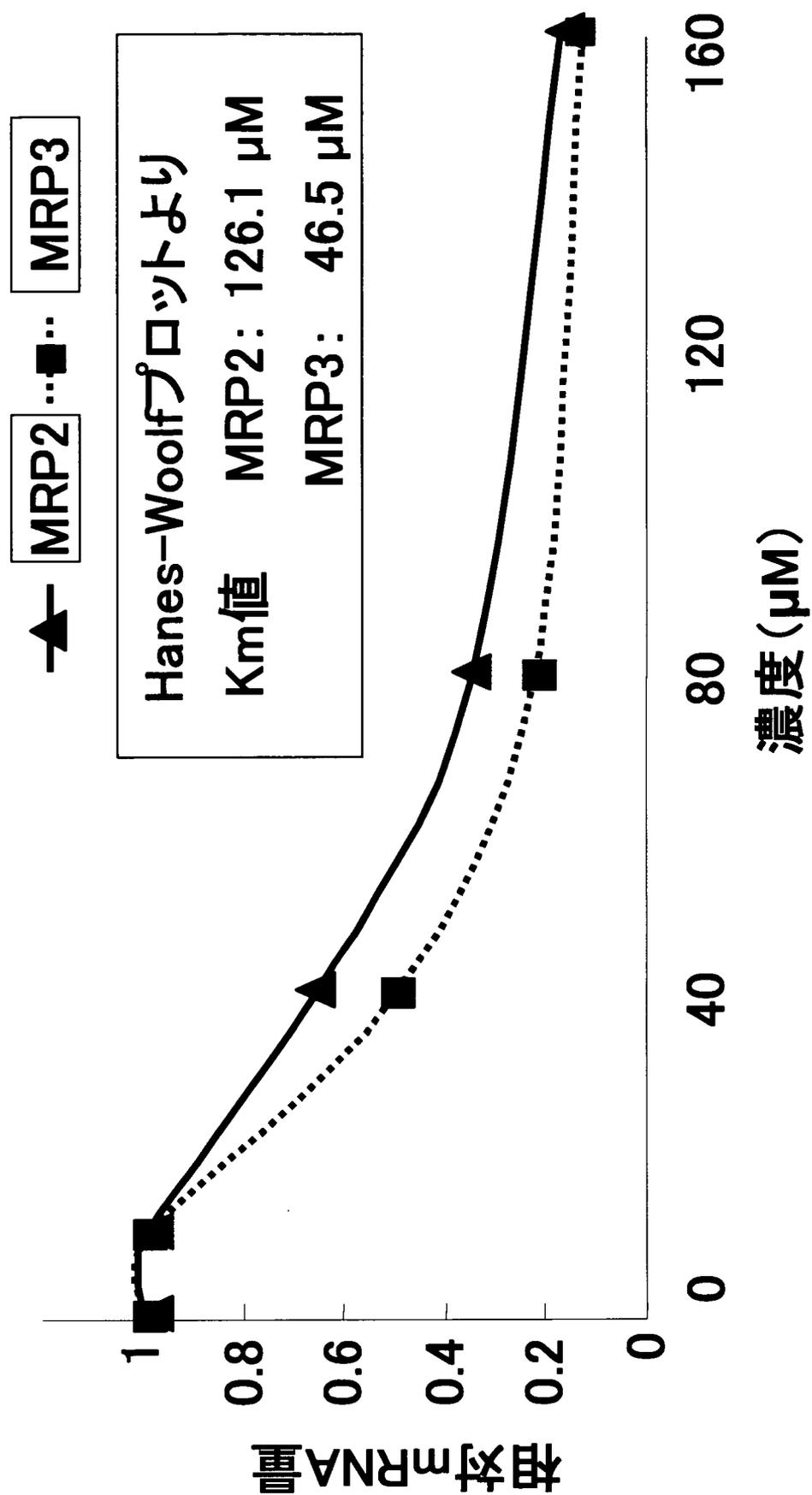


図7 CapillarisinのmRNA発現抑制における濃度依存性

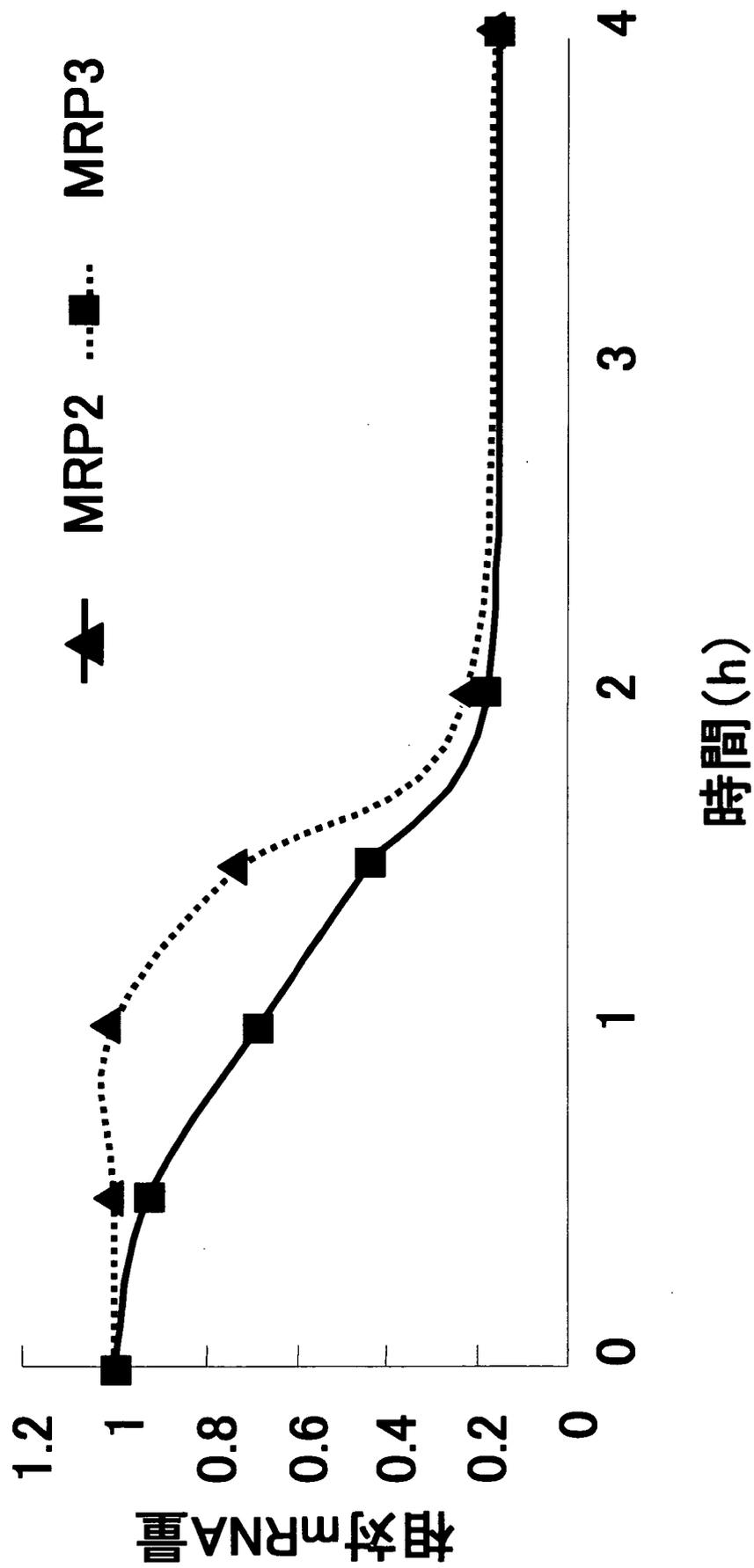


図8 Wogonin (20 $\mu$ M) の mRNA 発現抑制における経時変化

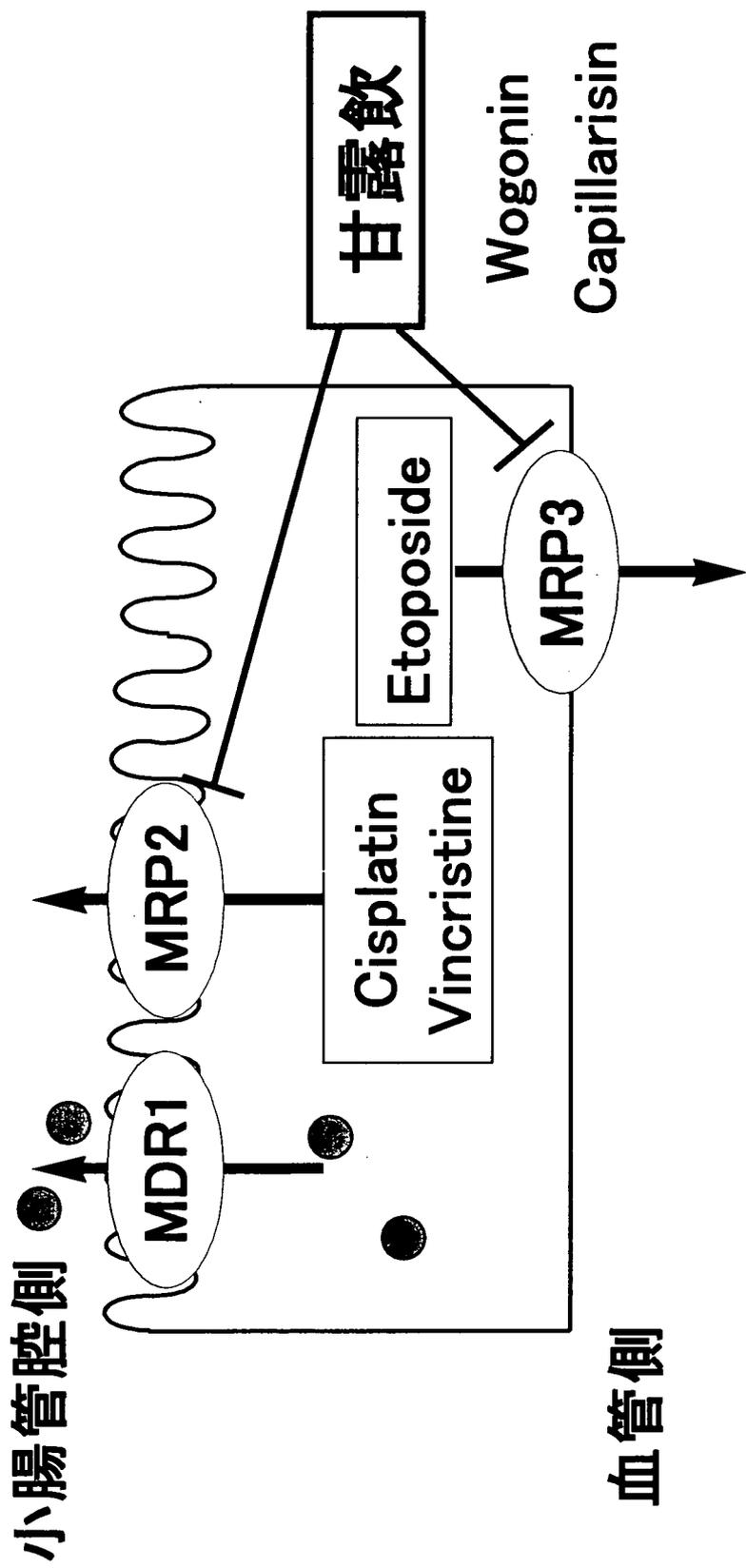


図9 MRP2及びMRP3を介した医薬品と生薬含有成分の相互作用

分担研究課題 漢方処方同等性並びに品質確保等に関する研究

分担研究者 袴塚 高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 室長

麗澤通気湯の品質評価に関する研究

麗澤通気湯は、平成 17 年度末に報告された「新一般用漢方処方の手引き案」において追加収載を提案された処方であり、においがわかりにくい嗅覚異常に効果があるとされ、一般用医薬品として理想的な効能・効果を有している。本研究では、新規処方の規格設定において生じる問題点を明らかにする目的で、構成生薬の確認試験について検討した。その結果、14 種類の構成生薬のうち 10 種類（葛根、生姜、黄耆、甘草、麻黄、山椒、蒼朮、羌活、百芷及び独活）について TLC を用いた確認試験案を提示することができた。

A. 研究目的

近年、一般用医薬品を利用したセルフメディケーションの重要性が認識されつつある。医学・薬学の進歩、生活環境の改善及び衛生観念の変革は、日本を長寿国へ導いたが、その一方で、生活様式の欧米化と人口分布の高齢化は、生活習慣病や痴呆の増加など疾病構造に変化をもたらした。これらの要因に、社会の高度情報化と生活の質の追求意識が相まって、多くの国民が自らの健康に強い関心を持つようになり、しかもそのニーズは多様化している。このような状況において、軽度な疾病の予防や生活の質の改善・向上などを目標とした、一般用医薬品によるセルフメディケーションの考え方が広がるのは自然な流れと言えよう。これに呼応するようにして厚生労働省では、国民の新たなニーズに対応し得る一般用医薬品の育成を考え、平成 14 年に一般用医薬品承認審査合理化等検討会を開催し、その中間報告として、「セルフメディケーションにおける一般用医薬品のあり方について 提言-具体的な方策-」を発表している。そして、その具体的な方策の一つとして、一般用漢方処方の見直しとその積極的な活用が

提言されている。

一般用漢方処方については、昭和 40 年代末に当時の厚生省より 210 の処方について承認審査の内規が公表され、「一般用漢方処方の手引き」としてまとめられている。この手引きは、古くより伝わる数千種の処方のうち一般用医薬品として必要と判断された 210 処方について、成分・分量、用法・用量、効能・効果等が記載されたものであり、この記載に従って一般用医薬品としての承認申請を行う限りにおいては、その有効性及び安全性が長年の臨床使用経験によって担保される。ただし、この内規は昭和 40 年代末に公開されて以来、ほとんど変更が加えられていないため、現代の社会構造及び疾病構造の変化に対応できない面も指摘されている。このような時代の要請と、一般用医薬品承認審査合理化等検討会の提言を受ける形で、厚生労働科学研究費補助金による医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「一般用漢方処方の見直しに資するための有用性評価（EBM 確保）手法及び安全性確保等に関する研究」において「一般用漢方処方の見直しを図るための調査研究班」が組織され、従来の

一般用漢方処方「210 処方」の見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規処方の追加が検討され、平成 17 年度末に「新一般用漢方処方の手引き案」として報告された。さらに、平成 19 年度末には本手引き案の改訂版が報告される予定である。本研究は、この「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」の新規処方について、実際に一般用医薬品として流通させるため、どのように有効性や安全性を担保し、どのように品質を保證するか検討を行うものである。

現時点では、一般用漢方製剤の製造方法、規格及び試験方法等は医療用漢方製剤の取扱いに準じることとされ、具体的には、20 年以上前の昭和 55 年 6 月 25 日付薬審第 804 号別添「医療用漢方製剤の取扱いについて」及び昭和 60 年 5 月 31 日付薬審二第 120 号通知の別紙 1「標準湯剤との比較試験に関する資料について」に規定されている。本研究では、科学の進歩に対応し、新規な処方について、現代の科学水準を反映させながら、どのように品質を保證するか検討を行う。

日本薬局方は、5 年ごとに改訂される。従って、局方収載生薬については、ある程度現代の科学水準が反映された規格が担保されていると言える。中間製品あるいは最終製品において該当する生薬の含有が確認されれば、製剤の品質は定性的に確保され得る。また、品質の保證された生薬が、製造規格における処方構成通りの分量で使用されている限り、数種の指標成分について中間製品あるいは最終製品中の含量を定量し、一定の規格内に収まることを確認できれば、煎出を含む製造工程における生薬成分の移行率及び収率を確認することができ、製剤の品質は定量的に確保され得る。従って、漢方製剤の適切な品質評価においては、各構成生薬の確認試験及び含有成分の定量法の確立が最重要事項と言える。

本研究では、新規処方の規格設定において生じる問題点を個別に解明する目的で、追加候補処方の一つであり、万病回春を原典とし、においがわかりにくい嗅覚異常に効果があるとされ、一般用

医薬品として理想的な効能・効果を有す麗沢通気湯を取り上げ、構成生薬の TLC による確認試験について基礎的な検討を行った。

## B. 研究方法

### 生薬及び試薬

麗沢通気湯構成生薬（黄耆、山椒、蒼朮、麻黄、羌活、百芷、独活、生姜、防風、大棗、升麻、葱白、葛根、甘草）は、葱白以外はウチダ和漢薬より日本薬局方規格のものを購入した。葱白は八百屋でネギを購入し、白い偽茎の部分を用いた。生薬確認試験の検討における標準化合物として、puerarin、astragaloside IV 及び [6]-gingerol を和光純薬より購入して用いた。煎出あるいは TLC 溶媒調製において用いる水は、Milli-Q Synthesis (Milipore) により調製した超純水を用いた。順相シリカゲル TLC プレートは、MERCK 社のシリカゲル 60F<sub>254</sub> を用いた。逆相 ODS TLC プレートは、MERCK 社の RP-18 F<sub>254S</sub> を用いた。その他の試薬は、いずれも各試薬メーカーの特級品を用いた。

### 機器

生薬を煎じる際には、ウチダ和漢薬製のらくらく煎を用い、煎出液の凍結乾燥は FREEZE DRYER FDU-830（東京理化器械）を用いて行った。

### 凍結乾燥エキスの調製

麗沢通気湯完全エキス：14 種類の麗沢通気湯構成生薬（黄耆 4 g、山椒 1 g、蒼朮 3 g、麻黄 1 g、羌活 3 g、百芷 4 g、独活 3 g、生姜 1 g、防風 3 g、大棗 1 g、升麻 1 g、葱白 3 g、葛根 3 g、甘草 1 g）をポット（らくらく煎）に取り、600 mL の水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液をナス型フラスコに入れ、-20℃で予備凍結させた後、凍結乾燥させて完全エキスを調製した。

麗沢通気湯一味去エキス：任意の生薬一つを除いた 13 種類の生薬を用いて、麗沢通気湯完全エキスと同様の操作により調製した。

生薬単味エキス：麗沢通気湯構成生薬をそれぞれ

れ20gずつポット（らくらく煎）に取り、400 mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液から凍結乾燥により生薬単味エキスを調製した。

#### 生薬確認試験検討のための試料溶液調製

麗沢通気湯構成生薬のうち、I) 日本薬局方既収載処方構成生薬でもあるもの（葛根、甘草、生姜、麻黄、黄耆、升麻及び蒼朮）については、局方既収載処方の確認試験における試料調製方法をスケールダウンして準用した。また、II) 処方構成生薬としては未収載であっても、単味の生薬として収載され、TLCによる確認試験の規格が存在するもの（羌活、山椒、独活及び防風）、及び、III) 上記のいずれにも該当しない生薬（大棗、百芷及び葱白）については、別に試料調製方法を設定して検討した。完全エキス、一味去エキス及び単味エキスを同じ調製方法で処理した。

#### ◎局方既収載処方の確認試験における試料調製方法の準用したもの

- 1) 葛根（葛根湯構成生薬）：凍結乾燥エキス20mgをマイクロチューブに取り、水200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。
- 2) 甘草（葛根湯等構成生薬）：凍結乾燥エキス20mgをマイクロチューブに取り、水200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。
- 3) 生姜（葛根湯等構成生薬）：凍結乾燥エキス20mgをマイクロチューブに取り、水200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル500 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた。ジエチルエーテル層を分取し、減圧で溶媒を留去した後、残留物にジエチルエーテル40 $\mu$ Lを加えて試料溶液とした。また、上記と同様の操作を施したものに対し、メタノール40 $\mu$ Lで溶かした溶液も分析に供した。
- 4) 麻黄（葛根湯構成生薬）：凍結乾燥エキス20mg

をマイクロチューブに取り、水200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール200 $\mu$ Lを加えて振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とした。

- 5) 黄耆（補中益気湯構成生薬）：乾燥エキス36mgをマイクロチューブに取り、水酸化カリウム・メタノール溶液（1 $\rightarrow$ 50）480 $\mu$ Lを加え、15分間振り混ぜた後、遠心分離し、上澄液を分取し、減圧で溶媒を留去した。残留物に水360 $\mu$ L及びジエチルエーテル240 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、水層を分取した。ここに1-ブタノール240 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール層を分取した。この1-ブタノール層に水240 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール層を分取した。上記の操作を別々に3度繰り返し、3回分の1-ブタノール層を合わせ、減圧で溶媒を留去した後、残留物にメタノール36 $\mu$ Lを加えて試料溶液とした。
- 6) 升麻（補中益気湯構成生薬）：凍結乾燥エキス20mgをマイクロチューブに取り、水300 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、1-ブタノール500 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた。1-ブタノール層を分取し、減圧で溶媒を留去した後、残留物にメタノール30 $\mu$ Lを加えて試料溶液とした。
- 7) 蒼朮（補中益気湯等構成生薬）：凍結乾燥エキス60mgをマイクロチューブに取り、水300 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた後、ヘキサン750 $\mu$ Lを加えて振り混ぜた。ヘキサン層を分取し、無水硫酸ナトリウム50mgを加えて乾燥した後、遠心分離し、上澄液を分取した。上澄液の溶媒を減圧で留去した後、残留物にヘキサン60 $\mu$ Lを加えて試料溶液とした。

#### ◎別に試料調製方法を設定したもの

局方既収載処方の構成生薬でないものは、以下の2つの方法(①あるいは②)で試料を調製した。羌活、山椒及び防風については①を適用し、独活、大棗、百芷及び葱白は①及び②を適用した。

①エキス水溶液の1-ブタノール分配：凍結乾燥エ