

キス 30 mg をマイクロチューブに取り、水 300 μ L を加えて振り混ぜた後、1-ブタノール 300 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、1-ブタノール層を分取し、無水硫酸ナトリウム 50 mg を加えて乾燥した後、遠心分離し、上澄液を分取した。

- ②エキス水溶液のジエチルエーテル分配：凍結乾燥エキス 30 mg をマイクロチューブに取り、水 300 μ L を加えて振り混ぜた後、ジエチルエーテル 300 μ L を加えて振り混ぜ、遠心分離し、ジエチルエーテル層を分取し、無水硫酸ナトリウム 50 mg を加えて乾燥した後、遠心分離し、上澄液を分取した。

呈色試薬の調製

展開後のTLCプレートに噴霧する希硫酸、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液、ニンヒドリン試液及びバニリン・硫酸試液については、日本薬局方一般試験法の試薬・試液の項 (9.41) に従って調製した。

倫理面への配慮

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用しない。

C. 研究結果

構成生薬の確認試験

麗沢通気湯における生薬確認試験は、局方等に示される定法と同様に、操作が簡便なTLCを用いた分析法の確立を目標とした。麗沢通気湯の完全処方煎出エキス、一味去処方煎出エキス及び単味生薬煎出エキスを水に溶解させ、1-ブタノール、ジエチルエーテル、あるいはヘキサンで分配したものについて、特異的な指標成分を検出できるような条件の検討を行った。第15改正日本薬局方及び第一追補あるいはJP Forumに確認試験法の記載がある生薬については、その分析法の準用を念頭に置きつつ、麗沢通気湯処方中での確認試験について検討した。以下に個別の分析結果につい

て示す。

1) 葛根確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (20:3:2)

検出方法：紫外線 (主波長 365 nm) 照射

標準溶液：puerarinのメタノール溶液

備考：第15改正局方収載の葛根湯エキスにおける葛根確認試験を準用した。

完全処方及び葛根単味の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、puerarin標準溶液から得た青白色の蛍光を発するスポットと色調及びR_f値 (0.33) が等しく、去葛根処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が葛根確認試験として適当であることが分かった (図1)。また、このスポットは254 nm照射によっても同様に観察された。

2) 甘草確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (20:3:2)

検出方法：希硫酸を噴霧し、105°Cで5分間加熱

備考：第15改正局方収載の葛根湯エキス等における甘草確認試験を準用した。

完全処方及び甘草単味の試料溶液から得られたR_f値0.37及び0.29の黄褐色のスポットは去葛根処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が甘草確認試験として適当であることが分かった (図2)。これら2つのスポットはいずれも指標成分となり得るが、過去のデータとの比較より、R_f値0.37のスポットはliquiritinと推測された。

3) 生姜確認試験の条件検討

試料溶液：ジエチルエーテル分配画分

固定相：シリカゲルTLC

展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン (1:1)

検出方法：4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱

標準溶液：[6]-gingerol のメタノール溶液

備考：第15改正局方収載の葛根湯エキスにおける生姜確認試験を準用した。

完全処方及び生姜単味の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、[6]-gingerol 標準溶液から得た赤紫色のスポットと色調及び Rf 値 (0.44) が等しく、去生姜処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が生姜確認試験として適当であることが分かった (図3)。また、このスポットは 254 nm 照射あるいは 365 nm 照射では検出できなかった。この分析条件では [6]-gingerol 以外に指標成分となり得るスポットが存在しなかった。

4) 麻黄確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (7:2:1)

検出方法：ニンヒドリン試液に2秒浸した後、105℃で5分間加熱

備考：第15改正局方収載の葛根湯エキスにおける麻黄確認試験を準用した。

完全処方及び麻黄単味の試料溶液から得られた Rf 値 0.37 の赤紫色のスポットは去麻黄処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が麻黄確認試験として適当であることが分かった (図4)。ただし、完全処方から検出される該当スポットは極めて色が薄いものであった。また、このスポットは 254 nm 照射あるいは 365 nm 照射では検出できなかった。過去のデータとの比較より、Rf 値 0.37 のスポットは ephedrine と推測された。この分析条件では Rf 値 0.37 のスポット以外に指標成分となり得るスポットが存在しなかった。

5) 黄耆確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：逆相 ODS TLC

展開溶媒：メタノール/水/ブタノール/水 (60:30:10:1)

検出方法：メタノールに2秒間浸した後、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱

標準溶液：astragaloside IV のメタノール溶液

備考：第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける黄耆確認試験を準用した。

完全処方及び黄耆単味の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、astragaloside IV 標準溶液から得た赤褐色のスポットと色調及び Rf 値 (0.43) が等しく、去黄耆処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が黄耆確認試験として適当であることが分かった (図5)。ただし、完全処方から検出される該当スポットは極めて色が薄いものであった。また、このスポットは 254 nm 照射あるいは 365 nm 照射では検出できなかった。

6) 升麻確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/アセトン/水 (20:12:3)

検出方法：希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱

備考：第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける升麻確認試験を準用した。

完全処方及び升麻単味の試料溶液から観察され、去升麻処方の試料溶液からは検出されないようなスポットは本分析条件では検出できなかった (図6)。これは 254 nm 照射あるいは 365 nm 照射でも検出できなかった。

7) 蒼朮確認試験の条件検討

試料溶液：ヘキサン分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：ヘキサン/アセトン (7:1)

検出方法：4-ジメチルアミノベンズアルデヒド

試液を噴霧し、105°Cで5分間加熱

備考：第15改正局方第一追補収載の補中益気湯エキスにおける蒼朮確認試験を準用した。

完全処方及び蒼朮単味の試料溶液から得られたRf値0.25の帯緑褐色のスポット（図7の矢印の先）は去蒼朮処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が蒼朮確認試験として適当であることが分かった。ただし、完全処方から検出される該当スポットは極めて色が薄いものであった。このスポットは254 nm照射でも検出されたが、極めて吸収は弱いものであった。この分析条件ではRf値0.25のスポット以外に指標成分となり得るスポットが存在しなかった。

8) 羌活確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：逆相 ODS TLC

展開溶媒：メタノール/水（9:1）

検出方法：紫外線（主波長 365 nm）及び紫外線（主波長 254 nm）の照射

備考：第15改正局方収載の羌活単味生薬の確認試験を準用した。

紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において完全処方及び羌活単味の試料溶液から得られたRf値0.56の青白色のスポットは去羌活処方の試料溶液からは検出されず、また、このスポットは紫外線（主波長 254 nm）の照射では暗紫色を呈し、本分析条件が羌活確認試験として適当であることが分かった（図8）。ただし、完全処方から検出される該当スポットは極めて色が薄いものであった。さらに、紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において完全処方及び羌活単味の試料溶液から得られたRf値0.37の青白色のスポットも同様に去羌活処方の試料溶液からは検出されず、これも指標成分となり得ることが分かった。ただし、このスポットはRf値0.56のスポットより色が薄いものであった。

また、羌活に対しては、順相のシリカゲル TLC

による条件検討も行った。

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水（20:5:4）

検出方法：紫外線（主波長 365 nm）及び紫外線（主波長 254 nm）の照射

紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において完全処方及び羌活単味の試料溶液から得られたRf値0.42及び0.30の青白色のスポット（図9Bの試料3における青色の矢印の先）は去羌活処方の試料溶液からは検出されず、順相のシリカゲル TLCでも十分に羌活の確認を行えることが分かった（図9の試料1~3）。

9) 山椒確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/エタノール（95）/水（8:2:1）

検出方法：紫外線（主波長 254 nm）の照射

備考：第15改正局方収載の山椒単味生薬の確認試験を準用した。

完全処方及び山椒単味の試料溶液から観察され、去山椒処方の試料溶液からは検出されないようなスポットは本分析条件では検出できなかった（図10）。これは365 nm照射あるいは希硫酸を噴霧して加熱した場合でも同様であった。

また、山椒に対しては、前述の羌活と同じ条件での分析も行った。

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水（20:5:4）

検出方法：紫外線（主波長 365 nm）及び紫外線（主波長 254 nm）の照射

紫外線（主波長 254 nm）を照射した条件において完全処方及び羌活単味の試料溶液から得られたRf値0.80のスポット（図9Aの試料5における黄色の矢印の先）は去羌活処方の試料溶液から

は検出されず、本分析条件が山椒確認試験として適当であることが分かった（図 9 の試料 1、4 及び 5）。

10) 独活確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分あるいはジエチルエーテル分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (30:10:1)

検出方法：バニリン・硫酸試液を噴霧し、105℃で5分間加熱

備考：第 15 改正局方第一追補収載の独活単味生薬の確認試験を準用した。

完全処方及び独活単味の試料溶液から得られた R_f 値 0.60 の赤紫色のスポットは去独活処方の試料溶液からは検出されず、本分析条件が独活確認試験として適当であることが分かった（図 11）。特に、ジエチルエーテルで分配した試料では、完全処方においても該当スポットが良好に観察された。紫外線照射（254 nm 及び 365 nm）においては、指標成分となり得るスポットを見出すことができなかった。

11) 防風確認試験の条件検討

試料溶液：1-ブタノール分配画分

固定相：シリカゲル TLC

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (10:2:1)

検出方法：紫外線（主波長 254 nm）の照射

備考：JP Forum Vol. 16 No. 3 (2007) 収載の防風単味生薬の確認試験を準用した。

防風単味の試料溶液からいくつかのスポットが良好に観察されたが、完全処方に存在し、且つ、去防風処方に存在しないようなスポットは本分析条件では見出すことができなかった（図 12）。紫外線照射（254 nm 及び 365 nm）においても、指標成分となり得るスポットを見出すことができなかった。

12) 大棗、百芷及び葱白確認試験の条件検討

大棗、百芷及び葱白においては、公定書等に参考となる分析条件の記載が存在しなかったため、以下の3種類の溶媒系によるシリカゲル TLC 分析を検討した。いずれも試料溶液は1-ブタノール分配画分及びジエチルエーテル分配画分の双方を供した。検出方法としては紫外線照射（254 nm 及び 365 nm）及び希硫酸を噴霧して 105℃で5分間加熱する検出法を適用した。

i) 低極性成分に標的を絞り、展開溶媒ヘキサン/アセトン (4:1) による分析を試みた（図 13）。

大棗及び葱白の単味より調製した試料溶液には、この溶媒系で展開される目立つスポットは存在しなかった。百芷単味の場合は、紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において1-ブタノール分配画分で R_f 値 0.24 の青白色のスポット、ジエチルエーテル分配画分で R_f 値 0.15 の青白色のスポットが鮮やかに観察され、これらはいずれも紫外線（主波長 254 nm）を照射した条件でも強い吸収を示したが、完全処方由来試料溶液のスポットが全体的に薄いこともあり、指標成分となり得るかどうかの判断は付かなかった。

ii) 中程度の極性の成分に標的を絞り、展開溶媒酢酸エチル/メタノール/水 (20:5:4) による分析を試みた（図 14）。大棗及び葱白の単味より調製した試料溶液には、共に、1-ブタノール分配画分で R_f 値 0.19 に希硫酸噴霧加熱により暗紫色に呈色するスポットが観察されたが、それぞれの去処方の試料溶液においても該当スポットが観察され、指標成分としては不適合であった。百芷単味の場合は、紫外線（主波長 365 nm）を照射した条件において1-ブタノール分配画分及びジエチルエーテル分配画分で R_f 値 0.74 の青白色のスポットが鮮やかに観察されたが、同等の R_f 値に去百芷処方でも弱い蛍光が見られた。一方、百芷の1-ブタノール分配画分で R_f 値 0.11 に希硫酸噴霧加熱により暗紫色に呈色するスポットが観

察され、これは完全処方に検出され、去百芷処方には検出されないため、特異的な指標成分となり得ることが示された。

iii) 高極性の成分に標的を絞り、展開溶媒 1-ブタノール/水/酢酸 (7:2:1) による分析を試みた (図 15)。大棗及び葱白の単味より調製した試料溶液には、共に、ii) の溶媒系で希硫酸噴霧加熱により 1-ブタノール分配画分に観察されたものと同じと思われる暗紫色のスポットが、*R_f* 値 0.28 に観察されたが、やはりそれぞれの去処方の試料溶液においても該当スポットが観察され、比較的普遍的な化合物であると推測された。百芷単味の場合は、紫外線 (主波長 365 nm) を照射した条件において、ii) で述べたものと同じと思われる青白色の蛍光スポットが 2 つ (*R_f* 値 0.75 及び 0.69) に分離し、そのうち *R_f* 値 0.69 のスポットは去百芷処方には観察されず、特異的な指標成分となり得ることが示された。また、これらの 2 つのスポットは紫外線 (主波長 254 nm) を照射した条件においても吸収が観察され、やはり *R_f* 値 0.69 のスポットは去百芷処方には観察されず、特異的な指標成分となり得ることが示された。ただし、ii) において観察された、百芷の 1-ブタノール分配画分における希硫酸噴霧加熱により暗紫色に呈色する特異的なスポットは、本溶媒系では観察されなかった。

D. 考察

麗沢通気湯は 14 種類もの生薬から構成される処方であり、シリカゲル TLC プレート上で多くのスポットを与えるが、10 種類の生薬について確認試験法となり得る分析条件を見出すことができた。このうち、葛根、生姜及び黄耆については、指標成分をそれぞれ puerarin、[6]-gingerol 及び astragaloside IV と特定することが可能であり、また、甘草及び麻黄についても、今回の実験で指標成分として想定したスポットは、それぞれ liquiritin 及び ephedrine に相当することはほぼ

確実と思われる。山椒、蒼朮、羌活、百芷及び独活については、完全処方と単味に検出され、一味去処方においては検出されないという判定基準において指標成分として設定し得るスポットを見出すことができた。今後は、これらの成分を同定することが必要である。また、今回の研究では全般的に完全処方及び一味欠処方由来の試料溶液の濃度が薄かったため、高濃度の試料を用いた検討により、今回示した確認試験候補の妥当性を確認する必要があると思われる。確認試験となり得る分析条件を見出すことができなかった構成生薬のうち、防風、升麻及び葱白については、今回試みた検出法であっても TLC プレート上にいくつかのスポットが観察されたため、展開溶媒の吟味により特異的な確認試験を見出せる可能性はある。一方、大棗については目立ったスポットが検出されず、特定成分の濃縮や呈色試薬の工夫等により含有成分を TLC 上で検出することがまず優先事項であると思われる。

指標成分の特定は不十分であるが、日本薬局方あるいは JP Forum に漢方処方の構成生薬としての確認試験が規定されていない生薬の中で山椒、羌活及び百芷について確認試験案を提出できたことは大きな成果であると思われる。特に、羌活については、日本薬局方の羌活の項に規定されている逆相 TLC を用いた確認法の他に、順相のシリカゲル TLC でも十分に確認試験を設定できる可能性を示すことができた。さらに、山椒については、日本薬局方の山椒の項に規定されているものとは異なる溶媒系を提案することができた。漢方処方の成分組成は構成生薬が一つ増えただけでも大きく変化する可能性があるため、新規収載候補処方の品質評価法は個別に検討せざるを得ないが、本研究において見出した分析条件が、麗沢通気湯以外の新規処方の確認試験検討の参考情報として貢献することを期待している。

E. 結論

麗沢通気湯エキス中の生薬確認試験として、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、シリカゲル TLC あるいは
逆相 ODS TLC を用いた条件設定案を提示すること
ができた。

F. 研究発表

1. 学会発表
 該当無し
2. 誌上発表
 該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

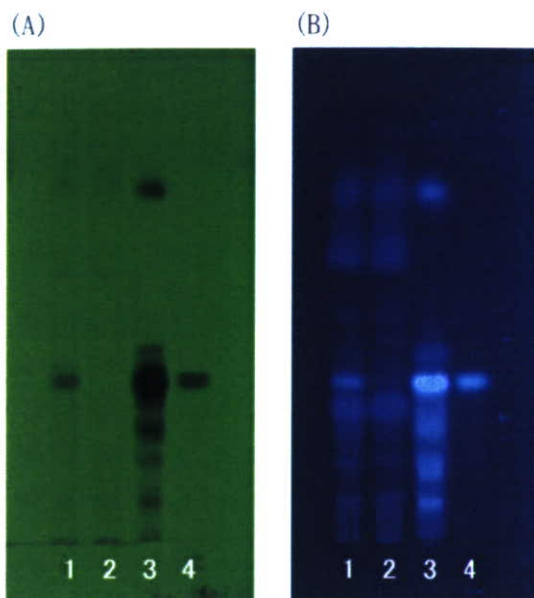


図1 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による葛根確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水（20:3:2）。試料：いずれもブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去葛根煎出エキス、3. 葛根単味煎出エキス、4. puerarin 標準溶液。

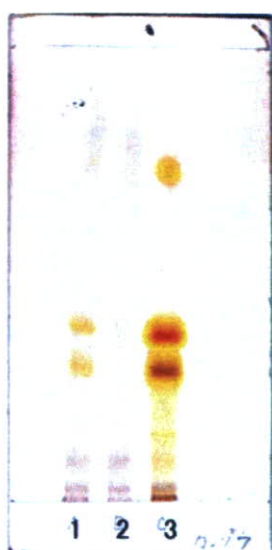


図2 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による甘草確認試験の条件検討

希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水（20:3:2）。試料：いずれもブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去甘草煎出エキス、3. 甘草単味煎出エキス。

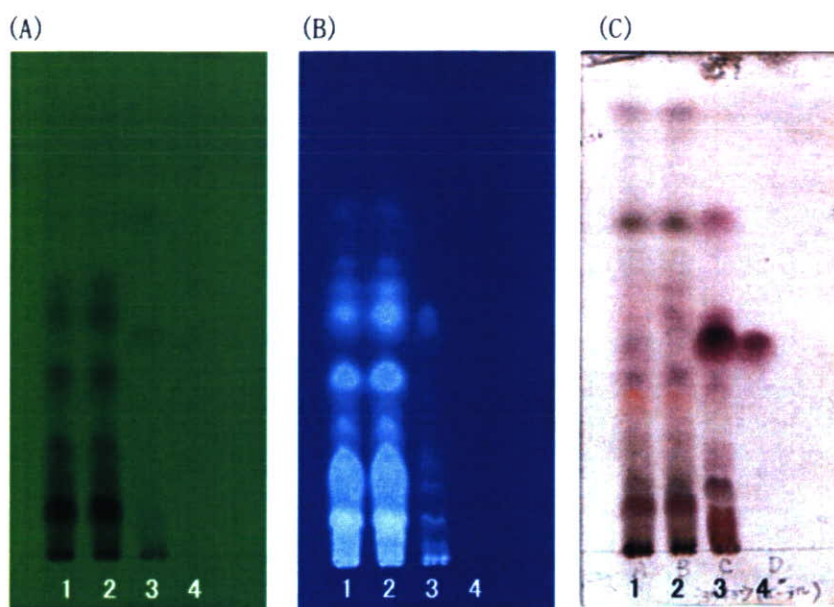


図3 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による生姜確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/ヘキサン（1:1）。試料：いずれもジエチルエーテル分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去生姜煎出エキス、3. 生姜単味煎出エキス、4. [6]-gingerol 標準溶液。



図4 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による麻黄確認試験の条件検討

ニンヒドリン試液に2秒浸した後、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸（7:2:1）。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去麻黄煎出エキス、3. 麻黄単味煎出エキス。

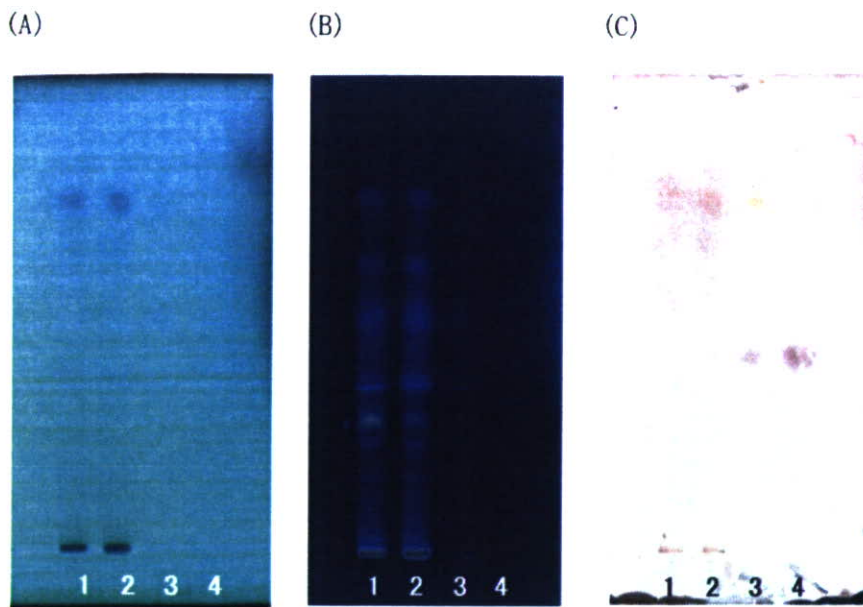


図5 麗沢通気湯エキスにおける逆相 ODS TLC RP-18 による黄耆確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：メタノール/水/ブタノール/水（60:30:10:1）。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去黄耆煎出エキス、3. 黄耆単味煎出エキス、4. astragaloside IV標準溶液。

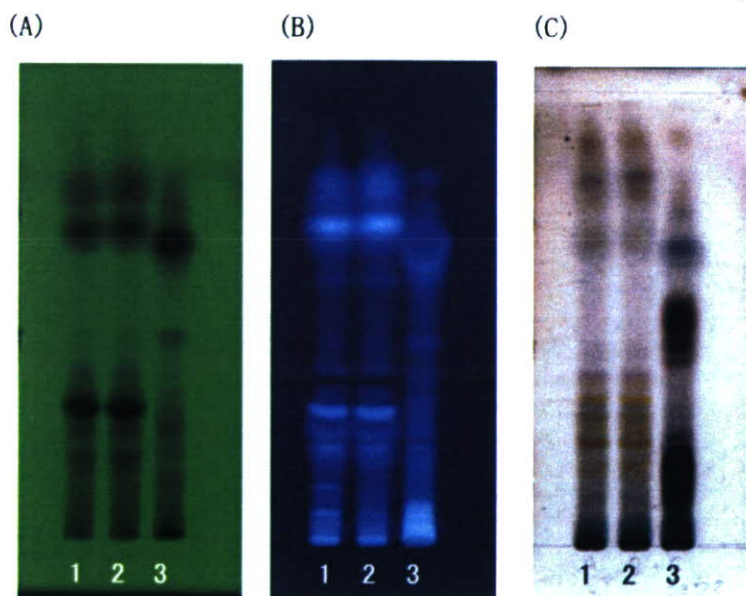


図6 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による升麻確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/アセトン/水（20:12:3）。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去升麻煎出エキス、3. 升麻単味煎出エキス。

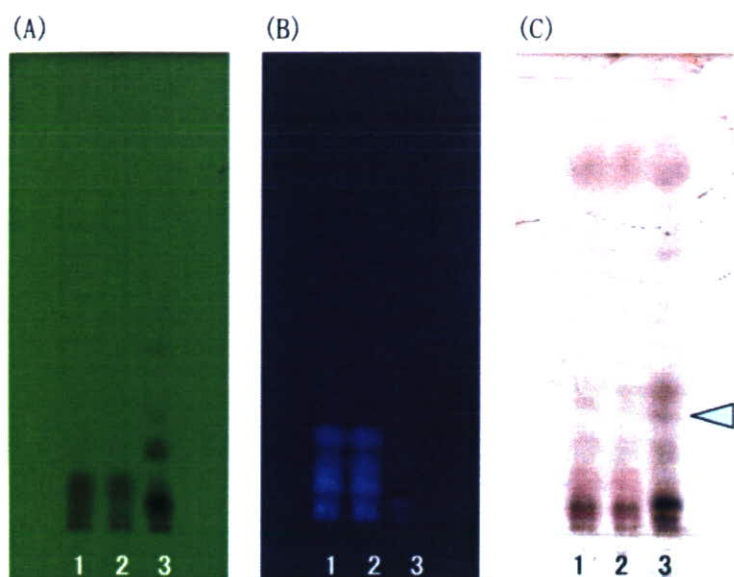


図7 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による蒼朮確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 4-ジメチルアミノベンズアルデヒド試液を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：ヘキサン/アセトン（7:1）。試料：いずれもヘキサン分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去蒼朮煎出エキス、3. 蒼朮単味煎出エキス。

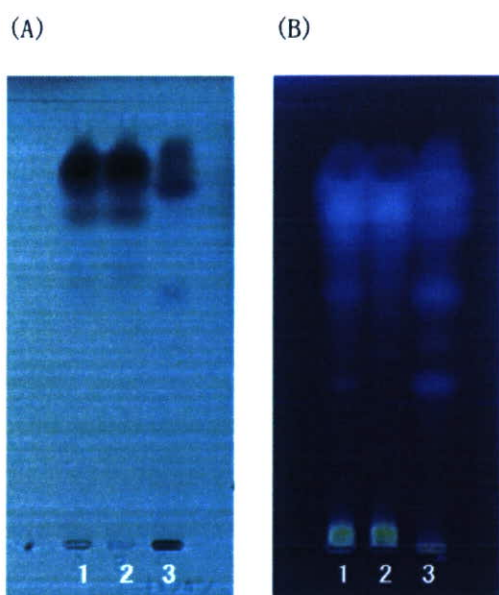


図8 麗沢通気湯エキスにおける逆相 ODS TLC RP-18 による羌活確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。

展開溶媒：メタノール/水（9:1）。試料：いずれも1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去羌活煎出エキス、3. 羌活単味煎出エキス。

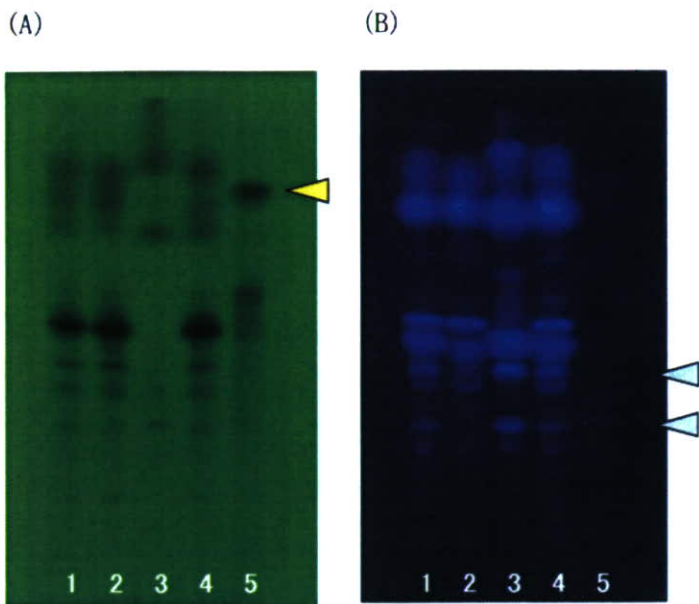


図9 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による羌活及び山椒確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水（20:5:4）。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去羌活煎出エキス、3. 羌活単味煎出エキス、4. 去山椒煎出エキス、5. 山椒単味煎出エキス。

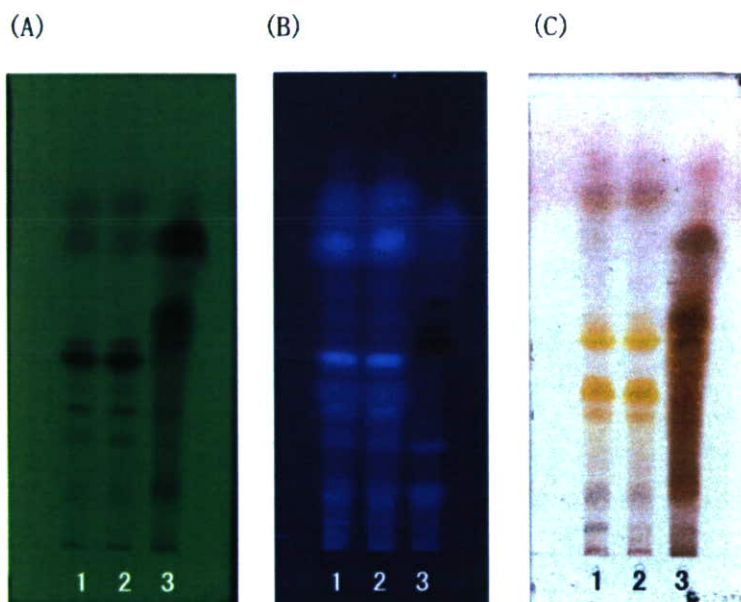


図10 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による山椒確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/エタノール(95)/水（8:2:1）。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去山椒煎出エキス、3. 山椒単味煎出エキス。

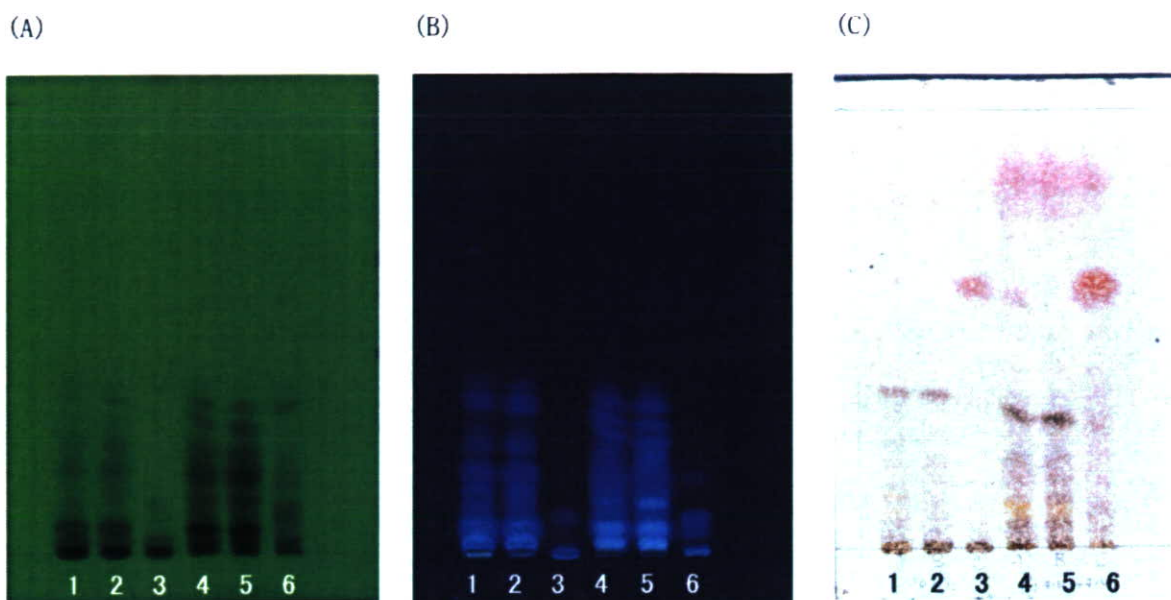


図 11 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による独活確認試験の条件検討

(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) バニリン・硫酸試液を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：ヘキサン/酢酸エチル/酢酸 (30:10:1)。試料：1～3 は 1-ブタノール分配画分、4～6 はジエチルエーテル分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去独活煎出エキス、3. 独活単味煎出エキス、4. 完全煎出エキス、5. 去独活煎出エキス、6. 独活単味煎出エキス。

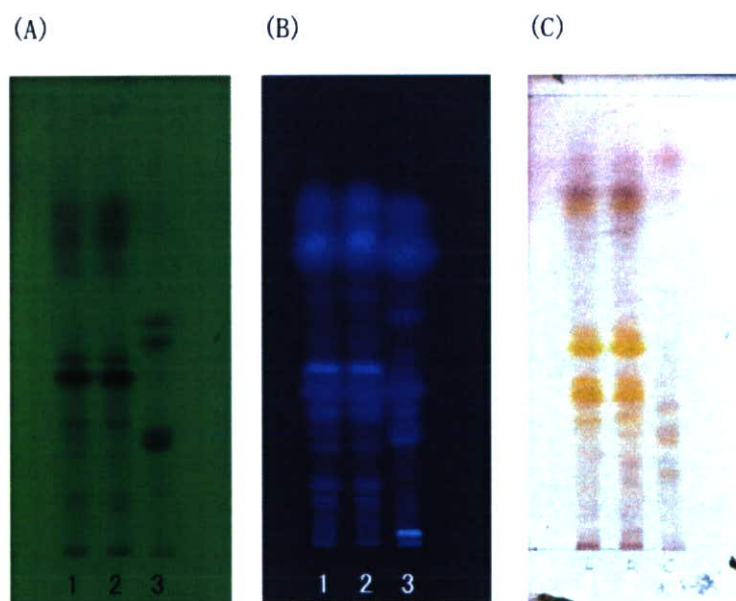
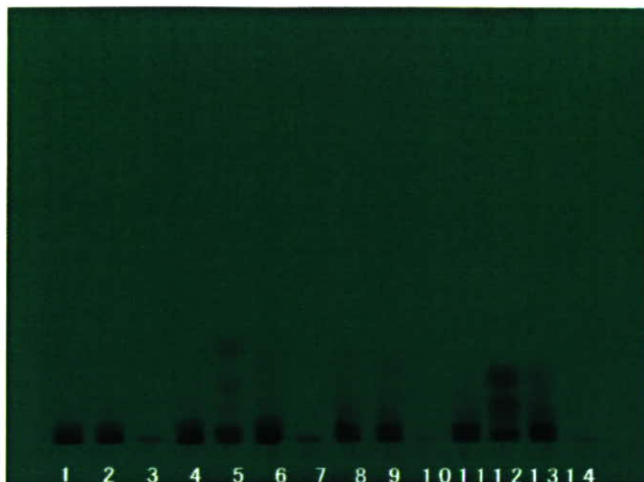


図 12 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による防風確認試験の条件検討

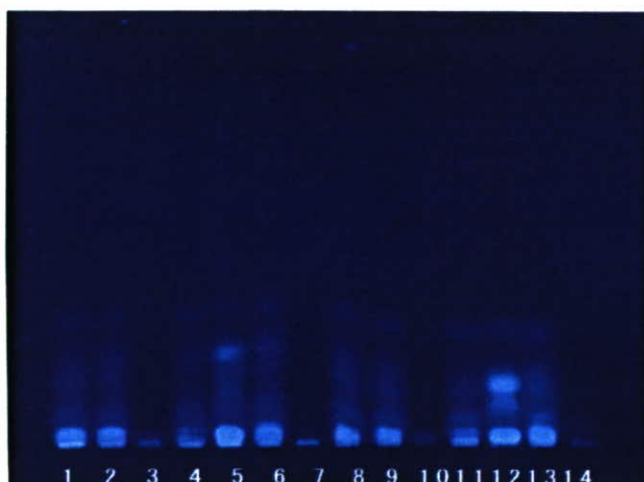
(A) 紫外線（主波長 254 nm）照射による検出。(B) 紫外線（主波長 365 nm）照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (10:2:1)。試料：いずれも 1-ブタノール分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去防風煎出エキス、3. 防風単味煎出エキス。

(A)



(B)



(C)

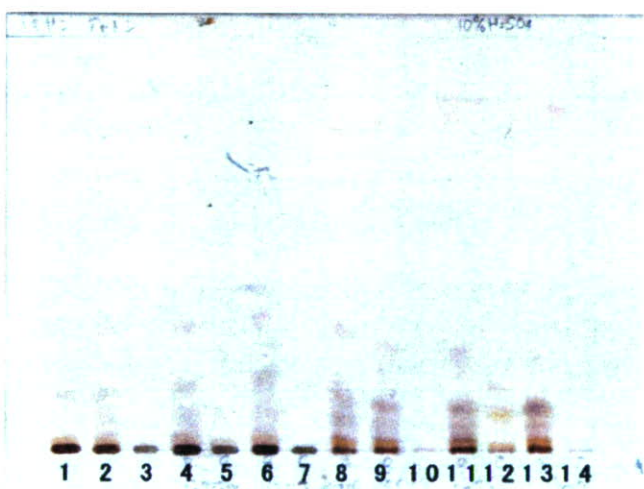
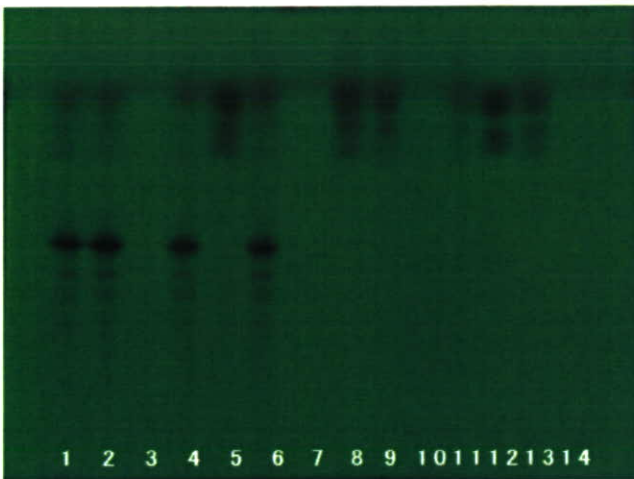


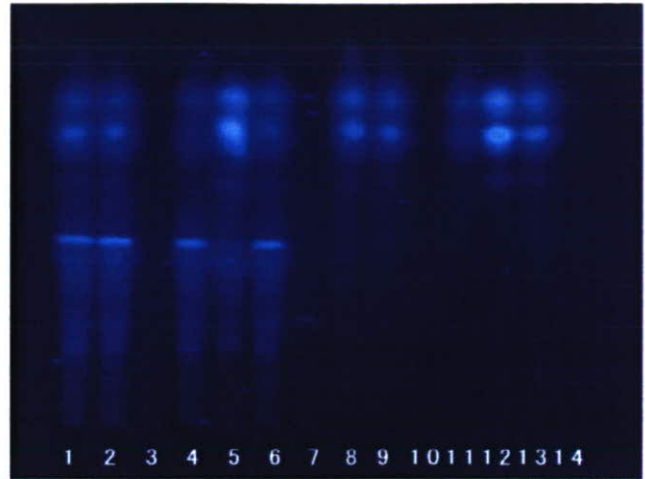
図 13 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による大棗、百苳及び葱白の確認試験の条件検討 1
(A) 紫外線 (主波長 254 nm) 照射による検出。(B) 紫外線 (主波長 365 nm) 照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105℃で5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：ヘキサン/アセトン (4:1)。試料：1～7 は 1-ブタノール分配画分、7～14 はジエチルエーテル分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去大棗煎出エキス、3. 大棗単味煎出エキス、4. 去百苳煎出エキス、5. 百苳単味煎出エキス、6. 去葱白煎出エキス、7. 葱白単味煎出エキス、8. 完全煎出エキス、9. 去大棗煎出エキス、10. 大棗単味煎出エキス、11. 去百苳煎出エキス、12. 百苳単味煎出エキス、13. 去葱白煎出エキス、14. 葱白単味煎出エキス。

(A)



(B)



(C)

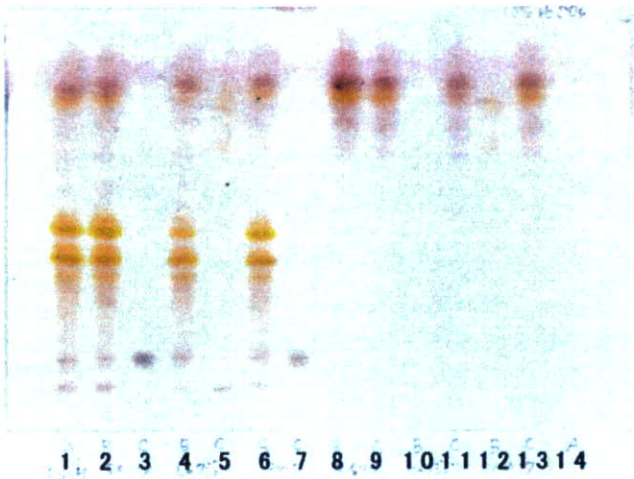
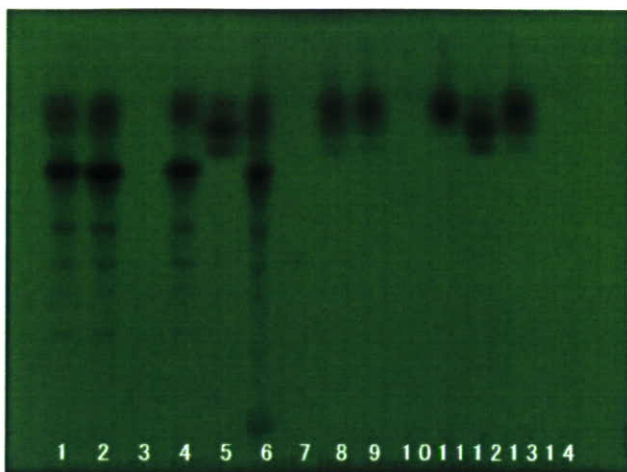


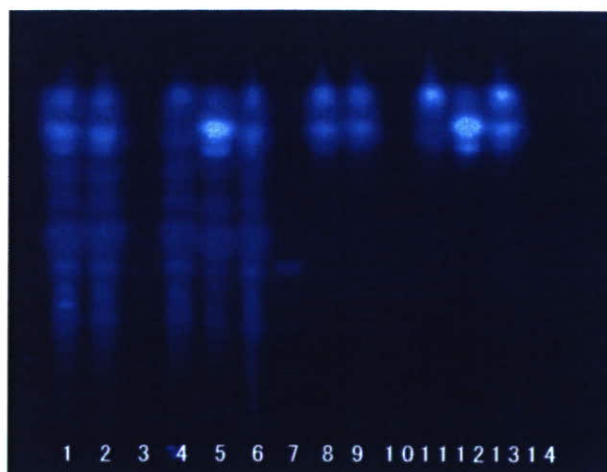
図 14 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による大棗、百苳及び葱白の確認試験の条件検討 2
 (A) 紫外線 (主波長 254 nm) 照射による検出。(B) 紫外線 (主波長 365 nm) 照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105℃で 5 分間加熱することによる検出。

展開溶媒：酢酸エチル/メタノール/水 (20:5:4)。試料：1～7 は 1-ブタノール分配画分、7～14 はジエチルエーテル分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去大棗煎出エキス、3. 大棗単味煎出エキス、4. 去百苳煎出エキス、5. 百苳単味煎出エキス、6. 去葱白煎出エキス、7. 葱白単味煎出エキス、8. 完全煎出エキス、9. 去大棗煎出エキス、10. 大棗単味煎出エキス、11. 去百苳煎出エキス、12. 百苳単味煎出エキス、13. 去葱白煎出エキス、14. 葱白単味煎出エキス。

(A)



(B)



(C)

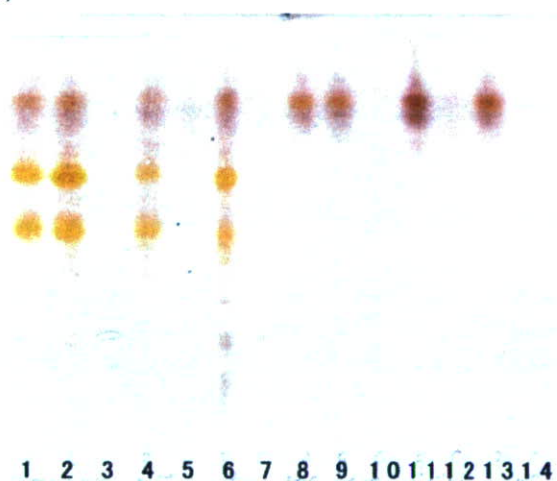


図 15 麗沢通気湯エキスにおけるシリカゲル TLC による大棗、百苳及び葱白の確認試験の条件検討 3
 (A) 紫外線 (主波長 254 nm) 照射による検出。(B) 紫外線 (主波長 365 nm) 照射による検出。(C) 希硫酸を噴霧し、105°Cで5分間加熱することによる検出。

展開溶媒：1-ブタノール/水/酢酸 (7:2:1)。試料：1~7は1-ブタノール分配画分、7~14はジエチルエーテル分配画分、1. 完全煎出エキス、2. 去大棗煎出エキス、3. 大棗単味煎出エキス、4. 去百苳煎出エキス、5. 百苳単味煎出エキス、6. 去葱白煎出エキス、7. 葱白単味煎出エキス、8. 完全煎出エキス、9. 去大棗煎出エキス、10. 大棗単味煎出エキス、11. 去百苳煎出エキス、12. 百苳単味煎出エキス、13. 去葱白煎出エキス、14. 葱白単味煎出エキス。

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

新一般用漢方処方の腸内細菌の生育に与える影響に関する研究

漢方処方及び生薬エキスの腸内細菌の生育に対する影響について、*in vitro* 培養した腸内細菌の培地 pH を測定することにより検討した。処方においては大黄甘草湯、小承気湯、梔子柏皮湯及び葛根黄連黄芩湯に、個別の生薬では大黄、黄連及び黄柏に強い pH 降下抑制活性が見出された。また、*Clostridium perfringens* について、培地 pH 降下を促進する処方及び生薬が多数見出された。これらの pH 降下促進活性は短鎖脂肪酸（有機酸）生産量と良い相関を示した。さらに、*Clostridium difficile* の生育に対して、特異的に影響を及ぼし得る処方として大柴胡湯を見出し、その活性の主役が枳実及び黄芩であることを明らかにした。

研究協力者

遠藤明仁 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

ヒト腸内細菌叢は数百種類の菌種から形成され、宿主の健康維持や疾患の予防・発症・増悪と密接な関係を持つことが知られている。この腸内細菌叢のバランスを良い状態に保つことが健康維持の上で非常に重要とされている。また、腸内細菌が生産する酪酸、プロピオン酸等の短鎖脂肪酸（有機酸）は、宿主腸管細胞によって利用され、腸内環境の改善に有用であることが知られている。このため、腸内細菌叢の組成解明に関する研究やプロバイオティクス、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢や短鎖脂肪酸含量をコントロールする試み等が、ヒトを含む多くの動物を対象として行われている。漢方処方の作用発現における腸内細菌の関与も古くから論じられ、腸内細菌に代謝されることにより漢方処方成分の有効性に変化が生じる例はよく調べられている。一方、漢方処方の服用が腸内細菌叢のバランス及び短鎖

脂肪酸生産に与える影響に関しては、十分に検討されているとは言い難い。

さて、社会構造及び疾病構造の変化に加えて、自らの健康に強い関心を持つ国民が増え、軽度な疾病の予防や生活の質の改善、向上等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普及しつつあることを受けて、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、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-」を平成 14 年に発表している。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。

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

る研究」において「一般用漢方処方を見直しを図るための調査研究班」が組織され、従来的一般用漢方処方を見直しと共に、現代社会に相応しいと考え得る新規 85 処方の追加が検討され、平成 18 年 3 月に「新一般用漢方処方の手引き案」（新 210 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。

「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」に記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、漢方処方の有効性及び安全性に関する研究の一環として、*in vitro* 培養したヒト腸内構成菌を用い、その生育及び短鎖脂肪酸生産に及ぼす漢方処方及びその構成生薬の影響について検討を行った。

B. 研究方法

試薬及び器具

生薬はウチダ和漢薬より日本薬局方規格品を購入して用いた。D-glucose、resazurin Na 及びブロムチモールブルーは関東化学の製品を用いた。アネロパックは三菱ガスケミカル製の製品を用いた。嫌気ジャーは BD の GasPak 100 Holding Jar を用いた。24 穴マイクロプレートは AGC テクノグラス (IWAKI) の製品を用いた。0.22 μm 孔あるいは 0.45 μm 孔のメンブランフィルターは Millipore 社の Millex (PVDF) を用いた。短鎖脂肪酸分析用の HPLC カラムは、TOSOH 社のイオン排除型有機酸分析カラム TSKgel OApak-A 及びプレカラム TSKgel OApak-P を用いた。

腸内細菌

以下の腸内細菌の基準株 *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132、*Lactobacillus reuteri* JCM 1112、*Bifidobacterium adolescentis* JCM

1275、*Bifidobacterium catenulatum* JCM 1194、*Bifidobacterium longum* JCM 1217、*Clostridium perfringens* JCM 1290 及び *Clostridium difficile* JCM 1296 を理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室より購入して用いた。

設備及び機器

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 (東京理化学器械) を用いて行った。培地のガス噴射法による窒素置換は、嫌気性培養装置 AG-2 (三紳工業) により行った。オートクレーブには MAC-601 (東京理化) を用いた。嫌気グローブボックスは米国 COY 社の製品を用いた。pH の測定は、簡易 pH メーター twin pH (AS ONE) を用いた。短鎖脂肪酸定量には TOSOH の HPLC システム (SC-8020、CCPM-II、AS-8020、CO-8020、UV-8020) を用いた。

漢方処方及び生薬のエキス調製

漢方処方エキス：それぞれの処方の構成生薬を表 1 に示した処方構成でポット (らくらく煎) に取り、生薬総重量の 20 倍量の水を入れ、半量になるまで煎じた。この煎出液をナス型フラスコに入れ、 -20°C で予備凍結させた後、凍結乾燥させて漢方処方エキスを調製した。

単味生薬エキス：それぞれの生薬 20g をポットに取り、400 mL の水で半量になるまで煎じた。この煎出液をナス型フラスコに入れ、 -20°C で予備凍結させた後、凍結乾燥させて単味生薬エキスを調製した。

腸内細菌の培地調製

MRS 培地：本培地は *L. acidophilus* 及び *L. reuteri* の培養に用いた。MRS broth (Oxoid) を定法の通り 52 g/L で用い、蒸留水で溶解後、L-cysteine を最終濃度 0.05% で加え、pH を 5.5 に合わせた。そして、 121°C 、15 分間オートク

レーブ滅菌を施した後に用いた。

GAM 培地：本培地は *B. adolescentis*、*B. catenulatum*、*B. longum*、*C. perfringens* 及び *C. difficile* の培養に用いた。GAM ブイヨン（日水製薬）を蒸留水で 41.7 g/L になるように溶かし、ここに最終濃度 5 g/L の D-glucose 及び最終濃度 1 mg/L の resazurin Na を加え、溶解後に pH を 6.8 に合わせた。酸素を除去した窒素ガスの噴射により培地を窒素置換し、115 °C、15 分の条件でオートクレーブ滅菌を行った後に用いた。

腸内細菌の培養

乳酸菌の培養：-80°C に凍結保存した細菌を MRS 培地に一白金耳接種し、アネロパックを入れた嫌気ジャーの中で 37°C、一晚培養した。

乳酸菌以外の培養：無酸素混合ガス ($N_2/CO_2/H_2=80/10/10$) で置換した嫌気グローブボックスの中で、-80°C に凍結保存した細菌を GAM 培地に一白金耳接種し、37°C で一晚培養した。

培養液 pH の測定による細菌生育試験

試料溶液は、漢方処方エキス及び生薬エキスを細菌培養用培地に 100 mg/mL の濃度で溶解したものとし、0.22 μ m 孔あるいは 0.45 μ m 孔のメンブランフィルターでろ過した後に用いた。24 穴マイクロプレートの 1 穴に 800 μ L の培地と 200 μ L の試料溶液（最終濃度 20 mg/mL）を加え、一晚培養した細菌を 10 μ L ずつ接種し、さらに 37°C、20 時間培養した。培養終了後、培養液 100 μ L を取り、その pH を測定した。

HPLC による短鎖脂肪酸の定量

pH 測定に用いた培養液の残りから 250 μ L を取り、MilliQ 水 750 μ L を加えて 4 倍希釈し、0.22 μ m 孔あるいは 0.45 μ m 孔のメンブランフィルターでろ過した後に、その 20 μ L を HPLC 分析に供した。短鎖脂肪酸の HPLC 定量は、イ

オン排除型有機酸分析カラムとブロムチモールブルー（BTB）指示薬を用い、ポストカラム反応型検出法により行った。分析条件は以下の通りである。

カラム：TSKgel OApak-P (6.0mm I. D. x 4cm)

TSKgel OApak-A (7.8mm I. D. x 30cm)

溶離液：0.75mM H_2SO_4

反応液：0.2mM BTB/15mM Na_2HPO_4 (pH8.6)

流速：溶離液及び反応液共に 0.8mL/min

反応温度：60°C

反応コイル：0.2mm I. D. x 5m

検出：VIS450nm

試料：20 μ L

標準溶液として乳酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸の希釈系列を同様の条件で分析し、検量線を描いて定量計算に用いた。

（倫理面への配慮）

本研究はいずれも動物等の倫理面を考慮すべき研究材料は使用していない。

C. 研究結果

漢方処方の腸内細菌生育に及ぼす影響

ヒト腸内細菌叢は 500 種以上の菌種で複雑に構成されており、そのうち現時点で培養可能な菌種は腸内構成菌種の 30%程度と言われている。本研究では、このうちから一般的に善玉菌及び悪玉菌と称される細菌を選択して実験に用いた。善玉菌の代表として *L. acidophilus*、*L. reuteri*、*B. adolescentis*、*B. catenulatum* 及び *B. longum* を選び、悪玉菌の代表として *C. perfringens* 及び *C. difficile* を選んだ。ただし、明確に善玉菌と悪玉菌を区別することは難しく、善玉菌及び悪玉菌という用語は科学的には用いられない用語となりつつあるが、今回の研究では便宜的に用いた。

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」において新規収載が提案され

た 85 処方から、効能・効果として下痢、胃腸炎、便秘等の下部消化管への作用が謳われている処方を中心にして、真武湯、附子理中湯、半夏散及湯及び梔子柏皮湯を選び、上記腸内細菌の生育に対する影響を検討した。また、現行の「一般用漢方処方の手引き」に記載されている 210 処方のうち、同様な基準で代表的な処方(桂枝加芍薬湯、五苓散、大柴胡湯、甘草瀉心湯、小承気湯、柴胡桂枝湯、桂枝加芍薬大黄湯、葛根黄連黄芩湯、三黄瀉心湯及び大黄甘草湯)を選択し、試験に供した。これら試験に供した処方の処方構成、効能・効果等については表 1 にまとめた。

一般的に、腸内細菌は増殖生育と共に有機酸(短鎖脂肪酸)を生産して周囲の環境の pH を下げ、一定の pH に達したときに増殖と有機酸生産を止めることが知られている。本研究ではこの特質を利用して、腸内細菌の増殖生育に関し、培地の pH を測定することにより間接的に観察した。

表 2 に MRS 培地で培養する *L. acidophilus* 及び *L. reuteri* に対する漢方処方エキスの影響をまとめた。表中の MRS negative control の列は、菌株を接種せずに MRS 培地のみでインキュベートしたものであり、また、試料名の MRS 培地の行は、漢方処方エキスの代わりに MRS 培地を添加したものである。つまり、MRS 培地のみで 20 時間インキュベートした場合、培地の pH は 5.5 のままであった。MRS 培地に試料番号 1~14 の漢方処方エキスを投与し、菌を接種せずに 20 時間インキュベートした場合、ほとんどが pH5.5 前後であり、最も大きく変化したのもでも梔子柏皮湯の pH5.2 であった。また、MRS 培地のみが存在する状況で *L. acidophilus* 及び *L. reuteri* を 20 時間培養すると、pH は両者共に 4.2 まで下がった。このような状況で、*L. acidophilus* 及び *L. reuteri* に漢方処方エキスを投与して 20 時間培養した場合、ほとんどのケースで pH が 4.2 前後まで下がったが、大黃

甘草湯エキスを投与したケースでは、エキスのみを含む培地では pH5.3 であるのに対して、*L. acidophilus* 及び *L. reuteri* と培養しても、pH はそれぞれ 5.2 及び pH5.0 までしか降下せず、双方の菌の成育阻害が起こったものと推測された。また、表 2 において、様々な試料の存在下に *L. acidophilus* 及び *L. reuteri* を 20 時間培養した際の pH の変化を数値で表すと、それぞれ [NM-A] 及び [NM-B] の列の数字の通りとなり、MRS 培地のみで培養した時の pH の変化 ($5.5 - 4.2 = 1.3$) を 100%として相対値で表したものが、それぞれの菌種における pH 変化率 (%) の列の数字となった。この列を見ても、大黃甘草湯を投与した場合は、*L. acidophilus* 及び *L. reuteri* においてそれぞれ 8%及び 23%しか pH が下がっておらず、それぞれの菌の生育が抑制されているものと推測された。また、小承気湯においても、*L. acidophilus* に対する弱い pH 降下抑制活性 (77%) が観察された。

次に、GAM 培地で培養する *B. adolescentis*、*B. catenulatum*、*B. longum*、*C. perfringens* 及び *C. difficile* の 5 菌株について検討した。結果は表 3 に示したが、表の見方は前述の表 2 のものと同様である。GAM 培地のみで 20 時間インキュベートした場合、培地の pH は作製時と変わらず 6.8 であり、これは漢方処方エキスを加えてもそれほど変化せず、最も大きく動くもので大黃甘草湯の pH6.4 であった。ここに bifidobacteria を接種して培養すると pH は大きく下がり、*B. adolescentis*、*B. catenulatum* 及び *B. longum* でそれぞれ 4.4、4.5 及び 4.4 まで到達した。一方、clostridia ではそれほど変化せず、*C. perfringens* 及び *C. difficile* の両者において pH5.6 であった。この状況において、小承気湯及び大黃甘草湯に 5 菌株すべてに対する強い pH 降下抑制活性が見られ、生育が抑制されているものと推測された。また、一部の菌に選択性を持つ漢方処方エキスが見出され、葛根黄連黄芩湯は *B. catenulatum* 及び

*B. longum*に強い抑制活性と *C. difficile*に弱い抑制活性を示し、大柴胡湯は *C. difficile*にのみ強い抑制活性を示した。

さらに、clostridia に関しては、pH の降下を加速する、すなわち生育促進作用と思われる現象が観察され、真武湯、附子理中湯、桂枝加芍薬湯、五苓散、大柴胡湯、甘草瀉心湯、柴胡桂枝湯、桂枝加芍薬大黃湯及び葛根黄連黄芩湯を投与した *C. perfringens* の培地において pH が 5 近くまで落ちていた。また、*C. difficile*でも桂枝加芍薬湯により pH の降下がやや加速されていた。

漢方処方構成生薬の腸内細菌生育に及ぼす影響

前項において、いくつかの処方が腸内細菌の生育に影響を及ぼす可能性が見出された。ここでは、腸内細菌の生育に対する影響を、個々の構成生薬について検討した。ここでも、それぞれの培地に溶解した生薬エキスを一律に最終濃度 20 mg/mL で投与し、20 時間培養後の培地の pH を測定した。ただし、茯苓及び猪苓はエキス収量が少なく、試験に供することができなかった。

まず、表 4 に MRS 培地で培養する lactobacilli の 2 菌株に対する生薬エキスの影響を示したが、黄連に強烈な pH 降下抑制活性が見出され、大黃にも強い抑制活性が観察された。また、黄柏は *L. acidophilus* に特異的な著しい抑制活性を示し、生姜及び乾姜も *L. acidophilus* のみを強く抑制した。一方で、大棗及び芍薬には *L. reuteri* の pH 降下を促進する傾向が観察された。

次に、GAM 培地で培養する bifidobacteria 及び clostridia の 5 菌株について検討した。結果は表 5 に示したが、5 菌種に渡り強く抑制する生薬は黄連、黄柏及び大黃であり、これに次いで広い抑制スペクトラムを示した生薬が、桂皮 (*B. catenulatum* 以外を抑制)、甘草及び厚

朴 (共に *B. adolescentis* 以外を抑制) であった。また、山梔子は *B. longum* のみを抑制し、麻黄は *C. perfringens* のみを抑制し、葛根、黄芩、枳実、柴胡及び加工ブシは *C. difficile* のみを抑制した。一方で、葛根、大棗、芍薬、生姜、人参、乾姜、白朮、加工ブシおよび沢瀉は、*C. perfringens* の pH 降下を促進し、特に、大棗及び加工ブシの作用は強烈であり、通常は pH 5.5 付近で生育を止める *C. perfringens* において pH をさらに 1 以上も下げている。また、大棗及び生姜は *C. difficile* においても pH 降下を促進し、芍薬及び加工ブシは *B. catenulatum* の pH 降下を促進していた。

腸内細菌培養液の pH 降下抑制作用の濃度依存性について

MRS 培地で培養される lactobacilli の 2 菌株に対して、20 mg/mL において培地の pH 降下を強烈に抑制し、生育抑制活性があると推測された大黃、黄柏及び黄連についてさらに試料濃度を変化させて検討を進めた。表 6 に示した通り、最終濃度 10、5、2.5 及び 1 mg/mL において投与したところ、大黃は *L. acidophilus* に対して 10 mg/mL まで抑制を示し (69%)、*L. reuteri* に対しては 5 mg/mL まで抑制を示した (77%)。黄柏の活性は選択的且つ強烈であり、*L. acidophilus* に対しては 1 mg/mL においても抑制を示すが (69%)、*L. reuteri* には全く効果が無かった。黄連の活性も強烈で、しかもある程度の選択性もあり、*L. acidophilus* に対しては 1 mg/mL においても強い抑制を示すが (38%)、*L. reuteri* では 10 mg/mL まで抑制し (8%) それ以下の濃度では効果が無かった。

次に、GAM 培地で培養される bifidobacteria 及び clostridia の 5 菌株について検討した。結果は表 7 に示したが、上述の通り 20mg/mL において 5 菌種に渡り強く抑制活性を示した黄連、黄柏及び大黃は濃度を下げても広いスペクトラムで強い抑制活性を示した。特に、強烈な