

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。これを引き継いだ本研究事業では、平成 19 年度末に、「新一般用漢方処方の手引き案（改訂版）」を報告している。そして、この手引き案（改訂版）を基礎として、厚生労働省一般用医薬品部会において一般用漢方処方の見直しが審議され、平成 20 年 9 月 30 日に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として、「一般用漢方製剤承認基準の制定について」（薬食審査発第 0930001 号）が発出され、昭和 40 年代末に公表された一般用漢方処方 210 処方の承認審査内規は、多くの見直しと共に、内規から通知へと格上げされた。今回の通知は、従来の 210 処方に関して見直したものであるが、新一般用漢方処方（改訂版）において新規追加が提案された 85 処方についても、今後順次検討されていくものと期待されている。

「新一般用漢方処方（改訂版）」に記載された新規追加候補処方は、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、ヒト腸内常在菌である *Lactobacillus reuteri* を取り上げ、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。生薬として販売していない粟、扁豆はウチダ和漢薬より購入し、菰は高知県産のものを購入して用いた。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。96 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。顕微鏡観察用の細胞計数盤は、ワンセル社のワンセルカウンターを用いた。

腸内細菌

Lactobacillus reuteri JCM 1112 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。オートクレーブには MAC-601 (東京理化) を用いた。pH の測定は、簡易 pH メーター Twin pH (HORIBA) 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。観察・撮影は、Olympus の位相差顕微鏡 IX51 及びデジタルカメラ DP20 を用い、画像処理・画像解析には WinROOF (MITANI) 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、 -45°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、 -45°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 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。

腸内細菌の培養

-80°C凍結保存した *L. reuteri* グリセロールストックを 3 mL MRS 培地に 1 白金耳接種し、アネロバックを入れた嫌気ジャーで 37°C、15 時間、静置培養した。

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 μm 孔あるいは 0.45 μm 孔のメンブランフィルターでろ過した後に用いた。96 穴マイクロプレートの 1 穴に終濃度 $\text{OD}_{600}=0.01$ となるよう菌を加えた 80 μL の培地と 20 μL の試料溶液（最終濃度 20 mg/mL）を加え、37°C で一定時間培養した。

顕微鏡画像解析

培養終了後、培養液の一部を取り、位相差顕微鏡にて観察・撮影した。位相差用対物レンズは UPlanFLN 4 \times Ph を、位相差用光学素子には PhL を用いた。得られた画像は、WinROOF ソフトにより 2 値化処理を施して細胞と背景に分離し、細胞に相当する部分の面積を計測することにより、細菌増殖度を数値化した。また、得られた数値は検量線グラフを元に OD 値へ変換し、増殖度を求めた。

HPLC による短鎖脂肪酸の定量

培養液の一部に MilliQ 水 750 μL を加えて 10 または 20 倍希釈し、0.22 μm 孔あるいは 0.45 μm 孔のメンブランフィルターでろ過した後に、40 μL 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 H₂SO₄
反応液：0.2mM BTB/15mM Na₂HPO₄ (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 μL

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

in vitro 培養した *L. reuteri* の生育と培地 pH の相関

細菌の増殖度測定は透過光濁度法による間接的計測が一般的であるが、漢方処方・生薬等の天然物由来試料は試料自身の UV 吸収による干渉が問題となる。一方、一般的に、腸内細菌は増殖と共に有機酸（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。そこで、平成 19 年度の本研究班では、検体自身の UV 吸収の影響を排除するため、培地 pH の降下を細菌増殖の指標とし、漢方処方エキスの腸内細菌生育に及ぼす影響を間接的に評価した。しかし、実際に細菌の生育を顕微鏡観察したところ、培地 pH は降下するにも関わらず生育が抑えられるケース（図 1b の黄柏）や培地 pH の降下度から予測される以上に生育が促進されているケース（図 1e の生姜）等が見られ、培地 pH 変化と細菌増殖度は

必ずしも相関しないことが分かった。そこで、今回は、細菌を顕微鏡で観察することによる直接的計測法を適用することとした。

光学顕微鏡観察による細菌数直接計測システムの構築

動物細胞やコロニーの場合は、形状が球形でも大型であるため、汎用の自動計測装置を利用可能であるが、多くの腸内細菌の場合、細胞は桿状や糸状の不定形を呈し、細胞であることを自動的に認識することが困難である。しかし、スクリーニングの多検体処理に対応するためには、ある程度の自動化が必要である。そこで本研究では、顕微鏡観察視野において細菌の占める部分を画像処理により認識し、自動計測した細胞占有面積を細菌数に換算することにした。すなわち、培養した細菌は位相差顕微鏡により観察し、その視野をデジタル画像として撮影保存し、WinROOFソフトにより2値化処理を施して細胞と背景を分離し(図2A)、細胞に相当する部分の面積を計測した。OD₆₀₀値既知の細菌液を用いて検量線を作成し(図2B)、面積値から細菌増殖度を数値化するシステムの構築に成功した。

細菌増殖及び有機酸生産の経時変化

漢方処方あるいはその構成生薬エキスを乳酸菌 *L. reuteri* に投与し、その増殖度及び有機酸生産に与える影響を調べるに当たり、適切な細菌収穫時間を把握するために細菌増殖及び有機酸生産の経時変化を観察した。図3に示す通り、*L. reuteri* は10時間以降には成長がプラトーに達することが分かり、対数増殖期中期に相当する5時間に細菌を収穫して顕微鏡観察に供することにした。また、*L. reuteri* は乳酸あるいは酢酸を生産するが、図4に示す通り、乳酸の生産カーブも増殖曲線と良く似たタイムコースをたどることが分かった。こちらはHPLCの検出限界を勘案し、プラトーに達する直前の8時間、あるいはプラトーに十分達した30時間に収穫し、HPLC分析

に供することにした。

スクリーニングの対象処方

「一般用漢方処方の手引き」に既記載の210処方及び「新一般用漢方処方の手引き案」に新規記載された85処方の中から、効能・効果として下部消化管への作用が謳われている処方を中心に選別し、その水煎出液の凍結乾燥エキスを得て本スクリーニング系に適用した。スクリーニングに供した漢方処方とその構成生薬及び適応症について表1にまとめた。

*L. reuteri*の増殖に対する漢方処方エキスの影響評価

表1に示した37種類の処方の水煎出エキスを *L. reuteri* に投与し、その増殖への影響を評価した(図5)。図5は処理後5時間における細菌占有面積をOD₆₀₀の値に換算したものであり、増殖が抑えられた順に左から右へ並んでいる。大黃甘草湯(27)、麻子仁丸(36)、小承気湯(24)及び桃核承気湯(32)は *L. reuteri* の増殖を強く阻害し、逆に、中建中湯(31)、參苓白朮散(19)、滋血潤腸湯(17)及び大柴胡湯(30)は *L. reuteri* の増殖を強く促進していた。

*L. reuteri*の有機酸生産に対する漢方処方エキスの影響評価

図6は、検体を投与してから8時間後及び30時間後の乳酸生産量を示したものであり、8時間後の乳酸量が低いものから順に左より右へ並んでいる。30時間が経過すると、ほとんどの処方において乳酸生産量は対照検体の場合と同等あるいはそれを上回るレベルまで蓄積する。その中で、図5において強い増殖抑制作用を示した大黃甘草湯(27)、麻子仁丸(36)、小承気湯(24)及び桃核承気湯(32)は8時間はもとより、30時間経過しても乳酸をほとんど生産させていなかった。また、三黄瀉心湯(15)、大黃牡丹皮湯(28)及び桂枝加芍薬大黃湯(11)も、8時間で乳酸産

生を強く抑制し、30時間が経過しても対照検体のレベルには到達しなかった。一方、滋血潤腸湯(17)及び紫根牡蛎湯(18)は、図5に示した通り、処理後5時間では対照検体よりも良好に生育しているが、8時間の段階での乳酸産生量は著しく低かった(図6)。このほかに、30時間では対照検体と同レベルになるものの、8時間の段階で乳酸産生が抑制されている処方には、黄連解毒湯(5)、黄連湯(6)、乙字湯(7)、葛根黄連黄芩湯(8)、及び桂枝加芍薬湯(12)が挙げられる。

L. reuteriの増殖度及び有機酸産生に対する漢方処方構成生薬エキスの影響評価

L. reuteriの増殖を著しく抑制した大黄甘草湯(27)、麻子仁丸(36)、小承気湯(24)及び桃核承気湯(32)について、その構成生薬及び関連する生薬をL. reuteriに投与し、増殖度及び有機酸産生について検討した。図7に示す通り、大黄、厚朴及び黄芩には強い増殖阻害活性が観察された。逆に、芍薬及び生姜には著しい増殖促進作用が観察された。これらの生薬について乳酸の生成量を調べたところ、大黄、厚朴、桂皮及び黄連では30時間後に至るまで著しく有機酸の生産が抑制されていた。また、8時間後の時点では乳酸の生産が阻害されているものの、30時間後には対照検体レベルに戻る生薬として、黄芩、牡丹皮及び麻子仁が見出された。逆に、著しい増殖促進活性を示した芍薬及び生姜については、意外なことに乳酸産生に関してはほとんど影響を及ぼさなかった。

D. 考察

薬物や生物活性物質等のスクリーニングにおいて大切なことは、簡便で再現性が良く、多検体処理に適したアッセイ系を持つことである。細菌を対象として、その増殖に対する影響をスクリーニングの指標とすることは古くから行なわれており、培養液の濁度を紫外線吸収分光器(660nmの吸光度)で測定する方法、細胞内ATPの増加を

ルシフェラーゼ反応の化学発光としてルミノメーターで測定する方法、コロニーを自動カウントする方法等の様々なアッセイ法が開発されている。ただし、漢方処方エキスあるいは生薬エキスの持つ紫外線吸収あるいは発光が非常に強く、増殖による測定値の変動幅と比較して測定バックグラウンドの方が著しく大きいため前者2つは適用が難しく、また、コロニーカウントは結果を得るまでに時間が掛かるという短所がある。そこで、前年度の本研究では培養液のpHを測定することで細菌の増殖度を間接的に定量する方法を採用した。ただし、これについても、今回の検討において、培地のpHと細菌の増殖に明確な相関が見られない例が発見され、結局、顕微鏡下で細胞数の増加を観察するという最も基本的なアッセイ方法に落ち着くことになった。ここで問題となったことは、腸内細菌のサイズが小さく、しかも形態が球形ではなく細長い桿菌の場合が多いため、画像認識ソフトに細胞として認識され辛いという点である。多検体を短時間に処理する上で、地道にマニュアルで細菌をカウントすることは考えられないため、ある程度の自動化の方策を模索し、今回、顕微鏡観察画像に2値化処理を施し、細胞専有部分の面積を自動計測して細菌数に換算する方法を構築するに至った。本方法は、細菌の顕微鏡画像を取得できれば、後はほぼ自動化できるため、ある程度の多検体処理にも対応できる優れたアッセイ法と考えられる。

本アッセイ法を用い、効能・効果として下部消化管への作用が謳われている処方を中心にスクリーニングを行なったところ、L. reuteriの増殖を強力に抑制する処方として、大黄甘草湯、麻子仁丸、小承気湯及び桃核承気湯が検出された。さらに、これらの処方の構成生薬を個別にアッセイしたところ、大黄及び厚朴に強い増殖抑制活性が見出され、黄芩にもある程度の増殖抑制活性が見られた。大黄に含まれるアントラキノン類等に強い抗菌活性があることは良く知られた事実であるが、厚朴及び黄芩のL. reuteri増殖抑制活性

がどの成分に起因するのか興味深い。また、今回、中建中湯、参苓白朮散、滋血潤腸湯及び大柴胡湯等の *L. reuteri* の増殖を促進させる処方も見出されており、これらの活性を牽引する生薬及び含有成分の正体にも興味を持たれるところである。

今回は、いわゆる善玉菌の一例として *L. reuteri* を取り上げたが、今後、善玉菌として他の乳酸菌やビフィズス菌について検討を進め、また同時に、*Clostridium* 属などのいわゆる悪玉菌への影響についても検討していく予定である。

E. 結論

本研究では、漢方処方エキス及び生薬エキスの腸内細菌の生育及び有機酸生成に対する影響を検討するため、*in vitro* 培養した腸内細菌 *L. reuteri* を用い、顕微鏡観察画像における細菌占有面積より細菌数を自動計測するアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用い、効能・効果として下部消化管への作用が謳われている処方を中心にスクリーニングを行なったところ、*L. reuteri* の増殖を強力に抑制する処方として、大黃甘草湯、麻子仁丸、小承気湯及び桃核承気湯を、また、増殖を促進する処方として中建中湯、参苓白朮散、滋血潤腸湯及び大柴胡湯を見出した。本アッセイ系は、*L. reuteri* に限らず、他の腸内細菌にも応用可能なシステムであり、今後、様々ないわゆる善玉菌及び悪玉菌を用いて検討を行い、現代の科学水準に基づいた漢方処方の安全性及び有効性に関する研究を推進する予定である。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 勢ノ康代、遠藤明仁、袴塚高志、合田幸広、新規漢方処方の品質規格に関する基礎的検討
(8) 嫌気性腸内細菌の生育に影響を及ぼす漢方処方、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 (京都)
- 2) 勢ノ康代、遠藤明仁、袴塚高志、合田幸広、腸内細菌バランスを整える漢方処方を探せ、

日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 (京都)

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

表1 スクリーニングに供した漢方処方の一覧

1/2

処方番号	漢方処方名	配合生薬	適応症
1	胃風湯	ifuto	急、慢性胃腸炎、冷えによる下痢
2	胃苓湯	ireito	急、慢性胃腸炎、冷えによる下痢 食あたり、暑気あたり、冷え腹、急性胃腸炎、腹痛
3	温清飲	unselin	月経不順、月経困難、血の道症、更年期障害、神経症、皮膚炎
4	黄耆建中湯	ogikenchuta	虚弱体質、病後の衰弱、おあせ、湿疹、皮膚のびらん、腫瘍、冷え性
5	黄連解毒湯	orengadokuto	鼻出血、不眠症、神経症、胃炎、二日酔い、血の道症、目まい、動悸、更年期障害、皮膚のかゆみ、口内炎
6	黄連湯	orento	胃痛、急性胃炎、二日酔い、口内炎
7	乙字湯	otujito	痔核、切れ痔、便秘、軽度の脱肛
8	葛根黄連黄芩湯	kakkonorenngontō	下痢、急性胃腸炎、胃こり、口内炎、舌炎、不眠症
9	加味逍遙散	kamishoyōsan	冷え性、虚弱体質、月経不順、月経困難、更年期障害、血の道症、不眠症
10	甘草瀉心湯	kanzoshashinto	胃腸炎、口内炎、口臭、不眠症、神経症、下痢
11	桂枝加芍薬大黄湯	keishikeshakuyakudaiotō	便秘、しぶり腹
12	桂枝加芍薬湯	keishikeshakuyakuto	渋り腹、腹痛、下痢、便秘
13	啓膈湯	keihito	胃腸虚弱、慢性胃腸炎、消化不良、下痢
14	五苓散	gonreisan	水溶性下痢、急性胃腸炎、暑気あたり、頭痛、むくみ、二日酔い 高血圧の随伴症状のほせ、胃こり、耳鳴り、閉塞、不安、
15	三黄瀉心湯	sanzoshashinto	鼻血、痔出血、便秘、血の道症、更年期障害
16	四逆散	shigyakusan	胃炎、胃痛、腹痛、神経症
17	滋血潤腸湯	jinketsujunchōtō	便秘、のぼせ、胃こり
18	紫根牡蛎湯	shikonbaitō	乳房の痛み、痔の痛み、皮膚炎、リンパ腺の腫れ、貧血、疲労倦怠、腸運動等にて諸治療の効果がもたらすに用い、奇効を奏することがある

表1 スクリーニングに供した漢方処方の一覧

2/2

19	参苓白朮散	Jinyo-byakujutsusan	人参(3)、山萸(3)、白朮(4)、茯苓(4)、蓮肉(3)、薏苡仁(8)、扁豆(3)、桔梗(2.5)、饴砂(2)、甘草(1.5)	食欲不振、慢性下痢、病後の体力低下、疲労倦怠、消化不良、慢性胃腸炎
20	柴胡桂枝湯	saikokeishito	柴胡(5)、半夏(4)、桂枝(2.5)、芍薬(2.5)、黄芩(2)、人参(2)、大薈(2)、甘草(1.5)、生姜(1)	胃腸炎、風邪の中期から後期の症状
21	柴苓湯	saireito	柴胡(7)、半夏(5)、生姜(1)、黄芩(3)、大薈(3)、人参(3)、甘草(2)、沢瀉(5)、猪苓(3)、茯苓(3)、白朮(3)、桂皮(2)	水溶性下痢、急性胃腸炎、暑気あたり、むくみ
22	十全大補湯	juzentaihoto	人参(3)、黄耆(3)、白朮(3)、茯苓(3)、当帰(3)、地黄(3)、芍薬(3)、川芎(3)、桂皮(3)、甘草(1.5)	病後、病後の体力低下、疲労倦怠、食欲不振、むくみ、手足の冷え、貧血
23	小建中湯	shokenchuto	桂皮(4)、生姜(1)、大薈(4)、芍薬(6)、甘草(2)、膠飴(20)	小児虚弱体質、慢性胃腸炎、腹痛、神経痛、小児夜尿症、夜泣き
24	小承氣湯	sho-jikito	大薈(2)、枳実(2)、厚朴(3)	便秘
25	真武湯	shimputo	茯苓(5)、芍薬(3)、生姜(1)、白朮(3)、加工附子(1)	下痢、急・慢性腸炎、胃腸盛弱、目まい、動悸、感冒、むくみ、皮膚のかゆみ
26	千金内托散	senkin-naitakusan	人参(2.5)、当帰(3)、黄耆(2)、川芎(2)、防風(2)、桔梗(2)、厚朴(2)、桂皮(2)、白芷(1)、甘草(1)	化膿性皮膚炎疾患の初期、痛、軽い床ずれ
27	大黃甘草湯	daio-kanzoto	大薈(4)、甘草(1)	便秘、便秘に伴う頭重、のぼせ、肌荒れ、吹き出物、食欲不振、腹部膨満、腸内異常発酵、痔などの症状の緩和
28	大黃牡丹皮湯	daio-botanpito	大薈(2)、牡丹皮(4)、桃仁(4)、芒硝(4)、冬瓜子(6)	月経不順、月経困難、月経痛、便秘、痔疾
29	大建中湯	daikenchuto	山椒(2)、乾姜(5)、人参(3)、膠飴(20)	下腹部痛、腹部膨満感
30	大柴胡湯	daisaikoto	柴胡(6)、半夏(4)、生姜(2)、黄芩(3)、芍薬(3)、大薈(3)、枳実(2)、大薈(1)	胃炎、常習便秘、高血圧や肥満に伴う肩こり・頭痛・便秘、神経症、肥満症
31	中建中湯	chukenchuto	山椒(2)、乾姜(1)、人参(3)、膠飴(20)、桂皮(4)、芍薬(6)、甘草(2)、大薈(4)	慢性胃腸炎、下痢、便秘
32	桃核承氣湯	tokaku-jikito	桃仁(5)、桂皮(4)、大薈(3)、芒硝(2)、甘草(1.5)	月経不調、月経困難、月経痛・精神不安、腰痛、便秘、高血圧の随伴症状、痔疾、打撲傷
33	人参湯(理中丸)	ninjinto	人参(3)、甘草(3)、白朮(3)、乾姜(3)	胃腸虚弱、下痢、嘔吐、胃痛、腹痛、急・慢性胃腸炎
34	半夏瀉心湯	hangeshashinto	半夏(5)、黄耆(2.5)、乾姜(2.5)、人参(2.5)、甘草(2.5)、大薈(2.5)、黄連(1)	急・慢性胃腸炎、発酵性下痢、消化不良、胃下垂、神経性胃炎、胃弱、二日酔い、げっぷ、胸やけ、口内炎、神経症
35	附子理中湯	bushijichuto	人参(3)、甘草(3)、白朮(3)、乾姜(3)、加工附子(1)	胃腸虚弱、下痢、嘔吐、胃痛、腹痛、急・慢性胃腸炎
36	麻子仁丸	mashiningan	麻子仁(5)、芍薬(2)、枳实(2)、厚朴(2)、大薈(4)、杏仁(2)	便秘、便秘に伴う頭重、のぼせ、肌荒れ、ふきでもの、食欲不振、腹部膨満、腸内異常発酵、痔などの症状の緩和
37	六君子湯	rikkunshito	人参(4)、白朮(4)、茯苓(4)、半夏(4)、陳皮(2)、大薈(2)、甘草(1)、生姜(0.5)	胃炎、胃腸虚弱、胃下垂、消化不良、食欲不振、胃痛、嘔吐

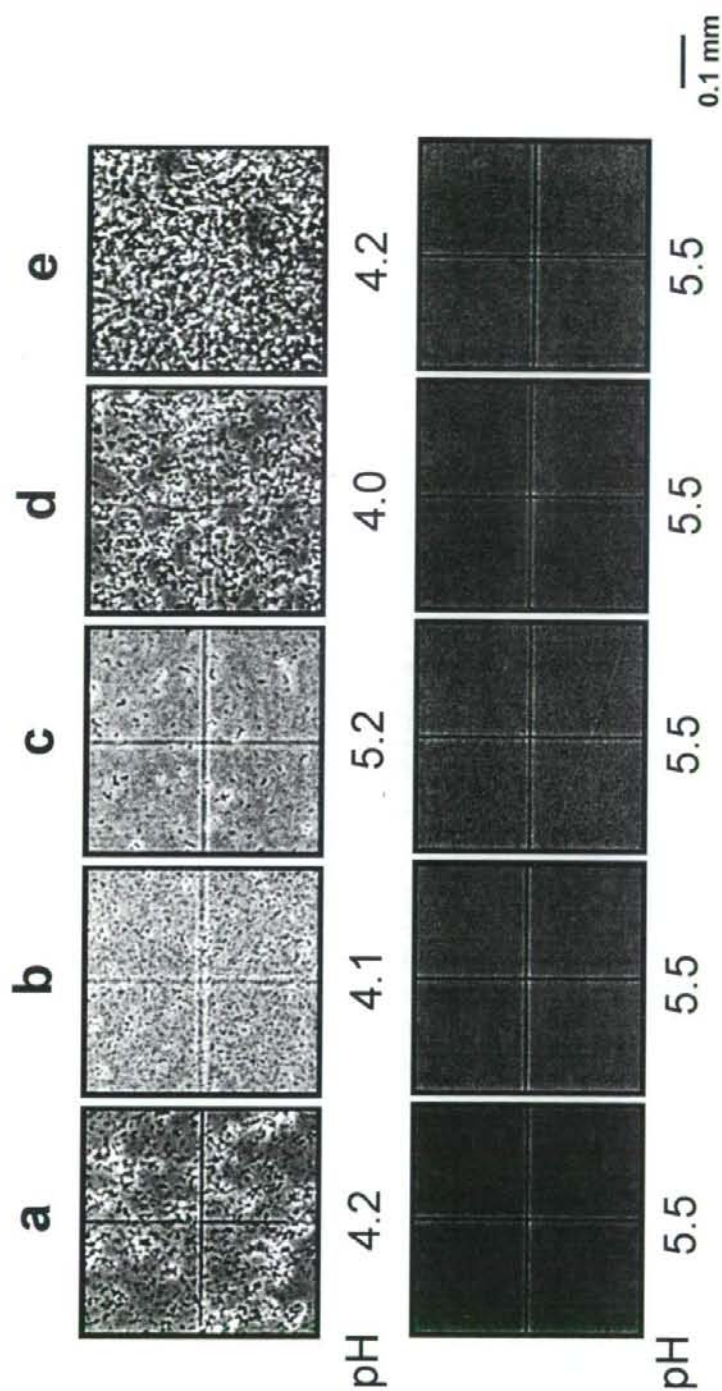


図1 8時間培養後の*L. reuteri*顕微鏡画像と培地pHの関係

上図:生薬と*L. reuteri*を添加した培地

下図:生薬のみを添加した培地

a:コントロール、b:黄柏、c:大黃、d:甘草、e:生姜

(A)



20 μm

(B)

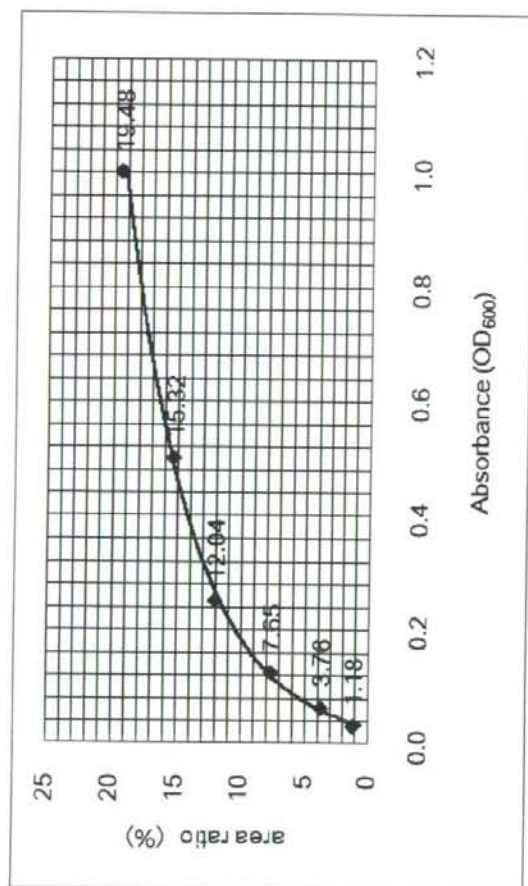


図2 光学顕微鏡観察による細菌数計測システムの構築

(A) 位相差観察像の画像処理例

(B) 増殖度の検量線

画像解析条件

機器：倒立型顕微鏡IX51、顕微鏡用デジタルカメラ DP20 (OLYMPUS)

位相差用対物レンズ：UPlanFLN 4 × Ph

位相差用光学素子：PhL

解析：WinROOF (Mitani Co., Japan)

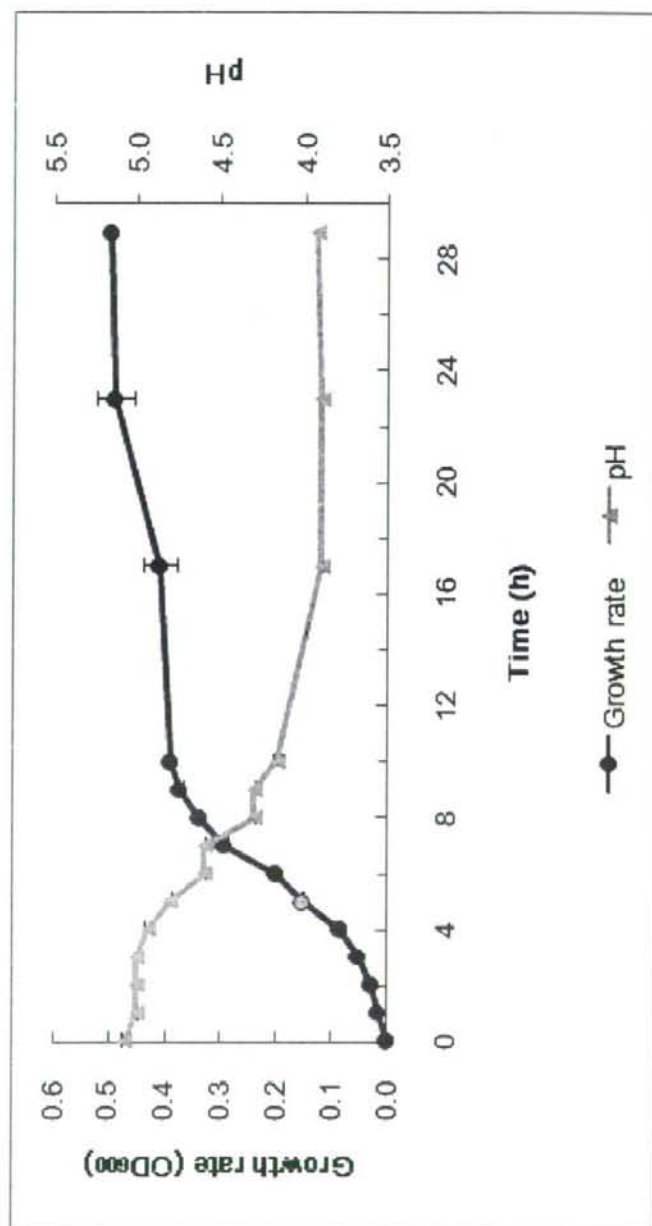


図3 *L. reuteri* の増殖度およびpHの経時変化

pH測定: Twin pH (HORIBA)

OD測定: NanoDrop ND-1000 (NanoDrop)

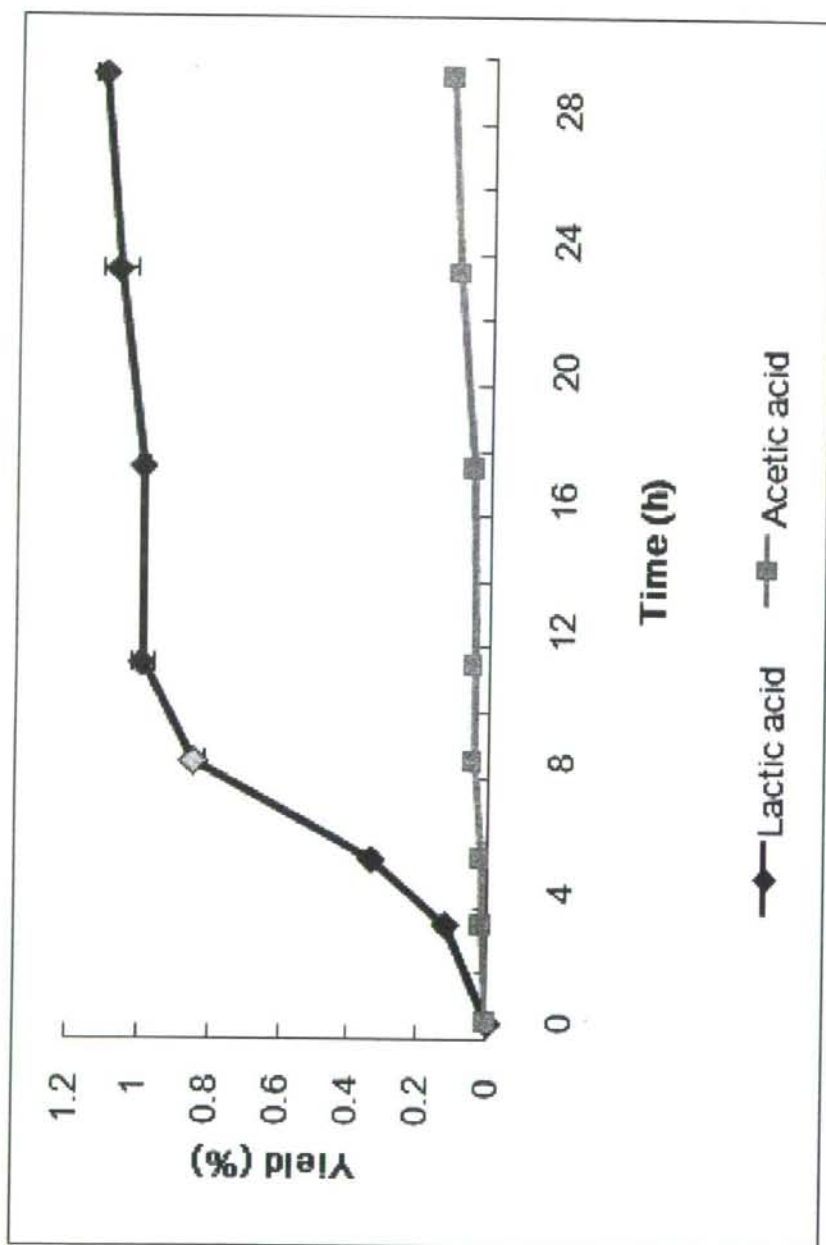


図4 有機酸産生量の経時変化

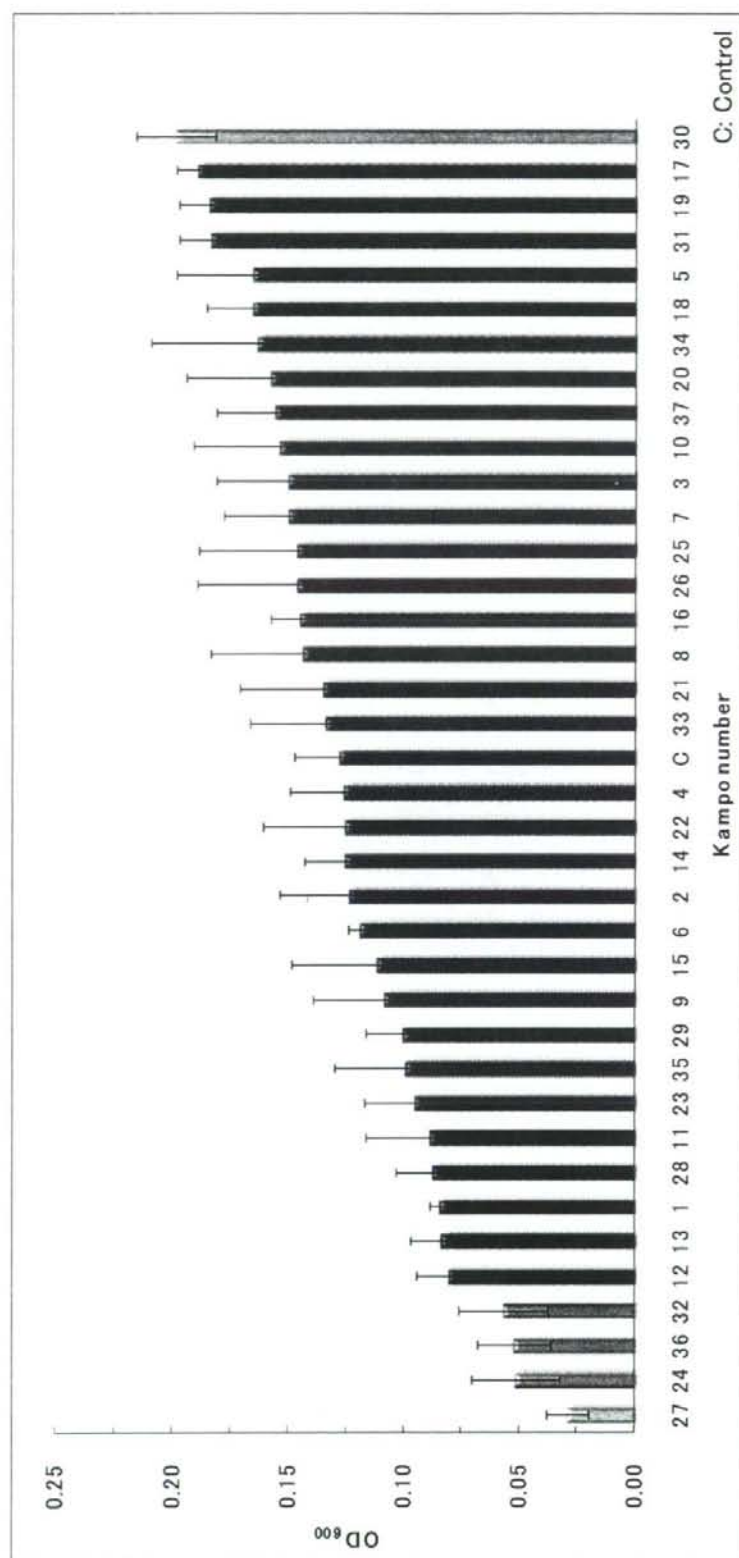


図5 漢方処方煎出エキス処理5時間後の*L. reuteri*の増殖度

それぞれのKampo numberの処方名は表1に記載

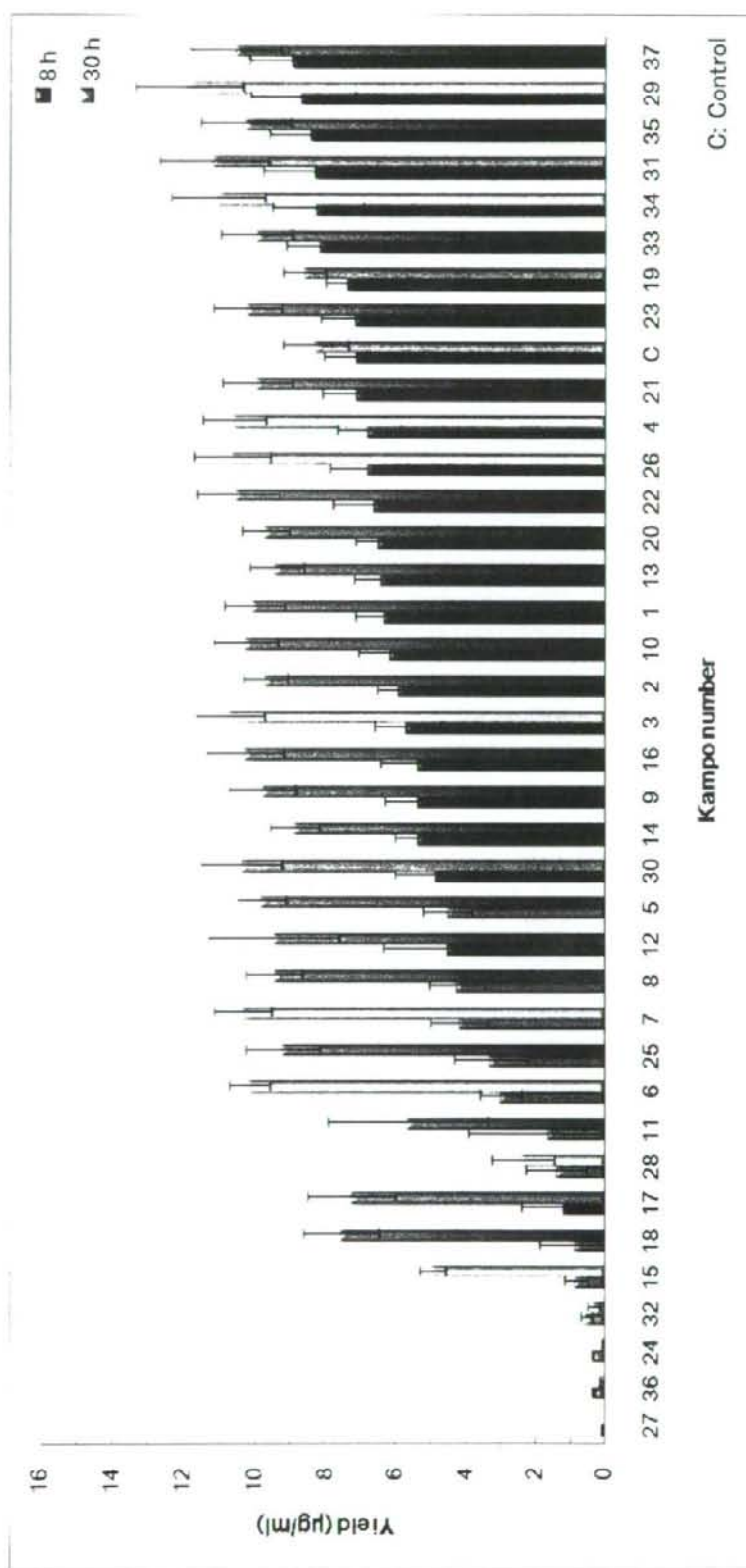


図6 漢方処方煎出エキス処理8時間あるいは30時間後の*L. reuteri*の乳酸生産量

それぞれのKampo numberの処方名は表1に記載

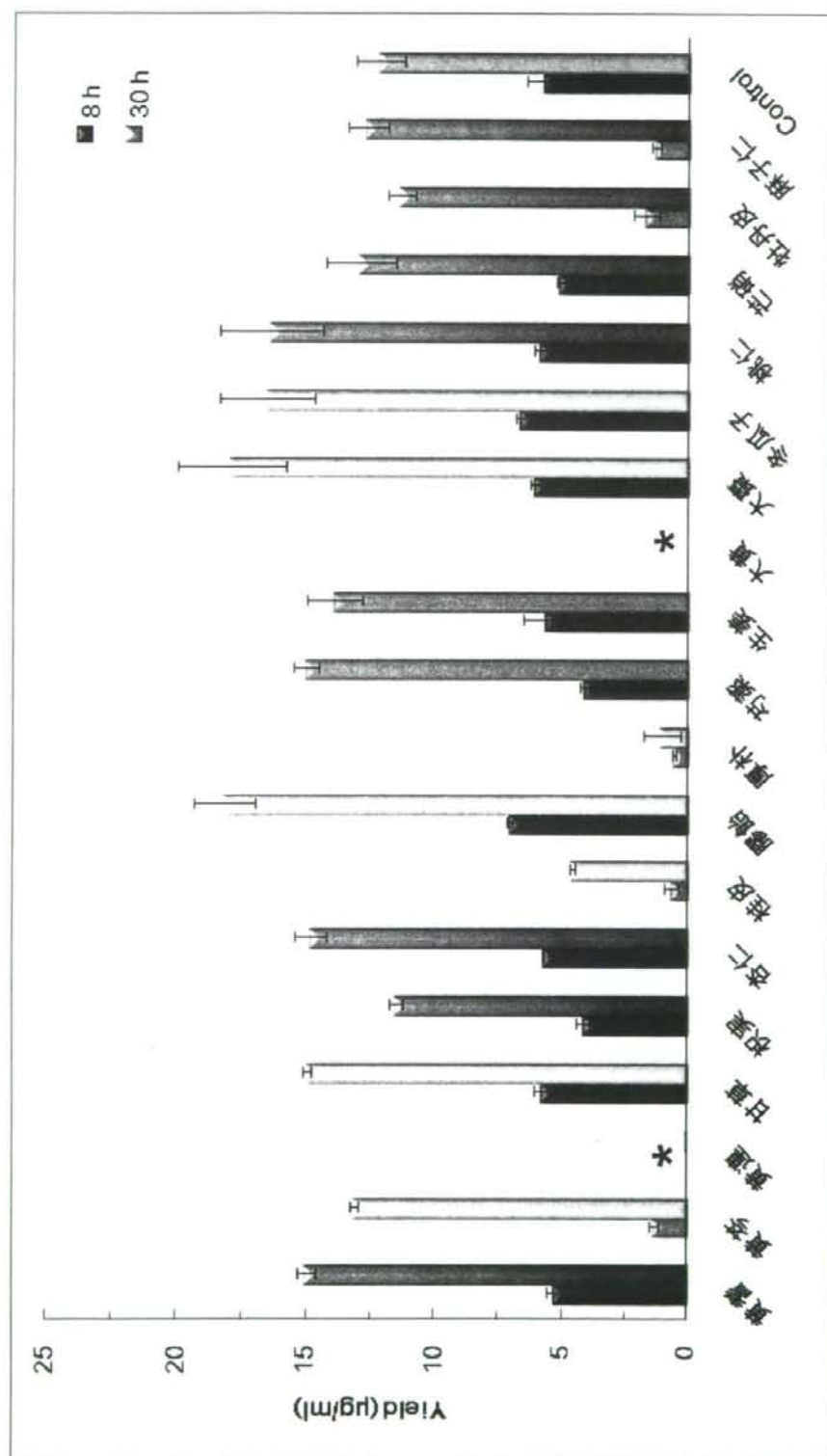


図 8 生薬煎出エキス処理8時間あるいは30時間後の *L. reuteri* の乳酸生産量

* 検出限界以下のサンプル

分担研究課題 漢方処方の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

医療用漢方製剤後発品の同等性評価に関する研究

漢方製剤後発品の承認申請における同等性評価の指標として、処方及びその構成生薬のエキス収量が利用可能であるか検討した。例として加味逍遙散、柴苓湯、補中益気湯及び大黃甘草湯を取り上げ、5社の生薬メーカーより購入した生薬を用い、処方の水煎出液及び個々の構成生薬の水煎出液を調製し、その凍結乾燥エキスの収量を測定した。また、大黃甘草湯については、スプレードライエキスも調製し、凍結乾燥エキスとの比較を行なった。処方エキスの収量について、配合される生薬のエキス収量の合算として算出される理論値と、処方エキスを調製して得られる実測値は概ね近く、エキス収量を同等性評価の指標の一つとして適用できる可能性が示された。

研究協力者

竹田忠紘 慶應義塾大学薬学部 教授
羽田紀康 慶應義塾大学薬学部 准教授
勢ノ康代 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

A. 研究目的

現在、我が国の薬価基準には148処方の医療用漢方エキス製剤が収載されている。漢方エキス製剤の品質基準と言うべき薬審二第120号通知「医療用漢方エキス製剤の取扱いについて」は、従来の医療用漢方製剤の抱える品質上の問題点を解決するために昭和60年に発出されたものであり、古典成書の記載に従って調製した標準湯剤との同等性を確保することが基本骨格となり、漢方エキス製剤の基本的な考え方と承認内容等について記載している。しかしながら、薬審二第120号通知における基準は、昭和57-59年に厚生科学研究として行われた「漢方エキス製剤の規格基準作成に関する研究」に基づき設定されたものであり、言わば20年前の科学水準を反映した基準である。また、薬審二第120号通知の後1年余りの

間に新規申請及び従来製剤の代替申請が完了し、現行148処方の体制に移行したが、これ以降現在まで新規な医療用後発品の承認は無い。この原因の一つは、先発品との同等性確保において必要となる条件及び手順が明示されていないことと考えられる。そこで、本研究では、医療用漢方製剤後発品を承認する際の同等性の基準を科学的に示すことを目的とし、現代の科学水準を反映させながら、エキス収量を同等性評価の指標の一つとして適用できるか検討を行う。我々は既に平成19年度本事業分担研究報告書「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究 医療用漢方製剤後発品の同等性評価に関する研究」において、葛根湯エキス及び半夏厚朴湯エキスを検討処方として選択し、処方及び構成生薬のエキス収量について検討した結果を報告したが、今年度は、加味逍遙散、柴苓湯、補中益気湯及び大黃甘草湯について検討した。また、大黃甘草湯についてはスプレードライエキスも調製し、凍結乾燥エキスとの比較を行なった。

B. 研究方法

生薬

加味逍遙散、柴苓湯、補中益気湯及び大黃甘草湯の構成生薬である黄芩、黄耆、甘草、桂皮、柴胡、山梔子、芍薬、生姜、升麻、大黃、大棗、沢瀉、猪苓、陳皮、当帰、人參、薄荷、半夏、白朮、茯苓及び牡丹皮は、国内主要生薬メーカー5社（A社、B社、C社、D社及びE社と仮称）より日本薬局方規格品で漢方処方調剤用のものを購入して用いた。ただし、平成19年度に葛根湯あるいは半夏厚朴湯の構成生薬として検討した甘草、桂皮、芍薬、生姜、大棗、半夏及び茯苓については、冷暗所において保存しておいたものを再度用いた。煎出用の水は、Milli-Q Synthesis (Milipore) により調製した超純水を用いた。

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。煎出液のスプレードライはスプレードライヤーSD-1000（東京理化器械）を用い、煎出液の遠心分離はKUBOTA高速冷却遠心機6500で行った。

生薬煎出エキスの調製とエキス収量測定

加味逍遙散、柴苓湯及び補中益気湯の構成生薬のうち、平成19年度に葛根湯あるいは半夏厚朴湯の構成生薬として検討したものを除く、黄芩、黄耆、柴胡、山梔子、升麻、大黃、沢瀉、猪苓、陳皮、当帰、桃仁、人參、薄荷、白朮及び牡丹皮について、以下の方法により煎出エキスを調製した。生薬20gをポット（らくらく煎）に取り、400 mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液を3000 rpmで5分間遠心し、上澄液をあらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させてエキスを調製した。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を差し引くことで算出した。

処方煎出エキスの調製とエキス収量測定

大黃甘草湯以外の処方煎出エキスは以下のように調製した。加味逍遙散構成生薬の一日量（甘草2g、柴胡3g、山梔子2g、芍薬3g、生姜1g、当帰3g、薄荷1g、白朮3g、茯苓3g及び牡丹皮2g：生薬総重量23g）をポット（らくらく煎）に取り、460 mLの水で半量になるまで煎じた。柴苓湯構成生薬の一日量の半量（黄芩1.5g、甘草1g、桂皮1.5g、柴胡3.5g、生姜0.5g、大棗1.5g、沢瀉3g、猪苓2.25g、人參1.5g、半夏2.5g、白朮2.25g及び茯苓2.25g：総重量23.25g）をポット（らくらく煎）に取り、470 mLの水で半量になるまで煎じた。補中益気湯構成生薬の一日量（黄耆4g、甘草1.5g、柴胡2g、生姜0.5g、升麻1g、大棗2g、陳皮2g、当帰3g、人參4g及び白朮4g：生薬総重量24g）をポット（らくらく煎）に取り、480 mLの水で半量になるまで煎じた。得られた煎出液は生薬煎出エキス調製と同様の操作に供して処方煎出エキスを調製し、そのエキス収量を測定した。

大黃甘草湯及びその構成生薬のエキス調製と収量測定

大黃甘草湯及びその構成生薬である大黃及び甘草について以下の方法により煎出を行った。大黃甘草湯構成生薬の一日量の4倍量（大黃32g及び甘草16g：生薬総重量48g）をポット（らくらく煎）に取り、960 mLの水で半量になるまで煎じた。また、大黃あるいは甘草の50gをポット（らくらく煎）に取り、1 Lの水で半量になるまで煎じた。放冷後、得られた煎出液を3000 rpmで5分間遠心し、デカンテーションで上澄液を取り、綿栓ろ過し、その容積及び重量を測定した。遠心ろ過した煎出液の1/5重量に相当する溶液を、あらかじめ重量を計ったナス型フラスコに入れ、-45℃で予備凍結させた後、一晚凍結乾燥させて凍結乾燥エキスを得た。エキス収量は、凍結乾燥後のフラスコの重量からフラスコ自体の重量を

差し引くことで算出した。一方、遠心ろ過した煎出液の4/5重量に相当する溶液を、重量測定済みの回収瓶及び冷却回収管（サイクロン）が接続されたスプレードライヤーに供し、スプレードライエキスを調製した。エキス収量は、スプレードライエキスを回収した回収瓶及び冷却回収管の重量と風袋重量の差から算出した。

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

加味逍遙散構成生薬のエキス収量

加味逍遙散構成生薬の煎出液より凍結乾燥エキスを調製し、それぞれの生薬 20 g に相当するエキス収量測定値と生薬重量あたりの百分率に換算したエキス収率を表 1 に示した。また、5 社の平均値を 100 とした場合の相対値も示した。生姜、芍薬、甘草及び茯苓については、平成 19 年度の研究で検討した値を用いた。

それぞれの変動係数 (Cv) を算出したところ、今年度新たに測定した生薬については概ね 10%前後に収まっていたが、柴胡では 42%と大きなばらつきを示した。柴胡は E 社製が相対値で 183.3 を示しており、この特例によるばらつきの影響が出た。一方、加味逍遙散のエキス収量を最下段に示したが、変動係数は 3.9%であり、柴胡、生姜及び茯苓が示したメーカー間のばらつきは、10 種類の構成生薬の配合の中で目立たなくなっていた。

加味逍遙散処方エキス収量及び構成生薬エキス収量の総和との比較

表 1 に示した各構成生薬のエキス収率をもとにして、加味逍遙散の一日量中の分量に相当するエキス収量理論値を算出し、その総和をもって加味逍遙散処方エキス収量理論値とした (表 2)。この理論値と実測値 (測定値) は良い相関を示し、理論値と測定値の比は概ね 1 前後であり、そのメ

ーカー間の変動係数も 6.9%を示し、ばらつきは極めて小さかった。

柴苓湯構成生薬のエキス収量

柴苓湯構成生薬の煎出液より凍結乾燥エキスを調製し、それぞれの生薬 20 g に相当するエキス収量測定値と生薬重量あたりの百分率に換算したエキス収率を表 3 に示した。半夏、生姜、大枣、甘草、茯苓及び桂皮については、平成 19 年度の研究で検討した値を用い、また、柴胡及び白朮については前述の加味逍遙散で検討した値を用いた。

それぞれの変動係数 (Cv) を算出したところ、柴苓湯で新たに測定した黄芩、人参、沢瀉及び猪苓のうち、人参及び猪苓は、それぞれ 27.53 及び 19.06 のばらつきを示した。人参は C 社製が相対値で 54.0 を示し、猪苓では E 社製が相対値で 135.5 を示し、これらの特例によるばらつきの影響が出た。全体的にばらつきの大きな生薬が多く、柴胡、半夏、生姜及び茯苓は変動係数で 20%を超えていた。一方、柴苓湯のエキス収量を最下段に示したが、変動係数は 13.25%であり、他の処方と比較してやや大きめの値を示した。

本処方の構成生薬はおしなべておおきなばらつきを示すものが多いことに起因しているが、別の見方をすると、構成生薬のばらつきはこれだけ多いのにもかかわらず、処方としてのばらつきは 13.25%で収まると解釈することもできると思われる。

柴苓湯処方のエキス収量及び構成生薬エキス収量の総和との比較

表 3 に示した各構成生薬のエキス収率をもとにして、柴苓湯の一日量中の分量に相当するエキス収量理論値を算出し、その総和をもって柴苓湯処方のエキス収量理論値とした (表 4)。ただし、柴苓湯エキスは 1 日量の半量で調製したため、値を 2 倍して満量として比較検討した。上記の理論値と実測値 (測定値) は良い相関を示し、理論値と測

定値の比は概ね1前後であり、そのメーカー間の変動係数も4.0%を示し、ばらつきは極めて小さかった。

補中益気湯構成生薬のエキス収量

補中益気湯構成生薬の煎出液より凍結乾燥エキスを調製し、それぞれの生薬20gに相当するエキス収量測定値と生薬重量あたりの百分率に換算したエキス収率を表5に示した。また、5社の平均値を100とした場合の相対値も示した。白朮、当帰、大棗、甘草及び生姜については、平成19年度の研究で検討した値を用い、また、人参については前述の柴苓湯で検討した値を用いた。

それぞれの変動係数(Cv)を算出したところ、補中益気湯で新たに測定した黄耆、陳皮及び升麻のうち、升麻のみが14.5%とやや大きな値を示した。一方、補中益気湯のエキス収量を最下段に示したが、変動係数は10.8%であり、ばらつきはそれほどおおいものではなかった。

補中益気湯処方エキス収量の総和との比較

表5に示した各構成生薬のエキス収率をもとにして、補中益気湯の一日量中の分量に相当するエキス収量理論値を算出し、その総和をもって加味逍遙散処方のエキス収量理論値とした(表6)。この理論値と実測値(測定値)は良い相関を示し、理論値と測定値の比は概ね1前後であり、そのメーカー間の変動係数も5.0%を示し、ばらつきは極めて小さかった。

大黃甘草湯構成生薬のエキス収量

大黃甘草湯構成生薬の煎出液を重量により1/5と4/5に分け、それぞれから凍結乾燥エキス及びスプレードライエキスを調製し、それぞれのエキス収量を測定した。生薬重量あたりの百分率に換算したエキス収率を表7に示す。また、5社の平均値を100とした場合の相対値も示した。

凍結乾燥についてもスプレードライについて

も、大黃及び甘草のエキス収率の変動係数(Cv)は10%前後と小さなばらつきを示した。スプレードライは凍結乾燥と比較して回収率は低く、凍結乾燥を100%とした場合、大黃で5社平均が68.1%、甘草で75.6%であった。一方、大黃甘草湯のエキス収量を最下段に示したが、変動係数は凍結乾燥で5.5%、スプレードライで3.7%であり、ばらつきは少なかった。また、処方の場合のスプレードライ回収率は69.6%であり、個別の生薬における値とほぼ同等であった。

大黃甘草湯処方エキス収量及び構成生薬エキス収量の総和との比較

表7に示した各構成生薬の凍結乾燥エキス収率をもとにして、大黃甘草湯の一日量中の分量に相当する凍結乾燥エキス収量理論値を算出し、その総和をもって大黃甘草湯処方の凍結乾燥エキス収量理論値とした(表8)。ただし、本実験では大黃甘草湯の一日量の8倍量で煎出し、その1/5を凍結乾燥に供しているため、これを勘案して計算した。

得られた理論値と実測値(測定値)は良い相関を示し、理論値と測定値の比は概ね1前後であり、そのメーカー間の変動係数も4.9%を示し、ばらつきは極めて小さかった。一方、スプレードライに関して同様の計算を行なったものを図9に示した。スプレードライの場合も、理論値と実測値(測定値)は良い相関を示し、理論値と測定値の比は概ね1前後であり、そのメーカー間の変動係数も2.9%を示し、ばらつきは極めて小さかった。

D. 考察

漢方製剤は天然物の生薬を原料とするため、その品質確保を考える場合に合成医薬品では該当しない以下の問題点をはらんでいる。すなわち、1)採集と栽培の違い、天候、産地、収穫時期等により生薬の成分含量がばらつきやすく、2)乾燥や貯蔵の方法が適切でないとカビや虫の被害を受けることがあり、3)不安定な成分や揮発性の成分

を含有する場合もあり、4) 指定部位以外の部位やその他の異物等が混入しやすく、また、5) その有効成分が明らかになっていない生薬も多く、それぞれの成分に対する定量法が整っていない場合が多い。このうち本研究に深く関係する項目は1) 及び3) と思われる。

本研究において5つの生薬メーカーについてエキス収量を比較したが、特定の生薬に関してはメーカー間のばらつきが無視できないほど大きいことが分かった。特に、今回検討した生薬のうち、柴胡、人參及び猪苓については変動係数がそれぞれ42%、27%及び19%と高く、大きなばらつきが観察された。猪苓については、エキス自体の収量が極めて少ないため、わずかな誤差が大きなばらつきとして反映された可能性も考えられる。一方で、エキスの重量も充分であり、精油含量が高いわけではない柴胡あるいは人參においてもメーカー間のばらつきが大きいことを考えると、前述の1) の問題、すなわち各メーカーの生薬における採集と栽培の違い、天候、産地、収穫時期等の違いにより、成分含量（二次代謝産物）のばらつきだけでなく、エキス収量（一時代謝産物）にもばらつきが生じていると解釈した方が妥当と思われる。

ところで、平成19年度において検討した葛根湯及び半夏厚朴湯の例に続き、漢方処方エキス収量の実測値が、個々の構成生薬のエキス収量から想定される理論値と極めて良い一致を示したことは非常に重要である。これは、エキス収量が明確に保証された生薬を原料として用いる限り、得られる漢方処方エキスエキス収量は予測可能であることを意味している。現在、医療用漢方製剤の承認申請には標準湯剤との比較試験が必要であり、ここでは原料生薬、標準湯剤及びエキスまたは最終製品の3つの試料に対して指標成分の定量比較が求められている。これに加えて、1日量分の生薬から採れるエキス量を記載することも求められているが、原料となる生薬のエキス収量を明らかにすることは求められていない。つまり、現在の承認制度では、指標成分の移行率を

もって標準湯剤との同等性を保証しており、エキス収量は一定品質の製品であることを目安にしなければならない。一方、本研究の成果は、原料生薬、標準湯剤及び漢方処方エキスエキス収量を比較することが同等性評価の指標となり得ることを示したことになる。

今年度は、さらにスプレードライによりエキスを調製した場合についても検討した。実際に漢方処方エキスを製造する場合は、スケールアップが難しい凍結乾燥ではなく、スプレードライ法によっているため、より実態に近い考察が可能と考えられる。スプレードライは、機器の構造上の問題で、回収率は凍結乾燥に劣るが、得られた結果は、メーカー間でほとんどばらつきがなかった。さらに、スプレードライでエキスを調製した場合についても、漢方処方エキス収量の実測値が、個々の構成生薬のエキス収量から想定される理論値と極めて良い一致を示した。

以上、凍結乾燥について6処方、スプレードライについて1処方に関するデータを得た。その結果、エキス収量を同等性評価の指標として使用出来る可能性が高いことが明らかとなった。今後さらに例数を増やして検討を重ねる予定ではあるが、生物学的同等性を証明することが非常に難しい天然物由来医薬品にとって、新たな同等性評価指標が得られたことの意味は非常に大きいものと思われる。これらの研究成果を起点として、合成医薬品あるいは生物由来製品と同様に、漢方製剤の分野においても医療費削減政策に資する後発品市場の開発が進むことを望むものである。

E. 結論

加味逍遙散、柴苓湯、補中益気湯及び大黃甘草湯の構成生薬について5社の生薬メーカー由来の漢方処方調剤用製品を入手し、そのエキス収量を測定したところ、概ね変動係数は10%前後以下に収まっていたが、柴胡及び人參については20%以上の値を示し、メーカー間のばらつきが大きい生薬もあることが分かった。