

スクリーニングの対象処方及び生薬

「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」において新規収載が提案された 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して 37 処方を選択し、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成分・分量及び適応症について表 2 にまとめた。また、上記 37 処方の構成生薬 53 種（表 3）についてもスクリーニングを行った。

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 2 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：表 3 に示した生薬 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。

GAM 培地の調製

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 を加え、溶解後に 3N HCl で pH を 6.5 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。

C. perfringens の培養

無酸素混合ガス ($\text{N}_2/\text{CO}_2/\text{H}_2=80/10/10$) 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。

培養液の増殖度及び pH 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、 $0.22\ \mu\text{m}$ 孔あるいは $0.45\ \mu\text{m}$ 孔のメンブランフィルターでろ過した後に用いた。50 mg/mL となるように培地で希釈した試料溶液 10 μL を 96 穴マイクロプレートの 1 穴に加え、菌懸濁液を 90 μL ずつ接種し（最終濃度 5 mg/mL）、 37°C 、嫌気条件下で一定時間培養した。培養終了後、培養液 7.5 μL を取り細胞計測盤（ワンセルカウンター）へ供し、顕微鏡観察によりその増殖度を、残りの試料で pH を測定した。また、対照試料として、エキス溶液と培地のみを含むもの、及び菌懸濁液のみを含むものを同様に処理した。スクリーニングは独立に 3 回行い、結果は 3 回の平均値によって示した。

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菌と背景に分離し、細菌に相当する部分の面積を計測した。さらに、得られた細菌占有面積率は検量線グラフ（図 1）を基に濁度 (OD_{600} 値) へ変換し、増殖度を数値化した。

（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ていない。

C. 研究結果

細菌数直接計測システムの改良

前年度は、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の指標として扱った。今年度は、顕微鏡観察における細菌専有面積率を、細菌増殖度測定の一般的な指標である培養液濁度 (OD_{600}) に換算することを試み、 OD_{600} 値既知の *C.*

perfringens 細菌液を用いて検量線を作成したところ、細菌面積占有率 0~35%の範囲において、OD₆₀₀ と概ね良好な相関が見られたため (図 1)、以降は下の式に従い、細菌専有面積率 (X) を培養液濁度 (Y) に換算することとした。

$$Y = 0.0148e^{0.1005X}$$

C. perfringens の増殖及び培地 pH の経時変化

漢方処方あるいはその構成生薬エキスを *C. perfringens* に投与し、その増殖度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培地 pH の経時変化を観察した。図 2 に示す通り、*C. perfringens* は 8 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、pH の降下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。本結果は、前年度に報告した乳酸菌 *L. reuteri* よりも世代時間が短かった。しかし、増殖曲線と pH の降下の変化は *L. reuteri* と同じく反比例の関係にあり、このことから有機酸の産生曲線も同様の傾向であると予想された。

C. perfringens の増殖度に対する漢方処方エキスの影響評価

はじめに、表 2 に示した 37 種類の処方の水煎出エキスを 20 mg/ml で *C. perfringens* に投与し、その増殖への影響を評価したところ、37 処方中 26 処方は *C. perfringens* の生育を著しく抑制した (データ示さず)。この予備実験の結果を受け、処方の投与濃度を再検討し、以降の試験では 5 mg/ml にて試験を行うこととした。図 3 に、検体処理後 5 時間における細菌占有面積を OD₆₀₀ の値に換算したもの、及び、培養液の pH を示した。また、表 4 には OD₆₀ 測定値及び pH 測定値の平均値 (N=3) を示し、また、3 回の実験における OD 値の標準偏差と OD 平均値の Positive Control に対する相対値を示した。ここでは、黄連解毒湯

(K05)、黄連湯 (K06)、乙字湯 (K07)、葛根黄連黄芩湯 (K08)、桂枝加芍薬大黄湯 (K11)、三黄瀉心湯 (K15)、滋血潤腸湯 (K17)、紫根牡蛎湯 (K18)、小承気湯 (K24)、大黄甘草湯 (K27)、大黄牡丹皮湯 (K28)、大柴胡湯 (K30)、桃核承気湯 (K32)、及び麻子仁丸 (K36) は、Positive Control と比較して 20%以下の著しく強い生育阻害活性を示した。また、甘草瀉心湯 (K10)、柴胡桂枝湯 (K20)、半夏瀉心湯 (K34) も 60%以下の強い阻害活性を示した。

表 4 において、*C. perfringens* の生育を顕著に抑制した処方の場合、その培地の pH は、菌体を加えずに検体だけを投与した Control の値 (6.4~6.5) とほぼ変わらず、pH 降下が起きていないことが分かった。一方、検体を加えずに菌体だけを培養した Positive Control の培地 pH は 5.1 まで降下し、これに匹敵する pH 降下を示した検体では概ね OD 値も上昇し、細胞増殖が良好であった。ただし、人參湯 (K33)、半夏瀉心湯 (K34) 及び六君子湯 (K37) のように、pH は降下しているものの細菌増殖は抑えられている検体も観察され、pH 降下が必ずしも細菌生育度を反映していないことが分かった。

C. perfringens の増殖度に対する漢方処方構成生薬エキスの影響評価

C. perfringens の増殖に影響を与える生薬を特定するために、表 3 に示した 37 種類の処方の構成生薬 54 種のうち、試験用の水煎出エキスを十分量調製できなかった猪苓 (S33)、牡蛎 (S51)、麻子仁 (S52) を除いた 51 種類の生薬について試験を行った。処理後 5 時間における顕微鏡画像を用いて細菌増殖度 (OD 値に換算) を調べた結果、図 4 に示す通り、黄芩 (S03)、黄柏 (S04)、黄連 (S05)、甘草 (S08)、桂皮 (S12)、厚朴 (S15)、蘇葉 (S29)、大黄 (S30)、忍冬 (S40)、薄荷 (S41) 及び牡丹皮 (S50) において、Positive Control と比較して 20%以下の顕著な増殖抑制効果が確認された。また、葛根 (S06)、乾姜 (S07)、枳実 (S10)、

山査子 (S17)、山梔子 (S18)、山椒 (S19)、芍薬 (S23)、縮砂 (S24)、生姜 (S25)、川芎 (S27) において、Positive Control と比べ 20-60% の強い増殖抑制効果が観察された。一方、茯苓 (S45)、芒硝 (S48)、防風 (S49)、薏苡仁 (S53) においては、Positive Control と比べ 120% 以上の増殖促進効果が認められた。

表 5 において、*C. perfringens* の生育を顕著に抑制した生薬の場合、その培地の pH は、菌体を加えずに検体だけを投与した Control の値 (6.2 ~ 6.5) とほぼ変わらず、pH 降下が起きていなかった。一方、検体を加えずに菌体だけを培養した Positive Control の培地 pH は 6.5 から 5.3 まで降下し、これに匹敵する pH 降下を示した検体では概ね OD 値も上昇し、細胞増殖が良好であった。ただし、葛根 (S06)、芍薬 (S23) 及び川芎 (S27) のように、pH は降下しているものの細菌増殖は抑えられている検体も観察され、処方と同様に生薬の場合も、pH 降下が必ずしも細菌生育度を反映していないことが分かった。また、上述の通り、増殖を促進する生薬もいくつか認められたが、これらは培地の pH 降下から判定することは不可能であった。

D. 考察

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、我々は、平成 19 年度の「生薬及び漢方処方の有用性評価手法・安全性確保と国際調和に関する研究」において、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、乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* を対象として、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、その後、実際に *L.*

reuteri 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、昨年度は、*L. reuteri* を地道に顕微鏡で直接観察する方針に切り換え、顕微鏡観察画像に 2 値化処理を施し、細菌占有部分の面積を自動計測し、その面積値を細菌増殖の指標とするアッセイシステムを構築した。そして、今回はいわゆる悪玉菌の一種である *Clostridium perfringens* にこのシステムを適用し、その生育に影響を及ぼす漢方処方について検討した。

スクリーニングを行うに先立ち、*C. perfringens* の増殖特性を調べたところ (図 2)、非常に増殖力が強く、*L. reuteri* よりも世代時間が短いことが分かった。前年度の *L. reuteri* のスクリーニングでは、漢方処方及び生薬のエキスを 20 mg/mL の最終濃度で投与したため、同じ濃度において *C. perfringens* に対する影響を調べたが、ほとんどの処方 (37 処方中 26 処方) で顕著な増殖抑制効果が見られた。そこで、*L. reuteri* のスクリーニング結果と直接比較することはできなくなるが、抑制活性の強弱を判定するために試料濃度を再検討し、1/4 濃度である 5 mg/mL の試料溶液を用いて試験を進めることにした。この件については、将来的に *L. reuteri* に関しても 5 mg/mL の試料濃度においてスクリーニングをやり直す必要がある。

表 2 に示す 37 処方のスクリーニングの結果、5 mg/mL の濃度において、*C. perfringens* の増殖を対照試料との比較で 10% 以下まで強力に抑制する処方として、黄連解毒湯、乙字湯、桂枝加芍薬大黄湯、三黄瀉心湯、滋血潤腸湯、紫根牡蛎湯、小承気湯、大黄甘草湯、大黄牡丹皮湯、大柴胡湯、桃核承気湯及び麻子仁丸が見出された (表 4)。このうち、小承気湯、大黄甘草湯、桃核承気湯及び麻子仁丸は、*L. reuteri* に対しても、20 mg/mL の濃度において、対照試料との比較で 50% 以下の

強い増殖抑制効果を見せた処方であり、桂枝加芍薬大黃湯及び大黃牡丹皮湯は 70%前後の弱い抑制効果を見せた処方である。一方、黄連解毒湯、乙字湯、三黄瀉心湯及び紫根牡蛎湯は、*L. reuteri* の生育にほとんど影響を与えず、滋血潤腸湯及び大柴胡湯はむしろ、*L. reuteri* の増殖を促進させる処方として見出されたものである。表 5 に示す通り、構成生薬単味では多くの生薬に強力な抑制活性が見出されたが、処方のスクリーニング結果と総合して考察すると、配合率に関わらず大黃が配合されたすべての処方（乙字湯、桂枝加芍薬大黃湯、三黄瀉心湯、滋血潤腸湯、紫根牡蛎湯、小承氣湯、大黃甘草湯、大黃牡丹皮湯、大柴胡湯、桃核承氣湯及び麻子仁丸）において *C. perfringens* に対する強い増殖抑制活性が見出されており、*C. perfringens* の大黃に対する感受性は極めて高いことが分かった。これは、乙字湯、三黄瀉心湯、紫根牡蛎湯、滋血潤腸湯及び大柴胡湯において増殖を抑制されない *L. reuteri* とは対照的であった。また、黄連含有処方も *C. perfringens* に対して概ね抑制活性を示し、黄芩、黄柏、桂皮等が共に配合されている場合には特に顕著であった。これについても、黄連による増殖抑制を受けない *L. reuteri* とは対照的であった。

L. reuteri に対するスクリーニングと同様に、培地の pH が元のまま降下しないケースについては、悉く細菌の生育が抑制されていた。しかし、pH が降下したにも関わらず、細菌は増殖していないケースがいくつか見付かり、また、生育が促進されるケースを培地の pH の降下度から予測することは難しかった。培地の pH を測定するアッセイ法は、顕微鏡で直接観察する方法と比較して圧倒的に簡便ではあるが、得られる情報の解釈には注意を要することが改めて示された。

今回は、いわゆる悪玉菌の一例として *C. perfringens* を取り上げた。*C. perfringens* はウェルシュ菌とも呼ばれ、ヒト腸内の常在菌でありながら毒素を生産し、給食等を介した食中毒の

原因菌の一種である。このため、給食菌やカフエテリア菌と呼ばれることもある。ウェルシュ菌による食中毒発生の機序は、食品中で増殖した生菌が食品と共に摂取され、これが腸内で大量に増殖すると共に毒素を生産し、その毒素が腸上皮細胞に作用して下痢を引き起こすものとされている。ウェルシュ菌の毒素は熱や胃酸の pH によって分解されるため、食品中でウェルシュ菌を増殖させないこと、そして、摂取されたウェルシュ菌を腸内で増殖させないことが食中毒防止のために重要である。本研究において、*C. perfringens* は前年度に善玉菌の一例として検討した乳酸菌 *L. reuteri* とは大きく挙動が異なることが示され、特に、大黃及び黄連に対する感受性の高さが特徴的であった。漢方において、下痢に適用する多くの処方に大黃あるいは黄連が配合されており、*C. perfringens* に起因する食中毒は太古より頻発していたものと想像されるため、その予防及び治療に大黃あるいは黄連含有処方が貢献してきたものと思われる。また、本研究及び前年度の研究において明らかにされた結果が、単に *C. perfringens* 及び *L. reuteri* に限局された特質であるのか、クロストリジウム菌及び乳酸菌に普遍的な特質であるのかを明らかにすることは重要であり、現在、*C. perfringens* 及び *L. reuteri* 以外のクロストリジウム菌及び乳酸菌に関する検討を進めている。さらに、ビフィズス菌等の他の主な腸内常在菌についてもスクリーニングを行い、腸内細菌叢のモデルケースとして総合的に検討を進める予定である。そして、腸内環境の保全を考えた場合、腸内 pH を調節し、腸管上皮細胞のエネルギー代謝を支える有機酸の存在量は重要であり、これら腸内細菌の有機酸生産に及ぼす漢方処方の影響についても同時に検討を加えているところである。

腸内細菌叢は数百の細菌種から構成されるため、腸内細菌叢全体の組成変化及び有機酸生産等についてマクロ的な視点から把握することは重要である。しかし、別個体はもとより、同一個体

であっても、年齢、時刻、体調、食餌等により腸内細菌叢は変化し、その個体内でも腸の部位によって菌種組成は異なることが知られており、動物個体や腸内容物を用いることによりマクロ的に全体を捕らえたつもりでも、無数の腸内細菌叢パターンの中の限られたいくつかのケースを対象としている可能性は否めない。従って、主要な腸内細菌に限定したミクロ的視点からの検討を積み重ね、そこから全体を帰納するアプローチも重要と思われる。このような見地から、我々は今後も、*in vitro* 培養した腸内常在菌を用いて、漢方処方安全性及び有効性の確保のため、様々な観点から検討を進める予定である。

E. 結論

本研究では、いわゆる悪玉菌の一種である *C. perfringens* を取り上げ、その生育に及ぼす影響を指標として、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い、黄連解毒湯、乙字湯等に強力な生育抑制活性を見出し、*C. perfringens* の大黄に対する感受性が極めて高いことを明らかにした。また、*C. perfringens* は黄連含有処方によっても生育を強く阻害される傾向にあり、これらの特質は、乳酸菌 *L. reuteri* の性質と差別化しやすいものであった。

F. 研究発表

1. 学会発表

勢ノ康代、鄭美和、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 (10) 腸内細菌生育に影響を及ぼす漢方処方の比較検討. 日本薬学会第130年会、2010年3月(岡山)

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

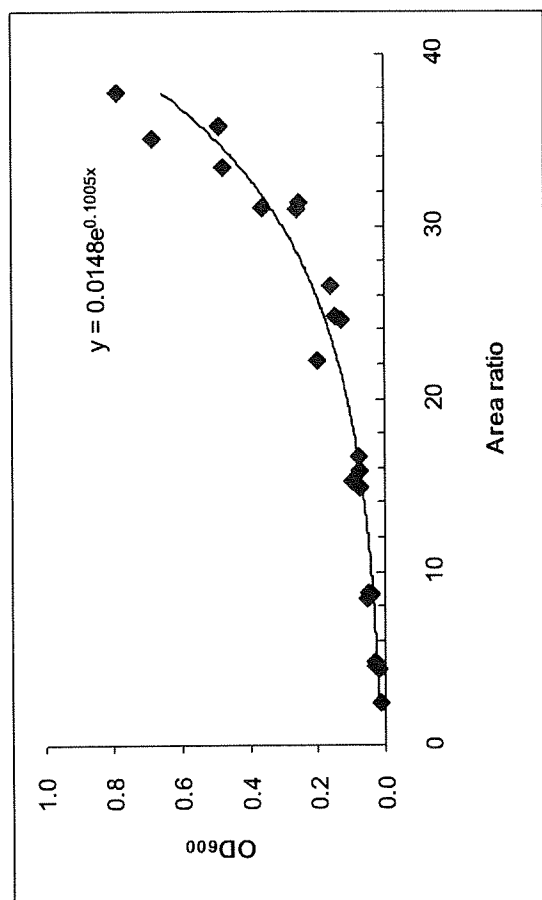


図1 光学顕微鏡観察における*C. perfringens* 菌体の視野中面積占有率と培養液濁度(OD₆₀₀)の相関

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)

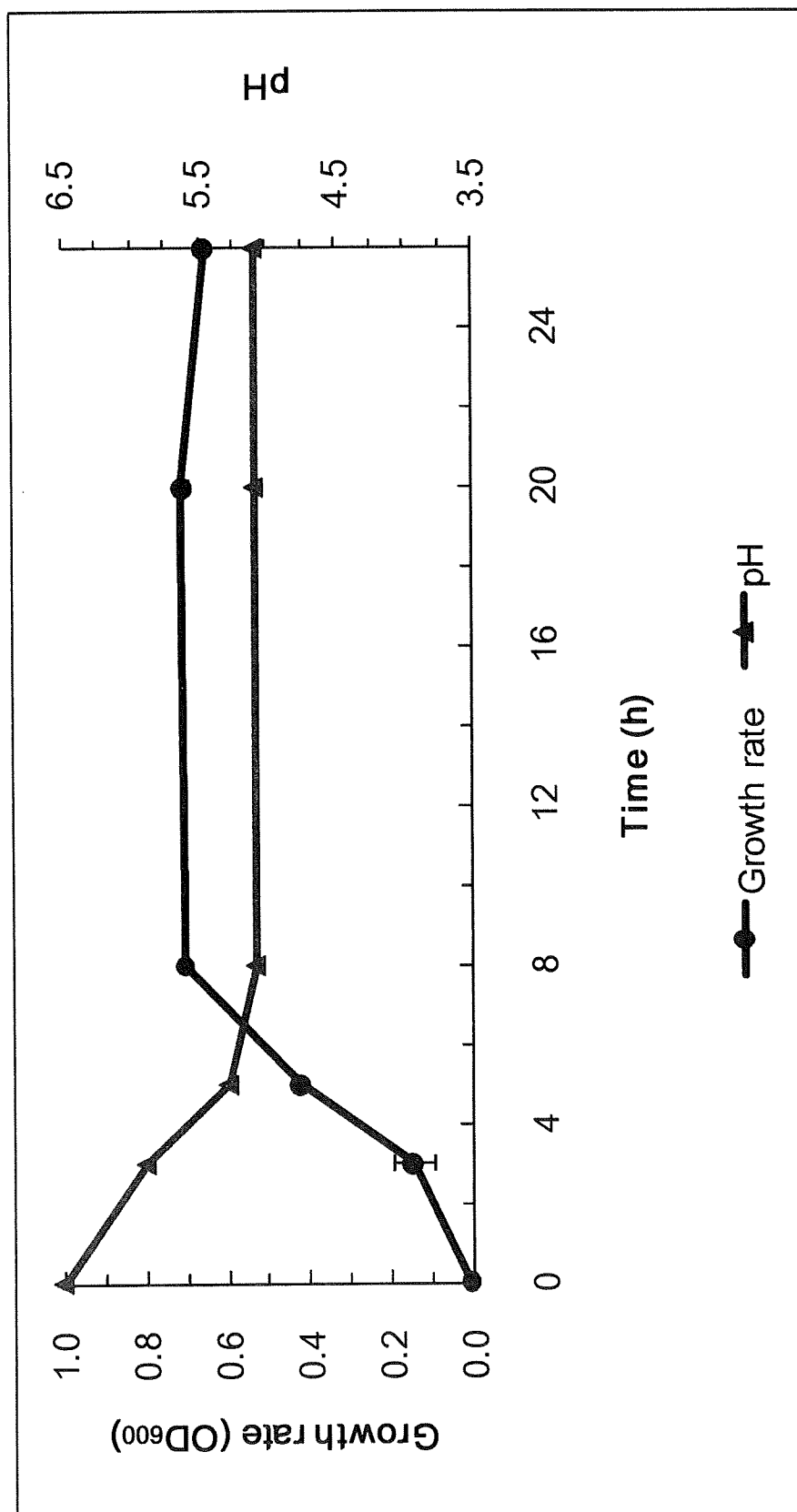
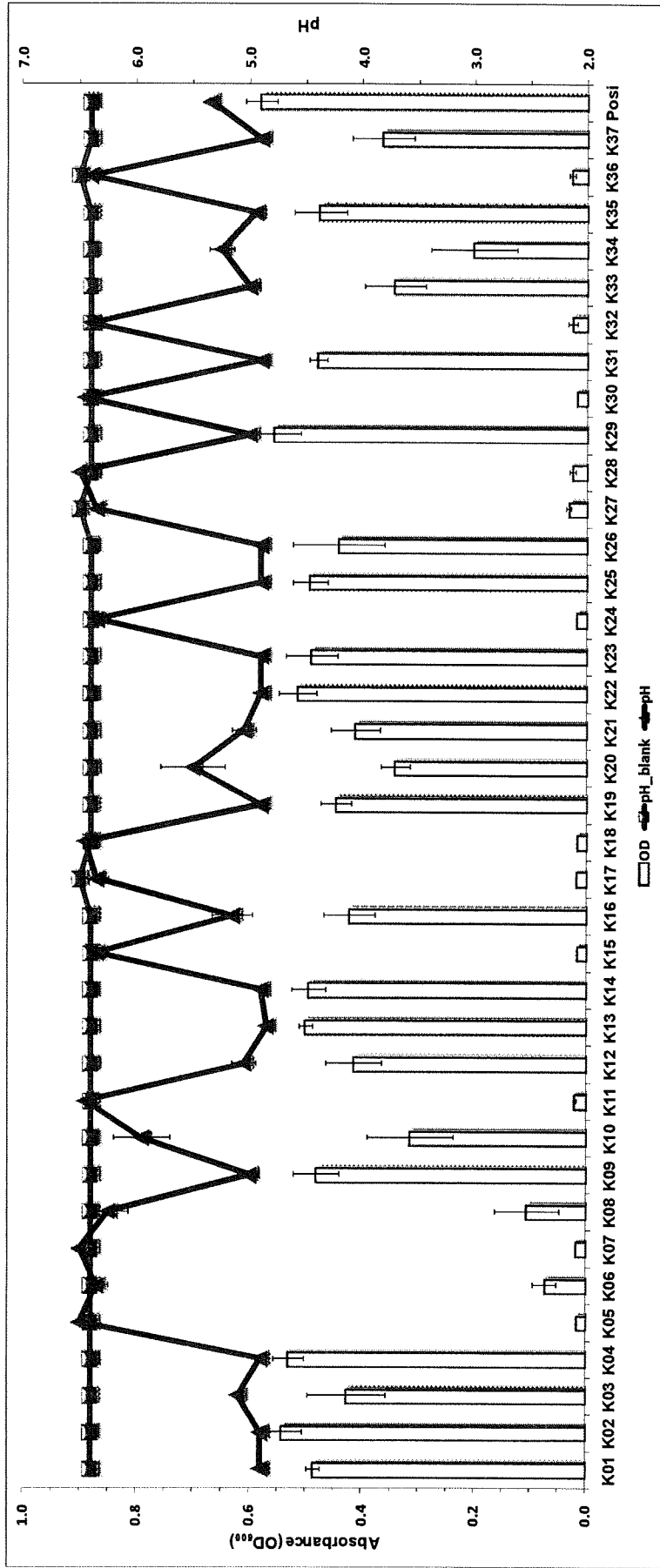


図 2 *C. perfringens* の増殖度および培地pH の経時変化

pH測定: Twin pH (HORIBA)

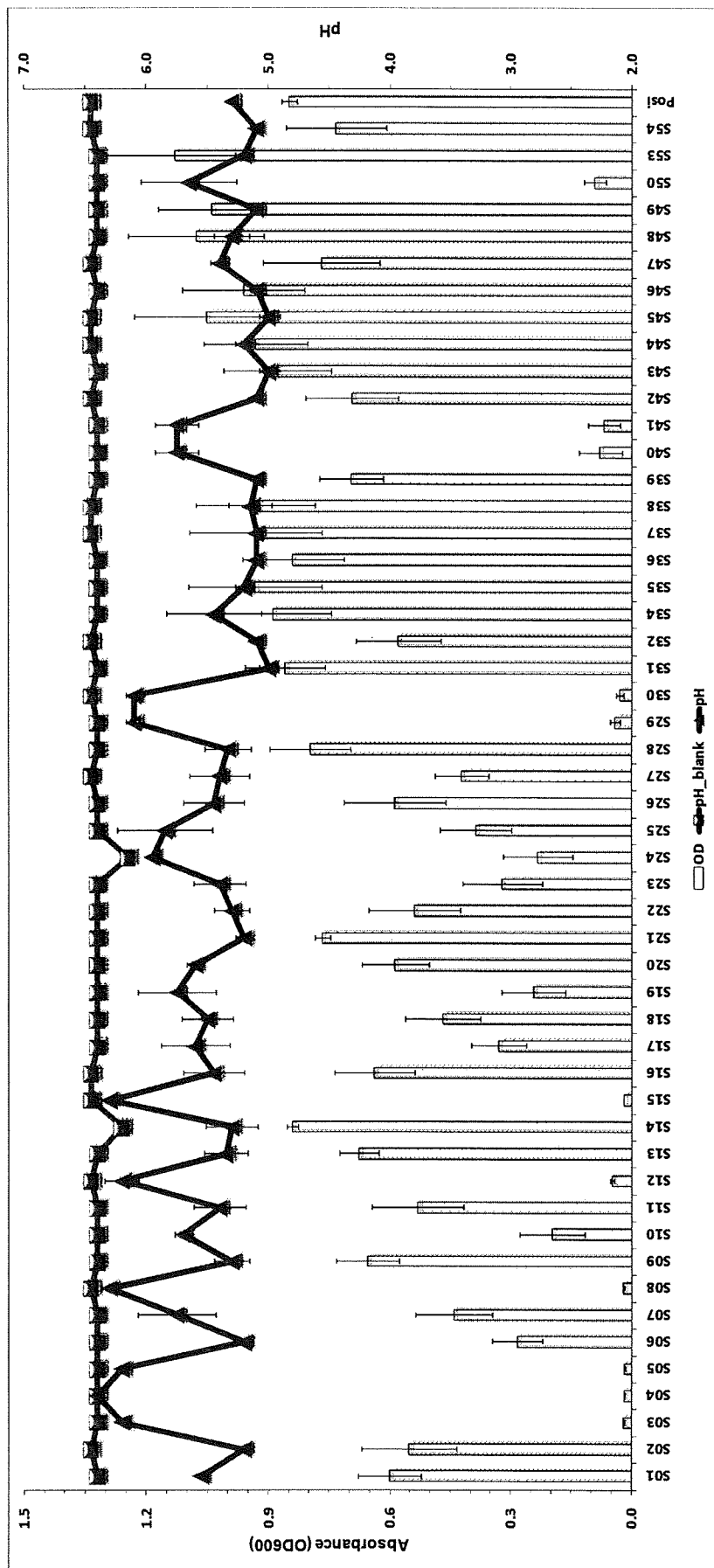
OD測定: NanoDrop ND-1000 (NanoDrop)



Posi: Positive Control

図3 漢方処方煎出エキス処理5時間後の *C. perfringens* の増殖度

それぞれの Kampo number は表2に記載



Posi: Positive Control

図 4 生薬煎出エキス処理5時間後の *C. perfringens* の増殖度

それぞれの Shoyaku number は表3に記載

表 1 生薬有効成分の腸内細菌による代謝の一例

生薬名	有効成分	代謝物	腸内細菌	代謝酵素
黄芩	Baicalin	Baicalein	<i>E. coli</i> , <i>Streptococcus</i>	beta-glucuronidase
甘草	Glycyrrhizin	Glycyrrhetic acid	<i>Eubacterium</i>	beta-glucuronidase
芍薬	Albiflorin	Albimetabolin	-	-
大黄	Paeoniflorin	Paeonimetabolin I, II	<i>Bacteroides</i> , <i>Lactobacillus</i>	beta-glucosidase
	Sennoside	Sennidin	<i>Bifidobacterium</i>	reductase
	Sennidin	Rhein anthrone	<i>Peptostreptococcus</i>	beta-glucosidase
人參	Ginsenoside	Protopanaxadiol	<i>Eubacterium</i>	

文献: 本間直人、漢方薬の薬物速度論解析、薬剤学 66:44-49、2006

表 2 スクリーニングに供した漢方処方の一覽

1/2

処方番号	漢方処方名	配合生薬	適応症
K01	胃風湯	当帰(3)、芍薬(3)、川芎(3)、人參(3)、白朮(3)、茯苓(3)、桂皮(2)、粟(2)	急・慢性胃腸炎、冷えによる下痢
K02	胃苓湯	蒼朮(2.5)、厚朴(2.5)、陳皮(2.5)、猪苓(2.5)、沢瀉(2.5)、白朮(2.5)、茯苓(2.5)、桂皮(2)、大棗(1.5)、生姜(1.5)、甘草(1)	食あたり、暑気あたり、冷え腹、急性胃腸炎、腹痛
K03	温清飲	当帰(4)、地黄(4)、芍薬(3)、川芎(3)、黄芩(3)、山梔子(2)、黄连(1.5)、黄柏(1.5)	月経不順、月経困難、血の道症、更年期障害、神経症、皮膚炎
K04	黄耆建中湯	桂皮(4)、生姜(1)、大棗(4)、芍薬(6)、甘草(2)、膠飴(20)、黄耆(4)	虚弱体質、病後の衰弱、ねあせ、湿疹、皮膚のびらん、腹痛、冷え性
K05	黄連解毒湯	黄連(1.5)、黄柏(1.5)、黄芩(3)、山梔子(2)	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
K06	黄連湯	黄連(3)、甘草(3)、乾姜(3)、人參(3)、桂皮(3)、大棗(3)、半夏(6)	胃痛、急性胃炎、二日酔い、口内炎
K07	乙字湯	当帰(6)、柴胡(5)、黄芩(3)、甘草(2)、升麻(1.5)、大黄(1)	痔核、切れ痔、便秘、軽度の脱肛
K08	葛根黄連黄芩湯	蘇葉(1)、葛根(6)、黄連(3)、黄芩(3)、甘草(2)	下痢、急性胃腸炎、肩こり、口内炎、舌炎、不眠症
K09	加味逍遙散	当帰(3)、芍薬(3)、白朮(3)、茯苓(3)、柴胡(3)、牡丹皮(2)、山梔子(2)、甘草(1.5)、生姜(1)、薄荷(1)	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
K10	甘草瀉心湯	半夏(5)、黄芩(2.5)、乾姜(2.5)、人參(2.5)、甘草(3.5)、大棗(2.5)、黄連(1)	胃腸炎、口内炎、口臭、不眠症、神経症、下痢
K11	桂枝加芍薬大黄湯	桂皮(4)、芍薬(6)、大棗(4)、生姜(1.5)、甘草(2)、大黄(1)	便秘、しぶり腹
K12	桂枝加芍薬湯	桂皮(4)、芍薬(6)、大棗(4)、生姜(1.5)、甘草(2)	渋り腹、腹痛、下痢、便秘
K13	啓脾湯	人參(3)、白朮(4)、茯苓(4)、蓮肉(3)、山藥(3)、山査子(2)、陳皮(2)、沢瀉(2)、甘草(1)	胃腸虚弱、慢性胃腸炎、消化不良、下痢
K14	五苓散	沢瀉(6)、猪苓(4.5)、茯苓(4.5)、白朮(4.5)、桂皮(3)	水溶性下痢、急性胃腸炎、暑気あたり、頭痛、むくみ、二日酔い
K15	三黄瀉心湯	大黄(1)、黄芩(1)、黄連(1)	高血圧の随伴症状(のぼせ、肩こり、耳鳴り、頭重、不眠、不安)、鼻血、痔出血、便秘、血の道症、更年期障害
K16	四逆散	柴胡(5)、芍薬(4)、枳実(2)、甘草(1.5)	胃炎、胃痛、腹痛、神経症
K17	滋血潤腸湯	当帰(4)、地黄(4)、桃仁(4)、芍薬(3)、枳実(2)、韭(2)、大黄(1.5)、紅花(1)	便秘、のぼせ、肩こり
K18	紫根牡蛎湯	当帰(5)、芍薬(3)、川芎(3)、紫根(3)、大黄(1.5)、忍冬(1.5)、黄耆(2)、牡蛎(4)、升麻(2)、甘草(1.5)	乳腺の痛み、痔の痛み、皮膚炎、リンパ腺の腫れ、貧血、疲労倦怠、腸腫瘍等にて諸治療の効なきものに用い、奇効を奏することがある

表 2 スクリーニングに供した漢方処方の一覧 2/2

処方番号	漢方処方名	配合生薬	適応症
K19	参苓白朮散	人参(3)、山薬(3)、白朮(4)、茯苓(4)、蓮肉(3)、薏苡仁(8)、扁豆(3)、桔梗(2.5)、縮砂(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
K20	柴胡桂枝湯	柴胡(5)、半夏(4)、桂皮(2.5)、芍薬(2.5)、黄芩(2)、人参(2)、大棗(2)、甘草(1.5)、生姜(1)	胃腸炎、風邪の中期から後期の症状
K21	柴苓湯	柴胡(7)、半夏(5)、生姜(1)、黄芩(3)、大棗(3)、人参(3)、甘草(2)、茯苓(6)、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
K22	十全大補湯	人参(3)、黄耆(3)、白朮(3)、茯苓(3)、当归(3)、地黄(3)、芍薬(3)、川芎(3)、桂皮(3)、甘草(1.5)	病後・術後の体力低下、疲労倦怠、食欲不振、ねあせ、手足の冷え、貧血
K23	小建中湯	桂皮(4)、生姜(1)、大棗(4)、芍薬(6)、甘草(2)、膠飴(20)	小児虚弱体質、疲労倦怠、慢性胃腸炎、腹痛、神経痛、小児夜尿症、夜泣き
K24	小承気湯	大黄(2)、枳実(2)、厚朴(3)	便秘
K25	真武湯	茯苓(5)、芍薬(3)、生姜(1)、白朮(3)、加工附子(1)	下痢、急・慢性腸炎、胃腸虚弱、目まい、動悸、感冒、むくみ、皮膚のかゆみ
K26	千金内托散	人参(2.5)、当归(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、痔、軽い床ずれ
K27	大黄甘草湯	大黄(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
K28	大黄牡丹皮湯	大黄(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
K29	大建中湯	山椒(2)、乾姜(5)、人参(3)、膠飴(20)	下腹部痛、腹部膨満感
K30	大柴胡湯	柴胡(6)、半夏(4)、生姜(2)、黄芩(3)、芍薬(3)、大棗(3)、枳実(2)、大黄(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
K31	中建中湯	山椒(2)、乾姜(1)、人参(3)、膠飴(20)、桂皮(4)、芍薬(6)、甘草(2)、大棗(4)	慢性胃腸炎、下痢、便秘
K32	桃核承気湯	桃仁(5)、桂皮(4)、大黄(3)、芒硝(2)、甘草(1.5)	月経不順、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
K33	人参湯(理中丸)	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
K34	半夏瀉心湯	半夏(5)、黄芩(2.5)、乾姜(2.5)、人参(2.5)、甘草(2.5)、大棗(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
K35	附子理中湯	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
K36	麻子仁丸	麻子仁(5)、芍薬(2)、枳実(2)、厚朴(2)、大黄(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
K37	六君子湯	人参(4)、白朮(4)、茯苓(4)、半夏(4)、陳皮(2)、大棗(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

表 3 スクリーニングに供した生薬の一覧

生薬番号	生薬名	生薬名	生薬名
S01	粟	awa	Setariae Semen
S02	黄耆	ogi	Astragali Radix
S03	黄芩	ogon	Scutellariae Radix
S04	黄柏	obaku	Phellodendri Cortex
S05	黄连	oren	Coptidis Rhizoma
S06	葛根	kakkon	Puerariae Radix
S07	乾姜	kankyo	Zingiberis Siccatum Rhizoma
S08	甘草	kanzo	Glycyrrhizae Radix
S09	桔梗	kikyo	Platycodi Radix
S10	枳实	kijitsu	Aurantii Fructus Immaturus
S11	杏仁	kyonin	Armeniaca Semen
S12	桂皮	keihi	Cinnamomi Cortex
S13	膠飴	koi	Saccharum Granorum
S14	紅花	koka	Carthami Flos
S15	厚朴	koboku	Magnoliae Cortex
S16	柴胡	saiko	Bupleuri Radix
S17	山査子	sanzashi	Crataegi Fructus
S18	山梔子	sanshishi	Gardeniae Fructus
S19	山椒	sansho	Zanthoxyli Fructus
S20	山薬	san'yaku	Dioscoreae Rhizoma
S21	地黄	jio	Rehmanniae Radix
S22	紫根	shikon	Lithospermi Radix
S23	芍薬	shakuyaku	Paeoniae Radix
S24	縮砂	shukusha	Amomi Semen
S25	生姜	shokyo	Zingiberis Rhizoma
S26	升麻	shoma	Cimicifugae Rhizoma
S27	川芎	senkyu	Cnidii Rhizoma
S28	蒼朮	sojutsu	Atractylodis Lanceae Rhizoma
S29	蘇葉	soyo	Perillae Herba
S30	大黃	daio	Rhei Rhizoma
S31	大棗	taiso	Zizyphi Fructus
S32	沢瀉	takusha	Alismatis Rhizoma
S33	猪苓	chorei	Polyporus
S34	陳皮	chimpi	Aurantii Nobilis Pericarpium
S35	冬瓜子	togashi	Benincasae Semen
S36	当帰	toki	Angelicae Radix
S37	桃仁	tonin	Persicae Semen
S38	韭	nira	Allii Tuberosi Folium
S39	人參	ninjin	Ginseng Radix
S40	忍冬	nindo	Lonicerae Folium Cum Caulis
S41	薄荷	hakka	Menthae Herba
S42	半夏	hange	Pinelliae Tuber
S43	白芷	byakushi	Angelicae Dahuricae Rhizoma
S44	白朮	byakujutsu	Atractylodis Rhizoma
S45	茯苓	bukuryo	Hoelen
S46	加工附子	bushi	Aconiti Tuber
S47	扁豆	henzu	Dolichoris Semen
S48	芒硝	bosho	Natrii Sulfus
S49	防風	bofu	Saposhnikoviae Radix
S50	牡丹皮	botampi	Moutan Cortex
S51	牡蛎	borei	Ostreae Testa
S52	麻子仁	mashinin	Cannabis Fructus
S53	薏苡仁	yokuinin	Coicis Semen
S54	蓮肉	ren'niku	Nelumbis Semen

表 4 漢方処方煎出エキス処理5時間後の
C. perfringens のOD値

処方番号	漢方処方名	pH		OD値	標準偏差	相対値
		Control	Sample			
K01	胃風湯	6.4	4.9	0.49	0.01	84%
K02	胃苓湯	6.4	4.9	0.54	0.04	93%
K03	温清飲	6.4	5.1	0.43	0.07	74%
K04	黄耆建中湯	6.4	4.9	0.53	0.03	91%
K05	黄連解毒湯	6.4	6.5	0.02	0.00	3%
K06	黄連湯	6.4	6.4	0.07	0.02	13%
K07	乙字湯	6.4	6.5	0.02	0.00	3%
K08	葛根黄連黄芩湯	6.4	6.3	0.11	0.06	18%
K09	加味逍遙散	6.4	5.0	0.48	0.04	83%
K10	甘草瀉心湯	6.4	6.0	0.31	0.08	54%
K11	桂枝加芍薬大黄湯	6.4	6.5	0.02	0.00	4%
K12	桂枝加芍薬湯	6.4	5.1	0.41	0.05	72%
K13	啓脾湯	6.4	4.9	0.50	0.01	86%
K14	五苓散	6.4	4.9	0.50	0.03	85%
K15	三黄瀉心湯	6.4	6.4	0.02	0.00	3%
K16	四逆散	6.4	5.2	0.42	0.05	73%
K17	滋血潤腸湯	6.5	6.4	0.02	0.00	3%
K18	紫根牡蛎湯	6.4	6.5	0.02	0.00	3%
K19	参苓白朮散	6.4	4.9	0.45	0.03	77%
K20	柴胡桂枝湯	6.4	5.5	0.34	0.03	59%
K21	柴苓湯	6.4	5.1	0.41	0.04	71%
K22	十全大補湯	6.4	4.9	0.51	0.03	89%
K23	小建中湯	6.4	4.9	0.49	0.05	84%
K24	小承気湯	6.4	6.4	0.02	0.00	3%
K25	真武湯	6.4	4.9	0.49	0.03	85%
K26	千金内托散	6.4	4.9	0.44	0.08	76%
K27	大黄甘草湯	6.5	6.4	0.03	0.01	6%
K28	大黄牡丹皮湯	6.4	6.5	0.03	0.01	5%
K29	大建中湯	6.4	5.0	0.56	0.05	96%
K30	大柴胡湯	6.4	6.5	0.02	0.00	3%
K31	中建中湯	6.4	4.9	0.48	0.02	83%
K32	桃核承気湯	6.4	6.4	0.03	0.01	4%
K33	人参湯	6.4	5.0	0.34	0.05	59%
K34	半夏瀉心湯	6.4	5.3	0.20	0.08	35%
K35	附子理中湯	6.4	5.0	0.48	0.05	82%
K36	麻子仁丸	6.5	6.4	0.03	0.01	5%
K37	六君子湯	6.4	4.9	0.36	0.06	63%
Posi	Control	6.4	5.1	0.58	0.03	100%

表 5 生薬煎出エキス処理5時間後の
C. perfringens のOD値

生薬番号	生薬名	pH		OD値	標準偏差	相対値
		Control	Sample			
S01	粟	6.4	5.6	0.60	0.1	71%
S02	黄耆	6.5	5.2	0.55	0.1	65%
S03	黄芩	6.4	6.2	0.02	0.0	2%
S04	黄柏	6.4	6.4	0.02	0.0	2%
S05	黄连	6.4	6.2	0.02	0.0	2%
S06	葛根	6.4	5.2	0.28	0.1	33%
S07	乾姜	6.4	5.8	0.44	0.1	52%
S08	甘草	6.5	6.3	0.02	0.0	2%
S09	桔梗	6.4	5.3	0.65	0.1	77%
S10	枳实	6.4	5.7	0.20	0.1	23%
S11	杏仁	6.4	5.4	0.53	0.1	62%
S12	桂皮	6.5	6.2	0.05	0.0	6%
S13	膠飴	6.4	5.4	0.68	0.0	80%
S14	紅花	6.2	5.3	0.84	0.0	99%
S15	厚朴	6.5	6.3	0.02	0.0	2%
S16	柴胡	6.5	5.5	0.64	0.1	75%
S17	山楂子	6.4	5.6	0.33	0.1	39%
S18	山梔子	6.4	5.5	0.47	0.1	55%
S19	山椒	6.4	5.8	0.24	0.1	29%
S20	山薬	6.4	5.6	0.59	0.1	69%
S21	地黄	6.4	5.2	0.77	0.0	90%
S22	紫根	6.4	5.3	0.54	0.1	64%
S23	芍薬	6.4	5.4	0.32	0.1	38%
S24	縮砂	6.2	6.0	0.23	0.1	27%
S25	生姜	6.4	5.9	0.39	0.1	45%
S26	升麻	6.4	5.5	0.59	0.1	69%
S27	川芎	6.5	5.4	0.42	0.1	50%
S28	蒼朮	6.4	5.3	0.80	0.1	94%
S29	蘇葉	6.4	6.1	0.04	0.0	5%
S30	大黄	6.5	6.1	0.03	0.0	3%
S31	大棗	6.4	5.0	0.86	0.1	101%
S32	沢瀉	6.5	5.1	0.58	0.1	68%
S34	陳皮	6.4	5.5	0.89	0.1	105%
S35	冬瓜子	6.4	5.2	0.93	0.2	110%
S36	当帰	6.4	5.1	0.84	0.1	99%
S37	桃仁	6.5	5.1	0.93	0.2	110%
S38	韭	6.5	5.2	0.93	0.1	110%
S39	人參	6.4	5.1	0.70	0.1	82%
S40	忍冬	6.4	5.8	0.08	0.1	9%
S41	薄荷	6.4	5.8	0.07	0.0	8%
S42	半夏	6.5	5.1	0.69	0.1	82%
S43	白芷	6.4	5.0	0.88	0.1	103%
S44	白朮	6.5	5.2	0.93	0.1	110%
S45	茯苓	6.5	5.0	1.05	0.2	124%
S46	加工附子	6.4	5.1	0.96	0.2	113%
S47	扁豆	6.5	5.4	0.77	0.1	91%
S48	芒硝	6.4	5.3	1.08	0.2	127%
S49	防風	6.4	5.1	1.04	0.1	122%
S50	牡丹皮	6.4	5.7	0.09	0.0	11%
S53	薏苡仁	6.4	5.2	1.13	0.2	133%
S54	蓮肉	6.5	5.1	0.73	0.1	86%
Posi	Control	6.5	5.3	0.85	0.0	100%

分担研究課題 漢方処方製剤の同等性の評価に関するおよび漢方処方の安全性と
有効性に関する研究

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

エキス収量による漢方製剤の品質評価に関する研究

現行の日本薬局方（第 15 改正第二追補まで）に記載されている処方を中心として、国内主要生薬・漢方メーカー 5 社の生薬を用い、17 処方及びそれらを構成する 37 種類の生薬の凍結乾燥エキスを調製し、そのエキス収量（収率）を測定した。また、黄連解毒湯、大黃甘草湯、芍薬甘草湯、葛根湯及びその構成生薬については、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った。生薬及び処方のエキス収率の会社間のバラツキは、概して小さく、さらに、漢方処方エキス収量の実測値は、個々の構成生薬のエキス収量から予測される理論値と良い一致を示した。この事実は、エキス収量が明確な生薬を構成原料とする限り、得られる漢方処方エキスのエキス収量は予測可能であることを意味し、エキス収量（収率）が、局方における新たな品質評価指標として、また、医療用漢方製剤後発品の同等性評価の指標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 元教授
木内文之 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
水沼周子 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

義的な確認試験が成立し、滴定や HPLC 分析による単一物質の定量によって精密に品質評価できる化学薬品類と異なり、成分の組成・含量に揺らぎを持つ天然物に由来し、他成分系である漢方製剤に関して完璧な規格設定を行うことは難しく、現行の規格及び試験方法は暫定版であり完成形ではない。一方、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記載されている。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

A. 研究目的

現行の第 15 改正日本薬局方（第二追補まで）には 11 処方の漢方処方エキスが記載され、第 16 改正までに 22 処方の記載が目標とされている。局方記載された漢方処方エキスの規格においては、製法、性状、構成生薬の確認試験、純度試験（重金属、ヒ素）、乾燥減量、灰分、貯法に加えて、原則的に 3 つの指標成分に関する定量法が設定され、それらの処方一日量当たりの含量規格が明記されている。しかし、紫外線可視吸収スペクトルや赤外吸収スペクトルの比較によりほぼ一

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。

このような状況において我々は、漢方エキス製剤の品質確保を目的として、局方におけるさらなる規格内容の充実や新規品質評価法の検討を行い、また、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、同等性評価の基準のあり方について検討している。その一環として、本研究では、漢方処方エキスのエキス収量（収率）が局方における新たな品質評価法として、また、医療用漢方製剤後発品の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 18～20 年度の厚労科研費研究事業「漢方処方の同等性並びに品質確保等に関する研究」（研究代表者、合田幸広）における分担研究「医療用漢方製剤後発品の同等性評価に関する研究」として、第 15 改正日本薬局方第一追補までに記載された 8 つの漢方処方エキスについて、原料生薬及び処方エキス収量に関して検討している。本研究ではこれを引き継ぎ、第 15 改正日本薬局方第二追補に記載された牛車腎気丸、真武湯及び八味地黄丸と、第 16 局収載が検討されている処方から小柴胡湯、黄連解毒湯、小青竜湯、芍薬甘草湯、六君子湯及び柴胡桂枝湯を取り上げ、凍結乾燥あるいはスプレードライにより調製した原料生薬及び漢方処方エキスのエキス収量についての検討を行った。そして、これまでに蓄積された 17 処方及び 37 種類の原料生薬に関するデータに基づき、エキス収量（収率）の漢方処方エキスの品質評価指標としての有用性について評価した。

B. 研究方法

生薬

牛車腎気丸、真武湯、八味地黄丸、小柴胡湯、黄連解毒湯、小青竜湯、芍薬甘草湯、六君子湯及び柴胡桂枝湯における正味 25 種類の構成生薬は、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、加工ブシについては、C 社及び E 社より入手することができなかったため、A 社の加工ブシを用いた。また、A 社及び B 社の加工ブシは局方規格におけるブシ 1 であり、D 社の加工ブシはブシ 2 であった。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（東京理化工械）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（東京理化工械）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。

生薬の凍結乾燥エキス調製とエキス収量測定

各処方の構成生薬は、その 20 g 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°C で予備凍結させた後、2 日間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。各生薬について独立に 3 回ずつエキスを調製し、そのエキス収量を測定した。前年度までの研究において、データが N=3 に満たなかった生薬については、今回の研究の中で不足回数分を補った。

処方の凍結乾燥エキス調製とエキス収量測定

処方のエキス調製においては、基本的に局方あ

るいは JP フォーラムに記載の一日量をポット(らくらく煎)に取り、生薬総重量の 20 倍の水で半量になるまで煎出したが、生薬総重量が 20~30g にならない処方については、適宜比例計算により煎出スケールを調節した。各処方の構成生薬と煎出に使用した重量は表 1 に記載した。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。各処方について独立に 3 回ずつエキスを調製し、そのエキス収量を測定した。前年度までの研究において、データが N=3 に満たなかった処方については、今回の研究の中で不足回数分を補った。

スプレードライと凍結乾燥のエキス収量比較

黄連解毒湯及び芍薬甘草湯、そしてその構成生薬については、同じ煎出液をスプレードライ用と凍結乾燥用に分割し、それぞれの方法でエキスを調製して収量を比較した。各処方及び構成生薬について独立に 2 回ずつエキスを調製し、そのエキス収量を測定した。黄連解毒湯については、一日量の 8 倍量(オウレン 12g、オウバク 12g、オウゴン 24g、サンシシ 16g)をポット(らくらく煎)に取り、1,280 mL の水で半量になるまで煎じた。芍薬甘草湯も一日量の 8 倍量(シャクヤク 48g、カンゾウ 48g)を 1,920 mL の水で煎じた。また、構成生薬については、それぞれの 50 g 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 3,000 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、2 日間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。スプレードライヤー SD-1000 は加圧二流体ノズル方式であり、入り口温度(150℃)、熱風量(0.68~0.72m³/min)、噴霧圧力(100kPa、日立 SC820 型コンプレッサー)、出口温度(80~85℃)の条件でエキス調製に用いた。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

生薬単味の凍結乾燥エキス収率

前年度までのデータも合わせて、37 生薬の凍結乾燥エキスに関する測定結果を表 2 に記載した。3 回の試行それぞれのエキス収率、各社の平均収率(試行間平均)及び各社の試行間変動係数(Cv)を示し、また、平均エキス収率の会社間平均と変会社間変動係数を求め、その平均値を 100 とした場合の相対値も示した。各社の試行間変動係数(Cv)は概ね 10 以下であったが、ショウキョウ、ソヨウ、チョレイ及びブクリョウについては大きく 10 を上回るメーカーが見られた。また、会社間の Cv は概ね 10 前後であったが、20 を上回る生薬(サイコ、サイシン、ショウキョウ、ソヨウ、ニンジン、ハンゲ、ブクリョウ及び加工ブシ)も見られた。

処方の凍結乾燥エキス収率

前年度までのデータも合わせて、17 処方の凍結乾燥エキスに関する測定結果を表 3 に記載した。表 2 の生薬と同様に、3 回の試行それぞれのエキス収率、試行間平均収率及び試行間変動係数(Cv)を示した。また、試行間平均収率の会社間平均と会社間変動係数、及び会社間平均の相対値を示した。各社の試行間変動係数(Cv)は概ね 2 以下で

あり、生薬と比較してバラツキは極めて小さかった。また、会社間のCvも生薬と比較して小さく、概ね5前後であったが、10を上回る処方(柴胡桂枝湯、柴苓湯、小柴胡湯及び半夏厚朴湯)も見られた。

構成生薬の凍結乾燥エキス収量に基づく処方エキス収量の予測

構成生薬単味での凍結乾燥エキス収量実測値を利用して処方一日量分の生薬から採れる理論エキス収量を算出し、それらを単純に加算することにより処方一日量あたりの理論エキス収量を予測した。この理論エキス収量を、実際に構成生薬を混合煎出して得られた処方凍結乾燥エキス収量の実測値と比較したところ、メーカーの別に依らず、理論値と実測値の比は概ね1であり、理論値と実測値は良く一致した(表4-1~17)。ただし、黄連解毒湯は、理論値に対する実測値の比が0.8前後であり、実測値収量が理論値と比較して低い値を示した。

生薬単味の凍結乾燥及びスプレードライによるエキス収率の比較

黄連解毒湯及び芍薬甘草湯の構成生薬について、同一煎液を1/5及び4/5に分割してそれぞれ凍結乾燥及びスプレードライに供し、エキス収率を比較した。前年度までの葛根湯及び大黃甘草湯の構成生薬のデータも合わせて、12生薬に関する2回ずつの測定結果を表5に示した。このうち、凍結乾燥における収率データは、凍結乾燥単独で生薬エキスを調製した表2の収率データと比較して、ほぼ同等の値であった。平均エキス収率の会社間変動係数は概ね10以下であり、しかも、凍結乾燥とスプレードライで変動係数に乖離のある生薬は観察されず、会社間のバラツキに関して凍結乾燥とスプレードライに大きな差は認められなかった。また、それぞれの生薬について、各会社のエキス収率の相対値を見ると、会社間の相対値の分布状況は、マオウを除いて凍結乾燥及び

スプレードライの違いに関わらずほぼ一定であった。多くの生薬において、スプレードライによるエキス収率は凍結乾燥によるその70%前後であったが、オウバクだけは特別にスプレードライによるエキス収率が低く、凍結乾燥と比べて45%前後であった。オウバクの場合、作業終了後、スプレードライ機の蒸発管の器壁に、黄色の膜状物質が大量に付着していた。

処方の凍結乾燥及びスプレードライによるエキス収率の比較

黄連解毒湯及び芍薬甘草湯について、同一煎液を1/5及び4/5に分割してそれぞれ凍結乾燥及びスプレードライに供し、エキス収率を比較した。前年度までの葛根湯及び大黃甘草湯のデータも合わせて、4処方に関する測定結果を表6に示した。このうち、凍結乾燥における収率データは、凍結乾燥単独で処方エキスを調製した表3の収率データと比較して、ほぼ同等の値であった。平均エキス収率の会社間変動係数は5%前後であり、生薬と比較してバラツキは小さかった。また、それぞれの処方について、各会社のエキス収率の相対値を見ると、会社間の相対値の分布状況は、1回のみの試行である葛根湯を除いて凍結乾燥及びスプレードライの違いに関わらずほぼ一定であった。大黃甘草湯、芍薬甘草湯及び葛根湯において、スプレードライによるエキス収率は凍結乾燥によるその70%前後であるが、黄連解毒湯はややスプレードライによるエキス収率が低く、60%前後であった。

構成生薬の凍結乾燥あるいはスプレードライエキス収量に基づく処方エキス収量の予測

表4に示した検討と同様に、構成生薬単味での凍結乾燥あるいはスプレードライエキス収量実測値を利用して処方一日量分の生薬から採れる理論エキス収量を算出し、それらを単純に加算することにより処方一日量あたりの理論エキス収量を予測した。この理論エキス収量を、実際に構

成生薬を混合煎出して得られた処方エキス収量の実測値と比較したところ、黄連解毒湯を除き、メーカーの別に依らず、また、凍結乾燥かスプレードライかエキス調製方法に依らず、理論値と実測値は良く一致した(表 7-1~4)。黄連解毒湯は、表 4-1 で示したものと同様に、凍結乾燥において理論値に対する実測値の比が 0.8 前後であり、スプレードライではさらに低い 0.7 前後であり、実測値収量が理論値と比較してかなり低かった。

D. 考察

現行の日本薬局方(第 15 改正第二追補まで)に記載されている処方を中心として、国内主要生薬・漢方メーカー 5 社の生薬を用い、17 処方及びそれらを構成する 37 種類の生薬の凍結乾燥エキスを独立に 3 回ずつ調製し、エキス収量を測定した。

生薬の凍結乾燥エキスにおいて(表 2)、3 回の試行における変動係数(Cv)は概ね 10 以下であり、天然物としては良く収束しているものと思われたが、精油含量の高い生薬(ショウキョウ、ソヨウ)、エキスの絶対量が小さい生薬(チョレイ、ブクリョウ)あるいは粘液質や油分の多い生薬(シャゼンシ、タイソウ、トウニン)においては、試行間変動係数が 10 を大きく上回るケースも見受けられた。ここでのバラツキは主に技術的な問題と考えられるが、エキス調製に際してこれらの性質を持つ生薬の扱いには特別な配慮が必要と思われる。また、メーカー間の変動係数は概ね 10 前後を示し、産地、天候、収穫時期、野生品と栽培品の違い等の不安定要素を有する天然物としては奇跡的に低い値と思われたが、中には 20 を上回る生薬も見受けられた。これらは、会社間相対値を見れば明らかなように、たいてい特定の 1 つのメーカーの生薬のエキス収量が突出していることによる値上昇であった。例えば、最も大きい 44.48 という変動係数を示したサイコでは、相対値 187.59% の E 社製サイコに引っ張られたものと思われる。この他に、20 を超える Cv を示した

生薬とそれを牽引するメーカーの相対値は以下の通りである;サイシン(Cv28.78、C社 148.64%)、ショウキョウ(Cv26.53、C社 54.64%)、ソヨウ(Cv21.78、E社 140.68%)、ニンジン(Cv26.73、C社 54.37%)、ハンゲ(Cv27.12、B社 146.43%)、ブクリョウ(Cv27.96、A社 130.29%、B社 135.18%、C社 63.52%)。ただし、ブシは 3 社のみの扱いであり、しかもブシ 1 と、A 社及び B 社はブシ 1 を、D 社はブシ 2 を扱っており、これらは修治の方法が明らかに異なる製品の組み合わせであるため、例外として扱うべきと思われた。

一方、処方の凍結乾燥エキスでは(表 3)、生薬と比較して試行間変動係数は極めて小さく、ほとんど 2 以下であり、会社間の変動係数もほとんど 5 前後までに収まっていた。柴胡桂枝湯、柴苓湯、小柴胡湯及び半夏厚朴湯は 10 を上回る会社間変動係数を示したが、このうち前半 3 処方は、配合生薬としてサイコを共通で含み、それぞれ 22.5g 中の 5g、46.5g 中の 7g、24g 中の 7g とサイコの配合割合が高いため、今回扱った生薬中で最大のメーカー間変動係数を持つサイコの影響を受けたものと思われた。半夏厚朴湯については、メーカー間変動係数が比較的大きい生薬として上に挙げたショウキョウ、ソヨウ、ハンゲ及びブクリョウを配合しているため、これらのバラツキの影響を複合的に受けたものと思われた。

ところで、特徴ある生薬を仕入れることはメーカーのアイデンティティの 1 つであり、メーカー間の Cv が大きくても一概に悪いこととは言えない。本研究にて使用した生薬はすべて局方規格品であり、指標成分の含量としては局方規格の範囲、そして、おそらくそれよりも狭く厳しいものと推測される各メーカーの自社規格の範囲に収められた製品と考えられる。しかし、これらの品質保証に用いる二次代謝成分がその生薬の有効性・安全性を正しく反映しているわけではなく、糖質、タンパク質、脂質、核酸等の一次代謝産物も生薬の薬効に寄与している可能性が高いと考えられたため、その重量のほとんどを一次代謝産物が占め