

分担研究課題 生薬及び漢方処方剤の安全性と有効性に関する研究
研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官
協力研究者 堀井周文 クラシエ製薬（株）漢方研究所

葛根湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究

研究要旨 昨年度の厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書において、漢方処方剤として、葛根湯を選択しマオウ成分であるエフェドリン及びプソイドエフェドリンの血漿中濃度推移を検討したことを報告した。本研究では、引き続き、葛根湯構成生薬のうち、カッコンのプエラリン、ダイゼイン、カンゾウのリクイチン、シャクヤクのペオニフロリンについて血漿中濃度推移を比較し、製剤と湯剤の同等性の評価についての検討を行った。その結果、プエラリンは、葛根湯のエキス製剤と湯剤の同等性を評価する際の指標成分として取り扱うことができる可能性があるものと考えられた。一方、ダイゼイン、リクイリチンやペオニフロリンは今回の試験ではばらつきが大きく、これらを同等性評価の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の有効性及び安全性に関する面での品質を担保するもののひとつである。漢方処方剤に関しては、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤 GMP」²⁾等の通知に基づき製造管理、品質管理の充実が図られてきた。しかしながら、漢方処方剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。漢方処方剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。従って、より現実的に、どのように同等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方剤において、指標となる成分を選択し、漢方処方剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。

本研究において、第十五改正日本薬局方にエキスとして収載された漢方処方の一つである葛根

湯（構成生薬はカッコン、タイソウ、マオウ、カンゾウ、ケイヒ、シャクヤク及びショウキョウの7種類）について、その指標成分で、マオウに含まれているエフェドリン及びプソイドエフェドリンの血漿中濃度推移を、製剤と湯剤で比較し、同等性の評価についての検討を行ってきた。今回、葛根湯構成生薬のうち、カッコンのプエラリン、ダイゼイン、カンゾウのリクイリチン、シャクヤクのペオニフロリンについて血漿中濃度推移を比較し、製剤と湯剤の同等性の評価についての検討を行うこととした。

B. 研究方法

被験者総数は6とし、無作為に2グループとした。これらについて、葛根湯の湯剤及びエキス製剤のクロスオーバー試験を行った。すなわち、各グループに葛根湯の湯剤またはエキス製剤を投与後、2週間おいて湯剤をそれぞれ投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤のグループは

湯剤をそれぞれ投与した。いずれの場合においても投与後、経時的に採血を行い、それを分析に供した。

倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省の「臨床試験に関する倫理方針」³⁾に従い、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会での審査を受けて実施した。

湯剤の調製法

土瓶にカッコン 8 g, マオウ 4 g, タイソウ 4 g, ケイヒ 3 g, シャクヤク 3 g, カンゾウ 2g 及び ショウキョウ 1 g と水 500 mL を加え、加熱抽出し、ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過し、湯剤を得た。

試薬・試液

プエラリン、ペオニフロリンは和光純薬工業株式会社製を、ダイゼインはフナコシ株式会社製を、リクイチンは和光純薬工業株式会社製を、ヒト血漿はコージンバイオ製を、メタノールは関東化学株式会社製または純正化学株式会社製の高速液体クロマト用を、アセトリルは関東化学株式会社製または純正化学株式会社製の高速液体クロマト用を、水は Milli-Q (日本ミリポア製) により精製されたものを用いた。その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

分析方法

検量線の作成

プエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリン各 1 mg を精密に取り、移動相組成溶媒 (0.1% 酢酸添加 50% アセトニトリル) に溶解し、精確に 100 mL とした。これを標準原液とし、段階希釈し、検量線を作成した。

添加回収実験

標準原液を 1000 倍希釈 (10 ng/mL) したものを標準溶液とした。

別にプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリン各 1 mg を精確に取り、50% メタノールに溶解し、精確に 100 mL とした。これを 1000 倍希釈 (10 ng/mL) したものを添加溶液

とした。

ブランク血漿 0.5 mL に添加溶液 0.5 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、試料調製に従い、試験溶液とした。

試料調製⁴⁾

血漿 0.5 mL にメタノール 5 mL を加え、30 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した後、遠心分離 (トミー精工製 LC 122 型遠心分離機, 3400 rpm, 10 min) し、上澄み液を採取した。残渣にメタノール 5 mL を加え、同様に操作し、上澄みを採取した。残渣はさらに同様に操作し、これらの上澄みをあわせ、エバポレーターで濃縮した。残渣に移動相組成溶媒 0.5 mL を加えて溶かし、試料溶液とした。

分析条件^{5~7)}

<HPLC 条件>

移動相: A: 0.1% 酢酸アセトニトリル
溶液, B: 0.1% 酢酸溶液

A: 5% → 70% 直線グラジエント
(0 min - 60 min)

カラム: YMC-Pack Pro C 18 (2.0 × 150 mm, 5 μm)

流速: 0.2 mL/min

カラム温度: 20 °C

<MS 条件>

プローブ: ESI

分析モード: SIM (ネガティブ)

測定質量数: プエラリン (m/z 415)

ダイゼイン (m/z 253)

リクイリチン (m/z 417)

ペオニフロリン (m/z 539)

ガス流量: 1.5 L/min

CDL 温度: 200 °C

ブロック温度: 200 °C

検出器電圧: 2 kV

プローブ電圧: -3.5 kV

CDL 電圧: 0 V

Q-array 電圧(DC 1, 2, 3): 0 / -15 / -20

Q-array 電圧(RF): 150

半値幅: 0.8 u

Drying Gas: 0.05 MPa

C. 研究結果

検量線の直線性と添加回収試験

プエラリン, リクイリチン及びペオニフロリンは 1 ~ 1000 ng/mL の範囲で相関係数がそれぞれ $R^2=0.9998$, $R^2=1.000$ 及び $R^2=0.9999$ と良好な直線性を示した。また, ダイゼインは 0.1 ~ 1000 ng/mL の範囲で相関係数が $R^2=1.000$ と良好な直線性を示した。

プエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの添加回収率はそれぞれ 107%, 85%, 90% 及び 99% であり, それぞれ良好な回収率が得られた。

プエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの血漿中濃度推移

それぞれの血漿中濃度は, エキス製剤中含量を湯剤中含量に等しいものとして補正をかけた値で示した。また, 最高血漿中濃度 (C_{max}) や血漿中濃度曲線下面積 (AUC) は, それらの値を用いて算出した。

図 1~4 に葛根湯エキス製剤及び湯剤投与後のプエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの血漿中濃度推移を示した。各成分とも, 採血点によっては, 血漿中濃度に被験者間でのばらつきが認められた。プエラリンに関しては, 投与後 30 分の血漿中濃度に薬剤間で有意な差 ($p<0.05$) が認められた。これらの血漿濃度推移から求めたそれぞれの最高血漿中濃度到達時間 (T_{max}), C_{max} 及び AUC を表 1 に示した。プエラリンの C_{max} はエキス製剤で 28.1 ng/mL, 湯剤で 27.7 ng/mL であった。また, AUC はエキス製剤で 79 ng·hr/mL, 湯剤で 74 ng·hr/mL であった。ダイゼインの C_{max} はエキス製剤で 7.3 ng/mL, 湯剤で 7.0 ng/mL であった。また,

AUC はエキス製剤で 14 ng·hr/mL, 湯剤で 13 ng·hr/mL であった。リクイリチンの C_{max} はエキス製剤で 14.1 g/mL, 湯剤で 6.9 ng/mL であった。また, AUC はエキス製剤で 32 ng·hr/mL, 湯剤で 15 ng·hr/mL であった。ペオニフロリンの C_{max} はエキス製剤で 5.3 ng/mL, 湯剤で 9.7 ng/mL であった。また, AUC はエキス製剤で 10 ng·hr/mL, 湯剤で 13 ng·hr/mL であった。プエラリンの C_{max} 値以外は, 被験者間でのばらつきが大きい傾向が認められた。表 2~5 に, プエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの C_{max} 及び AUC の分散分析表を示した。プエラリンの AUC 及びダイゼインの C_{max} の被験者の項で有意 ($p<0.05$) であった。

D. 考察 8-12)

葛根湯のエキス製剤及び湯剤を投与後, 血漿中のプエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの濃度を経時的に測定し, 生物学的同等性の指標である T_{max} , C_{max} 及び AUC を算出した。プエラリンの AUC 及びダイゼインの C_{max} で被験者の項が有意であり, 個体差が認められたが, それ以外は, 薬剤, 時期及び被験者のいずれの項においても有意差は認められなかった。プエラリン, ダイゼイン, リクイリチン及びペオニフロリンの C_{max} 及び AUC に関して, 一部につき個体差は認められるものの, 統計的には, エキス製剤と湯剤の間に差は検出されなかったことから, 検出力 $1-\beta$ の算出を行った。その結果, プエラリンでは, C_{max} で 53% 程度, AUC で 33% 程度であった。ダイゼインでは, C_{max} , AUC とともに 20% 以下, またリクイリチン及びペオニフロリンの C_{max} 及び AUC は, いずれも 10% 以下であった。検出力をあげるために, 被験者を増やしても同様のデータが得られると仮定して計算を行ったところ, プエラリンでは被験者数を 1 群 8 以上で十分な検出力が得られると考えられた。一方, ダイゼインでは, 1 群 16 以

上必要であり、リクイリチン及びペオニフロリンでは1群 61でも十分な検出力が得られないことが判明した。

今回、分析対象としたプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリンはそれぞれイソフラボン C-配糖体、イソフラボン (アグリコン)、フラバノン O-配糖体及びモノテルペン配糖体であり、消化管からの吸収¹³⁾には、グルコーストランスポーターを解する機構や、腸内細菌による代謝¹⁴⁾があるなど複雑であり、特に後者に関しては、腸内細菌叢の個体差が知られている。これらの要因により、被験者間で測定値にばらつきが生じ、今回の結果になったものと推定された。また、ダイゼインは、プエラリンやダイゼインが腸内細菌により代謝されることでも生じる¹⁵⁾が、ダイゼインの血漿中濃度の4時間値の上昇は、それによるものと推察した。

これらの事を考慮すると、今回検討した葛根湯成分のプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリンのうち、プエラリンについては、同等性を評価する際の指標成分にできる可能性が高いものと考えられた。一方、ダイゼイン、リクイリチンやペオニフロリンは今回の試験ではばらつきが大きく、代謝の問題もあり、これらを同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。しかしながら、リクイリチンやペオニフロリンは、カンゾウ及びシヤクヤクの代表的な成分であり、多くの処方に配合される生薬であることから、他の成分と合わせて、その可能性について今後も検討を行っていく必要があると考えられる。

本研究によれば、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリンは4時間以降に最高血漿中濃度に達する可能性が考えられた。従って、これらの化合物について、今後検討する場合には、採血を4時間以降に設定し、漢方処方製剤の血漿中濃度推移を把握する必要があると考えられる。

E. 結論

葛根湯構成生薬のうち、カッコンのプエラリン、ダイゼイン、カンゾウのリクイチン、シヤクヤクのペオニフロリンについて血漿中濃度推移を比較し、製剤と湯剤の同等性の評価について基礎的検討を行った。その結果、プエラリンは、葛根湯のエキス製剤と湯剤の同等性を評価する際の指標成分として取り扱うことができる可能性があるものと考えられた。

参考文献

- 1) 薬審二第120号, 1985年5月31日付
- 2) 薬監第72号, 1987年8月5日付
- 3) 医政発第128001号, 2004年12月28日付
- 4) Ozaki, Y., Noguchi, M., Kamakura, H., Harada, M.: Studies on concentration of glycyrrhizin in plasma and its absorption after oral administration of licorice extract and glycyrrhizin., *Yakugaku Zasshi*, **110**, 77-81 (1990)
- 5) Cheng, S., Qiu, F., Wang, S., He, J.: HPLC Analysis and Pharmacokinetic Study of Paeoniflorin after Intravenous Administration of a New Frozen Dry Powder Formulation in Rats, *Chromatographia*, **64**, 661-666 (2006)
- 6) Ma, Z., Wu, Q., Lee, D. Y. W., Tracy, M., Lukas, S. E.: Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography, *J Chromatogr. B*, **823**, 108-114 (2005)
- 7) Yagi, T., Yamauchi, K.: Effects of Daio-kanzo-to(Da-Huang-Gan-Cao-Tang) on colonic circular muscle motility in conscious rat: Role of glycyrrhiza in the prescription., *J. Trad. Med.* **18**, 191-196 (2001)
- 8) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドラインについて, 医薬審第487号, 1997年12月22日付

- 9) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUHHIN KENKYU*, **13**, 1106 - 1119 (1982)
- 10) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説 -統計解析 その2-, *IYAKUHHIN KENKYU*, **13**, 1267 - 1271 (1982)
- 11) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説 -統計解析 その3-, *IYAKUHHIN KENKYU*, **15**, 123 - 133 (1984)
- 12) 簡約統計数値表 (統計数値表編集委員会編), 日本規格協会, 東京 (1977)
- 13) 第4章ポリフェノールの体内吸収と動態, pp 38~48, 植物ポリフェノール含有素材の開発, 吉田隆志・有井雅幸監修, シーエムシー出版, 東京 (2007)
- 14) Hattori, M., Shu, Y.-Z., Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kobayashi, K., Xu, G.-J., Namba, T.: Metabolism of Paeoniflorin and Related Compounds by Human Intestinal Bacteria, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3838-3846 (1985)
- 15) Jin, J.-S., Nishihata, T., Kakiuchi, N., Hattori, M.: Biotransformation of C-Glucosylisoflavone Puerarin to E-strogenic (3S)-Equol in Co-culture of Two Human Intestinal Bacteria., *Biol Pharm Bull*, **31**, 1621-1625 (2008)

F. 健康危機情報

なし.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし.

2. 学会発表等

なし.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

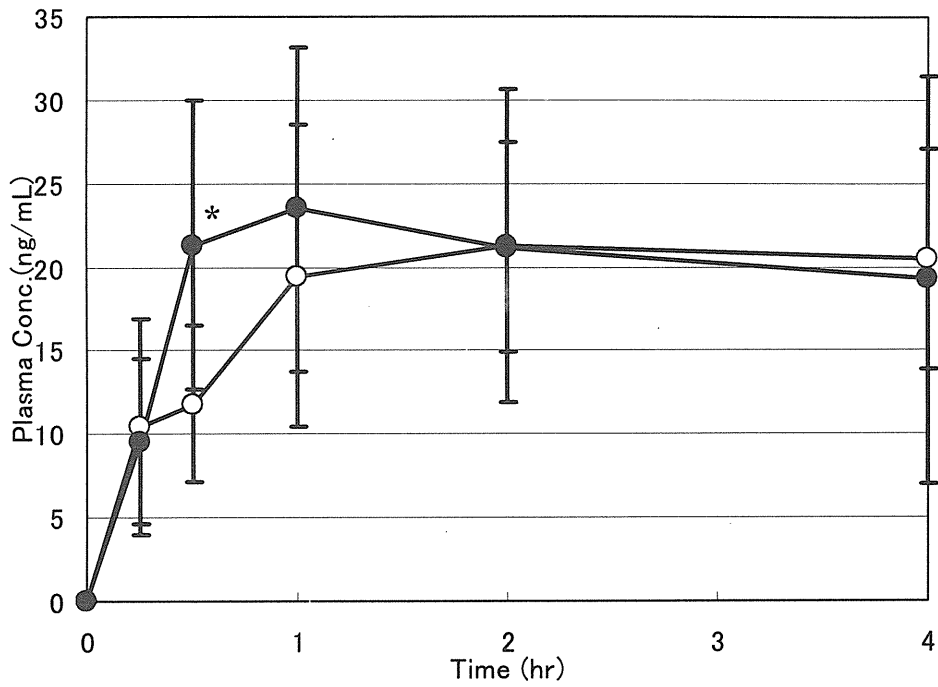


図 1 プエラリンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6),
 ● : エキス製剤, ○ : 湯剤,
 * P < 0.05

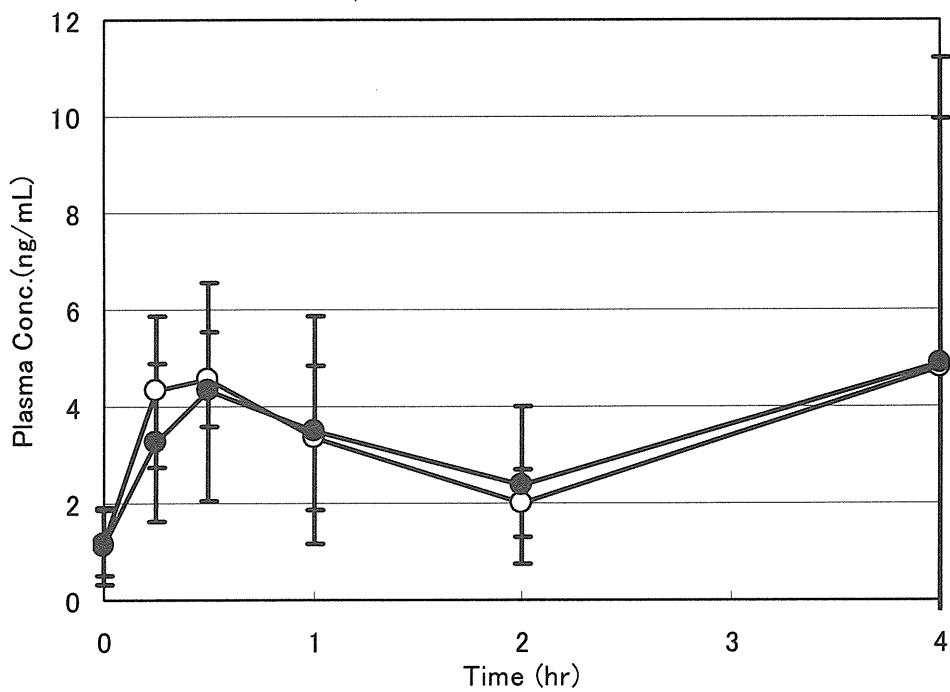


図 2 ダイゼインの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6),
 ● : エキス製剤, ○ : 湯剤

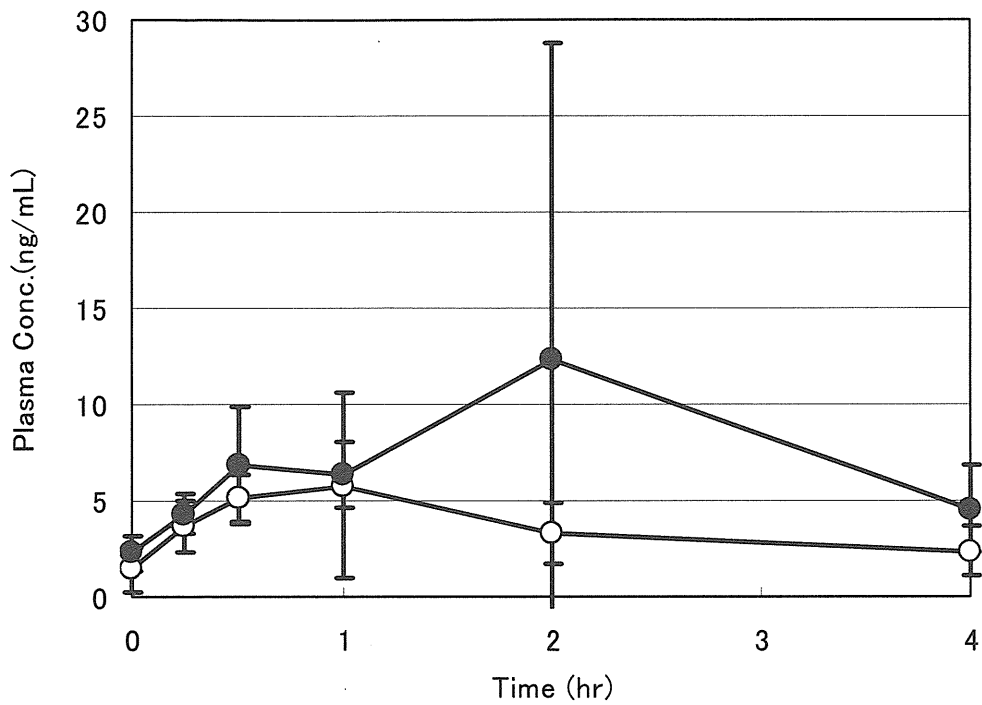


図 3 リクイリチンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6),
● : エキス製剤, ○ : 湯剤

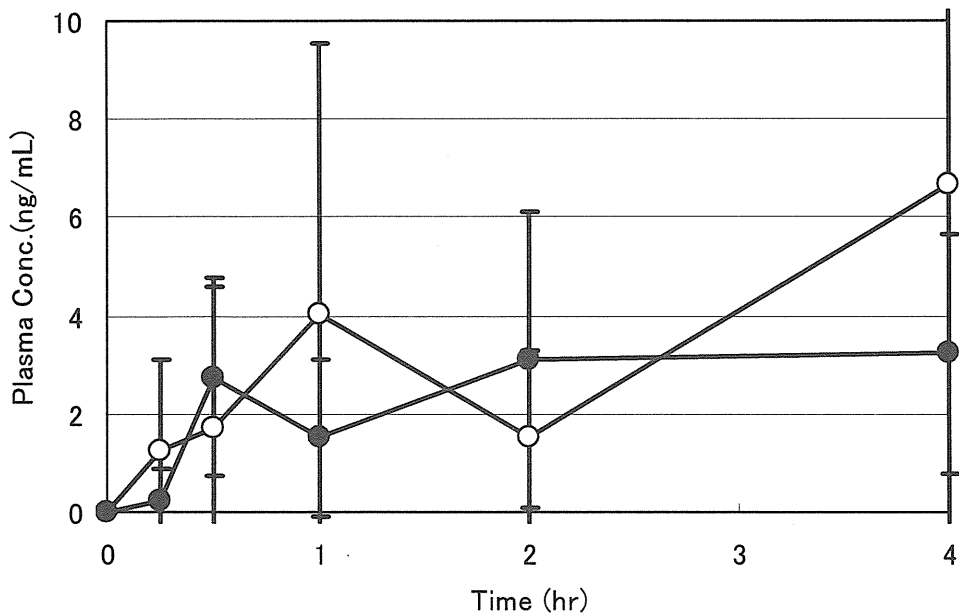


図 4 ペオニフロリンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6),
● : エキス製剤, ○ : 湯剤

Table 1 湯剤, エキス製剤投与時の指標4化合物のTmax, Cmax と AUC

	1日量 換算濃度 (mg/day)		Tmax (hr)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng·hr/mL)
プエラリン	130	湯剤	2	27.7±4.7	74±18
		エキス製剤	1	28.1±7.7	79±27
ダイゼイン	6.05	湯剤	4	7.0±3.6	13±4.7
		エキス製剤	4	7.3±5.2	14±7.3
リクイリチン	211	湯剤	1	6.9±4.0	15±4.3
		エキス製剤	2	14.1±15.7	32±24
ペオニフロリン	62.0	湯剤	4	9.7±11.5	13±15
		エキス製剤	4	5.3±2.0	10±4.5

プエラリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	72.1	1	72.1	0.798	7.71
	時期	4.34	1	4.34	0.048	7.71
AUC	被験者	4713	5	943	10.4	6.26
	合計	5151	11	468		
	残差	361	4	90.3		
	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	4.56	1	4.56	0.187	7.71
	時期	0.05	1	0.05	0.00219	7.71
Cmax	被験者	333	5	66.6	2.73	6.26
	合計	435	11	39.6		
	残差	97.6	4	24.4		

ダイゼインの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	0.46	1	0.46	0.0373	7.71
	時期	4.37	1	4.37	0.357	7.71
AUC	被験者	321	5	64.2	5.24	6.26
	合計	375	11	34.1		
	残差	48.9	4	12.2		
	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	0.27	1	0.27	0.0718	7.71
	時期	0.21	1	0.21	0.0567	7.71
Cmax	被験者	180	5	36.1	9.59	6.26
	合計	196	11	17.8		
	残差	15.1	4	3.76		

リクイリチンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	872	1	872	2.56	7.71
	時期	473	1	473	1.39	7.71
AUC	被験者	1234	5	247	0.724	6.26
	合計	3942	11	358		
	残差	1364	4	341		
	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	156	1	156	1.08	7.71
	時期	227	1	227	1.58	7.71
Cmax	被験者	516	5	103	0.718	6.26
	合計	1474	11	134		
	残差	575	4	144		

ペオニフロリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	23.8	1	23.8	0.279	7.71
	時期	222	1	222	2.61	7.71
AUC	被験者	634	5	127	1.49	6.26
	合計	1221	11	111		
	残差	341	4	85.2		
	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
	製剤	56.3	1	56.3	1.47	7.71
	時期	161	1	161	4.21	7.71
Cmax	被験者	362	5	72.4	1.89	6.26
	合計	733	11	66.7		
	残差	153	4	38.4		

分担研究課題 生薬及び漢方処方安全性と有効性に関する研究
研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官
協力研究者 堀井周文 クラシエ製薬（株）漢方研究所

小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究

研究要旨 生物学的同等性は、医薬品の有効性・安全性を確保する品質保証のための概念の一つである。しかしながら、漢方処方製剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。漢方処方製剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。従って、より現実的に、どのように同等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方製剤において、指標となる成分を選択し、漢方処方製剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。今回は、第十六改正日本薬局方に収載された漢方処方エキスの一つである小青竜湯について検討を行った。処方構成生薬の一つであるマオウの指標成分であるエフェドリン（E）及びプソイドエフェドリン（PE）を分析対象とし、小青竜湯湯剤と、それと同じ生薬を使用して作られた医療用小青竜湯エキス製剤について、それぞれ投与した時の血漿中濃度推移を検討し、湯剤と製剤の同等性について評価を行った。その結果、これらの化合物が同等性の判断の指標化合物となる可能性が示唆された。今後更に、他の成分についても検討を行い、知見を集積していく必要があると考えられた。

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の有効性・安全性を確保する品質保証のための概念の一つである。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤 GMP」²⁾等の通知に基づき製造管理、品質管理の充実が図られてきた。しかしながら、漢方処方製剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。漢方処方製剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。従って、より現実的に、どのように同

等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方製剤において、指標となる成分を選択し、漢方処方製剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。

我々はこれまでに日本薬局方収載品目である桂枝茯苓丸³⁾、葛根湯⁴⁾についてヒト投与試験を行い、同等性を評価するための基礎的検討を行ってきた。今回は、第十六改正日本薬局方に収載された漢方処方エキスの一つである小青竜湯について検討を行った。処方構成生薬はマオウ、シャクヤク、カンキョウ、カンゾウ、ケイヒ、サイシン、ゴミシ及びハンゲの 8 種類である。そこで、構成生薬の一

つであるマオウの指標成分であるエフェドリン (E) 及びプソイドエフェドリン (PE) を分析対象成分として、小青竜湯湯剤と、それと同じ生薬を使用して作られた医療用小青竜湯エキス製剤について、それぞれをヒトに投与した時の血漿中濃度推移を検討し、湯剤と製剤の同等性について評価を行った。

B. 研究方法

被験者総数は 6 とし、無作為に 2 グループとした。これらについて、小青竜湯の湯剤及びエキス製剤に関し、クロスオーバー試験を行った。すなわち、各グループに小青竜湯の湯剤またはエキス製剤を投与後、2 週間おいて湯剤をそれぞれ投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤のグループは湯剤をそれぞれ投与した。いずれの場合においても投与後、経時的に採血を行い、それを分析に供した。

倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省の「臨床試験に関する倫理方針」⁵⁾ に従い、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会での審査を受けて実施した。

湯剤の調製法

土瓶にマオウ 3 g、シャクヤク 3 g、カンキョウ 3 g、カンゾウ 3 g、ケイヒ 3 g、サイシン 3 g、ゴミシ 3 g 及びハンゲ 6 g と水 540 mL を加え、加熱抽出し、ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過し、湯剤を得た。

試薬・試液

E 塩酸塩は第一ファインケミカル製を、PE 塩酸塩はアルプス薬品工業株式会社製をそれぞれ用いた。また、E・d3 塩酸塩及び PE・d3 塩酸塩は合成したものを⁶⁾⁷⁾用いた。ヒト血漿はコージンバイオ社製を、N-ヘプタフルオロ

イミダゾール (HFBI) はサーモフィッシャーサイエンティフィック社製または東京化成社製を、ヘキサン及び酢酸エチルは関東化学社製 5000 倍濃縮検定品をそれぞれ用いた。水は Milli-Q (日本ミリポア社製) により精製されたものを⁸⁾用いた。そのほかの試薬は全て試薬特級品を用いた。

分析方法^{6,7)}

内標準液の調製

E・d3 塩酸塩 3 mg を精密に量り取り、水で溶解し、精確に 100 mL とし、E・d3 原液とした。同様にして、PE・d3 原液を調製した。次に、E・d3 原液及び PE・d3 原液各々 1 mL を精確に量り取り、その混液を水で精確に 100 mL とし、内標準液とした。

検量線の作成

E 塩酸塩 3 mg を精密に量り取り、水で溶解し、精確に 100 mL とし、E 原液とした。同様にして、PE 原液を調製した。これら E 原液、PE 原液及び内標準液を用い適宜濃度調製した水で、試料調製と同様の操作を行い、検量線を作成した。

添加回収試験

血漿に、E 原液、PE 原液及び内標準液を用い 25 ng/mL 及び 250 ng/mL に調製した水を添加し、試料調製と同様の操作を行い、回収率を調べた。

試料調製

採取した血漿サンプル 1 mL に 5 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 50 µL 及び内標準液 1 mL を加え攪拌混和し、均一な溶液とした。これに抽出溶媒 (ヘキサン及び酢酸エチルの 9 : 1 混液) 5 mL を加え、振とう機 (IWAKI サイテック製 KM・SHAKER モデル V・SN) で振とう後、遠心分離 (トミー精工製 LC 122

型遠心分離機, 2300 rpm, 5 min) した. この操作を 2 回行い, 有機層をあわせ, HFBI 100 μ L を加え, 水浴で 50°C, 15 min 加温した. 反応後, 0.1 mol/L 塩酸 4 mL を加えボルテックスミキサーで 30 s 攪拌した後, 遠心分離した. 得られた有機層を少量の無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, 減圧下 (40°C, 200 mmHg) で濃縮した. これに抽出溶媒 200 μ L を加え試料溶液とした.

分析条件

装置に GCMS・QP 2010 ガスクロマトグラフィ質量分析計 (島津製作所製) を用い, SIM 法により分析を行った.

測定質量荷電比: E 及び PE (m/z 254), E-d3 及び PE-d3 (m/z 257)

イオン源: EI

カラム: DB-1701 (J&W サイエンティフィック社製), 内径 0.32 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m

カラム温度: 70°C (3.5 min 保持後 40°C /min で昇温) \rightarrow 200°C (9.75 min 保持)

温度: 試料注入口 200°C, イオン源 230°C, インターフェース 260°C

キャリアガス: He

カラムガス流量: 64.6 cm/s

ページ流量: 3.0 mL/min

注入方法: スプリットレス

注入量: 1 μ L

C. 研究結果

検量線の直線性と添加回収試験

E, PE, E-d3 及び PE-d3 は 1.25~250 ng/mL の範囲で相関係数がそれぞれ $R^2 = 1.0000$, $R^2 = 0.9999$, $R^2 = 0.9997$ 及び $R^2 = 0.9999$ と良好な直線性を示した. は E で 1.0000, PE で 0.9999, E-d3 で 0.9997, PE-d3 で 0.9999 を示した.

添加回収率は 25 ng/mL 及び 250 ng/mL 各

濃度で E が 96 % 及び 95 %, PE が 87 % 及び 94 % であり, 良好な回収率であった.

ヒト血漿中の E 及び PE の濃度推移

湯剤及びエキス製剤投与後の Ephedrine (E) 及び Pseudoephedrine (PE) の血漿中濃度推移を 図 1 及び 図 2 にそれぞれ示した. 製剤間での各時間における E 及び PE の濃度に有意な差は認められず, 同様の濃度推移を示した. 表 1 にそれぞれの Tmax, Cmax 及び AUC を示した. E に関して, Cmax は, 湯剤 41.6 ng/mL, エキス製剤 42.9 ng/mL であった. また, AUC は, 湯剤 256 ng \cdot hr/mL, エキス製剤 252 ng \cdot hr/mL であった. PE に関して, Cmax は, 湯剤 18.7 ng/mL, エキス製剤 19.8 ng/mL であった. また, AUC は, 湯剤 110 ng \cdot hr/mL, エキス製剤 115 ng \cdot hr/mL であった. 製剤間で E 及び PE の Cmax と AUC に有意な差は認められなかった.

なお, 湯剤及びエキス製剤中の一日服用量あたりの含量は, E は, 湯剤 11.6 mg/day, エキス製剤 11.1 mg/day であり PE は, 湯剤で 5.1 mg/day, エキス製剤 5.2 mg/day であった.

D. 考察 8~12)

今回, E 及び PE の血漿中濃度, Cmax 及び AUC に製剤間で有意な差は認められなかった. E 及び PE の Cmax 及び AUC についての分散分析の結果を表 2 及び表 3 に示した. 投与製剤, 投与時期及び被験者いずれの変動要因についても有意差は認められなかった. そこで, 本試験の検出力 $1-\beta$ を求め, 十分な検出力があるかを検討した. その結果, E の AUC で 88 %, Cmax で 62 %, PE の AUC で 68 %, Cmax で 48 % であり, E の AUC で 80 % を超えるものの, 検出力は不十分であることが判明した. 検出

力をあげるために、被験者を増やしても同様のデータが得られると仮定して計算を行ったところ、被験者数5以上で十分な検出力が得られると考えられた。今回、局方で規定された指標成分である E 及び PE の血漿中濃度を測定し、漢方処方同等性についての検討を行った。その結果、これらの化合物が同等性の判断の指標化合物となる可能性が示唆された。更に、他の成分についても検討を行い、知見を集積していく必要があると考えられた。

E. 結論

小青竜湯のエキス製剤及び湯剤について、局方で規定された指標成分である E 及び PE の血漿中濃度を測定し、漢方処方同等性についての検討を行った。その結果、これらの化合物が同等性の判断の指標化合物となる可能性が示唆された。更に、他の成分についても検討を行い、知見を集積していく必要があると考えられた。

文献等

- 1) 薬審二第 120 号, 1985 年 5 月 31 日
- 2) 薬監第 72 号, 1987 年 8 月 5 日付
- 3) 第27回和漢医薬学会学術大会要旨集, p.88 (2010)
- 4) 第28回和漢医薬学会学術大会要旨集, p.60 (2011)
- 5) 臨床研究に関する倫理方針, 医政発第 128001号, 1997年12月28日付
- 6) Nakano, M., Morimoto, Y., Tajima, S., Kosaka, N.: GC - MS determination of *l* - ephedrine and *d* - pseudoephedrine in human plasma, *Yakugaku Zasshi*, **120**, 583 - 586 (2000).
- 7) 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイド

ラインについて、医薬審第487号, 1997年12月22日付

- 8) Yamamoto, K.: GC / MS determination of ephedrine related compounds in the human plasma after oral administration of the traditional Chinese drug containing mahuang, *Medicine and Biology*, **111**, 157 - 160 (1985).
- 9) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUJIN KENKYU*, **13**, 1106 - 1119 (1982).
- 10) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説 一統計解析 その2一, *IYAKUJIN KENKYU*, **13**, 1267 - 1271 (1982).
- 11) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説 一統計解析 その3一, *IYAKUJIN KENKYU*, **15**, 123 - 133 (1984).
- 12) 簡約統計数値表 (統計数値表編集委員会編), 日本規格協会, 東京 (1977).

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表等

堀井周文, 小此木明, 大窪敏樹, 鎌倉浩之, 合田幸広: 小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究, 日本薬学会第132年会 (札幌), 2012. 3

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

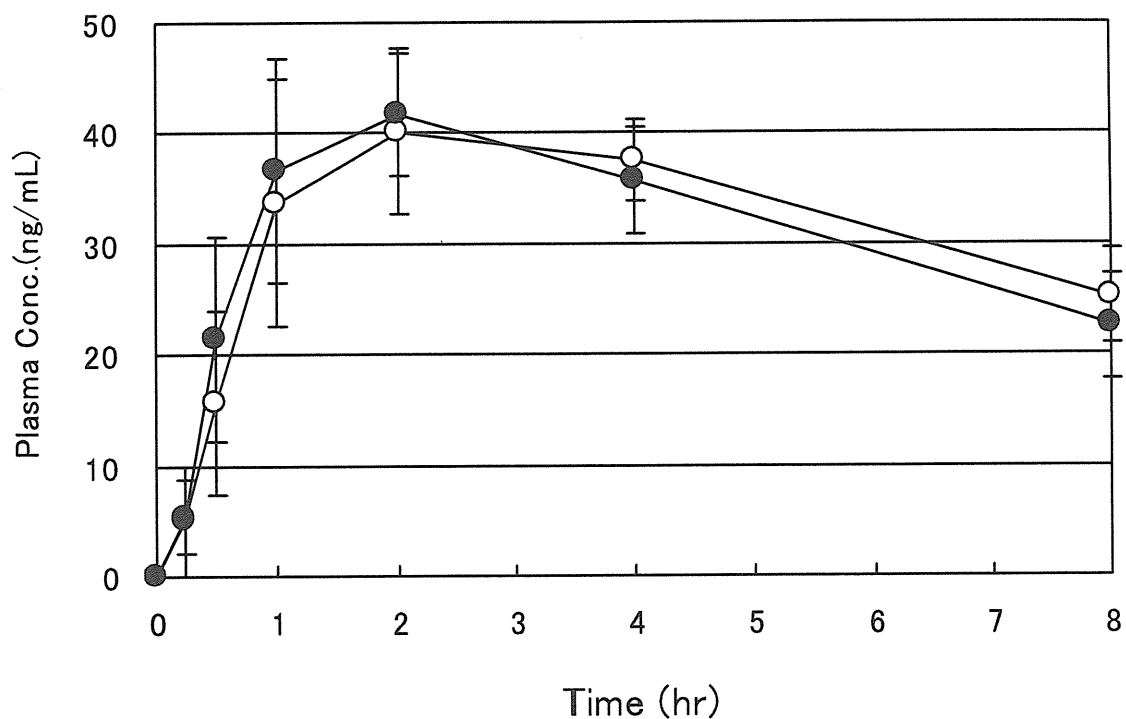


図1 Ephedrine の血漿中濃度推移 (mean \pm SD, n = 6),
 ● : エキス製剤, ○ : 湯剤

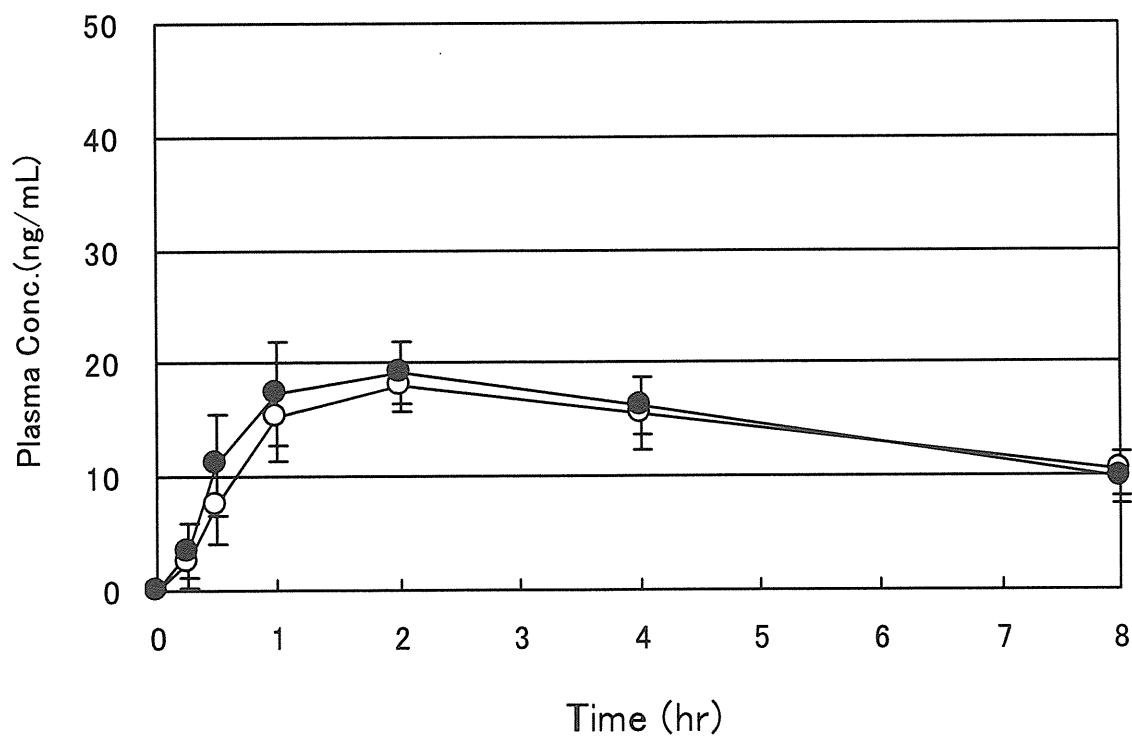


図2 Pseudoephedrine の血漿中濃度推移 (mean \pm SD, n = 6),
 ● : エキス製剤, ○ : 湯剤

表1 湯剤またはエキス製剤投与時の Ephedrine (E) 及び
Pseudoephedrine (PE) の Tmax, Cmax 及び AUC *)

		Tmax (hr)	Cmax (ng/mL)	AUC (ng·hr/mL)
E	湯剤	2	41.6 ± 6.1	256 ± 34.9
	エキス製剤	2	42.9 ± 5.9	252 ± 33.4
PE	湯剤	2	18.7 ± 2.2	110 ± 15.5
	エキス製剤	2	19.8 ± 3.1	115 ± 16.4

*) Tmax: 最高血漿中濃度時間, Cmax: 最高血漿中濃度, AUC: 血漿中濃度曲線下面積.
値は, 平均値±標準偏差 (n=6).

表2 E の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
AUC	製剤	48.75	1	48.75	0.0992	7.71
	時期	54.24	1	54.24	0.1104	7.71
	被験者	9640	5	1928	3.923	6.26
	合計	11709	11	1064		
	残差	1966	4	492		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
Cmax	製剤	4.94	1	4.94	0.2161	7.71
	時期	35.71	1	35.71	1.562	7.71
	被験者	233.3	5	46.66	2.041	6.26
	合計	365.4	11	33.22		
	残差	91.44	4	22.86		

表 3 PE の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
AUC	製剤	86.27	1	86.27	0.6351	7.71
	時期	111.0	1	111.0	0.8173	7.71
	被験者	1895	5	379.1	2.791	6.26
	合計	2636	11	239.6		
	残差	543.3	4	135.8		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	分散比	5% 限界値
Cmax	製剤	3.52	1	3.52	0.541	7.71
	時期	8.50	1	8.50	1.31	7.71
	被験者	35.7	5	7.14	1.10	6.26
	合計	73.7	11	6.70		
	残差	26.0	4	6.51		

分担研究課題 生薬及び漢方処方の安全性と有効性に関する研究
研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部長

研究協力者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官
協力研究者 堀井周文 クラシエ製薬（株）漢方研究所

生薬の切度と湯剤の指標成分量に関する研究

研究要旨 湯剤の指標成分量に対する湯剤の調製に使用する生薬の切度の影響について検討を行った。同一ロットのシャクヤクを粗切及び細切に切り分け、漢方処方を調製し、湯液中の指標成分ペオニフロリン含量測定を行った。その結果、細切した場合と比較して、粗切した場合では、エキス中の1日量のペオニフロリン含量が90%程度しかないことが判明し、生薬の切度が、湯剤中の指標成分の量に影響を及ぼすことが明らかとなった。

A. 研究目的

薬審2第120号通知「医療用漢方エキス製剤の取扱いについて(昭和60年5月31日)」によれば、(標準)湯剤の調製方法は、「各処方毎に設定することを原則とするが、概ね、全生薬量の20倍の水を加え、30分以上加熱抽出し、ろ過したとき、加えた水量の半量のろ液を得る方法によることが妥当」とされている。また、エキス及び最終製品の1日量分中指標成分については、湯剤1日量分中の指標成分における下限値の70%以上に設定することが望ましいとされている^{1,2)}。これらの規格においては、生薬量と、抽出水量、抽出時間、最終ろ液量等が記載され、指標成分量のコントロールも指示されている。他方、湯剤の調製の際重要と考えられる生薬の切度と加熱条件については規定されていない。本研究では、湯剤の調製に使用する生薬の切度と、湯剤調製方法が、指標成分量にどのように影響を与えるか若干の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

漢方処方として第十六改正日本薬局方にエキスとして収載される漢方処方のひとつである葛根湯エキスを選択し、その構成生薬のうち、シャクヤクのみの切度を変えて湯剤を調製した後、指標成分としたペオニフロリン含量をそれぞれ測定した。使用した生薬に関しては同一ロットのものをを用いた。シャクヤクは、切度により2つに分け、粗切及び細切とした(図)。任意に選んだ5片の長さの平均はそれぞれ27 mm及び5.2 mmで、細切したものを1とした場合、粗切したものは約5.2であった。

試薬・試液

生薬は日本薬局方規格品を、水は精製水を、その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

湯剤調製

1000 mLの漢方薬煎治土瓶(母こころ, 株式会社三陶製, 四日市市)にカクコン 8 g, タイソウ 4 g, マオウ 4 g, カンゾウ 2 g, ケイヒ 3 g, シャクヤク(粗切または細切) 3 g, ショウキョウ

1 g 及び水 500 mL を加え、半量となる重さまで加熱抽出し、熱時ろ過を行い湯剤を得た。湯剤は、水から温度コントロールを行わず通常の方法で煎じ抽出した湯剤Aと、熱履歴を考慮し温度コントロールしながら抽出した（温度コントロールの方法は、記載しない）湯剤Bの2種類を調製した。調製はそれぞれ条件について2回行った。また、半量となるまでの加熱抽出時間とろ過により得られた液量をそれぞれの場合について計測した。

試料調製

湯剤 10 mL を正確に取り、メタノールを加え正確に 20 mL とした後、ろ過した。ろ液 5 mL を正確に量り、あらかじめ、カラムクロマトグラフィー用ポリアミド 2 g を用いて調製したカラムに付し、水で流出させ正確に 20 mL とし、試料溶液とした。

別にペオニフロリン標準品 10 mg を精密に量り、薄めたメタノール（1 → 2）に溶かして正確に 100 mL とし、標準溶液とした。

試料溶液及び標準溶液をそれぞれ 10 mL 正確に取り、液体クロマトグラフィーによりペオニフロリンを測定した。

HPLC 条件³⁾

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：232 nm）

カラム：YMC・Pack ODS・A A・302（4.6 mm × 150 mm, 5 μm）

カラム温度：20 °C

移動相：水 / アセトニトリル / リン酸（850/150/1）

流量：1 mL/min

C. 結果

湯剤Aの調製過程において、粗切した生薬を使用したとき、半量になるまでの時間は約 53 分であり、ろ過後の液量は 250 mL であった。細切した生薬を使用したときも、半量になるまでの時間は約 53 分であったが、ろ過後の液量は 230 mL 及

び 235 mL であり、生薬中に保水する量が多かった。ペオニフロリン含量は、粗切した生薬を使用したときは 64 mg/1 日量、細切した生薬を使用したときは 70 mg/1 日量であった。

湯剤Bの調製過程において、粗切した生薬を使用したとき、半量になるまでの時間は約 45 分であり、ろ過後の液量は湯剤 250 mL 及び 230 mL であった。細切した生薬を使用したときも、半量になるまでの時間は 45 分であったが、ろ過後の液量は 230 mL 及び 235 mL であった。ペオニフロリン含量は、粗切した生薬を使用したときは 59 mg/1 日量、細切した生薬を使用したときは 67 mg/1 日量であった。

D. 考察

切度及び調製法の組み合わせで4種の湯剤を調製し、その指標成分であるペオニフロリンの測定を行ったところ、細切した生薬を使用して調製した湯剤Aが 70 mg/1 日量と最も多かった。この量を1とした場合、粗切した生薬を使用して調製した湯剤Aが 0.914 であった。また、湯剤Bの細切したものと粗切したものとを比較すると、細切したものを1とした場合、0.881 であった。今回の検討条件では調製法によらずに、切度によって指標成分の量が低下する可能性が示唆された。一方、湯剤Aと湯剤Bを比較すると、細切した生薬を使用した場合、湯剤Aを1としたとき、湯剤Bが 0.957 であった。また粗切した生薬を使用した場合は、湯剤Aを1としたとき、湯剤Bが 0.922 であった。今回の検討条件では、調製法によっても指標成分の量に影響を及ぼすが、切度ほど大きなものではないと考えられた。

エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究において、エキス剤と同じロットの生薬を使用しても、大規模に生産されるエキス製剤と、小規模に生産される湯剤では、使用される生薬の切度が異なる可能性がある。従って、エキス剤と湯剤の同等性を評価する際には、それぞれの、製剤中の指標成分含量を測定して、含量に違いがある場合に

は、ヒト血漿中濃度を含量比により調整する必要性が示唆される。

E.結論

湯剤を調製する際、生薬の切度が、湯剤中の指標成分の量に影響を及ぼすことが明らかとなった。なお、調製法も指標成分の量に影響を及ぼしたが、今回の条件では切度ほど大きなものではなかった。製品の品質確保のためには、生薬の切度や調製法といった抽出条件のコントロールが重要であるものと考えられた。

文献等

1) 医療用漢方製剤の取り扱いについて、薬審第

804号、昭和55年6月25日

2) 医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて、薬審二第120号、昭和60年5月31日

3) 第16改正日本薬局方

F.健康危機情報

なし。

G.研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表等

なし。

H.知的財産権の出願・登録状況

なし。