

201328032A

厚生労働科学研究費補助金

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

生薬及び生薬製剤の品質確保と

同等性・安全性・国際調和等に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

(H24-医薬-指定-020)

研究代表者 合田 幸広

平成 26 (2014) 年 3 月



## 目 次

### I 総括研究報告書

生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性・国際調和等に関する研究 合田 幸広	1
--	---

### II 分担研究報告書

#### 1. 生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性等に関する研究

合田 幸広 漢方処方での日本薬局方原案作成に関する研究 合田 幸広	21
日本薬局方における定量 NMR (qNMR) の利用に関する研究 合田 幸広・細江 潤子	25
小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 鎌倉 浩之・堀井 周文	31
LC/MS 分析データを利用した生薬成分のメタボローム解析に関する研究 合田 幸広・渥美 さやか	43

#### 2. 生薬及び生薬製剤の品質確保と安全性・有効性等に関する研究

袴塚 高志 柑橘類生薬の糖含量と腸内細菌増殖活性に関する研究 袴塚 高志・桑田 幸恵	65
乙字湯の <i>Clostridium difficile</i> 増殖抑制活性について 袴塚 高志・桑田 幸恵	73
半夏に含有される抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性成分に関する研究 袴塚 高志	85
新一般用漢方製剤承認基準の改正に関する研究 袴塚 高志	97
単味生薬製剤承認基準に関する研究 袴塚 高志	125

#### 3. 生薬中の不純物に関する研究

鎌倉 浩之 漢方エキス中の水銀, ヒ素, 鉛及びカドミウムの実態調査 鎌倉 浩之	217
--	-----

4. 生薬の品質確保と国際調和に関する研究	
川原 信夫	
分光測色計を用いた生薬滑石の識別に関する検討	
川原 信夫	..... 229
日本薬局方と香港中薬材標準収載生薬の比較表作成に関する研究	
川原 信夫・河野 徳昭	..... 237
第 11 回 Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH) 国際会議に 関する報告	
川原 信夫・河野 徳昭	..... 247
5. 生薬の薄層クロマトグラフィー試験法に関する研究	
木内 文之	..... 271
III 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 287

生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性・国際調和等に関する研究

研究代表者 合田幸広（国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長）

研究要旨 本研究は、日本で医薬品として使用される生薬や生薬製剤（漢方製剤を含む）について、安全性・有効性を確保し、どのように品質を保証して、国民の健康・安全に貢献するかというレギュラトリーサイエンス上生じる諸課題に幅広く対応していくための研究である。さらに、現在 Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines (FHH), ISO 等で生じた生薬に関する問題にも対応し、国際理解・国際調和にも貢献する。本研究では、漢方処方エキス等について、従前の研究を引き続き、不純物分析を実施し適切な規制のあり方を検討するとともに、LC/MS 等を利用した生薬の多様性の範囲の確認と同等性の評価、生薬や生薬製剤の品質確保を目的とした確認試験法等の検討を実施する。また、LC/MS を利用して、血清中の漢方処方成分分析を実施するとともに、漢方処方について、腸管上皮細胞のトランスポーターや腸内細菌相に対する影響等を明らかにする。本年度は、個々の研究課題に対して、以下の様な対応を行った。

漢方処方の規格化に関する研究：漢方処方原案作成 WG を主催し、葛根湯加川芎辛夷エキス、麻黄湯エキス、大柴胡湯エキス、乙字湯エキスの 4 エキスの原案が完成し、16 局第二追補収載となった。引き続き漢方処方エキス及び処方構成生薬の局方収載を目標として、技術的検討が進んでおり、桃核承気湯、防己黄耆湯、加味帰脾湯、防風通聖散、抑肝散の 5 エキスについては、17 局での収載にほぼ目処がたった。

定量 NMR の利用に関する研究：日本薬局方で使用する生薬成分含量測定用試薬を定量規格化するための検討を行っている。本年度は、サイコサポニン類及びチョウトウコウアルカロイド類、(-)-epigallocatechin 3-O-gallate 及び、(E)-ケイヒ酸について、バリデーション試験等を実施し、測定溶媒と内部標準物質、定量対象シグナルを決定した。また、ロスマリン酸について、使用溶媒等について予備的検討を行った。

エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究：小青龍湯では、従前の研究によりエフェドリン類について良好な結果が得られている。本年度は、構成生薬のうちゴミシのゴミシン A 及びシザンドリン、カンゾウのリクイリチン及びリクイリチゲニン、サイシンのアサリニ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について検討を行った。その結果、リクイリチゲニン、アサリニンはばらつきが大きく、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ものの、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチンは同等性を評価する指標成分となりうる可能性が示唆された。

生薬の多様性と標準化に関する研究：メタボローム分析による多様性確認を指向し、国内市

場に流通するニンジン及びサイコの熱水抽出エキスについて、LC/MS メタボローム解析を行った。多変量解析により生干人参と湯通人参の成分比較を行ったところ、OPLS/OPLS-DA による判別分析ではそれぞれの生薬に特徴的なピークを7つずつ検出した。また、サイコにおけるPCAによる主成分分析の結果、*Bupleurum falcatum* L. 及び *B. chinense* D.C を判別し得る成分を見出した。

漢方処方 of 安全性と有効性に関する研究：これまでの研究から腸内細菌 *Lactobacillus reuteri* の増殖促進活性が見出された陳皮を対象とし、その活性成分について検討を進めたところ、sucrose であると同定された。陳皮の他、同じ柑橘類生薬である枳実、青皮について sucrose 含量を測定したところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高く、陳皮は青皮より3~6倍も糖含量が高いことが確認された。また、これらの生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較したところ、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高かった。以上のことから、柑橘類生薬においては、sucrose 含量と *L. reuteri* 増殖促進活性に相関関係があることが確認された。次に、乙字湯が7種の腸内細菌 (*Clostridium* 属2種、*Lactobacillus* 属2種、*Bifidobacterium* 属3種) の増殖に与える影響を調べた結果、乙字湯は、*Clostridium* 属、特に *C. difficile* (抗生物質投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属及び *Bifidobacterium* 属の一部に対しては増殖促進活性を示すことが明らかとなった。このことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。また、*C. difficile* に対する増殖抑制活性を担う構成生薬は、大黄、黄芩、甘草であり、これらは大黄を中心として協調して活性を示すことが判明した。また別に、これまでの研究から六君子湯にマクロファージの抗炎症性サイトカイン Interleukin-10 の発現誘導活性を見出し、その構成生薬のうち半夏に強い活性を確認しているが、本年度は、半夏に含有される活性成分の特性についてさらに検討し、特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは、糖以外の高分子化合物であることを明らかにした。

新一般用漢方処方の手引きに関する研究：従前より継続していた研究成果を元に、平成24年8月30日、合計294漢方処方の承認基準として、厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知「一般用漢方製剤承認基準の改正について」(薬食審査発第0830第1号) 発出された。さらに、その解説書として平成25年9月に「新一般用漢方処方の手引き」が上梓された。本報告では、この「新一般用漢方処方の手引き」作成の経緯について報告する。

単味生薬製剤承認基準原案に関する研究：昨年度に引き続き、「局方医薬品承認申請の手引き」(局方手引き) の改訂案作成へ向けた検討を行った。局方手引きに記載されている効能効果のうち、一般用医薬品としてわかりにくいものをわかりやすく読替えた効能効果読替え案を作成し、局方手引き改訂案とした。一方、局方手引きでは、収載生薬について主に煎剤あるいは末での服用が規定されているため、局方手引き収載生薬をエキス製剤として承認申請する際のガイドラインである「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」

(案)を作成した。また、各生薬エキスの確認試験法と指標成分の定量法については具体例(案)も提示した。

生薬の品質確保に関する研究：これまでの検討結果に基づき重金属含量が高い可能性のある桂枝茯苓丸、柴胡桂枝湯、芍薬甘草湯、真武湯、大黄甘草湯、釣藤散、補中益気湯及び六君子湯の8処方170検体を対象にヒ素、カドミウム、水銀及び鉛の実態調査を行った。その結果、いずれも香港基準値を下回っていた。試験対象とした元素が比較的高値で検出された処方では、比較的金属含量が高い生薬が構成生薬となっており、その原因は、原料とした生薬に由来するものと考えられた。分光測色計を用いた生薬滑石の識別に関する検討も行った。これまでの結果より、中国で流通する滑石には、6タイプあることを明らかとしている。今回の検討から、粉末色の測定では、6タイプすべてのタイプ間での識別は困難であるが、日中の薬局方収載品の2タイプ間では、分光測色計による識別が可能出ることが明らかとなった。

TLC試験法に関する研究：これまでに、日本薬局方収載生薬で確認試験・純度試験にTLCが設定されているものについて広く実施データを集積し、問題点がある試験法について、改良法を局方原案として提案した。今年度は、日本薬局方に既に収載されているTLCによる確認試験のうち、センソとトウガラシについてデータを収集した。また、アマチャ、キキョウ、サイシン、サンヤク、シユクシャ、タクシャ、チモ、ハッカ等14品目について新たなTLCによる確認試験を検討し、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカについてTLCによる確認試験法を設定するとともに、TLCクロマトグラムの写真を画像データの収集を行った。更に、これらの試験法案を日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案する。

生薬の国際理解と国際調和に関する研究：FHHに関連した研究では、今年度は、香港の中華人民共和国香港特別行政区衛生署が作成・刊行した、香港中薬材標準(Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, HKCMSS)を入手し、日本薬局方(及び局外生規)との収載生薬品目及びTLC確認試験法について比較表の作成を行った。また、シンガポールで行われたFHHのStanding Committeeに出席し、日本の生薬の公的規格の最近のトピック(定量NMR)とSub-Committee 1の活動等について報告した。

#### 研究分担者

木内文之 慶應義塾大学薬学部教授  
川原信夫 (独)医薬基盤研究所薬用植物資源  
研究センター・センター長  
袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所生薬  
部・部長  
鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所生薬部  
主任研究官

#### A. 研究目的

本研究は、日本で医薬品として使用される生薬や生薬製剤(漢方製剤を含む)について、安全性・有効性を確保し、どのように品質を保証して、国民の健康・安全に貢献するかというレギュラトリーサイエンス上生じる諸課題に幅広く対応していくための研究である。さらに、現在FHH、ISO等で生じた生薬に関する問題にも対応し、国際理解・国際調和にも貢献する。

研究代表者らは、従来より生薬及び生薬製剤（漢方製剤を含む）の品質確保と安全性、有効性に関連する研究を推進してきた。その結果、これまで具体的な検討がなされていなかった国内流通生薬中の不純物（農薬、重金属等）の実態を示すとともに、最終製品中でどのようにコントロールしうるか明らかにし、日本薬局方等で科学的情報を元にした適切な規制を実現してきた。また、天然物である生薬や生薬製剤では、再現性ある医療の実現のため標準化が喫緊の課題であるが、様々な手法により、実現可能な標準化を実施してきた。さらに、局方で規定された指標成分を利用し、体内動態の検討から、ある程度生物学的同等性の確認が可能であることを示している。本研究では、漢方処方エキス等について、引き続き不純物分析を実施し適切な規制のあり方を検討するとともに、LC/MS を利用した生薬の多様性の範囲の確認と同等性の評価、生薬や生薬製剤の品質確保を目的とした確認試験法等の検討を実施する。また、引き続き LC/MS を利用して、血清中の漢方処方成分分析を実施するとともに、漢方処方について、腸管上皮細胞のトランスポーターや腸内細菌相に対する影響等を明らかにする。また、FHH の活動を支援することで、日本の生薬・生薬製剤に関する情報を世界に発信する。以上、本研究は、重層的な視野で生薬や生薬製剤を、医薬品として国内外で今後どのような形で流通させ、国民の保健衛生の向上に役立たせるか検討するための科学的情報を提供するものである。

## B. 研究方法

### B-1 漢方処方の規格化に関する研究

ほぼ2ヶ月に1回、国立医薬品食品衛生研究所内の会議室に、漢方処方の原案作成WGとして研究協力者が集まり、日本漢方生薬製剤協会技術

部会、東京生薬協会、日本試薬協会等が行った実験結果を元にして、お互いに忌憚ない意見を交換し、日本薬局方原案審議委員会生薬等A委員会に漢方処方WGからの報告書を提出した。

### B-2 定量 NMR の利用に関する研究

定量 NMR の測定は以下の条件で行った。観測スペクトル幅は 20 ppm, デジタルフィルタを使用し、スペクトル中心は 5 ppm の位置に設定、パルス幅は 90 度パルスとなる時間に設定し、取り込み時間 4 秒, デジタル分解能 (Resolution) 0.25 Hz, 遅延時間 60 秒, オート FG シムによるシム調整, 測定温度は室温とし, MPF8 による  $^{13}\text{C}$  デカップル実施, ダミースキャン 2 回とし, 内部標準法 (AQARI: Accurate quantitative NMR with internal reference substance) により, 原則として各試料について 3 回測定を行った。NMR データの処理には, 日本電子(株)製 Alice 2 for qNMR を使用, 内部標準物質のトリメチルシリルピークを 0 ppm とし, マニュアル法で位相補正, オートベースライン補正を行い, マニュアル法で各ピークの積分範囲を決定した。

### B-3 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

本研究では、小青龍湯及び葛根湯とも被験者総数は 6 とし、無作為に 2 グループとした。これらについて、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 ESI-LC-MS 分析に供した。本年度の分析対象物としては、ゴミシン A, シザンドリン (以上ゴミシ由来), リクイリチゲニン, リクイリチン (以上カンゾウ

由来), アサリニン (サイシン由来) を選択した。

#### B-5 生薬の多様性と標準化に関する研究

本研究に用いたニンジンおよびサイコの熱水抽出エキスは、国内市場に流通する生薬サンプルを2時間加熱還流して凍結乾燥したもので、医薬基盤研究所薬用資源研究センターより譲渡されたものである。ニンジンの分析では、LC-MS は、Shimadzu Prominence UFLC (島津製作所) に、LTQ Orbitrap XL を接続したのを用い、解析には、ESI, Neg. モードを利用した。ニンジンに含まれる ginsenoside Rg1 (12.8 min,  $m/z$  799) と ginsenoside Rb1 (18.1 min,  $m/z$  1107) のピークは、標品の保持時間と MS スペクトルとの比較によって同定した。サイコの分析では、ニンジン分析と同様の LC-MS を用い、解析には、ESI, Pos. モードを利用した。サイコに含まれる saikosaponin a (21.1 min,  $m/z$  781) と saikosaponin d (24.2 min,  $m/z$  781) のピークは、標品の保持時間と MS スペクトルとの比較によって同定した。LC-MS データのピーク抽出には、Sieve 2.0 (ThermoFisher Scientific) を用い、SIMCA-P<sup>+</sup> 12 (Umetrics) を用いて主成分分析 (PCA) および判別分析 (OPLS-DA) を行った。解析の前処理として、フレームデータの標準化にはパレートスケール (Par) を適用した。

#### B-5 漢方処方 of 安全性, 有効性に関する研究

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。 *Clostridium difficile* JCM1296, *C. perfringens* JCM1290, *Lactobacillus acidophilus* JCM1132, *L. reuteri* JCM1112, *Bifidobacterium adolescentis* JCM1275, *B. longum* JCM1217, *B. catenulatum* JCM1196 は、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。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 (東京理器) を用いて行った。オートクレーブには MAC-601 (東京理器) を用いた。HPLC-CAD 分析には、HPLC 装置として Shimadzu Prominence, CAD として Corona CAD (ESA Biosciences, Inc) を使用した。菌体の観察・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。

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 (ATCC: TIB-71) は、大日本住友製薬より購入した。RAW264.7 細胞の継代培養は、DMEM 培地 (10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin) で、37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 暗黒下に行った。継代する際は、セルスクレーパーでシャーレより剥がし、新鮮培地に 1/5~1/20 の希釈倍率で播種した。サイトカイン発現量定量においては、24 穴プレートに  $1.7 \times 10^5$  cells/1mL/well の濃度で細胞を播種し、24 時間培養した後に用いた。糖鎖標品としてのマルトトリオース (BC-G3), マルトペンタオース (BC-G5), マルトヘプタオース (BC-G7) 及び G1~G10 mix (BC-GM) はセンシュー科学より購入した。D-Glucose は SIGMA-ALDRICH より購入した。糖加水分解酵素として、 $\alpha$ -Amylase (*Aspergillus oryzae*, SIGMA-ALDRICH), Arabinanase (*A. niger*, Megazyme), Dextranase (*Chaetomium erraticum*, SIGMA-ALDRICH), Pectinase (*Aspergillus aculeatus*, SIGMA-ALDRICH) を用いた。

#### B-7 新一般用漢方処方の手引きに関する研究

厚生労働科学研究「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」(主任研究者: 合田幸広) における「漢方



処方同等性並びに品質確保等に関する研究」の報告書として完成された「新 210 処方案」には、従来の 213 処方に新規収載候補 85 処方を加えた 298 処方に関する記載がある。この内容を基礎として、新基準収載の 213 処方の解説書である「改訂 210 処方」を改訂・補足する形で、平成 25 年 9 月に「新一般用漢方処方の手引き」が上梓された。

#### B-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所生薬部を事務局とし、OTC 医薬品協会の生薬製品委員会と薬制委員会、日本漢方生薬製剤協会の原薬エキス委員会、生薬製剤委員会及び、大学関係者と連絡を取りつつ、4 回に渡り検討班会議を開催した。さらに、第二回会議以降は、(独)医薬品医療機器総合機構の関係者も参加した。

効能効果の読み替え案については「新・一般用漢方処方の手引き(じほう)」及び厚生労働省医薬食品局安全対策課の指定研究「一般用医薬品における、化学合成品等のリスク区分の見直しと漢方製剤の安全性に関する研究」における「効能効果の表現がセルフメディケーションにふさわしくない一般用医薬品の取り扱いについての検討」の研究結果等を参考とした。単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン(案)の作成には、第十六改正日本薬局方及び医薬品製造販売指針 2012 等の記載事項、昭和 60 年 5 月 31 日薬審 2 第 120 号「標準湯剤との比較試験に関する資料」を参考とした。各生薬エキスの指標成分及びその確認試験と定量法の具体例(案)作成には、日本薬局方他、各国の局方、香港中薬材標準等を参考とした。

#### B-9 生薬の品質確保に関する研究

生薬の不純物に関する研究では、日本漢方生

薬製剤協会を通じて入手した桂枝茯苓丸、柴胡桂枝湯、芍薬甘草湯、真武湯、大黄甘草湯、釣藤散、補中益気湯及び六君子湯の 8 処方 170 検体を対象にヒ素、カドミウム、水銀及び鉛の 4 大金属について、ICP-MS により含量測定を行った。

滑石に関する研究では、これまでに入手した日本市場品 3 点(タイプ A)、中国市場品 15 点(タイプ B~F 各 3 検体ずつ)を実験材料とした。分光測色計は、コニカミノルタ CM-3500d を用い、反射光を測定した。表色系は  $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  表色系 [ $L^*$  値(明度)、 $a^*$  値(+ : 赤方向、- : 緑方向)、 $b^*$  値(+ : 黄方向、- : 青方向)] を用いた。

#### B-10 TLC 試験法に関する研究

生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社の担当者を中心とする研究班を組織し、日本薬局方の生薬各条に規定された TLC による確認試験を実施して、その問題点等を検討した。薄層板としては、前年度に引き続き、メルク社製並びに和光純薬工業社製の市販プレートを用い、10 cm と 7 cm の展開結果を比較した。今年度検討した生薬は、センソ、トウガラシ(以上、既に日局で TLC 確認試験があるもの)、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカ、アマチャ、キキョウ、シュクシャ、サンソウニン(純度試験)、タクシャ、チョウトウコウ、バクモンドウ、ハマボウフウ、モクツウ、モッコウ(以上、日局で TLC の確認試験が未設定の生薬)の 16 品目である。

#### B-11 生薬の国際調和に関する研究

第 11 回 FHH Standing Committee (シンガポール、10 月 22-23 日)、に参加した。また、日本が主催する Nomenclature and Standardization の Sub-Committee I の活動を行った。

〈倫理面への配慮〉ヒト試料を用いる研究では、「ヒトゲノム・遺伝所解析研究に関する倫理指針」等，遵守すべき規準に従い，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。

なお，本研究で用いた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るが，所属機関の研究倫理規定に従い，必要に応じて所属機関の研究倫理委員会に申請して，その審査を受けた上で使用している。

## C. 結果・考察

### C-1 漢方処方規格化に関する研究

WG会議では，特に16局第一追補以降に収載する漢方処方エキスの候補品目，防已黄耆湯，麻黄湯，桃核承気湯，葛根湯加川芎辛夷，加味帰脾湯，防風通聖散，五苓散，半夏瀉心湯，大柴胡湯，抑肝散及び乙字湯の各エキス11品目について，規格化を検討するとともに，これらの漢方処方エキスの規格化の際使用する試薬類の規格化についても検討し，各WG会議後，生薬等A委員会に検討内容を報告している。前年度終了時，すでに，上記11処方のうち，半夏瀉心湯エキス，葛根湯加川芎辛夷エキス，麻黄湯エキス，大柴胡湯エキス，乙字湯エキスの5エキスについては，本WGでの規格化を経て，生薬等A委員会，生薬等B委員会での議論が終了しており，16局第一追補（半夏瀉心湯エキス），及び第二追補への収載が可能となっていた。桃核承気湯についても，審議はほぼ終了していたが，処方構成生薬であるボウショウが審議未了であった関係で，17局収載となっていた。本年度は，さらに，防已黄耆湯，加味帰脾湯，防風通聖散，五苓散，抑肝散の5エキスについて検討した。その結果，防已黄耆湯，加味帰脾湯，防風通聖散，抑肝散の4エキスについては，17局での収載にほぼ目処がたった。

### C-2 定量 NMR の利用に関する研究

本研究では，qNMR が局方収載されて，生薬成分の含量規格に公的に利用されるまでに解決すべき現実的な問題を順次検討している。本年度は，サイコサポニン類及びチョウトウコウアルカロイド類について，対象試薬の測定溶媒と内部標準物質，定量対象シグナルについて決定した。なお，サイコサポニン類については，吸湿性の問題があり，実際に販売する際，どのタイミングでどのように値付けして，どのような注意書きを書き，開封後，どのような条件で量りとして HPLC の分析用標品として溶解させるか，引き続き検討が必要とされた。ただし，この問題は，局方の標準品でも，同じであり，開封後の問題は，別次元で議論すべきかもしれない。また，実際に試薬として値付けする際には，S/N=100 以上になるように，濃度（例えば 10mg/mL）と，積算回数（scan 32 など）について，使用する機器の感度を考慮して，検討することとされた。さらに，(-)-epigallocatechin 3-O-gallate 及び(E)-ケイヒ酸について，測定溶媒と内部標準物質を決定，バリデーション試験を実施し，定量対象シグナルを決定した。

### C-3 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

投与した湯剤とエキス製剤のそれぞれの成分の含量が異なるため，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検討し，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。各成分とも採血点によっては，血漿中濃度にばらつきが認められた。また，薬剤間での有意な差は認められなかった。 $C_{max}$  及び AUC に関しては，リクイリチン及びアサリニン以外は被験者によるばらつきが大きい傾向が認められた。

分散分析の結果、ゴミシン A 及びシザンドリンの  $C_{max}$  では被験者の項が有意であり、個体差が認められた。また、アサリニンの AUC では時期の項が有意であった。一方、リクイリチゲニン及びリクイリチンは薬剤、時期及び被験者のいずれの項においても有意差は見られなかった。 $C_{max}$  及び AUC に関して、一部の成分で個体差は認められるものの、薬剤間に有意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、ゴミシン A では  $C_{max}$  は 38%、AUC は 16%、シザンドリンでは  $C_{max}$  は 28%、AUC は 17%、リクイリチゲニンは  $C_{max}$ 、AUC とともに 10% 以下、アサリニンでは  $C_{max}$  は 12%、AUC は 44%、リクイリチンでは  $C_{max}$  は 47%、AUC は 29% で、十分な検出力が得られていないことが判明した。そこで、得られた結果をもとに十分な検出力が得られる被験者数の推定をすることとした。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、十分な検出力を得るためには、ゴミシン A では 1 群 18 人以上、シザンドリンは 1 群 15 人以上、リクイリチゲニンは 1 群 61 人以上、アサリニンは 1 群 29 人以上、リクイリチンは 1 群 9 人以上の被験者数が必要となることが判明した。

今回検討を行った 5 成分のうち、リクイリチゲニン及びアサリニンの血漿中濃度推移には個体間でのばらつきが認められた。リクイリチゲニンに関しては、本間らが、柴朴湯投与後のフェノール性化合物の血中濃度測定を行い、リクイリチゲニンの AUC 及び  $C_{max}$  に被験者間で 2 倍以上の違いが観察されたことを報告している。また、Zuo らは、黄芩湯のフラボノイド配糖体が腸内細菌とのインキュベーションによりアグリコンへ代謝されるとして、リクイリチンからリクイリチゲニンへの腸内細菌による代謝の報告をしている。腸内細菌叢には個体差のあることが知られており、

そのため、血漿中濃度推移に影響を及ぼすことが推測される。アサリニンに関しては、検出はされたものの血漿中濃度が低く、十分な検出感度が得られなかった。

今回の結果から、リクイリチンは、同等性の指標成分となる可能性が示唆された。また、ゴミシン A 及びシザンドリンに関しても、検討の余地があるものと考えられた。一方、リクイリチゲニン及びアサリニンに関しては、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。

#### C-4 生薬の多様性と標準化に関する研究

ニンジンの修治過程における含有成分の変化は白参と紅参を対象とした解析が数多く報告されているが、日本薬局方に“人参”として収載されている生干人参および湯通人参の成分比較を行った例はほとんどない<sup>4</sup>。そこで、本研究では LC/MS データを用いた多変量解析により、国内に流通する人参の成分多様性を調査した。

その結果、OPLS/OPLS-DA による判別分析で、生干人参に特徴的な 7 つのピークと湯通人参に特徴的な 7 つのピークを得ることができた。さらに、個別試料における各ピークの比較では、RT 11.2 min,  $m/z$  961.5 と RT 17.2 min,  $m/z$  1269.7 のピークが、生干人参において湯通人参よりも明らかに高いピーク強度を示した。精密質量による組成推定から、このピークの成分は  $C_{48}H_{82}O_{19}$  と  $C_{60}H_{102}O_{28}$  と予測され、MS スペクトルからいずれも ginsenoside 類であることが示唆された。さらに、 $C_{48}H_{82}O_{19}$  は 3 つ、 $C_{60}H_{102}O_{28}$  は 5 つの糖を含む化合物と推定され、湯通人参では加熱によって糖鎖が脱離し構造変化が生じた可能性が示唆された。一方、紅参と人参の成分比較では、加熱処理による malonyl ginsenoside 類の脱マロニル化や糖鎖の脱離、

異性化が生じ、紅参特有の ginsenoside 類が生成されることが報告されているが、今回、生干人参と湯通人参でも同様に、糖鎖の脱離による ginsenoside 類の構造変化が生じる可能性が示唆された。

第 16 改正日本薬局方には、生薬柴胡の基原種として *Bupleurum falcatum* Linné が規定されているが、厳密には、*B. falcatum* L. に加えて *B. chinense* D.C と *B. scorzonerifolium* Willd. も分類学的には同一とみなされ収載種として認められている<sup>3)</sup>。そこで、国内に流通する柴胡の成分多様性を調査し、基原種による成分の違いを観察した。

サイコの PCA による主成分分析では、比較的寄与率の高いモデルが得られ ( $R^2 = 0.700$ ,  $Q^2 = 0.537$ )、*B. falcatum* グループと *B. chinense* グループに大別することができた。さらに OPLS/OPLS-DA による判別分析では、*B. falcatum* に特徴的な 13 のピークと *B. chinense* に特徴的な 20 のピークを得ることができた。これらのピークの個別試料における比較では、RT 19.0 min,  $m/z$  207.1 のピークが *B. chinense* において *B. falcatum* の 30 倍以上のピーク強度を示した。精密質量による組成推定から、このピークの成分は  $C_{11}H_{10}O_4$  と予測され、MS スペクトルからクロモンあるいはクマリン骨格を有する化合物と推定された。なお、クロモン類である eugenin は *B. scorzonerifolium* から、クマリン scoparone は *B. frutescens* から単離報告があり、*B. falcatum* と近縁変種、あるいは近縁異種を判別するマーカー化合物として利用できる可能性が高い。

C-5 漢方処方 of 安全性、有効性に関する研究

前年度までの研究で、陳皮に含有される *L. reuteri* 増殖促進活性成分は、2 糖類であると

考えられた。そこで、まず、単糖や二糖の分析に適したポリマー系アミノカラムを用いて、複数の単糖・二糖の標品を分析したところ、活性分画は、sucrose の保持時間と一致した。また、NMR 測定を行った結果、 $^1H$ -、 $^{13}C$ -NMR とともに、sucrose 標品とスペクトルが一致した。従って、陳皮に含有される *L. reuteri* 増殖促進活性成分は sucrose であることが明らかとなった。

次に、柑橘類生薬である陳皮、枳実、青皮における含量の測定を行ったところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高いことが明らかとなった。柑橘類果実や果皮の生育に伴う糖含量の経時変化については複数の報告があり、成熟に伴い sucrose をはじめとした糖の含量が高くなることがわかっている。よって、基原植物が同じで採取時期のみが異なる生薬青皮と陳皮においても、未熟果皮である青皮より、成熟果皮である陳皮の方が sucrose 含量が高いことが予想されたが、本研究結果により、市場に流通している陳皮は青皮よりも 3~6 倍も sucrose 含量が高いことが確認された。また、これら柑橘類生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較した結果、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高く、両者に差がみられた。青皮と陳皮は、ほぼ同じ効能効果を持つが、陳皮の方が性質が穏やかで、行気・化滯の効能が弱いとされ、使い分けられる場合もある。同じ植物の同じ部位でも、未熟品か成熟品かの違いで薬効の違いが生じることについて、科学的な議論はこれまでにほとんどなされていないが、本研究結果により、糖含量の違いが、青皮と陳皮の薬効の違いに関与している可能性が考えられた。

次に、乙字湯が腸内細菌 (*C. difficile*, *C.*



*perfringens*, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. catenulatum*) の増殖に与える影響を調べた。その結果、乙字湯は *Clostridium* 属、特に *C. difficile* に対する強い抑制活性をもつ一方、*L. reuteri*, *L. acidophilus*, *B. catenulatum* に対しては増殖促進活性をもつことを見出した。下痢や便秘は、腸内細菌叢のバランスの乱れ（有害菌の増加や有用菌の減少）が原因であることが多い。乙字湯が便秘や痔に対する効能を発揮する機序の一つとして、腸内細菌叢のバランスの乱れを改善することが考えられる。また、*Clostridium* 属の中でも *C. difficile* に対して特に強い増殖抑制活性がみられたことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。次に、乙字湯の上記に示した活性に、構成生薬がどのように寄与しているのかを調べたところ、*C. difficile* に対する増殖抑制活性には、大黄、黄芩、甘草が、また *Lactobacillus* 属や *B. catenulatum* の増殖促進活性には、主に当归や黄芩が寄与していることが明らかとなった。本研究では、*C. difficile* に対する増殖抑制活性について更に検討を行い、活性の中心を大黄が担っていることを示した。大黄は、便秘に対する緩下薬として、東南アジアやヨーロッパ等世界でも幅広く使用されている生薬である。その主な活性成分として、sennoside 類が知られているが、これらはそれ自体では瀉下活性を示さず、*Bifidobacterium* や *Peptostreptococcus* 等の腸内細菌により rhein anthrone に変換されてはじめて活性を示すことが報告されている。しかし、一方で、大黄の長期間服用により有用菌を含む腸内細菌の減少が懸念されており、実際に *in vitro* の

実験において、大黄は有用菌である *Bifidobacterium adolescentis* に対して抗菌活性があることが報告されている。我々の実験においても、大黄単独では、*B. adolescentis* を含む複数の菌に対して増殖抑制活性を示したが、大黄を含む 6 つの生薬からなる乙字湯は、上述の通り、有害菌である *Clostridium* 属に対して強く増殖抑制活性を示す濃度においても、有用菌である *Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属に対しては増殖に影響を与えない又は増殖促進活性を示した。この腸内細菌叢のバランスを考える上で優れた活性は、複数の生薬が協調することにより発揮されており、複数の生薬から構成される漢方処方の特徴を表していると考えられる。また、興味深いことに、大黄と黄芩、大黄と甘草の組み合わせは、協調的（相加的）に *C. difficile* に対して増殖抑制活性を示したが、黄芩と甘草の組み合わせは協調的な抑制活性を示さなかった。この選択的な協調作用機構に関しても、それぞれの生薬の活性成分を同定し、更に検討を行うことで議論できる可能性があると考えられる。さらに、黄芩が *Clostridium* 属に対して増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の一部の菌に対しては増殖促進活性を示すことに関して、同一の成分が菌の種類により相反する作用を発揮するのか、あるいは異なる成分がそれぞれの活性に寄与するのにも興味を持たれる。

半夏に見出したマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 における抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性に関して、その活性成分の精製を進め、成分の特性について検討した。エタノール沈殿における挙動、ゲルろ過カラムにおける溶出位置、また、昨年既に得られてい

る配位子交換カラムにおける溶出位置から、活性成分は極めて大きな分子量であることが分かった。活性の存在する画分は、CAD（荷電化粒子検出器）ではピークを検出できるものの、ほとんど UV 吸収を持たないため、糖鎖であろうとの仮説のもとに検討を進めた。しかし、一般的な糖加水分解酵素（ $\alpha$ -Amylase, Arabinanase, Dextranase, Pectinase）のカクテルで処理したところ、図 8 に示すように糖の加水分解は良好に進行しているにも関わらず、活性は消失せず、さらには巨大分子量のまま維持されていた。このことは、活性成分が特殊な糖より構成されるか、あるいは、糖以外の高分子化合物であることを示している。今後は、タンパク質あるいは核酸等の可能性を視野に検討を進める必要がある。

#### C-7 新一般用漢方処方の手引きに関する研究

改訂 210 処方では処方名の下にふりがなを括弧付きで記載したが、新一般用漢方処方の手引きでは括弧を付さないこととした。これは、別名を持つ処方に括弧が重複することを回避するためである。また、今回新たに、体力適応表の該当部分を抜き出し、処方名の隣に配置することとした。また、基準に反映されない部分（原典・出典、処方解説、参考文献情報）は、改訂 210 処方及び新 210 処方案の該当部分を再度見直し、以下の様な修正点を正した上で記載することとした。

各処方記述の参考文献表において、各参考文献を再調査したところ、旧 210 処方より移行した処方の中には、参考文献表に挙げられた文献中に当該処方に関する記述を見出せないケースが散見された。これらは原則的に新一般用漢方処方の手引きに移行せず削除した。また、参考文献の中には、新版が刊行されているものも

あり、この場合は新版を参考文献中に追加した。ただし、たとえ絶版になっている場合でも、旧版は参考のために残した。さらに、旧 210 処方では、「かぜ薬承認基準」や「局方」等の行政文書や公定書が参考文献になっているものも散見されたが、これらは削除した。参考文献は五十音順で並べ替えた。これに伴い、表注や注釈の番号も振り直しした上で、その番号に従って並べ直した。さらに、表で使用する記号（○、△、—）の定義を明確にして、これに従って記載を整備した。前述のように、参考文献の追加及び削除を行ったが、これに合わせて巻末の参考文献一覧も改訂した。また、記載整備として、明治以降の出版年は年号（明治、大正、昭和、平成）で記載し、明治より前の文献及び外国の文献は西暦で記載し、月及び日は記載しないこととした。新規処方の追加に対応して、全処方の記載から索引項目を改めて抽出し直した。また、関連する索引語を束ねて「主たる索引語」の下に並べる方式は改訂 210 処方の方針を踏襲し、ただし、主たる索引語を大幅に増やした。すなわち、主たる索引語として、従来の「胃炎、痛み、胃腸炎、かぜ、かゆみ、倦怠、痔、湿疹・皮膚炎、出血、ぜんそく、尿関連、冷え、鼻炎、扁桃炎」に加え、新たに「汗関連、顔色関連、渇き・乾き関連、気分、口腔関連、出産関連、せき、はれ、ほてり、目関連」を設定し、さらに、「倦怠」は「倦怠・疲労」に変更した。

#### C-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

読替えが提案された効能効果は、次の通りである。

- ・残尿感⇒残尿感（尿が出しづる）
- ・尿量減少⇒尿量減少<sup>注）</sup>の改善

注）尿量減少とは、下肢のポンプ機能低下など

が原因で水分の排泄が滞ることにより、下肢のむくみや夜間頻尿等の症状を伴って尿の量が減少している状態である。

- ・胃部・腹部膨満感⇒胃部・腹部膨満感（おなかが張った感じ）
- ・腹部膨満感⇒腹部膨満感（おなかが張った感じ）
- ・さしこみ（疝痛，癩）⇒さしこみ（胸やおなかの急激な痛み，疝痛，癩）
- ・吹出物⇒ふきでもの（にきび）
- ・激しい咳⇒激しいせき
- ・咽喉痛の緩解⇒咽喉痛（のどの痛み）の緩和  
（別案：のどの炎症によるのどのあれ・のどの痛み・のどのはれ・のどの不快感の緩和）
- ・血色不良⇒血色不良（皮膚の色つやの悪いもの）
- ・関節痛⇒関節のはれや痛み
- ・皮膚のあれ⇒皮膚(肌)のあれ  
（別案：皮膚のあれ・肌あれ）

主に煎剤または末で服用することと規定されている「局方手引き」収載単味生薬を、エキス製剤として承認申請する際のガイドライン「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)の作成では、エキス製剤の品質を確保する方法の基本方針としては、エキス希釈率を変化させて指標成分の含量を一定に保つ欧州式の方法ではなく、漢方における標準湯剤とエキスの同等性を担保することにより品質を確保する方法(昭和60年5月31日薬審2第120号「標準湯剤との比較試験に関する資料」)を参考とすることとした。すなわち、「局方手引き」に記載されている単味生薬の煎剤を標準煎剤とし、標準煎剤とエキスの1日量分中の指標成分定量値の比較を行いそれらの同等性を担保することにより、エキス

の品質を確保する。また、生薬「末」についても、漢方製剤と同様の考え方により標準化をはかる目的でエキス剤の申請を認めるものとし、標準煎剤を介して比較試験を行うことにより「末」とエキスの同等性を担保することとした。

最終的に、局方手引き収載生薬をエキス製剤として承認申請する際のブリッジングガイドラインである「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)を作成し、更に各生薬エキスの指標成分及びその確認試験法と定量法については具体例(案)も提示した。

#### C-8 生薬の品質確保に関する研究

生薬の不純物に関する研究では、全ての検体で、香港生薬標準(ヒ素 2.0 ppm, カドミウム 0.3 ppm, 水銀 0.2 ppm, 鉛 5.0 ppm)の基準値を満たしたが、比較的高値を示したエキスは、以下の通りである。桂枝茯苓丸では、ヒ素に関して31検体中3検体で1ppmを上回った(最大値 1.32ppm)。また、鉛に関して2検体で1ppmを上回った(最大値 1.49ppm)。柴胡桂枝湯では、30検体中1検体で、ヒ素に関して1ppmを越え(1.03ppm)、同検体で0.25 ppmのカドミウムが検出された。さらに、別な3検体で鉛が1ppmを超えて検出され、特に2検体では、4.88ppm, 4.45ppmの値を示した。釣藤散では、カドミウムに関し、12検体中3検体で比較的高い値(0.29 ppm, 0.22 ppm, 0.19 ppm)を示し、鉛においても、2検体で1ppmを越えて(1.71ppm, 1.02ppm)検出された。補中益気湯では、1検体で、鉛に関して1ppmを越えて(1.18ppm)検出された。これらの高値の原因は、原料とした生薬に由来する可能性が高いものと考えられた。

滑石に関する研究において、乾燥した粉末では各タイプで測定値に違いが見られたが、数値

の差はそれほど大きくなく、また使用した各 3 検体間のバラツキが大きいパラメータもあった。またペースト状では、各タイプともに  $L^*$  値は乾燥した粉末色よりも大幅に低い値を示した。しかし、 $a^*$  値、 $b^*$  値は乾燥した粉末と同様の傾向にあったことから、今後は粉末色だけを測定すればよいと考えられた。このように、6 タイプの滑石を分光測色計だけでそれぞれ識別することは困難であったが、各タイプの滑石について、色を数値化し、客観的に表現することができた。

一方、日本薬局方収載品であるタイプ A と中華人民共和国薬典収載品であるタイプ D を比較した場合、乾燥した粉末色の測定値は、タイプ A では、 $L^*$  値 89.65~91.51、 $a^*$  値 0.43~0.56、 $b^*$  値 4.40~5.74 であり、タイプ D は、 $L^*$  値 94.19~97.48、 $a^*$  値 -0.60~-0.26、 $b^*$  値 1.54~1.69 であった。従って、タイプ A とタイプ D は、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  の各値において両タイプで値が異なる上、3 検体間でのばらつきが比較的小さいため、両者が分光測色計により識別できることが示唆された。

#### C-10 TLC 試験法に関する研究

薄層クロマトグラフィーは、特別な装置を必要とせず、簡便に行えることから、日本薬局方の生薬の確認試験として多用されている。本研究では、昨年度に引き続き生薬の確認試験を日常的に行っている生薬関連会社で行われた TLC による生薬の確認試験のクロマトグラムを基にして、現行の確認試験法の問題点を整理し、これを解決するための試験法の検討を行った。

今年度、まず、既に TLC 確認試験法が設定されている、トウガラシ、及びセンソについて検討した。トウガラシでは、カプサンチンを対象とする確認試験についても検討したが、最終的に

は、現行のカプサイシンを確認する方法の改良法を、生薬等委員会に提出した。センソについては、指標物質であるレジブフォゲニンのスポットの色調の経時変化を観察した。日局試験法では変化の落ち着いた 5 分後の色調を比較することになっているが、5 分後では、色の変化の途中であることが明らかとなった。

次に、日局に TLC による確認試験が設定されていない 14 の生薬について、TLC による確認試験法の検討を行い、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカについて新たに TLC による確認試験を設定した。細辛については、小青竜湯エキスの試験法を参考にして試験法を設定したが、他の生薬については新たに検討したものである。これらの生薬は、これまで確認試験が設定されていないか呈色反応のような特異性が低い方法が設定されていたものであり、今回設定した TLC による確認試験は、日局生薬の品質の担保に貢献することが期待される。特にハッカについては、加味逍遥散エキスの確認試験で日局ハッカが標品として使用されることから、その確認試験に TLC が用いられるようになることの意義は大きいと思われる。今年度検討した生薬の中には、TLC による確認試験の設定が困難と思われるものもあるが、適切な条件がほぼ見出せているものもあることから、新たな品目も含めて TLC による確認試験を設定する努力を継続することが重要である。

#### C-11 生薬の国際調和に関する研究

FHH に関連した研究では、今年度は、香港の中華人民共和国香港特別行政区衛生署が作成・刊行した、香港中薬材標準 (Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, HKCMSS) を入手し、日本薬局方 (及び局外生規) との収載生薬品目及び TLC 確認試験法について比較表



の作成を行った。その結果、HKCMMS と日本薬局方（及び局外生規）との共通生薬は HKCMMS 収載植物由来生薬 133 種中 67 種 (50.4%) であり、そのうち 28 種については日本薬局方（及び局外生規）において TLC 確認試験法が規定されていないことが明らかになった。共通生薬のうち、TLC 確認試験法が同一なものはサンシュユの 1 種のみであった。また、HKCMMS においては一部クロロホルム、ジクロロメタン等有害溶媒を展開溶媒に使用するものが認められた。

シンガポールで行われた会議では、Standing-Committee member として、合田、木内が、それ以外の参加者として、川原、袴塚（国立医薬品食品衛生研究所生薬部長）、河野、東大の Lida Teng 博士が参加した。合田が、日本の生薬の公的規格の最近のトピックとして、定量 NMR を紹介し、川原が Sub-Committee I (Nomenclature and Standardization) の活動（HKCMMS との比較）について報告した。また、袴塚が、ISO/TC249 における伝統東アジア医療に関する標準化について報告した。さらに、Lida Teng 博士は、Sub-Committee III で、医療用漢方製剤の使用と副作用に関する統計学的手法による相関解析の予備的なアセスメント結果について報告した。

本会議では、特に、今後の FHH の方向性について議論があった。Sub-Committee II では、韓国より、International reference of Medicinal Plant Material（国際 RMPM、薬用植物国際標準品）の構築に向けた FHH における共同研究案について発表があり、先に品目を選択して feasibility study を行う方向で、Sub-Committee II の活動として、実施することとなった。また、設立当初からのメンバーであるオーストラリアが、このところ毎年不参加となっている一方

で、マレーシア、フィリピン、ブルネイの FHH 参加の希望があることが報告され、本年度末までに、これらの件について各国の意向を確認することとされた。また、Sub-Committee I の代表として、次年度から、合田に代わり川原が就任することが了承された。

## D. 結論

### D-1 漢方処方規格化に関する研究

日本薬局方に漢方処方エキスを収載する目的で、漢方処方の原案作成 WG 会議を 5 回開催し、日本漢方生薬製剤協会、日本生薬連合、東京生薬協会、薬剤師会、日本試薬協会、生薬等委員会等からの参加者の意見をとりまとめて、随時日本薬局方原案審議委員会生薬等 (A) 委員会に漢方処方 WG からの報告を行った。その結果、本原案作成 WG の報告を元にして、葛根湯加川芎辛夷エキス、麻黄湯エキス、大柴胡湯エキス、乙字湯エキスの 4 エキスの原案が完成し、16 局第二追補収載となった。さらに、残り 6 漢方処方エキス及び処方構成生薬の局方収載を目標として、技術的検討が進んでおり、桃核承気湯、防己黄耆湯、加味帰脾湯、防風通聖散、抑肝散の 5 エキスについては、17 局での収載にほぼ目処がたった。

### D-2 定量 NMR の利用に関する研究

サイコサポニン類及びチョウトウコウアルカロイド類、(-)-epigallocatechin 3-O-gallate 及び、(E)-ケイヒ酸について、バリデーション試験等を実施し、測定溶媒と内部標準物質、定量対象シグナルを決定した。また、ロスマリン酸について、使用溶媒等について予備的検討を行った。

### D-3 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

小青竜湯構成生薬のうち、ゴミシのゴミシン A 及びシザンドリン、カンゾウのリクイリチン及びリクイリチゲニン、サイシンのアサリニンについて血漿中濃度推移の比較を行い、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、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチンは同等性を評価する指標成分となる可能性が示唆された。

#### D-4 生薬の多様性と標準化に関する研究

国内市場に流通する人参および柴胡の熱水抽出エキスの LC/MS 分析データを用いて多変量解析を行った結果、生干人参と湯通人参、*B. falcatum* と *B. chinense* を判別するためのマーカー化合物となり得る成分を見出した。

#### D-5 漢方処方安全性、有効性に関する研究

まず、昨年度に引き続き、陳皮中の *L. reuteri* 増殖促進活性成分の同定を試み、活性成分が sucrose であることを明らかにした。また、同じ柑橘類生薬である枳実、青皮について sucrose 含量を測定したところ、枳実が最も糖含量が低く、次いで青皮、そして陳皮の順に糖含量が高く、陳皮は青皮より 3~6 倍も糖含量が高いことが確認された。更に、これらの生薬の *L. reuteri* 増殖促進活性を比較したところ、青皮と陳皮にはどちらも増殖促進活性がみられたが、sucrose 含量が高い陳皮の方が有意に活性が高かったことから、柑橘類生薬においては、sucrose 含量と *L. reuteri* 増殖促進活性に正の相関関係があることが確認された。

次いで、一般用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、乙字湯が 7 種の腸内細菌 (*Clostridium* 属 2 種、*Lactobacillus* 属 2 種、*Bifidobacterium* 属 3 種) の増殖に与える影響を調べた。その結果、乙字湯は、*Clostridium* 属、特に *C. difficile* (抗生物質

投与後に見られる下痢や腸炎の主な原因菌) に対して強い増殖抑制活性を示す一方、*Lactobacillus* 属及び *Bifidobacterium* 属の一部に対しては増殖促進活性を示すことが明らかとなった。また、*C. difficile* に対する増殖抑制活性を担う構成生薬は、大黃、黄芩、甘草であり、これらは大黃を中心として協調して活性を示すことが判明した。以上のことから、乙字湯が便秘や痔に対する効能を発揮する機序の一つとして、腸内細菌叢のバランスの乱れを改善することが考えられる。また、*Clostridium* 属の中でも *C. difficile* に対して特に強い増殖抑制活性がみられたことから、抗生物質投与等により *C. difficile* が日和見的に増殖した際の対応処方として乙字湯が有効である可能性が示唆された。

さらに、マウスマクロファージ様細胞をモデル系として用い、六君子湯の構成生薬半夏における抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性成分について特性解析を進めたところ、巨大分子量を持つことが分かった。ただし、単純な糖鎖ではなく、特殊な糖による糖鎖、あるいは、糖以外の高分子化合物であることが分かった。今後、活性本体の特定に向けてさらに検討を進める予定である。

#### D-7 新一般用漢方処方の手引きに関する研究

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、その後 3 回の改正を経て、平成 24 年 8 月 30 日発出の通知「一般用漢方製剤承認基準の改正について」(薬食審査発第 0830 第 1 号) において、81 処方の新たな承認基準が制定された大改訂も完了し、平成 25 年 9 月に本承認基準の内容に準拠した解説書として「新一般

用漢方処方の手引き」が上梓された。社会構造及び疾病構造が変化した現代において、一般用漢方製剤の承認基準が 30 数年ぶりに見直されたことは、国民のセルフメディケーションの選択肢を広げ、適切な健康管理に貢献するものと期待される。

#### D-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

生薬製剤承認審査基準原案策定の第一段階として、局方手引きに記載されている効能効果のうち、一般用医薬品としてわかりにくいものをわかりやすく読替えた効能効果読替え案を作成し、局方手引き改訂案とした。また、局方手引き収載生薬をエキス製剤として承認申請する際のブリッジングガイドライン「単味生薬と生薬エキス・生薬製剤等の同等性確保に関するガイドライン」(案)を作成、各生薬エキスの指標成分及びその確認試験法と定量法については具体例(案)も提示した。

#### D-9 生薬の品質確保に関する研究

ヒ素及び重金属含量が高い値を示した漢方処方エキスについて、多くの場合、これまでの実態調査で、高い 4 大金属含量を示す生薬(ハンゲ、ショウキョウ、ジオウ、サンヤク、ケイヒ、サイコ)が含まれた処方であった。今回の調査でも、比較的高い値を示す処方では、桂枝茯苓丸でケイヒ、柴胡桂枝湯で、ハンゲ、ショウキョウ、ケイヒ、釣藤散でハンゲ、ショウキョウ、補中益気湯でも、ショウキョウ(或いはカンキョウ)が含まれており、エキスでの金属の高含量は、概ね原料とした生薬に由来するものと考えられた。

分光測色計を用いて生薬滑石の色を測定し、識別が可能であるかどうか検討した。その結果、6 タイプ(タイプ A~F)すべてのタイプ間での識別は困難であった。しかし日中の薬局方収載

品間(タイプ A 及び D)での比較を行った場合、タイプ A とタイプ D は、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$ の各値において値が異なる上、検体間でのばらつきが比較的小さいため、分光測色計による識別が有効であると判断された。

#### D-10 TLC 試験法に関する研究

検討した、TLC による局方確認試験法未設定の 14 品目の生薬のうち、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカについては、適切な試験法が完成し、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案した。また、昨年度から検討を続けていたトウガラシの確認試験についても改正案を提案した。これらの試験法案は、日本薬局方の信頼性の向上と日本で用いられる生薬の品質の確保に貢献することが期待される。

#### D-11 生薬の国際調和に関する研究

第 11 回 FHH Standing Committee 会議に参加するとともに、Sub-Committee I の活動を継続した。日本が主催する Sub-Committee I では、各国薬局方の比較検討を以前より遂行しており、その成果として各国薬局方における生薬関連試験法の比較表を作成し、これらの内容に関する冊子を順次刊行してきた。本年は FHH 事務局より提供を受けた香港特別行政区の香港中薬材標準について、日本薬局方(及び局外生規)との収載生薬の品目の比較を行い、さらに両者の共通生薬について TLC 確認試験法の比較表を作成し、本会議において報告した。

#### E. 健康危機情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表等

- 1) Kammoto, T., Yomura, K., Kikuchi, Y., Hirakura, K., Makino, B., Hashimoto, K., Nishimura, H., Usui, K., Hakamatsuka, T., Goda, Y., Kawahara, N. and Kiuchi, F.: Discrimination between Prepared Glycyrrhiza and Glycyrrhiza by TLC. *Shoyakugaku Zasshi*, submitted (2014).
  - 2) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H. and Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation ( I ). *Shoyakugaku Zasshi*, accepted **68** (2014).
  - 3) Hosoe, J., Sugimoto, N., Suematsu, T., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki, H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T. and Goda, Y.: Preliminary studies for application of quantitative NMR (qNMR) in the Japanese Pharmacopoeia (I). *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **45**: 243-250 (2014).
  - 4) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H. and Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation ( I ). *Shoyakugaku Zasshi*, **68**: 9-12 (2014).
  - 5) Hoshino, T., Narukawa, Y., Haishima, Y., Goda, Y. and Kiuchi, F.: Two new sulfated oleanan saponins from *Achyranthes* root. *J. Nat. Med.*, **67**: 386-389 (2013).
  - 6) Goda, Y.: Characteristic features and challenges of crude drug and Kampo products as multicomponent mixtures. *The Journal of Practical Pharmacy*, **64**: 2777-2781 (2013).
  - 7) Goda, Y.: Introduction of quantitative NMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds *Pharmaceutical and Medical Device Regulatory Science*, **44**: 753-767 (2013).
  - 8) Goda, Y.: QNMR, application to regulatory sciences. *Kagaku to Kyoiku*, **61**: 300-305 (2013).
  - 9) 川原信夫: FHHにおける東アジア地域の生薬・薬用植物の国際調和の現状. *特産種苗*, **16**: 103-108 (2013).
  - 10) 川原信夫: 生薬規格の国際標準化と国際調和の動向 (ISO/TC249 と FHH), *漢方と最新治療*, **22**, 15-20 (2013).
  - 11) 袴塚高志: 一般用漢方製剤承認基準の制定及び改正について, *日本薬剤師会雑誌*, **65**(4), 371-375 (2013).
2. 学会発表等
- 1) 合田幸広, 多成分系としての生薬・漢方製剤の特性と課題, *日本薬剤学会第28年会*, 名古屋(2013.5).
  - 2) 合田幸広, 生薬及び漢方製剤の品質確保, *保健医療科学院薬事衛生管理研修*, 和光(2013.6).
  - 3) 堀井周文, 小此木明, 大窪俊樹, 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 (第2報), *第30回和漢医薬学会学術大会*, 金沢 (2013.8).
  - 4) 袴塚高志, ISO/TC249 における生薬製剤分野の動向, *第30回和漢医薬学会学術大会*, 金沢 (2013.9).
  - 5) 川原信夫, 伝統医学の国際標準化: 薬物分野を中心にWHO/FHHの話題. *第30回和漢医薬学会学術大会*, 金沢 (2013.9).
  - 6) 袴塚高志, ISO/TC249 における生薬及び関連製剤の国際標準化の動向, *日本生薬*