

201427025A

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 26 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 27 (2015) 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	15
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	19
小青竜湯エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 合田 幸広・鎌倉 浩之・堀井 周文	25
八味地黄丸エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 合田 幸広・鎌倉 浩之・堀井 周文	33
LC/MS 分析データを利用した生薬の品質評価に関する研究 合田 幸広・政田 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	
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・佐藤 直子	51
単味生薬製剤承認基準原案に関する研究 袴塚 高志・佐藤 直子	73

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	83

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 (2)	
-日本薬局方および中国薬典収載品の分光測色計による鑑別-	
川原 信夫	91
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	97
第12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	113
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	145
III 研究成果の刊行に関する一覧表	163

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、腸内環境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、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 エキスについて原案が完成し、第 17 改正日本薬局方収載予定となった。さらに、17 局以降の収載候補品目として 18 漢方処方エキスを選定した。

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、ロスマリン酸、レインについて、定量シグナルを決定するとともに、サイコサポニン b2 についても、市販形態を考慮した検討を行った。その結果、昨年度定量シグナルを決定した (E)-ケイヒ酸に加えて、新たにレイン、ロスマリン酸、サイコサポニン b2 について、qNMR を利用した試薬が供給できる見通しが立ち、13 品目の漢方処方エキス各条において、これらの試薬を利用した定量規格が採用されることになった。

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、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチンについて良好な結果が得られている。本年度は、カンキョウ由来の [6]-ショーガオール及びジングロ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、[6]-ショーガオールは同等性の指標となる可能性が示唆された。一方、ジングロンに関しては、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と考えられた。また、新たに八味地黄丸について同様の同等生に関する基礎的検討を実施した。対象成分としては、ブシ末のベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン、14-アニソイルアコニンを取り上げ、血漿中濃度推移を比較したところ、ベンゾイルメサコニン、14-アニソイルアコニンは同等性の評価に関する指標成分となりえ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：商品規格の多様性に富むシャクヤク及びセキシヤクを

対象として、LC/MS 分析と多変量解析を行った。その結果、シャクヤクとセキシャクの成分比較では、スクロース及びペオニフロリンが両者の判別に有効な成分として見出された。さらに、シャクヤクの成分比較では、産地や性状に関連する特異的な成分は見出されず、国内市場品の同等性が確認された。すなわち、LC/MS データを用いたメタボロミクス解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であることが示唆された。

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、半夏に含有される活性成分は、特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは、糖以外的高分子化合物であることを明らかにした。本年度は、タンパク質である可能性を視野に入れ、活性成分の特性のほか、効率的に活性本体を得る方法についても検討した。

単味生薬製剤承認基準原案に関する研究：「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。局方手引きは、主に煎剤あるいは末で服用することを規定しているが、今後開発される製剤はエキス製剤であることが想定される。これを踏まえ、実際に単味生薬をエキス製剤として承認申請する際に適用し得るよう改訂した「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン（原案）」を作成した。本年度は、この原案を元に「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」を策定し、パブリックコメントを経て、通知発出へ向けた記載整備を行った。

生薬の品質確保に関する研究：ヒ素、重金属含量が高い可能性のある柴朴湯、半夏厚朴湯、牛車腎気丸、柴苓湯、十全大補湯、小柴胡湯、無コウイ大建中湯、麦門冬湯及び苓桂朮甘湯の 9 処方 131 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、半夏厚朴湯 1 検体以外は、いずれも香港基準値を下回っていた。そこで、これらの処方のうち、鉛含量が 1.5ppm をこえていた半夏厚朴湯（11 検体）、小柴胡湯（3 検体）及び苓桂朮甘湯（1 検体）について、その構成生薬 9 種（コウボク、ソヨウ、ショウキョウ、ハンゲ、サイコ、オウゴン、ニンジン、ケイヒ及びビャクジュツ）62 検体を対象に、同様のヒ素、重金属分析を実施した。その結果、鉛が検出された要因は原料とした一部の生薬（コウボク、ソヨウ、サイコ、ビャクジュツ）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。その結果、JP カッセキと CP 滑石では、 L^* 、 a^* 、 b^* すべての値で有意な差が認められた ($p < 0.01$)。特に L^* 値と b^* 値における差が顕著であり、JP カッセキは CP 滑石に比べて、 L^* 値は小さく、 b^* 値は大きい傾向にあり、両者は、分光測色計により有意に識別が可能であることが明らかになった。

TLC 試験法に関する研究：今年度は、14 品目について新たな TLC による確認試験を検討し、アマチャ、シャゼンシ、シユクシャ、モッコウ、レンギョウについて新規試験法を作成、TLC クロマトグラム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した。

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

人民共和國香港特別行政區衛生署が作成・刊行した、香港中薬材標準(Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, HKCMSS)と、日本の局方及び局外生規との共通収載生薬 68 種について、定量法の比較表の作成を行った。その結果、共通収載生薬のうち日本薬局方(及び局外生規)において定量法が規定されている生薬は 17 種であった。また、シンガポールで行われた FHH の Standing Committee 及び、5th FHH 国際シンポジウムに出席した。Standing Committee では、日本の生薬の公的規格に関する最新情報と Sub-Committee 1 の活動等について報告した。また国際シンポジウムでは、日本は我が国のショウマ類を含む製品の現状について発表を行った。

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)の実態を示すと同時に、最終製品中でどのようにコントロールしうるかを明らかにし、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}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, 小青龍湯及び八味地黄丸とも被験者総数は 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, 小青龍湯では, カンキョウ由来の [6]-ショールガオール及びジングロンを, 八味地黄丸ではブシ末由来のベンゾイルメサコニン, ベンゾイルヒパコニン, 14-アニソイルアコニンを取り上げた。

B-4 生薬の多様性と標準化に関する研究

本研究に用いた芍薬 32 ロット及び赤芍 16 ロットは, 国内の生薬メーカー及び医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部より譲り受けたものである。LC/MS 分析の測定条件は以下の通りである。LC 部: Acquity UPLC I-Class FL (Waters)。カラム Acquity UPLC HSS C18, 2.1 x 100 mm, 1.8 μm (40 $^{\circ}$ C), 移動相 A = 0.1 % ギ酸水溶液, B = 0.1 % ギ酸アセトニトリル溶液, グラジエント B = 10 - 20% (0 - 4 min) - 70% (7.5 min) - 98% (8.5 - 9.5 min), 流速 0.4 mL/min, MS 部: Synapt G2-Si (Waters), ESI negative。

多変量解析には, SIMCA-P⁺ 12 (Umetrics) を用い, 主成分分析 (PCA) および判別分析 (OPLS-DA) を行った。データの標準化には, 平均化後に標準偏差の平方根で除するパレートスケール (Par) を適用した。

B-5 漢方処方の安全性, 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。レクチン検出試験は, IWAKI 製の丸底の 96 穴マイクロプレートで行い, コスモ・バイオ株式会社製のウサギ保存血液を用いた。サイトカインの定量には, Meso Scale Discovery 社の 96-Well Mouse Cytokine Assays Tissue Culture Kit を用いた。

B-6 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

昨年度までに, 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) (以下、同等性ガイドライン案) を作成した。平成 26 年度は引き続き、実際の承認申請の状況を想定しながら同等性ガイドライン案の改訂を行い、「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン(原案)」を作成した。この開発ガイドラインを通知として発出するべく、厚労省よりパブリックコメントが募集された。得られたコメントのうち、開発ガイドライン原案の記載に関するものについて、厚生労働省医薬食品局審査管理課の依頼を受け、記載整備を行った。

B-7 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半夏厚朴湯(11 検体)、小柴胡湯(3 検体)及び苓桂朮甘湯(1 検体)の構成生薬 9 種(コウボク、ソヨウ、シヨウキョウ、ハンゲ、サイコ、オウゴン、ニンジン、ケイヒ及びビャクジュツ) 62 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、日本薬局方規格適合品(JP カッセキ)と中華人民共和国薬典規格適合品(CP 滑石)各 10 検体を実験材料とした。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-8 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、サイシン、サンヤク、チモ、ハッカ、アマチャ、キキョウ、シユクシャ、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 14 品目である。

B-9 生薬の国際調和に関する研究

第 12 回 FHH Standing Committee (シンガポール, 11 月 25-26 日) 及び、第 5 回 FHH 国際シンポジウムに参加した。また、日本が主催する Sub-Committee I (Nomenclature and Standardization) 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 17 局に記載する漢方処方エキスの候補品目について、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。

本年度取り扱った防風通聖散では、19 の構成生薬の確認試験のうちレンギョウ、ケイガイ、キキョウ、カッセキ、ハマボウフウ、ボウショ

ウの6品目が新規分析法であり、大きな課題であった。このうち、キキョウについてはplatycodin D(トリテルペン配糖体)を確認するTLC試験法を確立した。また、レンギョウについては、レンギョウ抽出液を対照として、特に帯状にスポットし、Rf0.4 付近の赤紫色のスポット (rengyol) 確認することとなった。また、ケイガイは、pulegoneの含有量にばらつきがある上、TLCでの分離が難しく、ブランクと余り差がでないことから、ロスマリン酸(ハッカにも含まれるので、両者の確認)をTLCで確認、ハマボウフウは、TLCでscopoletinを確認することになった。無機化合物であるカッセキ、ボウショウはセッコウとともに様々な検討を行ったが、各メーカーにより、最終的な製剤中の含有量が異なり、規格設定が難しいことが判明した。セッコウの場合、主成分はCaSO₄であるが、蔞酸アンモニウム試液添加でも全く沈殿を生じないエキスも存在した。本件については、沈殿を生じなかったメーカーの製造方法を工夫して頂くことで、Ca塩の沈殿が確認出来るようになり、最終的に、同方法による規格設定に至った。カッセキの場合は、アンモニアアルカリ性下、アリザリンレッドS試液を加えた際の赤色変化を確認する方法を検討したが、様々な発色パターンがある上、赤く発色しない試料も存在し、最終的に本生薬の確認試験を規格に加えることを断念した。ボウショウの場合、確認する方法は、Na⁺あるいは、SO₄²⁻イオンということになるが、前者は、他の植物生薬からも由来するものと考えられるため、後者を選択し、セッコウ・ボウショウとして、硫酸塩の定性反応により確認することになった。

防己黄耆湯では、オウギの成分の定量法についての検討を多数行った。指標成分としては、astragaloside IVが候補になったが、0.01%程度しか含量がなく、最終的にTLCによる、標準溶液との比較による半定量法(0.005%以上)となった。また、シノメニンのHPLCによる定量で

は、同時に検出するグリチルリチン酸及び、ボウイ由来の複数の他ピーク(1成分はマグフロリン)とシノメニンが十分に分離するカラムを選択する必要がある、これらの成分とのピークの分離度でシステムの適合性を規定することになった。

桃核承気湯では、漢方エキス調製時にセンノシドがアントラキノン類に変換される場合もあることを考慮して、局外生規センナエキスでの手法を参考として、センノシドでなくレインも定量指標成分として規定してもよい規格とした。

加味帰脾湯では、ほぼ去年の段階で原案が決まっていたが、カンゾウ及び生姜の確認試験について防風通聖散で検討した方法に変更した。

五苓散エキスの場合、タクシャ由来の成分の定量法の設定が難航しており、最終的に、生薬タクシャの確認試験法として17局に収載となったアリソール類の分析法を参考として、単一成分への集約の後、TLCによる半定量法を規定する方向で、17局第一追補収載を目指して検討中である。

抑肝散については、昨年度以降、特に大きな問題もなく、収載案が決定された。

また、17局以降の収載候補品目として、猪苓湯、温経湯、柴胡加竜骨牡蛎湯、人参養榮湯、白虎加人参湯、麻黄附子細辛湯、十味敗毒湯、麻子仁丸、荊芥連翹湯、当帰四逆加呉茱萸生姜、桂枝加朮附湯、疎経活血湯、呉茱萸湯、柴胡桂枝乾姜湯、温清飲、清心蓮子飲、辛夷清肺湯、抑肝散加陳皮半夏の18エキスを選定した。

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、ロスマリン酸、レインについて、定量シグナルを決定するとともに、吸湿性のあるサイコサポニン b2 についても、市販形態を考慮し

た検討を行った。

サイコサポニン b2 そのものは、溶液中で安定であることが判明している。そこで、試薬の供給形態として、qNMR で値付けしたものを、定量的にメタノールに溶解し、そのものを電動ピペットで分注、真空乾燥機で乾燥した後、水/メタノール混液 (1/1) 溶液 2mL を加えて、HPLC 試料溶液として販売する形態を考案した。この系では、最大の誤差の原因は、電動ピペットでの分注作業であるものと考えられる。予備的な実験での質量測定での相対標準偏差は 0.17% であり、この値は、同物質の 11-H 位についての qNMR の測定相対標準偏差 0.16% -0.21% (600MHz) と匹敵するものであった。従って、この方法で、試薬を供給することが出来れば、現実的な解決が可能と考えられ、局方で、qNMR で値付けしたサイコサポニン b2 を採用することとなった。

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。

分散分析の結果、[6]-ショウガオール 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、ジンゲロン の C_{max} では、薬剤の項が有意であった。 C_{max} 及び AUC に関して、[6]-ショウガオールでは個体差が認められた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、[6]-ショウガオールでは C_{max} は 76%、AUC は 72% 程度であり、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を得るため被験者数を推定することとした。被験者数を増やしても同様のデータが得られると仮定して被験者数の計算を行ったところ、十分な検出力を得るためには、1群5人以上の被験者が必要となることが判明した。従って、[6]-ショウガオールは、被験者の数を増やすことで、同等性の評価に関する指標成分となる可能性が示唆された。一方、ジンゲロンは血漿中濃度が低く、検出はされたものの十分な感度が得られなかった。

八味地黄丸に関する今回の結果では、ベンゾイルメサコニン及びベンゾイルヒパコニンの血漿中濃度推移は 2 峰性を示した。一方、14-アニソイルアコニンは単峰性であり、血漿中濃度推移が前 2 者よりも評価しやすい成分であると考えられた。ベンゾイルメサコニン及びベンゾイルヒパコニンの血漿中濃度推移が 2 峰性を示したことは、過去の報告でもあり、腸管循環や pH による吸収の差が異なること、腸内で吸収する部位が異なることなどに由来すると考えられている。また、ベンゾイルメサコニン、ベンゾイルヒパコニン及び 14-アニソイルアコニンの AUC については湯剤より製剤が大きい結果となった。これまで検討した葛根湯及び小青竜湯についても湯剤に比べ製剤の AUC が大きい傾向が認められているが、この理由としては湯剤と製剤での賦形剤の違いによる可能性がある。分散分析の結果、ベンゾイルメサコニンの AUC は被験者の項が有意であり、個体差が認められたもののエキス製剤と湯剤の間に差は検出されなかった。またそれ以外の成分に関しては、薬剤、時期及び被験者のいずれの項においても差が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、ベンゾイルメサコニ

ンに関しては C_{max} は 13%, AUC は 16% 程度であった。ベンゾイルヒパコニンに関しては C_{max} 及び AUC のいずれも 10% 以下であった。14-アニソイルアコニンに関しては C_{max} は 13%, AUC は 14% 程度であり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を得るため被験者数を推定することとした。被験者数を増やしても同様のデータが得られると仮定して被験者数の計算を行ったところ、十分な検出力を得るためには、ベンゾイルメサコニンでは 1 群 24 人以上の、14-アニソイルアコニンは 1 群 25 人以上の被験者数が必要となることが判明した。一方、ベンゾイルヒパコニンでは 1 群 61 人以上でも十分な検出力が得られないことが判明した。分析を行った 3 成分に関して、投与に使用した八味地黄丸湯剤及び製剤においては 14-アニソイルアコニンの含量が最も高く、ベンゾイルメサコニンは 14-アニソイルアコニンの 1~1/2、ベンゾイルヒパコニンは 14-アニソイルアコニンの約 1/10 の含量であった。一方、3 成分の AUC を比較すると 14-アニソイルアコニンの値が最も高く、ベンゾイルメサコニンの値はベンゾイルヒパコニンの 1.3~1.5 倍程度であり 14-アニソイルアコニンの ~1/10 程度であった。以上、今回の結果からベンゾイルメサコニン及び 14-アニソイルアコニンは同等性の評価に関する指標成分となる可能性が示唆された。今後、その他の生薬についての可能性についても行う必要があると考えられた。

C-4 生薬の多様性と標準化に関する研究

全 48 品目 96 サンプルについて、LC/MS 測定とピーク抽出を行い、1,362 のピークを得た。PCA-X による主成分分析の結果、芍薬及び赤芍はスコアプロット上で、第一主成分が負の値を

示すグループ A、第二主成分が負の値を示すグループ B、第一主成分と第二主成分共に正の値を示すグループ C に大別することができた。このうち、グループ A は主に日本産の芍薬 22 品目、グループ B は主に中国産の芍薬 10 品目、グループ C には赤芍 16 品目から成り、日本国内に流通する芍薬と赤芍は概ね、成分によって区別可能であることが示された。さらに、ローディングプロットから、第一主成分に対して負の寄与を示し、グループ A の形成に影響する成分として sucrose、第一、第二の両主成分に対して正の寄与を示し、グループ C の形成に影響する成分として paeoniflorin と推定される化合物が見出され、グループ B の形成に大きく寄与する成分は見つからなかった。すなわち、日本産芍薬は中国産芍薬よりも sucrose を多く含む傾向があり、赤芍は芍薬よりも sucrose が少なく paeoniflorin を多く含む傾向があることが明らかになった。生薬中の糖の含量は、加工・調製法や貯蔵期間によって変化すること、また paeoniflorin がシャクヤクの皮に多く含まれることは、既によく知られており、実際、HPLC や NMR 等の従来定量法によって、sucrose と paeoniflorin が芍薬と赤芍の判別の指標となり得ることが報告されている。今回、LC/MS データの多変量解析という新たなアプローチによって、既報と同様の結果が得られたことから、本評価法は生薬の品質管理・評価法の一つとして有用であると考えられた。

次に、シャクヤクの主成分分析として日本産及び中国産の芍薬 32 品目 64 サンプルの LC/MS 測定データについて、PCA-X による主成分分析を行った。その結果、スコアプロット上で、新潟産、長野産、中国産の皮付き芍薬のグループが確認された。一方、富山産及び兵庫産芍薬は

サンプル数が少ないため分類できず、奈良産及び北海道産芍薬は分布が分散しており、明確なグループは確認できなかった。さらに、ローディングプロットからは、新潟産、長野産、中国産芍薬のグループ形成に大きく寄与する成分は見出せず、成分情報から芍薬の産地や性状の判定を行うことは困難だった。すなわち、国内市場に流通する芍薬の成分差異は比較的小さく、品種や産地、加工調製法が異なっているにもかかわらず、その品質は比較的安定していることが示唆された。このことから、LC/MS データを用いた多変量解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であると考えられた。

C-5 漢方処方安全性、有効性に関する研究

昨年度までの研究で、半夏に含まれる活性成分は特殊な糖より構成される糖鎖、あるいは糖以外的高分子化合物であることを明らかにしている。そこで、本年度はタンパク質である可能性を視野に入れ、活性画分を酸加水分解しアミノ酸が生成するかどうかを TLC にて確認した。その結果、ニンヒドリン反応陽性のスポットを確認し、活性画分にはアミノ酸で構成されるものが含まれていることが示唆され、タンパク質の存在が推察された。

次いで、赤血球凝集試験を実施し、糖タンパク質のひとつであるレクチンの可能性を調べたところ、どの画分を用いた場合も赤血球の凝集は見られず、IL-10 発現増強活性画分にはレクチンが含まれていないか検出限界以下の量であることが示された。

TLC によりアミノ酸が検出されたことをうけ、活性成分がタンパク質である可能性を確認するため、人参、甘草、半夏のそれぞれについてタンパク質粗抽出画分及びその硫酸アンモニウム画分を調製した。これらのサンプルについ

て、RAW264.7 細胞における IL-10 発現増強活性を調べたところ、どの生薬由来のタンパク質画分でも強い IL-10 発現増強活性が示された。硫酸アンモニウム沈澱により得た画分でもその活性は保持されていた。そこで、ゲル濾過により粗タンパク質抽出画分について精製を行い、IL-10 増強活性を調べた。その結果、人参や甘草の生薬由来サンプルにおいて、ゲルろ過カラムによる分画前には強い IL-10 発現増強活性が確認されたが、カラム分画後にはほぼみられなくなった。これは、IL-10 発現増強活性をもつタンパク質などが過酷な環境下で変性し、その活性を失ったためと考えられた。半夏においても同様の現象がみられたが、半夏の単味生薬エキスにおける活性成分と同様の挙動を示す画分の存在も確認され、この画分に含まれる活性成分は目的の成分と同じものである可能性が示唆された。今後、抽出方法を洗練させることで効率的に目的の活性成分を得、同定にむけた検討を進めていく予定である。

C-6 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

ガイドラインのパブリックコメントは、平成 26 年 9 月 1 日から 10 月 3 日の期間で募集された。寄せられたコメントのうち、開発ガイドライン原案の記載に関するものについて、厚生労働省医薬食品局審査管理課に協力し、主に以下の記載整備を行った。開発ガイドライン策定時の記載ミスと思われるものの修正。オンジやケイヒなど、今回初めて収載した生薬や効能効果に関するご意見について、科学的根拠を見直したうえでの記載整備。なお、平成 27 年 1 月現在、開発ガイドラインについて詰め検討が行われており、今年度中には開発ガイドラインが通知として発出される予定である。

C-7 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、半夏厚朴湯において、4種類の処方構成生薬のうちコウボク及びソヨウから鉛が高値で検出されており、エキスから鉛がある程度検出されたのは原料としたこれらの生薬に由来するものと考えられた。小柴胡湯において、5種類の処方構成生薬のうちサイコから鉛が高値で検出されており、エキスからある程度鉛が検出されたのは原料とした本生薬に由来するものと考えられた。苓桂朮甘湯において、2種類の処方構成生薬ケイヒ及びビヤクジュツのいずれからも鉛が高値で検出されており、エキスからある程度鉛が検出されたのは原料としたこれらの生薬に由来するものと考えられた。

滑石に関する研究では、に JP カッセキと CP 滑石では、 L^* 、 a^* 、 b^* すべての値で有意な差が認められ ($p < 0.01$)、特に L^* 値と b^* 値における差が顕著であった。 L^* 値は、JP カッセキでは 86.4~91.8 (平均値 89.7)、CP 滑石では 91.8~96.6 (平均値 94.5) であった。 b^* 値は、前者では 5.02~8.93 (平均値 6.27)、後者では 1.67~3.30 (平均値 2.50) であった。 b^* 値に関しては、値が 4 を境に、4 以上は JP カッセキで、4 未満は CP 滑石であった。従って、CP 滑石に比べて JP カッセキは、 L^* 値が小さく、 b^* 値は大きい傾向にあり、両者は、分光測色計により有意に識別可能であることが明らかになった。

C-8 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。今年度は日局に TLC による確認試験が設定されていない 14 の生薬について検討を行い、アマチャ、シャゼンシ、シュクシャ、タクシャ、モッコウ、レンギョウについて新たに TLC による確認試験

を作成して、日本薬局方原案審議委員会生薬等委員会に提案した。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。

C-9 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) と日本薬局方 (及び局外生規) との共通収載生薬 68 種について、定量法の比較表の作成を行った。その結果、共通収載生薬のうち日本薬局方 (及び局外生規) において定量法が規定されている生薬は 17 種であった。HKCMSS は全収載生薬について定量法が規定されていることを特徴とし、日本薬局方 (及び局外生規) において定量法が未規定の生薬の定量法の検討においては、これらの情報を参考とする余地があると考えられる。

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、袴塚、政田 (以上国立衛研)、川原、河野 (以上医薬基盤研) が参加した。合田が、日本の生薬の公的規格のこの 1 年のトピックを総括的に報告、川原が Sub-Committee I (Nomenclature and Standardization) の活動 (HKCMSS との比較) について報告した。FHH のメンバー各国においては、生薬並びに生薬製剤の監視・審査制度を強化する動きを活発化しており、これらの安全性確保に対する各国の強い意思が感じられた。また、各国間の試料提供による比較研究の進展や、

薬局方の改訂において他国の薬局方情報を参考とした事例などが報告され、FHH の目標とする国際協調の成果が際立った会議となった。なお、合田、木内は、本年度で、日本選出の Standing Committee メンバーをやめ、次年度からは、袴塚、川原が同メンバーになることを報告した。国際シンポジウムでは、政田が我が国のショウマ類を含む製品の現状について発表を行った。また、本発表の質疑において、合田が日本の食薬区分について解説した。

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、本研究課題で実施された漢方処方の原案作成WGの報告を元にして、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エキスの原案が完成し、第17改正日本薬局方収載予定となった。

D-2 定量NMRの利用に関する研究

昨年度定量シグナルを決定した(E)-ケイヒ酸に加えて、新たに、レイン、ロスマリン酸、サイコサポニン b2 について、qNMR を利用した試薬が供給できる見通しが立ち、以下の各条において、これらの試薬を利用した定量規格が採用されることになった。

加味帰脾湯エキス：サイコサポニン b2, ゲニポシド (既収載試薬)

桃核承気湯エキス：レイン, (E)-ケイヒ酸,

抑肝酸エキス：サイコサポニン b2,

乙字湯エキス：サイコサポニン b2, レイン

桂枝茯苓丸エキス：(E)-ケイヒ酸,
紫胡桂枝湯エキス：サイコサポニン b2,
柴朴湯エキス：サイコサポニン b2
紫苓湯エキス：サイコサポニン b2
小紫胡湯エキス：サイコサポニン b2
大紫胡湯エキス：サイコサポニン b2
補中益気湯エキス：サイコサポニン b2
苓桂朮甘湯エキス：(E)-ケイヒ酸,
半夏厚朴湯エキス：ロスマリン酸

D-3 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

小青竜湯成分のうち、カンキョウ由来の[6]-ショーガオールは同等性の指標となる可能性が示唆された。また、八味地黄丸成分のうち、ブシ末由来のベンゾイルメサコニン、14-アニソイルアコニンは同等性の評価に関する指標成分となりえ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

芍薬及び赤芍を対象として、LC/MS 分析と多変量解析を行い、試料の差異や同等性についての品質評価を行うと同時に、生薬の品質管理・評価におけるメタボロミクス解析の有用性を検討した。芍薬と赤芍の成分比較では、両者の判別に有効な成分として既報と同様の結果が得られ、芍薬の成分比較では、試料の同等性が確認された。すなわち、LC/MS データを用いた多変量解析は、生薬の規格判別のみならず、同等性評価においても有用であることが示唆された。

D-5 漢方処方の安全性、有効性に関する研究

マクロファージ様細胞をモデル系として用い、半夏における炎症性サイトカイン IL-10 の発現増強活性成分についてその特性を明らかにしてきた。本年度は活性本体の特定のため、効率的に目的の活性成分を得る抽出法の検討

を行い、従前の抽出法より簡潔に得られる可能性を見出した。

D-6 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」を策定し、パブリックコメントを経て、通知発出へ向けた記載整備を行った。

D-7 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。今回の調査では、サイコ、ケイヒに加え新たに、コウボク及びソヨウ、ビャクジュツの一部試料から鉛が高値で検出されており、エキスからある程度鉛が検出されたのは原料とした本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、JP カッセキと CP 滑石では、 L^* 、 a^* 、 b^* すべての値で有意な差が認められ、両者は、分光測色計による識別が可能であることが明らかとなった。

D-8 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、アマチャ、シャゼンシ、シュクシャ、モッコウ、レンギョウについて TLC による確認試験法を設定した。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-9 生薬の国際調和に関する研究

第 12 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と日本薬局方（及び局外生規）との共通生薬に関し、定量法の比較を行い本会議で報告した。また、第 5 回国際シンポジウムで、日本は我が国のショウマ類を含む製品の現状について発表を行った。

E. 健康危機情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表等

- 1) Oshima, N., Zaima, K., Kamakura, H., Hamato, A., Yamamoto, Y., Kang, D. H., Yokokura, T., Goda, Y., Hakamatsuka, T. and Maruyama, T.: Identification of marker compounds for Japanese Pharmacopoeia non-conforming jujube seeds from Myanmar. *J. Nat. Med.*, **69**: 58-75 (2015).
- 2) Hanaoka, N., Ishizuka, Y., Hayashi, K., Tu, P., Kammoto, T., Hakamatsuka, T. and Goda, Y.: Comparison of the constituents of the original plants of crude drugs *Cistanchis Herba* and *Boschniakia Herba*. *Shoyakugaku Zasshi*, **60**: 1-9 (2015).
- 3) 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, 68: 70-77 (2014).
- 4) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H. and Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I).
Shoyakugaku Zasshi, 68: 65-69 (2014).
- 5) Goda, Y., Standardization of crude drugs and Kampo medicines in Japanese Pharmacopoeia, pp166-172, CMC Publishing (2014).
- 6) Goda, Y. and Kiuchi, F.: Current situation and challenge of "Crude Drugs" in the Japanese Pharmacopoeia".
Regulatory Science of Medicinal Products, 4: 155-160 (2014).
2. 学会発表等
- 1) 合田幸広, 生薬・生薬製剤に関する12年3ヶ月, 日本漢方製剤協会講演会, 東京 (2014. 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 (2014. 5).
- 3) 合田幸広, 医薬品としての生薬・薬用植物薬学的視点からの共創的連携, 大阪大学総合学術博物館学術シンポジウム, 大阪 (2014. 6).
- 4) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 三浦亨, 山田裕子, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊池祐一, 山下忠俊, 合田幸広, NMRによる定量分析技術“AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)”の日本薬局方試薬への応用, プロセス化学会 2014 サマーシンポジウム (2014. 7) 東京.
- 5) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 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3報), 第31回和漢医薬学会学術大会 (2014. 8) 千葉.
- 6) Suematsu, T., Hosoe, J., Sugimoto, N., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T., Goda, Y. Application of AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance) to the reagents in the crude drug section of the Japanese Pharmacopoeia, The 8th JSP-CCTCN-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, (2014. 9) Fukuoka.
- 7) 木内文之: 生薬の品質評価と有効成分. 日本生薬学会第61回年会, (2014. 9) 福岡.
- 8) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 山田裕子, 三浦亨, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊池祐一, 山下忠俊, 合田幸広, AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)による天然由来成分の純度評価のための基礎研究, 天然有機化合物討論会 (2014. 10) 高知.
- 9) Goda, Y., Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines, 2014 International Summit on Innovative Drug Discovery, Charting the Course of Standardization of Chinese Materia Medica (2014. 11) Hong Kong.
- 10) 杉本直樹, 石附京子, 田原麻衣子, 細江潤

- 子, 多田敦子, 大槻 崇, 河崎裕美, 佐藤恭子, 合田幸広, 穂山 浩: 食品添加物等の NMR スペクトル検索システムの検討. 第 51 回全国衛生化学技術協議会年会 (2014. 11) 別府.
- 11) 合田幸広, 一般用漢方処方について行って来たこと, 第 47 回社団法人日本漢方交流会全国学術集会, 京都(2014. 11).
- 12) Goda, Y., Pharmacopoeial topics on herbal medicines in Japan from 2013 to 2014, The 12th Standing Committee Meeting of FHH, Singapore (2014. 11).
- 13) 合田幸広, 医薬品としての生薬の品質評価, 北里WHO・COIシンポジウム (兼漢方診療標準化プロジェクト第2回シンポジウム), 横浜 (2014. 12).
- 14) 堀井周文, 小此木明, 高橋隆二, 鎌倉浩之, 袴塚高志, 合田幸広: 八味地黄丸エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究 (第 1 報), 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3) 神戸.
- 15) 鎌倉浩之, 細江潤子, 袴塚高志, 合田幸広: 漢方エキス中の水銀, ヒ素, 鉛及びカドミウムについて, 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3) 神戸.
3. その他
- 1) 第 17 改正日本薬局方原案, 核磁気共鳴 (NMR)法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用 (改訂), 定量 NMR に使用する機器の性能の管理, 日本薬局方フォーラム, 23(4), 727-728 (2014).
- 2) 第 17 改正日本薬局方原案, 試薬・試液, (E)-ケイヒ酸, 定量用; サイコサポニン b2, 定量用; ロスマリン酸, 定量用; サイコサポニン b2 標準試液, 定量用; レイン, 定量用; 日本薬局方フォーラム, 23(4), 607-610, 690, 694 (2014).
- 3) 第 17 改正日本薬局方原案, 加味帰脾湯, 桃核承気湯, 防己黄耆湯, 防風通聖散, 抑肝散エキス, 日本薬局方フォーラム 23 (4) pp687-690, 691-694, 695-704.
- 4) 第 17 改正日本薬局方原案, 各種漢方処方一部改正案, 日本薬局方フォーラム 23 (4) pp 704-707, 707-709, 711, 712, 713, 714, 715, 716.
- 5) 東京生薬協会, 日本薬局方「タクシャ」の新規確認試験 (原案) の設定経緯, 生薬学雑誌, 69(1) 39 (2015).

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）
分担研究報告書

分担研究課題

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

研究分担者 合田幸広 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部長

漢方処方日本薬局方原案作成に関する研究

要旨 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会議を平成26年度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、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エキスの原案が完成し、第17改正日本薬局方収載予定となった。さらに、17局以降の収載候補品目として18漢方処方エキスを選定した。

研究協力者

川原信夫（医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター）

木内文之（慶應義塾大学薬学部）

袴塚高志（国立医薬品食品衛生研究所）

以上生薬等委員会。

塚田正論（医薬品医療機器総合機構）

三上正利（日本薬剤師会薬局製剤・漢方委員会）

小此木明，堀井周文，近藤誠三，高尾正樹，田村 真，川崎武志，玉木智生，石崎昌洋，山本藤輔，岩嶋 浄，西川加奈子，山田修嗣（日本漢方生薬製剤協会）

有本恵子（日本生薬連合会）

菊地祐一，神本敏弘（東京生薬協会）

佐藤陽子，高谷和広（日本試薬協会）

山下忠俊（常磐植物化学）

政田さやか（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

漢方処方製剤の品質確保を目指し、日本薬局方に漢方処方エキスを収載する目的で、事前にどのような規格が可能か、実際に漢方処方製剤を販売している業界団体の関係者と日本薬局方生薬等委員会の委員、エキス製剤の原料を供給する生薬団体、分析試薬を準備する試薬業界団体の関係者及び日本薬剤師会の関係者が定期的に集まり意見交換を行う。また、漢方処方エキスの原料である一部の生薬の規格及び、漢方処方エキスの規格で使用する試薬・試液の規格についても意見交換を行う。

B. 研究方法

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する。

C. 研究結果・考察

本WG会議は、平成26年4月28日、同年6月27日、同年9月10日、同年12月2日、平成26年3月3日(予定)の5回開催された。WG会議では、特に17局に収載する漢方処方エキスの規格化を検討するとともに、17局以降の収載候補品目として、医療用漢方処方エキスの売り上げ順位(50位程度まで)に、OTCの売り上げ順位も加味して、猪苓湯、温経湯、柴胡加竜骨牡蛎湯、人参養榮湯、白虎加人参湯、麻黄附子細辛湯、十味敗毒湯、麻子仁丸、荊芥連翹湯、当帰四逆加呉茱萸生姜、桂枝加朮附湯、疎経活血湯、呉茱萸湯、柴胡桂枝乾姜湯、温清飲、清心蓮子飲、辛夷清肺湯、抑肝散加陳皮半夏を選定した。これら18エキスにこれまで16局第二追補まで収載された28処方、17局で収載が決まった5処方エキス(桃核承気湯、防己黄耆湯、加味帰脾湯、防風通聖散、抑肝散)、さらに既に原案を作成中である五苓散を合わせると、52処方エキスとなる。これらのエキスのうち、猪苓湯、温経湯の場合には、生薬としてアキョウの収載が前提となる。アキョウの場合、漢方処方エキス製剤で多く使用されている局方ゼラチンとの関係をどのように整理するかが今後の課題となる。なお、医療用漢方処方で売り上げが28位(2012年)と上位にある半夏白朮天麻湯は、処方構成生薬であるシンキクの基原をどのように定義するかの問題があり、収載候補品目に選定しなかった。

前年度からの課題である17局への収載候補品目については、防風通聖散の19の構成生薬の確認試験のうち、レンギョウ、ケイガイ、キキョウ、カッセキ、ハマボウフウ、ボウショウの6品目が新規分析法であり、本年度の大きな課題であった。このうち、キキョウについてはplatycodin D(トリテルペン配糖体)を確認するTLC試験法を確立した。また、レンギョウについては、レンギョウ抽出液を対照として、特に帯状

にスポットし、Rf0.4付近の赤紫色のスポット(rengyol)確認することとなった。また、ケイガイは、pulegoneの含有量にばらつきがある上、TLCでの分離が難しく、ブランクと余り差がでないことから、ロスマリン酸(ハッカにも含まれるので、両者の確認)をTLCで確認、ハマボウフウは、TLCでscopoletinを確認することになった。

無機化合物であるカッセキ、ボウショウはセッコウとともに様々な検討を行ったが、各メーカーにより、最終的な製剤中の含有量が異なり、規格設定が難しいことが判明した。セッコウの場合、主成分はCaSO₄であるが、蓆酸アンモニウム試液添加でも全く沈殿を生じないエキスも存在した。本件については、沈殿を生じなかったメーカーの製造方法を工夫して頂くことで、Ca塩の沈殿が確認出来るようになり、最終的に、同方法による規格設定に至った。

カッセキの場合は、主成分は、含水ケイ酸アルミニウム及び二酸化ケイ素であり、アルミニウムの定性反応として、アンモニアアルカリ性下、アリザリンレッドS試液を加えた際の赤色変化を確認する方法を検討したが、様々な発色パターンがある上、赤く発色しない試料も存在した。これらの試料液について、ICP-MS等により含有金属分析も実施したが、色差に関する明確な理由は判明しなかった。カッセキの場合、含有成分の生理活性を期待して処方に加えられているというより、カッセキを加えることで他の生薬由来の成分の抽出を抑える等の理由で処方に加えられているものと推定されるため、最終的に本生薬の確認試験を規格に加えることを断念した。

ボウショウの場合、確認する方法は、Na⁺あるいは、SO₄²⁻イオンということになるが、前者は、他の植物生薬からも由来するものと考えられるため、後者を選択し、セッコウ・ボウショウとして、硫酸塩の定性反応により確認することになった。

防己黄耆湯では、オウギの成分の定量法につ

いての検討を多数行った。指標成分としては、astragaloside IVが候補になったが、0.01%程度しか含量がなく、最終的にTLCによる、標準溶液との比較による半定量法(0.005%以上)となった。また、シノメニンのHPLCによる定量では、同時に検出するグリチルリチン酸及び、ボウイ由来の複数の他ピーク(1成分はマグノフロリン)とシノメニンが充分に分離するカラムを選択する必要がある、これらの成分とのピークの分離度でシステムの適合性を規定することになった。

桃核承気湯と乙字湯(既記載処方)では、漢方エキス調製時にセンノシドがアントラキノン類に変換される場合もあることを考慮して、局外生規センナエキスでの手法を参考として、センノシドでなくレインも定量指標成分(その場合センノシド類はレインに変換)として規定してもよい規格とした。なお、レインは、定量NMRで純度が規定された試薬が供給されることになっている。

加味帰脾湯では、ほぼ昨年の段階で原案が決まっていたが、カンゾウ及び生姜の確認試験について、防風通聖散で検討した方法(リクイリチンの検出に希硫酸+加熱後、UV照射で蛍光検出、及び6-ギンゲロールの確認に、色調を安定させるため水噴霧を規定)に変更した。

五苓散エキスの場合、タクシャ由来の成分の定量法の設定が難航しており、最終的に、生薬タクシャの確認試験法として17局に収載となったアリソール類(アリソールBモノアセテート、アリソールB、アリソールA)の分析法を参考として、単一成分への集約の後、TLCによる半定量法を規定する方向で、17局第一追補収載を目指して検討中である。

抑肝散については、昨年度以降、特に大きな問題もなく、収載案が決定された。

D. 結論

本研究課題で実施された漢方処方の原案作成WGの報告を元にして、桃核承気湯、防已黄耆湯、

加味帰脾湯、防風通聖散、抑肝散の5エキスの原案が完成し、第17改正日本薬局方収載予定となった。さらに、17局以降の収載候補品目として、猪苓湯、温経湯、柴胡加竜骨牡蛎湯、人參養榮湯、白虎加人參湯、麻黄附子細辛湯、十味敗毒湯、麻子仁丸、荊芥連翹湯、当帰四逆加呉茱萸生姜、桂枝加朮附湯、疎経活血湯、呉茱萸湯、柴胡桂枝乾姜湯、温清飲、清心蓮子飲、辛夷清肺湯、抑肝散加陳皮半夏の18エキスを選定した。

健康危機情報

本研究において健康に危機を及ぼすような情報は無い。

E. 研究発表

論文等報告

- 1) Goda, Y. (2014). Standardization of crude drugs and Kampo medicines in Japanese Pharmacopoeia, CMC Publishing.
- 2) Goda, Y. and Kiuchi, F.: Current situation and challenge of "Crude Drugs" in the Japanese Pharmacopoeia". Regulatory Science of Medicinal Products, 4: 155-160 (2014).
- 3) 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, 68: 70-77 (2014).
- 4) Kumeta, Y., Maruyama, T. and Goda, Y.: Species identification of Asini Corii Collas (donkey glue) by PCR amplification of cytochrome b gene. J. Nat. Med., 68: 181-185 (2014).