

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 (2014. 6).
- 4) 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).
- 5) Goda, Y., Pharmacopoeial topics on herbal medicines in Japan from 2013 to 2014, The 12th Standing Committee Meeting of FHH, Singapore (2014. 11).
- 6) 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).

3. その他

- 1) 日本薬局方フォーラム 23 (4) pp687-690, 691-694, 695-704 に, 加味帰脾湯, 桃核承気湯, 防己黄耆湯, 防風通聖散, 抑肝散エキスの原案が収載された。また, 同 pp 704-707, 707-709, 711, 712, 713, 714, 715, 716 に各種漢方処方エキスの一部改定案が提示された。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器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
研究協力者 細江潤子 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部

日本薬局方における定量 NMR (qNMR) の利用に関する研究

定量 NMR (qNMR) を利用して、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。

研究協力者

杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部室長

西村浩昭, 菊地祐一, 勝原孝雄 株式会社ツムラ生産本部製剤・品質部品質設計 1 グループ

末松孝子 株式会社 JEOL RESONANCE ソリューション・マーケティング部

早川昌子, 鈴木裕樹 和光純薬工業株式会社試薬事業部試薬開発本部試薬開発部

三浦 亨 和光純薬工業株式会社試薬事業部 試薬開発本部試薬研究所

山田裕子 和光純薬工業株式会社試薬事業部試薬開発本部試薬研究所主席研究員

山下忠俊 株式会社常磐植物化学研究所研究開発部

A. 目的

我々は、日本薬局方における天然物の定量に

関する問題を解決するため、定量 NMR (qNMR) 法を利用することを前提とし、これまでに天然物由来の試薬をどのように純度規格化していくか検討を行ってきた。実際に日本薬局方試薬及び研究者が天然素材よりクロマトグラフィーにより精製した化合物について qNMR の測定を行い、同法を純度規格化に利用する場合における課題について報告、さらに、日本薬局方において生薬等の成分の定量測定用の分析用標品として用いられる 2 化合物（「コウボク」に使用されるマグノロール、「サンシシ」に使用されるゲニポシド）を用い、qNMR 法を利用して複数機関の測定者が独立に定量実験を行うことにより、同法についてバリデーション実験を行い良好な結果を得た。ついで、日本薬局方の生薬等で使用する個々の試薬について、実際に qNMR を測定し、個々の試薬について、どのシグナルを純度規格化に利用するか順次、検討して

きた。これらの研究に基づき、第 16 改正日本薬局方第一追補では、参考情報として「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」が収載された。さらに、第二追補の段階では、qNMR を利用して定量値付けされた 4 種の試薬 (ゲニポシド、ペオノール、マグノロール、マグノフロリン) が試薬・試液の項に収載されるとともに、生薬試験法で「核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した生薬及び漢方処方エキスの定量指標成分の定量」が収載され、サンシシ、サンシシ末、黄連解毒湯エキス (以上、ゲニポシド)、ボタンピ、ボタンピ末、加味逍遙散エキス (以上、ゲニポシド、ペオノール)、コウボク、コウボク末、半夏厚朴湯エキス (以上、マグノロール)、葛根湯加川芎辛夷エキス (新規収載品目、マグノフロリン) の各条規格において、qNMR により SI トレーサビリティを確保した試薬を利用して、指標成分の定量が行われることになった。

既に、qNMR 法そのものは、日本薬局方のような公的規格の中で十分に利用できることは明確にされている。しかし、これまでの研究で、qNMR で値付けされた試薬を利用して、日本薬局方等で定量規格を規定する場合には、試薬の吸湿性が大きな課題であることも判明している。即ち、試薬として、試薬供給業者が qNMR で純度を規定したとしても、実際に、利用者の研究室で HPLC の検量線を作成する際の標準溶液を調製する際には、純度規定された試薬を、試薬瓶から出して重量を秤量する必要がある。試薬の水分含量は、試薬のまわりにある空気の湿度により変動するが、現実の吸湿あるいは乾燥速度は試薬によって異なる。もし、秤量の段階で、水分含量が変動してしまうと、折角 qNMR で正確な純度規定を行っても、HPLC の定量値は動いてしまうことになる。正確な HPLC の検量線作

成するためには、試薬を秤量する状態での吸湿あるいは乾燥速度が無視できるほど小さいことである。従って、試薬を供給する業者は、このような条件を確認して、試薬の純度を値付けしておく必要がある。理想的には、試薬供給業者が秤量する際の温・湿度条件を規定して、試薬の水分含量が平衡状態に達した時に、秤量後、qNMR を測定し、その温・湿度条件を表記し、出荷先でも、秤量する際には、同じ、温・湿度条件で秤量することが正確な定量につながるようになる。

本年度の研究は、このような背景に基づき、国立医薬品食品衛生研究所の研究者と、試薬会社 (和光純薬、常盤植物化学)、機器会社 (日本電子)、製薬会社 (ツムラ) の研究者が共同で複数の非吸湿性化合物について、値付けのバリデーション実験を実施するとともに、吸湿性の化合物を対象に試薬の供給システムを確立する目的で行った。

B. 研究方法

B. 1. 班会議の開催

研究班会議を 5 回 (4 月 16 日、5 月 29 日、7 月 24 日、9 月 1 日、9 月 16 日、12 月 15 日) 開催し、研究班員が具体的にそれぞれの分野で抱えている問題点を持ち寄り議論を行い、検討課題を整理し、それぞれの分野で実証的な対応を行った。

B. 2. 試料

ロスマリン酸 (Lot. RSA003, Lot. PDK6694) は、(株)ツムラおよび和光純薬工業(株)より入手し、レイン (Lot. 140618) は、常盤植物化学研究所より入手したものをを用いた。サイコサニン b2 (Lot. SB2006) は、(株)ツムラで分析用標品として単離精製されものを使用した。

有機溶媒可溶の内部基準物質としては、認証

標準物質 (NMIJ CRM) である 1,4-ジクロロベンゼンから SI トレサブルな値付けをされた 1,4-BTMSB- d_4 (1,4-bis(trimethylsilyl)benzene- d_4 , Mw= 226.50), 及び水系用の内部基準物質として, DSS- d_6 (Sodium 3-(Trimethylsilyl)-1-propane-1,1,2,2,3,3- d_6 -sulfonate, Mw= 224.36) を和光純薬工業(株)より購入して使用した. なお, これらは ASNITE (Guide34) を取得した認証標準物質と同一である. qNMR 測定用重溶媒としては, 重水素化率 99.9% 以上のジメチルスルホキシド- d_6 (DMSO- d_6) (Isotec 社製, Lot. MKBB9086, 関東化学(株)製, Lot. 509B2059, Aldrich 社製, Lot. MKBP2932V, 和光純薬工業(株)製, Lot. KPQ4594, Lot. 13A-252) 及び重メタノール (methanol- d_4) (Isotec 社製, Lot. TV1921) を用いた.

B. 3. 器具及び装置

天秤は, 最小表示値が 0.0001 mg のウルトラマイクロ天秤 (Mettler Toledo UMX2) を使用した. NMR はオートサンプラー付き JNM-ECA600 (600 MHz), JNM-ECA800 (800 MHz) 及び JNM-ECS400 (400 MHz) (日本電子(株)製) を使用し, ケミカルシフト値は, 内部標準物質を基準シグナル (0 ppm) とし, δ 値を ppm 単位で表した. NMR 試料管は Wilmad 製 528-pp 及び Wako 製 NMR Test Tube S-Type, HG-Type を使用した. なお, 内部基準物質は, 実際には, 0.1ppm (DSS- d_6) から 0.2ppm (1,4-BTMSB- d_4) 程度の化学シフトを持つが, 測定溶媒毎に異なるため, 特に断らない限り, その値は補正しなかった. インキュベーターは, EYELA 社製 Multi Thermo Incubator (MTI-204) を使用した. 温湿度計は, (株)テスト製 testo622 卓上式温湿度・気圧計を使用した.

B. 4. 試料溶液の調製

B. 4. 1. バリデーション試験

各試薬約 5 mg, 内標準物質約 1 mg をそれぞれ精密に量り採り, 風袋ごと同一の容器に入れ NMR 測定溶媒 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を NMR 試料管に封入したものを試料溶液とした.

B. 4. 2. サイコサポニン b2

NaCl 飽和塩水溶液の入った容器に, あらかじめ必要量のサイコサポニン b2 を採取したサンプル瓶を入れ, 密閉し, 25°C のインキュベーターに 18 時間放置し吸湿させた. 各秤量環境湿度 (75%, 63%, 43%, 24%) の時に, 吸湿させた試料約 5 mg, 内標準物質約 1 mg をそれぞれ精密に量り採り, 風袋ごと同一の容器に入れ NMR 測定溶媒 1 mL に溶解した. この溶液 0.6 mL を NMR 試料管に封入したものを試料溶液とした.

B. 5. qNMR 測定条件

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. また, 本報告では積分値は, 全て純度換算 (%) により表示した.

C. 結果と考察

C-1. ロスマリン酸

半夏厚朴湯の定量指標成分として利用されており、昨年度からの継続課題である。本品について、溶媒を重 DMSO とし、内部標準物質は、DSS-d6 が溶解度の関係から適切と考えられた。さらに、従前の実験から、定量シグナル 7-H(7.49ppm), 8-H(6.27ppm), 8'-H(5.06ppm) が適切と判断されたため、これらのシグナルを対象として 5 機関によるバリデーション試験を行った。また、ロスマリン酸は弱い吸湿性があることから、105 度常圧下 1 時間シリカゲルで乾燥したものをを用いた。その結果、ツムラおよび和光純薬 2 社が提供する試薬とも、8-H のシグナルでの定量値(ツムラ 97.6%, 和光 93.8%) が明らかに小さく(絶対値で 1-0.6%) また SD 値が他の 2 つのシグナルでの値の 1/3 程度(0.58, 0.46) となった。従って、これまでの、定量シグナルの決定ルールに従い、他のシグナルには、不純物シグナルが入っている可能性が考えら得ることから、このダブルレットシグナルのみを、定量測定に利用することとなった。

C-2. レイン

レインは、17 局で新規収載される桃核承気湯エキス及び既収載である乙字湯エキスで新たに定量指標成分として利用されるアントラキノ系化合物である。本品について、溶媒を重 DMSO とし、内部標準物質は、DSS-d6 を使用し、芳香族領域の 3 カ所のシグナル 8.17ppm(d, H-4), 7.77-7.88ppm(3H, H-6, 2, 5), 7.44ppm(d, H-7)について、5 機関による qNMR バリデーション実験を実施した。その結果、8.17ppm のダブルレットシグナルが最も小さい定量値(95.7%) と SD(0.37)を示した。また、これらのシグナルについて、1000 回程度積算して、定量範囲を拡大したところ、7.77-7.88ppm 及び 7.44ppm のシグナルについては、明らかに不純物シグナルが観測されたことから、8.17ppm のシグナル(H-4)

についてのみ、定量測定に利用することとなった。

C-3. サイコサポニン b2

昨年度、サイコサポニン類について、重メタノールを溶媒とし、1,4-BTMSB-d4 を内部標準物質として、複数の機関で定量 NMR を実施した。その結果、サイコサポニン b2 では、11-H(6.22ppm) を積分対象シグナルとすると、妨害ピークがなく良好な結果が得られることが判明している。一方で、本化合物は吸湿性が高く、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。

製剤学の研究では、調湿用に飽和塩水溶液が利用されている。例えば、NaCl の飽和塩水溶液を 25°C の限定された空間に放置すると、76% の相対湿度となることが知られており、様々な塩の飽和溶液を利用することで、湿度コントロールが可能となる。そこで、サイコサポニン b2 を恒温(25°C) 調湿下(NaCl の飽和塩水溶液を設置した空間)で十分に吸湿させたのち、直ちに秤量し、qNMR 測定し、定量値を値付けし、その物を販売後、HPLC での分析用標品として使用する際には、同様の条件で調湿したのち、秤量し、値付けされた定量値を利用することを考えた。予備実験として、18 時間の調湿時間(事前に TG 実験により、16 時間以上で平衡に達することを確認)をおいた後、湿度 43% の空間で秤量したが、天秤に載せた瞬間から、秤量値が減少することが判明した。これまでの TG の実験結果から、湿度 75% から 40% に変化すると重量変化が直線的におこり、最終的に 105/109 となることが示されており、秤量場所そのものの温・湿度コントロールが重要であることが判明

した。そこで、室内湿度が異なった秤量日を選び (75%, 63%, 43%, 24%; 28, 26, 27, 23°C), それぞれ個別に定量し前述したシグナルを対象として, qNMR を行ったところ, ほぼ直線的に定量値が変化することが判明した。従って, 数度の温度の変化より, 湿度変化が定量値に大きな影響をあたえることが判明した。そこで, 次に天秤スペースに飽和溶液をおき, 天秤スペースを恒温, 恒湿条件として, 秤量が可能か検討し, 定量 NMR での値付けについて, 異なった研究室間で同様の値が示されるか, 検討することになった。

一方, 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 (10.0mg) を, 定量的 (250mL) にメタノールに溶解し, そのものを電動ピペットで 500 μ L 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 (5.0mg 秤量, 25mL 溶解, 50 μ L 分注, N=30) 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。現在, 上記条件で, 分注した試料について, 質量を測定し, バラツキを検討中である。

D. まとめ

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, 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, 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, ゲニボシド (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

紫菀湯エキス: 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

E. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報は無い。

F. 研究発表

論文等

- 1) Yamazaki, T., Ohtsuki, T., Miura, T., Suematsu, T., Horinouchi, T., Murakami, M., Saito, T., Ihara, T., Tada, A., Tahara, M., Goda, Y., Akiyama, H., Nakao, S., Yamada, Y., Koike, R. and Sugimoto, N.: Study of sample preparation method

using internal standard solution to accurate quantitative analysis with ¹H NMR spectroscopy. *Bunseki Kagaku*, **63**: 323-329 (2014).

- 2) Tahara, M., Sugimoto, N., Ohtsuki, T., Tada, A., Akiyama, H., Goda, Y. and Ikarashi, Y.: Application of quantitative NMR to determine the purities of analytical standards of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Kankyo Kagaku Kaishi*, **27**: 142-150 (2014).
- 3) 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).
- 4) 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).

学会等

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

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 薬品部長

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

生物学的同等性は、医薬品の有効性や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。本研究において、日本薬局方にエキスとして収載されている漢方処方の一つである小青竜湯の同等性の評価について検討を行ってきた。これまでに、マオウ成分のエフェドリン及びプソイドエフェドリン、カンゾウ成分のグリチルリチン酸、リクイリチン及びリクイリチゲニン、シャクヤク成分のペオニフロリン、ゴミシのゴミシン A 及びシザンドリン、サイシンのアサリニンについて、血漿中濃度推移をもとに、同等性の評価を行っている。本年度は、小青竜湯構成生薬のうち、カンキョウのの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、ジンゲロンに関しては、同等性の指標成分とするには、現段階では困難と思われた。

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の有効性や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。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」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。

本研究において、これまでに、日本薬局方にエキスとして収載される漢方処方の一つである小青竜湯（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）について、その指標成分で、マオウに含まれるエフェドリン及びプソイドエフェドリン³⁾、カンゾウに含まれるグリチルリチン酸及びシャクヤクに含まれるペオニフロリンや、その他の成分としてカンゾウに含まれるリクイリチン及びリクイリチゲニン、ゴミシに含まれるゴミシン A 及びシザンドリンならびにサイシンに含まれるア

サリニン^{4,5)}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、小青竜湯構成生薬のうち、カンキョウの指標成分である[6]-ショーガオールと、同じくカンキョウに含まれるジンゲ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、小青竜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」⁶⁾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, 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、湯剤とした。本品中に [6]-ショーガオールは 0.45 mg, ジンゲロンは 0.21 mg を含有する。エキス製剤は湯剤と同じ構成生薬、配合割合により製したクラシエ小青竜湯エキス細粒 6.0 g を使用した。本品中に [6]-ショーガオールは 0.66 mg, ジンゲロンは 0.13 mg を含有する。

試薬・試液

[6]-ショーガオールは和光純薬工業株式会社製を、ジンゲロンはジョンソン・マッセイ社製を、ヒト血漿はコージンバイオ社製を、メタノールは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用を、アセトニトリルは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マスペクトロメトリー用を、ギ酸は和光純薬工業株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マスペクトロメトリー用を、水は Milli-Q (日本ミリポア社製)により精製されたものを用いた。遠心式限外ろ過フィルターはメルクミリポア社製の Amicon® Ultra - 0.5 mL Centrifugal Filters Ultracel® - 10 K をそれぞれ使用した。

分析方法

検量線の作成

[6]-ショーガオール、ジンゲロン各 1 mg を精密に取り、薄めたメタノール(3→5)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

[6]-ショーガオール及びジンゲロンそれぞれ 1 mg を精密に取り、薄めたメタノール(3→5)に溶解し、精確に 100 mL とした。これを 10 倍希釈 (1000 ng/mL) したものを添加溶液とした。ブランク血漿 0.2 mL にメタノール 0.3 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌し、そのうち 450 μ L 及び添加回収用溶液 50 μ L をボルテックスミキサーで攪拌した後 10 $^{\circ}$ C, 15000 rpm で 30 分間遠心処理(トミー精工製 MX - 150 型遠心分離機)を行った。上澄み液を遠心式限外ろ過フィルターで 10 $^{\circ}$ C, 15000 rpm で 60 分間遠心処理を行い、ろ液を添加回収用試料溶液とした。同様に添加回収標準溶液を添加しないものを添加回収用ブランク試料溶液とした。別に薄めたメタノール (3→5) 450 μ L と添加回収標準溶液 50 μ L ボルテックスミ

キサーで攪拌したものを添加回収用標準溶液とした。

試料調製^{8~12)}

血漿 0.2mL にメタノール 0.3 mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した後、10 °C、15000 rpm で 30 分間遠心処理を行った。上澄み液を遠心式限外ろ過フィルターで 10 °C、15000 rpm で 60 分間遠心処理を行い、ろ液を試料溶液とした。

分析条件

装置は、LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム (Waters 社製) を配した Waters Xevo TQ MS システム (Waters 社製) を用いた。

<HPLC 条件>

カラム : ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 mm \times 100 mm (Waters 社製)

移動相:A 液 (0.1% ギ酸アセトニトリル溶液),
B 液 (0.1% ギ酸溶液)

グラジエント条件

%A = 20 (init.) , 90 (30 min.) , リニア

流速 : 0.4 mL/min

カラム温度 : 40°C

<MS 条件>

プローブ : ESI

キャピラリー電圧 : 3 kV

脱溶媒温度 : 500°C

脱溶媒ガス流量 : 1000 L/h

[6]-ショーガオール

MRM ポジティブで Precursor ion を m/z 277.14, Product ion を m/z 137.17 とし, コーン電圧 12 V, コリジョン電圧 12 V で行った。

ジンゲロン

MRM ポジティブで Precursor ion を m/z 195.06, Product ion を m/z 137.06 とし, コーン電圧 6 V, コリジョン電圧 12 V で行った。

C. 研究結果^{7~11)}

検量線の直線性と添加回収試験

[6]-ショーガオールは 0.1 - 1000 ng/mL の範囲で, ジンゲロンは 0.1 - 1000 ng/mL の範囲で相関係数がいずれも $R^2 = 1.000$ と良好な直線性を示した。[6]-ショーガオール及びジンゲロンの回収率は, それぞれ 101%, 99% であり, 良好な回収率が得られた。

各成分の血漿中濃度推移

湯剤及びエキス製剤投与後の各成分の血漿中濃度推移をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。投与した湯剤とエキス製剤のそれぞれの成分の含量が ([6]-ショーガオールは 32%, ジンゲロンは 38%) 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。また, C_{max} は, 各採取時間における血漿中濃度の平均値の最高値とし, T_{max} はその最高値を示した時間とした。AUC は投与後 8 時間までの血漿中濃度の平均値をもとに台形法により算出した。

各成分とも採血点によって血漿中濃度にばらつきがみとめられた。また, 湯剤とエキス製剤との間で, [6]-ショーガオールでは投与後 30 分における血漿中濃度に有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。ジンゲロンに関しては投与後 60 分の血漿中濃度に湯剤とエキス製剤との間で有意な差 ($p < 0.01$) が認められた。

これらの血漿中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} , AUC 及び平均滞留時間を表 1 に示した。[6]-ショーガオールの C_{max} はエキス製剤で 0.80 ng/mL, 湯剤で 0.93 ng/mL, AUC はエキス製剤で 1.26

ng/mL・h, 湯剤で 1.50 ng/mL・h であった. また MRT はエキス製剤で 1.55 h, 湯剤で 1.54 h であった. ジンゲロンの C_{max} はエキス製剤で 0.19 ng/mL, 湯剤で 0.12 ng/mL, AUC はエキス製剤で 0.52 ng/mL・h, 湯剤で 0.26 ng/mL・h であった. また MRT はエキス製剤で 1.52 h, 湯剤で 1.30 h であった. C_{max} に関しては, 被験者間でのばらつきは, [6]-ショウガオール及びジンゲロンともに薬剤間で大きな差は認められなかった. 一方, AUC に関しては, [6]-ショウガオールでは湯剤の方が, ジンゲロンでは製剤の方がばらつきが大きかった. 表 2 及び表 3 に各成分の C_{max} 及び AUC の分散分析表を示した.

D. 考察

小青竜湯のエキス製剤及び湯剤を投与後, 血漿中の各成分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. 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. ジンゲロンに関しては薬剤間で有意であったことから検出力の算出は行わなかった. 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.

対象とした [6]-ショウガオールに関しては, 徳原¹³⁾らが, ラットに [6]-ショウガオールを経口投与したところ, 投与 5 分後で C_{max} に到

達し, 投与 2 時間後には血漿中から消失することを報告している. 今回得られた血漿中濃度推移は, 同様な結果を示した. またジンゲロンに関しては Monge¹⁴⁾らが, ラットに経口または腹腔内投与し, 24 時間後までに尿中に排泄される代謝物の大部分は, グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体であること等を報告している. 今回の結果では, 血漿中濃度が低く検出はできたものの十分な感度が得られなかった. C_{max} に薬剤間での有意差が出たのは分析精度の影響も考えられた.

今回の結果から [6]-ショウ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, ジンゲロンに関しては, 同等性の指標成分とするには, 現段階では困難と思われた.

今回の報告を含めて, 小青竜湯構成生薬 8 種類のうちマオウ, シャクヤク, ゴミシ, カンゾウ, サイシン及びカンキョウの 6 種類の生薬について, それらに含まれる成分の血漿中濃度推移を湯剤と製剤で比較し, 同等性の評価についての基礎的検討を行ってきた.^{3~5)} その結果, エフェドリン, プソイドエフェドリン, ゴミシン A, シザンドリン, リクイリチン及び [6]-ショウガオールが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, その他の処方について, その可能性について検討を行い評価する必要があると考えられる.

E. 結論

小青竜湯構成生薬のうち, カンキョウの [6]-ショウガオール及びジンゲロンについて血漿中濃度推移の比較をし, 製剤と湯剤の同等性の評価についての基礎的検討を行った. その結果, [6]-ショウガオール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. 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.

参考文献

- 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) 医療用漢方エキスの取り扱いについて，薬審二第 120 号，昭和 60 年 5 月 31 日。
 - 3) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H., Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I), *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (2), 65 - 69 (2014).
 - 4) 第 30 回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 85 (2013).
 - 5) 第 31 回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 128 (2014).
 - 6) 臨床研究に関する倫理方針，医政発第 128001 号，平成 16 年 12 月 28 日。
 - 7) Van Meulebroek, L., Bussche, J. V., Steppe, K., Vanhaecke, L.: Ultra-high performance liquid chromatography coupled to high resolution orbitrap mass spectrometry for metabolomic profiling of the endogenous phytohormonal status of the tomato plant., *J. Chromatogr. A*, **1260**, 67 - 80 (2012).
 - 8) 平成 18 年 11 月 24 日薬食審査発第 1124004 号 後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について。
 - 9) 江島昭他：生物学的同等性の試験方法についての解説，*IYAKUHIN 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 -，*IYAKUHIN 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 -，*IYAKUHIN KENKYU*, **15**, 123 - 133 (1984).
 - 12) 統計数値表編集委員会編：簡約統計数値表，日本規格協会，東京 (1977).
 - 13) Tokuhara, D., Shimada, T., Takahashi A., Saimaru H., Aburada, M., Asami, A., Kobayashi, H.: Pharmacokinetics of 6 - shogaol, a pungent ingredient of *Zingiberis Rhizoma*, and the anti - inflammatory activity of its metabolite, 6 - paradol., *J Tradit Med*. **30**, 199 - 205 (2013).
 - 14) Monge, P., Scheline, R., Solheim, E.: The Metabolism of Zingerone, a Pungent Principle of Ginger., *Xenobiotica*, **6**, 411 - 423 (1976).
- F. 健康危機情報
なし。
- G. 研究発表
1. 論文発表
Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H., Goda, Y.: Studies on bioequivalence of kakkonto decoction and its extract preparation (I)., *Shoyakugaku Zasshi*, **68**, 9 - 14 (2014).
2. 学会発表等
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（千葉），2014. 8.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

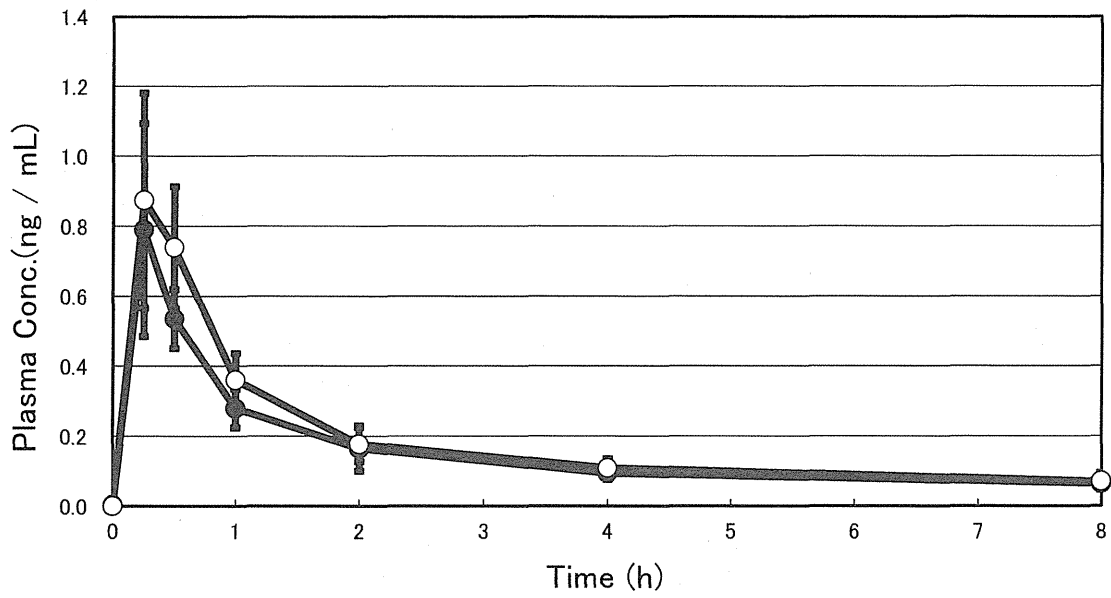


図. 1 [6]-ショーガオール の血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)
*p < 0.05

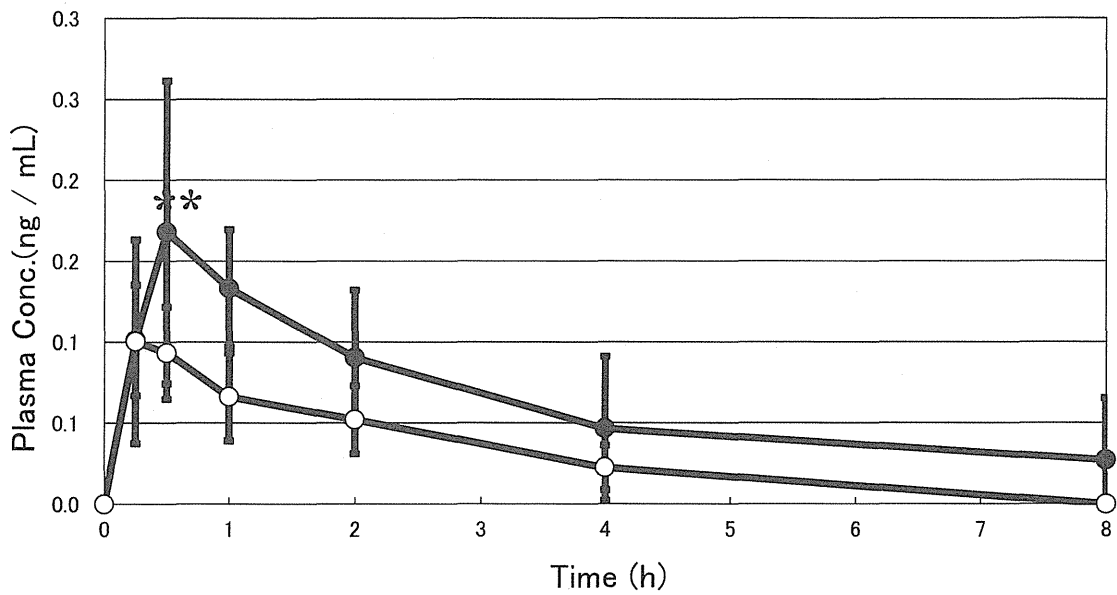


図. 2 ジンゲロンの血漿中濃度推移 (mean ± SD, n = 6) (● : エキス製剤, ○ : 湯剤)
**p < 0.01

表 1 湯剤, エキス製剤投与時の各成分の T_{max} , C_{max} , AUC 及び MRT

(Values are means \pm SD (n = 6))

		T_{max} (h)	C_{max} (ng / mL)				AUC (ng / mL · h)				MRT (h)		
						CV (%)				CV (%)			
[6]-ショウガ オール	製剤	0.29	0.80	\pm	0.29	36	1.26	\pm	0.09	7	1.55	\pm	0.06
	湯剤	0.33	0.93	\pm	0.27	29	1.50	\pm	0.21	14	1.54	\pm	0.09
ジンゲロン	製剤	0.92	0.19	\pm	0.07	37	0.52	\pm	0.23	44	1.52	\pm	0.28
	湯剤	0.67	0.12	\pm	0.05	42	0.26	\pm	0.07	27	1.30	\pm	0.02

表 2 [6]-ショウガオールの分散分析表

AUC	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値
	薬剤	0.16	1	0.16	6.739	7.71
	時期	0.02	1	0.02	0.772	7.71
	被験者	0.15	5	0.03	1.241	6.26
	合計	0.42	11	0.04		
	残差	0.09	4	0.02		

C_{max}	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F 比(分散比)	5%限界値
	薬剤	0.05	1	0.05	5.789	7.71
	時期	0.01	1	0.01	1.055	7.71
	被験者	0.76	5	0.15	18.158	6.26
	合計	0.85	11	0.08		
	残差	0.03	4	0.01		

表 3 ジンゲロンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
AUC	薬剤	0.2067	1	0.2067	4.864	7.71
	時期	0.0033	1	0.0033	0.078	7.71
	被験者	0.1056	5	0.0211	0.497	6.26
	合計	0.4856	11	0.0441		
	残差	0.1700	4	0.0425		

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
C _{max}	薬剤	0.0140	1	0.0140	8.762	7.71
	時期	0.0004	1	0.0004	0.227	7.71
	被験者	0.0277	5	0.0055	3.455	6.26
	合計	0.0484	11	0.0044		
	残差	0.0064	4	0.0016		

分担研究課題 生薬及び漢方処方へ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 薬品部長

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

八味地黄丸エキス製剤及び湯剤の同等性に関する研究

生物学的同等性は、医薬品の有効性や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。これまでに、桂枝茯苓丸、葛根湯、小青竜湯中の指標成分の血漿中濃度推移をもとに、同等性について基礎的検討を行ってきた。本研究では、引き続き日本薬局方にエキスとして収載されている漢方処方の一つである八味地黄丸の同等性について同様の基礎的検討を行う目的で、同処方の構成生薬のうち、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、製剤と湯剤の同等性について、血漿中濃度推移を比較することで検討を行った。その結果、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

A. 研究目的

生物学的同等性は、医薬品の有効性や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。漢方処方製剤に関しては、「医療用漢方製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤の取り扱いについて」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。

本研究において、これまでに、第十六改正日本薬局方にエキスとして収載された桂枝茯苓丸³⁾、葛根湯^{4、5)}及び小青竜湯^{6、8)}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、日本薬局方にエキスとして収載されている漢方処方の一つである八味地黄丸について検討を行った。処方構成生薬はジオウ、サンシュユ、サンヤク、タクシャ、ブクリョウ、ボタンピ、ケイヒ及びブシ末の8種類である。それらのうちのブシ末をとりあげ、その指標成分である総アルカロイドのうち、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を分析対象成分として、八味地黄丸湯剤と、それと同じ生薬を使用して作られた医療用八味地黄丸エキス製剤について、それぞれヒトに投与したときの血漿中濃度推移を比

較し、湯剤と製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、小青竜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」⁹⁾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

土瓶にジオウ 5 g, サンシュユ 3 g, サンヤク 3 g, タクシャ 3 g, ブクリョウ 3 g, ボタンピ 3 g, ケイヒ 1 g, ブシ末 1 g と水 440 mL を加え、加熱抽出し、ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過し、湯剤とした。本品中にベンゾイルメサコニン 0.38 mg, ベンゾイルヒパコニン 0.06 mg, 14-アニソイルアコニン 0.57 mg を含有する。エキス製剤は湯剤と同じ構成生薬、配合割合により製したクラシエ八味地黄丸料エキス細粒 6.0 g を使用した。本品中にベンゾイルメサコニン 0.30 mg, ベンゾイルヒパコニン 0.04 mg, 14-アニソイルアコニン 0.33 mg を含有する。

試薬・試液

ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質は和光純薬工業株式会社製を使用した（本品はベンゾイルメサコニン 0.05 mg, ベンゾイルヒパコニン 0.10 mg, 14-アニソイルアコニン 0.1 mg を含有する）。ヒト血漿はコージンバイ

オ社製を、メタノールは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用を、アセトニトリルは関東化学株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、ギ酸は和光純薬工業株式会社製の高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、水は Milli-Q (日本ミリポア社製) により精製されたものを用いた。遠心式限外ろ過フィルターはメルクミリポア社製の Amicon® Ultra- 0.5 mL Centrifugal Filters Ultracel® - 10 K をそれぞれ使用した。

分析方法

検量線の作成

ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質を薄めたメタノール (3→5) に溶解し、精確に 50 mL とする。これを標準原液とし、薄めたメタノール (3→5) で段階希釈し、検量線を作成した。

添加回収実験

ブシモノエステルアルカロイド混合標準物質を薄めたメタノール (3→5) に溶解し、精確に 50 mL とした。これを薄めたメタノール (3→5) で 10 倍希釈 (ベンゾイルメサコニン 100 ng/mL, ベンゾイルヒパコニン 200 ng/mL, 14-アニソイルアコニン 200 ng/mL), 100 倍希釈 (ベンゾイルメサコニン 10 ng/mL, ベンゾイルヒパコニン 20 ng/mL, 14-アニソイルアコニン 20 ng/mL), 1000 倍希釈 (ベンゾイルメサコニン 1 ng/mL, ベンゾイルヒパコニン 2 ng/mL, 14-アニソイルアコニン 2 ng/mL), 10000 倍希釈 (ベンゾイルメサコニン 0.1 ng/mL, ベンゾイルヒパコニン 0.2 ng/mL, 14-アニソイルアコニン 0.2 ng/mL) したものを添加回収用溶液とした。ブランク血漿 0.4 mL に添加回収用溶液 0.1 mL 及びメタノール 0.5 mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、10 °C, 15000 rpm, 30 分間遠心分離 (トミー精工製 MX-150 型遠心分離機) を行った。上澄み液を遠心式限外ろ過

フィルターにより 10 °C, 15000 rpm, 60 分間遠心分離を行い, 添加回収用試料溶液とした.

試料調製¹⁰⁾

血漿 0.2mL にメタノール 0.3 mL を加え, ボルテックスミキサーで攪拌した後, 10 °C, 15000 rpm で 30 分間遠心処理を行った. 上澄み液を遠心式限外ろ過フィルターで 10 °C, 15000 rpm で 60 分間遠心処理を行い, ろ液を試料溶液とした.

分析条件

装置は, LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム (Waters 社製) を配した Waters Xevo TQ MS システム (Waters 社製) を用いた.

<HPLC 条件>

カラム: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1 mm \times 100 mm (Waters 社製)

移動相: A (0.1% ギ酸アセトニトリル溶液), B (0.1% ギ酸溶液)

グラジエント条件

%A = 5 (init.), 70 (30 min), リニア

流速: 0.4 mL/min

カラム温度: 40°C

<MS 条件>

プローブ: ESI

キャピラリー電圧: 3 kV

脱溶媒温度: 500°C

脱溶媒ガス流量: 1000 L/h

ベンゾイルメサコニン

MRM ポジティブで Precursor ion を m/z 590.19, Product ion を m/z 105.10 とし, コーン電圧 56 V, コリジョン電圧 52 V で行った.

ベンゾイルヒパコニン

MRM ポジティブで Precursor ion を m/z 574.20, Product ion を m/z 542.23 とし, コーン電圧 52 V, コリジョン電圧 34 V で行った.

14-アニソイルアコニン

MRM ポジティブで Precursor ion を m/z 634.22, Product ion を m/z 584.25 とし, コーン電圧 54 V, コリジョン電圧 36 V で行った.

C. 研究結果^{11~15)}

検量線の直線性と添加回収試験

ベンゾイルメサコニンは 0.05 - 100 ng/mL の範囲で, ベンゾイルヒパコニンは 0.1 - 100 ng/mL の範囲で, 14-アニソイルアコニンは 0.05 - 100 ng/mL の範囲で相関係数がいずれも $R^2 = 0.999$ と良好な直線性を示した. 回収率は 0.1 ng/mL レベルでベンゾイルメサコニンは 101%, ベンゾイルヒパコニンは 107%, 14-アニソイルアコニンは 100% であり, それぞれ良好な回収率であった.

各成分の血漿中濃度推移

湯剤及びエキス製剤投与後の各成分の血漿中濃度推移をそれぞれ図 1~3 に示した. 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 (ベンゾイルメサコニンは 79%, ベンゾイルヒパコニンは 67%, 14-アニソイルアコニンは 58%, 湯剤を 100% としたそれぞれのエキス剤含量), 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. 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. また, C_{max} は, 各採取時間における血漿中濃度の平均値の最高値とし, T_{max} はその最高値を示した時間とした. AUC は投与後 8 時間までの血漿中濃度の平均値をもとに台形法により算出した.

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. ベンゾイルヒパコニンに関しては, 投与後 240 分の血漿中濃度に湯剤

とエキス製剤との間で有意な差 ($p < 0.01$) が認められたが、その他の成分については血漿中濃度に薬剤間で有意な差は認められなかった。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について、投与後 60 分の測定値が 120 分の測定値よりが低くなったため、再度試料を調製し検討したところ、同様の結果が得られた。

これらの血漿中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} , AUC, 及び平均滞留時間 (MRT) を表 1 に示した。ベンゾイルメサコニンの C_{max} はエキス製剤で 23 pg/mL, 湯剤で 17 pg/mL, AUC はエキス製剤で 92 pg/mL·h, 湯剤で 70 pg/mL·h であった。また MRT はエキス製剤で 1.63 h, 湯剤で 1.63 h であった。ベンゾイルヒパコニンの C_{max} はエキス製剤で 28 pg/mL, 湯剤で 22 pg/mL, AUC はエキス製剤で 69 pg/mL·h, 湯剤で 47 pg/mL·h であった。また MRT はエキス製剤で 1.62 h, 湯剤で 2.11 h であった。14-アニソイルアコニンの C_{max} はエキス製剤で 173 pg/mL, 湯剤で 165 pg/mL, AUC はエキス製剤で 948 pg/mL·h, 湯剤で 799 pg/mL·h であった。また MRT はエキス製剤で 1.71 h, 湯剤で 1.80 h であった。 C_{max} 及び AUC に関しては、湯剤, 製剤ともに、ベンゾイルヒパコニンで大きなばらつきが認められた。表 2~4 に各成分の C_{max} 及び AUC の分散分析表を示した。

D. 考察

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、Liu, X.¹⁶⁾ らや Liu, J.¹⁷⁾ らの研究と同様の挙動であった。Liu, X. らはラットにブシ単味抽出物 (Radix Aconiti Lateralis Praeparata, FZ)

及び ダイオウ, ブシ, サイシンから構成される処方の大黄附子湯 (Dahuang Fuzi Decoction, DFD) を経口投与し、アルカロイド成分の薬物動態パラメータを算出しており、DFD 投与後の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に関しては 2 峰性を示していた。また、Liu, J. らは、ベンゾイルメサコニン及びベンゾイルヒパコニンを含むブシアルカロイド 6 成分の薬物動態研究を行っており、ブシ抽出エキス剤の経口投与後のこれらの成分の血漿中濃度推移は 2 峰性を示していた。血漿中濃度推移が 2 峰性を示す理由として、腸管循環や pH による吸収の差が異なることや腸内で吸収する部位が異なることなどを報告している。

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^{4, 5)} 及び小青竜湯^{6, 8)} 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ものと推測された¹⁸⁾。

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。このことから、ベンゾイルメサコニンの生物学的利用能はベンゾイルヒパコニンや14-アニソイルアコニンに比べて低く、ベンゾイルメサコニンとベンゾイルヒパコニンとでは、化学構造的に水酸基の有無の違いが、体内動態に大きな差を与えていることが判明した。

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る。

E. 結論

八味地黄丸構成生薬のうち、ブシ末をとりあげ、その指標成分である総アルカロイドのうち、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を分析対象として湯剤と製剤の同等性の評価についての検討を行うこととした。その結果、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る可能性が示唆された。

参考文献

- 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27回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 88 (2010).
- 4) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H., Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I), *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (1), 9 - 12 (2014).
- 5) 第29回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 89 (2012).
- 6) Horii, C., Okonogi, A., Okubo, T., Kamakura, H., Goda, Y.: Studies on bioequivalence of Shoseiryuto decoction and its extract preparation (I), *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (2), 65 - 69 (2014).
- 7) 第30回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 85 (2013).
- 8) 第31回和漢医薬学会学術大会要旨集, p. 128 (2014).
- 9) 臨床研究に関する倫理方針, 医政発第128001号, 平成16年12月28日。
- 10) Yamazaki, H., Tanaka, K., Gamura, S., Hashimoto, T., Shimizu, M. : High - performance Liquid Chromatographic Assay for Carboplatin in Ultrafiltered Plasma Combined with Hyperbaric Oxygenation, *Drug Metab. Pharmacokinet*, **21** (5), 429 - 431 (2006).
- 11) 平成18年11月24日薬食審査発第1124004号後発医薬品の生物学的同等性試験ガイドライン等の一部改正について。
- 12) 江島昭他: 生物学的同等性の試験方法についての解説, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1106 - 1119 (1982).
- 13) 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 -, *IYAKUHIN KENKYU*, **13**, 1267 - 1271 (1982).