

201427025B

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 24 年度～26 年度 総合研究報告書

(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. 総合研究報告書	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 29
III. 研究成果の刊行物・別刷 31

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、Western Pacific Regional Forum for the Harmonization of Herbal Medicines（FHH）、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。具体的には、本研究で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、麻黄湯、乙字湯、大柴胡湯、葛根湯加川芎辛夷について、日本薬局方原案を作成し、第16改正日本薬局方（16局）第二追補収載となった。さらに桃核承気湯、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を作成し、17局収載予定となった。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。

公定書未収載生薬の英名に関する検討：漢方処方に用いられる局方、局外生規未収載の生薬や生薬製剤に使用される生薬等で、これまで英語名が定められていなかった66の生薬について、日本での使用実態にあわせて、英語名について検討し、厚労省審査管理課から発出される事務連絡の原案を作成した。

定量NMRの利用に関する研究：定量NMRを日本薬局方試薬の規格に組み込むために、のりを超えるべき個々具体的な問題点を明確にし、その解決策を明らかにした。その結果、ゲニポシド、ペオノール、マグノロール、マグノフロリンについて、試薬として必要な局方規格が完成した。これらの試薬を利用して、16局第二追補においてサンシシ、サンシシ末、ボタンピ、ボタンピ末、コウボク、コウボク末と、加味逍遥散エキス、半夏厚朴湯エキス等複数の漢方処方エキスにおいて、qNMRの定量結果に基づいた指標成分の定量が可能となった。さらに、ケイヒ酸、レイン、ロスマリン酸、サイコサポニンb2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、これらの化合物についてqNMRで値づけされた試薬が供給できる目処がたち、17局では、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、エキス製剤または湯剤投与後の血漿中濃度推移から、エフェドリン類について同等性評価の指標になり得る可能性が示唆されている。一方で、グリチルリチン酸、ペオニフロリン、リクイリチゲニン、アサリニン、ジンゲロンでは、吸収や代謝のメカニズムの個体差によるものと考えられるばらつきや、感度の問題から同等性の指標成分とするには、現段階では困難であることが明らかとなった。他方、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチン、[6]-ショーガオール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。また、新たに八味地黄丸では、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：LC-MS によるメタボローム分析による多様性確認を指向し、生薬中の異性体成分の新しい識別法の確立を目的として、LC-IMS-MS を利用した構造推定法の有用性を検討するため、大黄に含まれるアントラキノン配糖体の構造推定を試みた結果、低分子化合物に対しても生体高分子と同程度の精度で化合物の推定が可能であることが確認でき、イオンモビリティ分離技術が生薬中の異性体成分の構造推定に有用であることが示唆された。また、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について、LC/MS メタボローム解析を行ったところ、多変量解析により生干人参と湯通人参で、生薬に特徴的なピークを7つずつ検出した。また、サイコでは、*Bupleurum falcatum* L. 及び *B. chinense* D.C を判別し得る成分を見出した。また、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結果、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。

漢方処方安全性と有効性に関する研究：乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* を増殖させる生薬として陳皮を見出し、活性本体が sucrose であることを明らかにした。そこで陳皮の他、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。従って、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を示した。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を明らかにした。また別に、漢方処方が腸内環境へ与える影響について検

討するため、小腸上皮細胞様培養細胞におけるサイトカインの発現に着目した *in vitro* アッセイ系の構築を試みた。その結果、ヒト小腸上皮細胞株 Caco-2 における炎症性サイトカインの発現を惹起する刺激として TNF- α 処理について検討し、Interleukin-6 及び 8 の発現が誘導されることを見出した。また、漢方処方スクリーニングの予備実験として、Caco-2 細胞における漢方処方凍結乾燥エキスの細胞毒性について検討した。さらに、抗炎症性サイトカイン Interleukin-10 の誘導活性を持つ六君子湯の活性生薬として半夏を見出し、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、あるいは糖以外の高分子化合物（タンパク質等）であることを明らかにした。

一般用漢方製剤承認基準の改正に関する研究：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、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）が発出された。本研究では、通知発出のために、最終的な処方名称、処方構成、効能効果等の検討を行い、一部の処方について名称の変更、効能効果の言い換え等を行った。さらに、「一般用漢方製剤承認基準の改正について」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」を上梓した。

単味生薬製剤承認基準原案に関する研究：単味生薬について「局方医薬品承認申請の手引き」（局方手引き）の改訂案を作成した。さらに局方手引きでは、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、これらに基づき「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：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 9 処方エキスの計 131 検体、8 処方エキスの 170 検体を集め、4 大金属含量を調査した。その結果、半夏厚朴湯 1 検体においてヒ素値が 2.20ppm と局方の基準値（3 ppm）を満たしていたものの香港生薬標準での基準値 2.0ppm を超え、それ以外は、いずれも香港の基準値を下回っていた。また、試験対象とした元素が比較的高値で検出された処方は、処方構成に、これまで時に 4 大重金属含量が高い値をしめした生薬を含み、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。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。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、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($p < 0.01$), 両者は, 分光測色計による識別が可能であることが判明した.

TLC 試験法に関する研究: 検討した 26 品目の生薬の TLC 試験のうち, アラビアゴム, コウイ, ゴマ, ゴミシ, サンシシ, ゼンコ, センブリ, ソヨウ, ダイオウ, ニクズク, ニンドウ, ブシ, ボタンピについて展開距離を 7 cm とするとともに, 何らかの問題点が明らかになったものに関して試験法の改正案を作成した. また, ソウジュツ並びにビャクジュツの新たな TLC による確認試験法案を作成するとともに, サンシュユについても試験法の改正案を作成した. また 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, サイシン, サンヤク, シュクシャ, チモ, ハッカ, シャゼンシ, モッコウ, レンギョウについて TLC による新規試験法を作成, TLC 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, JP16(局外生規 2012 も含む)と CP2010 との生薬の比較を実施し, 日本の公的規格収載生薬のおよそ 2/3 の 137 の生薬で, CP と同じ基原と部位の動植物を, その生薬の基原種として認めていることを示した. さらに, 香港中薬材標準(Hong Kong Chinese Materia Medica Standards, HKCMMS)について, JP(局外生規も含む)との収載生薬品目及び TLC 確認試験法, 定量法について比較表の作成を行った. また, ベトナム(2012), シンガポール(2013, 2014)で行われた FHH の Standing Committee に出席して, 日本の生薬の公的規格の現状と Sub-Committee 1 の活動等について報告した. さらに 5th FHH 国際シンポジウムに出席し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, FHH 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するか明らかにし, 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 公定書未収載生薬の英名に関する検討

公定書に未収載の66の生薬について、標準となる英名が示されておらず、各社で使用している生薬英名がそれぞれの生薬で異なる現状を受け、今後の国際対応を踏まえ、流通実態を考慮しながら、生薬の英名の統一化を図る目的

で英名の検討を行った。対象生薬としては、日漢協原料生薬使用量等調査で使用量の多い生薬、210 処方使用生薬、薬価基準収載（薬効分類 510）生薬より、局方収載生薬（収載予定生薬を含む）、局外生規収載生薬（収載予定生薬を含む）を除き66生薬を選択した。

B-3 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¹³Cデカップル実施、ダミーキャン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-4 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、葛根湯、小青龍湯、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

分析に供した。分析装置は、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。

分析対象としては、葛根湯では、グリチルリチン酸を選択した。小青竜湯では、グリチルリチン酸、ペオニフロリン、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチゲニン、リクイリチン、アサリニン、[6]-ショーガオール及びジングロンを選択した。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-アノイルアコニンを取り上げた。

B-5 生薬の多様性と標準化に関する研究

生薬は、多様性の範囲を確認する目的で、医薬基盤研が広く国内生薬メーカーより収集したものを使用した。Emodin 6-*O*-glucoside は、センナ由来の配糖化酵素 UGT73B11 を用いて emodin と UDP-glucose から酵素化学的に合成したものを使用した。イオンモビリティ MS (IMS) は、Synapt G2-Si (Waters) で測定した。それ以外の LC-MS 分析は、同機器あるいは、Shimadzu Prominence UFLC (島津製作所) に、LTQ Orbitrap XL を接続したものをを用いた。LC-MS データのピーク抽出には、Sieve 2.0 (ThermoFisher Scientific) を用い、SIMCA-P⁺ 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-6 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。*Lactobacillus reuteri* JCM 1112, *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。ヒト腸上皮細胞様細胞株 Caco-2 及び Non Essential Amino Acids (NEAA) は大日本住友製薬より購入した。培地中のサイトカイン量は、Meso Scale Discovery 社の 96-Well Mouse Cytokine Assays Tissue Culture Kit に従って測定した。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。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。

B-7 一般用漢方製剤承認基準の改正に関する研究

「新 210 処方案」において承認基準への新規収載が提案された処方 85 処方であり、これまでの通知で発出された処方 36 処方である。今回の通知では、残りの 36 処方のうち、配合生薬の市場流通性及び公的規格の策定しやすさ等を勘案して 5 処方 (温脾湯, 玉屏風散, 銀翹散, 天王補心丸及び独活寄生湯) を除外し、31 処方について検討した。その結果、従来の 213 処方に新規収載候補 81 処方を加えた 294 処方について解説した「新一般用漢方処方の手引き」を平成 25 年 9 月に上梓した。

B-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

従前の研究班で作成した「単味生薬の有効性及び安全性を保証するエビデンスに関する文献情報 (I) (II)」より、どの効能をどのように読み替えるか、(どの生薬の) どの効能を新規に追加するかを取捨選択し、それらを支持するエビデンス (文献) に関する情報を報告書別冊から抜き出した。抜き出した文献は、①臨床

研究 [RCT (ランダム化比較試験), RCT 以外の CT (臨床試験) (無作為, 非対照など), 調査研究, 症例報告] であること, ②単味製剤 (あるいは単味エキス) に関する研究であること, の 2 つを満たすものを「コアエビデンス」, それ以外を「サポートエビデンス」とした. 次に, これらの論文のうち, 新規効能として提案可能なものを支持するコアエビデンス論文をピックアップし, 各論文の内容を精査した後にエビデンスレベルの評価を行った. 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

日本漢方生薬製剤協会を通じて入手した柴朴湯, 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, 苓桂朮甘湯, 桂枝茯苓丸, 柴胡桂枝湯, 芍薬甘草湯, 真武湯, 大黃甘草湯, 釣藤散, 補中益気湯及び六君子湯の各処方エキス (17 処方 301 検体), 及び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, ヒ素, カドミウム, 水銀及び鉛の 4 大金属を中心に, ICP-MS により含量測定を行った.

滑石に関する研究では, まず, 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. ついで, 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-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, 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. 検討した生薬は, アラビアゴム, オウヒ, ガイヨウ, ケイガイ, コウイ, ゴマ, ゴミシ, サンザシ, サンシシ, サンシュユ, ジオウ, ゼンコ, センソ, センブリ, ソヨウ, ソウジュツ, ダイオウ, トウガラシ, トウヒ, ニクズク, ニンドウ, バクガ, ビャクジュツ, ブシ, ボタンピ, ユウタン, 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, 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, モッコウの 39 品目である.

B-11 生薬の国際調和に関する研究

第10回(ハノイ)及び11,12回 FHH Standing Committee (シンガポール), 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,まず特に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,防己黄耆湯,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た。その結果,第16改正日本薬局方第二追補では,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,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局第二追補収載予定となった。さらに引き続き残り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,技術的検討を行った結果,桃核承気湯,防己黄耆湯,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,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局で収載予定となった。また,桃核承気湯に対応して,ボウショウ,無水ボウショウについても,規格を検討し収載されることになった。次に,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。

C-2 公定書未収載生薬の英名に関する検討

検討班会議では,まず,生薬の本質を確認するため,基原の学名について調査した。さらに,検討案を元に,日漢協会会員会社からの意見募集を行い,さらに,局外生規検討委員会で議論の後,最終案を決定した。決定された英名は,2013年に,審査管理課より事務連絡として発出された。

C-3 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として,以下の問題に対応した。内部基準物質の不純物シグナルの問題では,実際に測定を実施し,不純物シグナルの1の確認を行った。また,qNMR の使用溶媒として,重クロロホルムや重メチレンクロライドを使用する際には,試料溶液を調製してから,素早く測定することが重要であることを示した。測定対象物の不純物シグナルの問題では,これらのシグナルを確認するために,実際の qNMR の定量とは別に,事前になるべく多くの積算回数での NMR 測定を実施して,対象となる可能性のシグナルのショルダー等に不純物シグナルが含まれないことを確認する必要性を明らか

にした。さらに、内部基準物質の実際の化学シフトを実測し示した。また、NMR で定量値を規定される試薬は、実際には HPLC で使用されるという事実の注意喚起も含めて、ピークの単一性試験を試薬の規格に組み込むことが必要であるとの結論を得た。さらに、qNMR で値付けする可能性の高い試薬について熱重量分析を実施し、それぞれの試薬について吸湿特性を解析し、どのような状態で試薬を値付けし販売すべきかを明らかにした。

これらの検討結果を踏まえ、ゲニポシド、ペオノール、マグノロール、マグノフロリンについて、試薬として必要な局方規格が完成した。これらの試薬を利用して、16 局第二追補においてサンシシ、サンシシ末、ボタンピ、ボタンピ末、コウボク、コウボク末と、加味逍遙散エキス、半夏厚朴湯エキス等複数の漢方処方エキスにおいて、qNMR の定量結果に基づいた指標成分の定量が可能となる。さらに、ケイヒ酸、レイン、ロスマリン酸、サイコサポニン b2 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、これらの化合物について qNMR で値づけされた試薬が供給できる目処がたち、17 局では、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。

C-4 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

小青竜湯のエキス製剤及び湯剤を投与後、血漿中のグリチルリチン酸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。分散分析の結果、グリチルリチン酸、ペオニフロリンともにエキス製剤と湯剤の間で有意差は認

めら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、グリチルリチン酸、ペオニフロリンともに、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の被験者数を推定することとした。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被験者数の計算を行ったところ、1 群 61 人に増やしても両化合物とも、十分な検出力が得られないことが判明した。また、葛根湯のグリチルリチン酸についても同様の結果となった。今回、分析対象としたグリチルリチン酸やペオニフロリンは、腸内細菌による消化管内での代謝や、グルコーストランスポーターを介する吸収機構などが認められており、また、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、血漿中濃度推移が影響を及ぼすことが推測される。グリチルリチン酸に関しては、甘草エキス、甘草配合漢方エキス、あるいはグリチルリチン酸製剤を投与した場合、グリチルリチン酸は検出されるものの血液中の濃度は低く、その代謝物としてグリチルレチン酸が検出されることが報告されている。今回の結果でもグリチルリチン酸の血漿中濃度は低く、また、個体差が認められた。ペオニフロリンに関しては、芍薬や芍薬配合処方投与後の薬物動態試験において、単味と処方とでは血液中の濃度に違いが認められ、また個体間変動が大きい結果が示されている。今回の結果では、ペオニフロリンの血漿中濃度は低く、また、個体差が認められた。以上の結果より、グリチルリチン酸、ペオニフロリンは同等性を評価する指標成分とするには現段階では困難と考えられた。

ついで、同様の検討を、小青竜湯において、ゴミシン A、シザンドリン、リクイリチゲニン、

リクイリチン、アサリニン[6]-ショーガオール及びジンゲロンについて行った。検出力 $1-\beta$ について算出を行ったところ、どの化合物でも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¹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、[6]-ショーガオールでは、1 群 5 人以上の被験者が必要となることが判明した。他方、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。従って、7 成分のうち、リクイリチン、[6]-ショーガオールは、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。リクイリチゲニン、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が、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、黄芩湯のフラボノイド配糖体（リクイリチン等）が腸内細菌とのインキュベーションによりアグリコン（リクイリチゲニン等）へ代謝されることが報告されている。従って、同化合物の場合、腸内細菌叢の個体差によりデータがばらつくことから、同等性の指標成分とするには困難であると考えられた。また、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。

次に、八味地黄丸に関する結果では、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 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、どの化合物も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も行う必要があると考えられた。

C-5 生薬の多様性と標準化に関する研究

LC/MS によるメタボローム分析による多様性確認を指向し、LC-IMS-MS を用いた生薬中の異性体成分の構造推定法の有用性を検討するため、大黄中のアントラキノン配糖体の位置異性体について、衝突断面積を測定し、分子シミュレーションによって得られた候補化合物の衝突断面積の理論値と比較することによって、構造推定を行った。その結果、文献情報を基に LC の保持時間や MS スペクトルから予測した構造と、衝突断面積の比較から推定された構造は良く一致した。さらに、衝突断面積の理論値と実測値の誤差は十分低い値であったことから、LC-IMS-MS 分析により、高い精度で生薬中の異性体成分の構造推定が可能であることが示唆された。

次いで、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から、特徴的なピークは、ginsenoside 類であることが示唆され、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。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、*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、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。

次に、シャクヤク (芍薬) 及びセキシヤク (赤芍) を対象として、LC-MS 分析と多変量解析を行った。その結果、3 グループに分類されることが判った。即ち、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. 即ち, 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の LC-MS 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も, 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-6 漢方処方 of 安全性, 有効性に関する研究

陳皮に含有される菌 *L. reuteri* 増殖促進活性成分の分離を行った. その結果, 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に違いが生じ

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。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、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、主に当帰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。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かにも興味を持たれる。

小腸上皮細胞におけるサイトカイン発現に影響を及ぼす漢方処方に関する研究では、ヒト小腸上皮細胞株 Caco-2 における炎症性サイトカインの発現を惹起する刺激として TNF- α 処理について検討し、Interleukin-6 及び 8 の発現が誘導されることを見出した。また、漢方処方スクリーニングの予備実験として、Caco-2 細胞における漢方処方凍結乾燥エキス (31 処方) の細胞毒性について検討した。100 μ g/mL の濃度ではほとんど毒性を示さず、250 μ g/mL において黄連解毒湯、三黄瀉心湯及び大黄甘草湯が強い細胞毒性を示すことを見出した。

次に、六君子湯の抗炎症性サイトカイン IL-10 発現増強活性について検討した。その結果、活性は半夏に由来することが判明した。また、去甘草及び去生姜においても活性抑制が見られた。一方、単味で IL-10 増強活性が見られた生薬のうち、白朮についてはそれを除いても活性にほとんど影響が無かった。次に、半夏に含まれる活性成分について精製を試みた。その結果、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なった。そこで、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。引き続き、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-7 一般用漢方製剤承認基準の改正に関する研究

平成 23 年に行われた第 4 回一般医薬品漢方処方に関する検討会の審議内容、及びパブリックコメント（募集期間平成 24 年 4 月 9 日から平成 24 年 5 月 8 日）で集まった意見を基礎として、国立医薬品食品衛生研究所生薬部を拠点とし、厚生労働省医薬食品局審査管理課、医薬品医療機器総合機構、日本漢方生薬製剤協会及び医師等と綿密に連絡を取りつつ、平成 24 年 6 月 7 日開催の厚生労働省薬事・食品衛生審議会一般用医薬品部会における「一般用漢方処方に係る新規処方の追加について」の審議における基礎的資料の準備等を行なった。さらに、今回の改正により一般用漢方製剤承認基準に関する一連の改訂作業が一段落することから、承認基準の処方の掲載順が、「新 210 処方案」にて提案されたものに従い、漢方の考え方を取り入れて基本処方と類方の組み合わせで分類した並び順に変更することとされた。すなわち、基本処方を五十音順で並べて番号を振り、それらに類方がある場合は枝番を付して表現し、その基本処方に続けて並べることとされた。また、長年慣れ親しんだ“210 処方”を尊重し、基本処方の数を 210 に合わせることにされた。そこ

で、黄芩湯、加味涼膈散（浅田）、甘草乾姜湯、沢瀉湯及び奔豚湯（肘後方）を類方から基本処方へ変更した。これらの検討をもとに、平成 24 年 8 月 30 日に、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）が発出された。

さらに、「一般用漢方製剤承認基準の改正について」の解説書として「新一般用漢方処方の手引き」の内容について検討した。新手引きでは新たに、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。最終的に平成 25 年 9 月に「新一般用漢方処方の手引き」を上梓することができた。

C-8 単味生薬製剤承認基準原案に関する研究

文献的にエビデンスがあり、すでに「局方医薬品承認申請の手引き（昭和 55 年 10 月、日本公定書協会編、厚生省監修）」に収載されている生薬は、以下の 5 生薬であり、エビデンスに基づき新規効能として提案可能なものは以下の通りであった。ボウイ：関節リウマチによる関節のこわばり・痛みの緩和・改善。サフラン：軽度うつ症状の緩和・改善、月経前症候群症状の緩和・改善、過剰な食欲の緩和。ケイヒ：健康診断等により指摘された境界領域の血糖値の改善、糖尿病の予防。コウジン：食後高血糖の改善、抗ストレス作用（更年期障害における精神状態の改善）。オウバク：（外用）歯周疾患の緩和。さらに、局方収載生薬であるオンジは上記手引きには収載されていないものの、エビデンスより次の効能が提案可能である。記憶

力減退、健忘症。次に、読み替え効能効果や新規効能効果における承認を取得するための手順を示すガイドラインの参考とするため、生薬製剤の品質に関わる欧米ガイドライン／ガイドダンス比較対比表を、生薬に関する事項、生薬エキスに関する事項、生薬末に関する事項に分けて作成した。

次に、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)の作成を行った。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。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。これらに基づき「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」を策定し公表した。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。さらに医薬食品局審査管理課に協力し、パブリックコメントに対応した。平成27年3月現在、開発ガイドラインについて詰めの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-9 生薬の品質確保に関する研究

漢方処方エキスでは、半夏厚朴湯1検体においてヒ素値が2.20 ppmと香港基準値2.0 ppmを超えたが、局方の基準値(3 ppm)は満たしていた。それ以外は、いずれも香港基準値を下回

っていた。また、試験対象とした元素が比較的高値で検出された検体においても概ね原料とした生薬に由来するものと考えられた。今後の金属含量規制を考えると、均一化された処方エキスの状態で規格化することが、現実的と考えられるが、今回の調査から、漢方処方エキス中の重金属、ヒ素量をコントロールするには、特定の原料生薬の重金属、ヒ素量を低減下することが重要であるものと考えられた。

ついで検討を行った処方のうち、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。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にしている。今回の検討では、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。従って、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ことが判明した。しかしながら、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は可能であった。次に、JPカッセキとCP滑石について検討したところ、両者は、 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。即ち、CP滑石に比べてJPカッセキは、 L^* 値が小

さく、 R_f 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-10 TLC 試験法に関する研究

検討した 26 品目の生薬の TLC による試験のうち、アラビアゴム、コウイ、ゴマ、ゴミシ、サンシシ、ゼンコ、センブリ、ソヨウ、ダイオウ、ニクズク、ニンドウ、ブシ、ボタンピについては、展開距離を 7 cm としても問題ないことが判明した。

また、展開距離以外の主な変更案は以下の通りである。アラビアゴムでは、展開溶媒を変更するとともに、加熱時間を 2 分間と規定した。コウイでは、検出手順を改訂した。サンシユでは、10 cm 展開が必要であることが判明した。また、色調については加熱時間によって発色が異なるため、色調は記載しないことになった。センソでは、標準品の濃度と試料溶液の濃度が等しくなるようスポット量や試料採取量を再度検討し、改定案を作成した。なお、分離を確保するため、展開距離は 10 cm が必要である。センブリでは、指標成分であるスウェルチアマリンの色調についてランプにより見え方が異なることが報告され、対応した記載案とした。ダイオウでは、レインを指標成分とする確認試験法を確立するとともに、純度試験については、ラポンチシンを標品として同時に展開する方向を検討した。バクガでは、 R_f 値を変更した。ビヤクジュツの純度試験では、分離条件・検出方法について検討し、確認試験と純度試験を同時に行う試験法が可能となった。ブシでは、ベンゾイルメサコニン塩酸塩の濃度を変更した。ボタンピでは、現行の標準溶液の濃度が薄すぎるため、濃度を 5 倍とし、溶解溶媒を変更した。もメタノールから試料調製と同じヘキサンに

変更することとした。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、色調の観察時間を変更した。

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、アマチャ、シャゼンシ、シユクシヤ、タクシヤ、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、JP16(局外生規 2012 も含む)と CP2010 との生薬の比較を実施し、日本の公的規格収載生薬のおよそ 2/3 の 137 の生薬で、CP と同じ基原と部位の動植物を、その生薬の基原種として認めていることを示した(この場合、多くの生薬で、基原として複数の種を認めているため、日本と中国において一部の基原種が同じであった場合は同一の基原と見なしている)。さらに、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, HKCMMS)と日本薬局方(及び局外生規)との収載生薬品目及び TLC 確認試験法、定量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。また、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。HKCMMS 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。

また、ベトナム、ハノイ(2012)、シンガポール(2013,2014)で行われた FHH の Standing Committee に出席して、日本の生薬の公的規格の現状と Sub-Committee 1 の活動について報告するとともに、各国関係者に JP の英語版(官版及び CD)を配布した。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, 国際生薬標品)の構築に向けた FHH における共同研究案が提示され、現在、Sub-Committee II の活動として日本も協力中である。なお、合田、木内は、2014 年度で、日本選出の Standing Committee メンバーを辞任し、次年度からは、袴塚、川原が同メンバーになることとなった。また、シンガポールで行われた第 5 回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。

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、麻黄湯、乙字湯、大柴胡湯、葛根湯加川芎辛夷について、第 16 改正日本薬局方(16 局)第二追補収載となった。さらに桃核承気湯、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 17 局収載予定となるとともに 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。

D-2 公定書未収載生薬の英名に関する検討

漢方処方に用いられる局方、局外生規未収載の生薬や生薬製剤に使用される生薬等で、これまで英語名が定められていなかった 66 の生薬について、日本での使用実態にあわせて、英語名について検討し、厚労省審査管理課から平成 25 年 4 月 15 日に発出された事務連絡の原案を作成した。

D-3 定量 NMR の利用に関する研究

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として、内部基準物質の不純物シグナルの問題、測定対象物の不純物シグナルの問題、内部基準物質の化学シフトの問題、ピークの単一性の問題及び、吸湿性の問題について考察、検討し、生薬試験法に記載すべき qNMR 測定上の注意点は、どのようなものであるべきか、

qNMR の試薬各条での記載案をどうすべきか、qNMR を実際に局方で採用した後、試薬会社で値付けの際、個々の試薬で、どのようなことを注意すべきで、販売の際には、どのような注意書きを書くべきであるか等を明らかにした。本研究の結果、その結果、ゲニポシド、ペオノール、マグノロール、マグノフロリンについて、試薬として必要な局方規格が完成した。これらの試薬を利用して、16 局第二追補においてサンシシ、サンシシ末、ボタンピ、ボタンピ末、コウボク、コウボク末と、加味逍遥散エキス、半夏厚朴湯エキス等複数の漢方処方エキスにおいて、qNMR の定量結果に基づいた指標成分の定量が可能となる。さらに、ケイヒ酸、レイン、ロスマリン酸、サイコサポニン b2 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、これらの化合物について qNMR で値づけされた試薬が供給できる目処がたち、17 局では、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。

D-4 エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究

小青龍湯において、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、[6]-ショールガオール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。一方、グリチルリチン酸（葛根湯も同様）、ペオニフロリン、リクイリチゲニン、アサリニン、シザンドリン、ジンゲロンを検討した結果、個体差による吸収や代謝のメカニズムに由来すると考えられるばらつきが大きいこと、感度が低いこと等から同等性の指標成分とするには、現段階では困難であることが明らかとなった。また、八味地黄

丸成分のうち、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-5 生薬の多様性と標準化に関する研究

LC/MS によるメタボローム分析による多様性確認を指向し、生薬中の異性体成分の新しい識別法の確立を目的として、LC-IMS-MS を利用した構造推定法の有用性を検討するため、大黄に含まれるアントラキノン配糖体の構造推定を試みた結果、低分子化合物に対しても生体高分子と同程度の精度で化合物の推定が可能であることが確認でき、イオンモビリティ分離技術が生薬中の異性体成分の構造推定に有用であることが示唆された。次いで、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。さらに、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。即ち、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-6 漢方処方の安全性、有効性に関する研究

in vitro 培養した乳酸菌 *L. reuteri* の生育に影響を与える処方について研究を行い、茯苓飲及びその構成生薬である陳皮に菌増殖促進活性があることを見出した。陳皮中の活性成分について更に検討を行ったところ、sucrose が