

平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)  
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  
生薬・漢方製剤の安全使用に関する研究  
分担研究報告書

分担研究課題 漢方製剤の安全性確保に関する研究

分担研究者 名城大学薬学部 教授 能勢 充彦

研究要旨 前年度の結果から、まず甘草の配合量に比してグリチルリチン酸 (GL) 含量の低かった小青竜湯について、マウスを用いて血中代謝物であるグリチルレチン酸 (GA) の動態を検討した。小青竜湯では、対照として用いた小柴胡湯に比べ、GL 含量が低いにもかかわらず、その bioavailability は高いことが明らかとなり、副作用の予測には甘草の配合量や当該処方における GL 含量の他に血中濃度なども考慮に入れる必要性が示唆された。また、新たに麻黄配合処方におけるエフェドリン系アルカロイド含量の測定を開始し、医療用および一般用漢方エキス製剤として承認されている 32 処方中 17 処方の分析を終了した。その結果、これらの処方においては麻黄配合量とエフェドリン系アルカロイド含量の間に良好な直線性が認められ、他の構成生薬の影響を受けることはあまりないことが判明した。以上の結果は、麻黄配合漢方エキスにおいて、エフェドリン系アルカロイドに起因する副作用の予測には麻黄の配合量を一義として用いることができることを示している。

#### A. 研究目的

本研究は、「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生薬・漢方製剤の安全性に関する研究」の一部として、昨年度甘草配合漢方処方におけるグリチルリチン酸 (glycyrrhizin, GL) の移行率について、使用上の注意における甘草の記載事項を意識しながら定量解析を行っ

た<sup>1)</sup>。

その結果、検討した代表的な甘草配合漢方処方 25 処方におけるヒト一日量中の GL 含量 (mg) は配合甘草量 (g) に対して概ね直線性を示すことが明らかとなった。一方、小青竜湯はその相関から大きく外れた GL 含量を示すことも明らかとなり、小青竜湯では構成生薬の五味子に含有される有

機酸の影響を受け、煎じ液の pH の低下が GL の抽出効率を低下させていることを推定した。

また、pH=2 から 8 までの緩衝液を作製し、甘草末からの GL の抽出効率（抽出液中の GL 含量 (mg) / 使用した甘草重量 (g)）を検証したところ、GL の pKa3 周辺を最大とする抽出パターンが観察され、生薬からの GL の抽出効率は pH に依存したパターンを示すことが明らかとなった。

そこで、25 種類の漢方処方についてもヒト一日量中に含まれる GL 含量 (mg) を配合甘草量 (g) で除した値を算出し、それぞれの煎じ液の pH との関係について相関分析を行ったところ、相関係数は 0.7101 を示し、また有意な相関があることが判明した ( $p < 0.0001$ )。つまり、漢方処方においても GL の抽出効率は煎じ液の pH と強い相関があることが示された。

さらに、エキス一日量における GL 含量が低値を示した小青竜湯について、偽アルドステロン症など甘草に起因する副作用報告件数は低いのかどうかを確認するため、今回検討した甘草配合漢方処方の副作用報告件数を PMDA のデータベース（2004–2015 年）から拾い出した。それぞれの副作用全体の報告件数ならびに甘草に起因すると考えられる副作用（偽アルドステロン症、低カリウム血症、ミオパチー、横紋筋融解症）の二つについて、甘草配合量 (g) あるいは一日量中の GL 含量 (mg) との関連を検証した。その結果、エキス一日量あたり最も多

くの GL を含有する芍薬甘草湯では、副作用報告のほとんどが偽アルドステロン症関連報告であり、その他では抑肝散が同様の傾向を示していた。小青竜湯についても、偽アルドステロン症に関する副作用報告は存在し、甘草の配合量をもとに考えると少ない印象を受けるものの、他の処方と比較して少ないわけではなかった。これらの副作用との関連については、それぞれの処方の実臨床における使われ方や患者背景によることも考えられる一方で、処方として投与された際の血中濃度などにも影響されるのではないかと考えられた。

そこで、本年度の検討として、まず小青竜湯投与時の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度を検証することとした。ヒトにおける先行研究では、甘草単味エキスや小柴胡湯、小青竜湯を投与した際の血中 GA 濃度推移を検討し、必ずしも同様の挙動を示さないことが報告されており<sup>2)</sup>、昨年度の考察を検証する上で興味を持たれる。

また、漢方製剤の安全使用については、甘草のような配合量による記載事項の違いなど細かな設定はないものの、その他にも懸念される生薬がいくつか存在する。本年度は、麻黄を対象生薬として取り上げ、昨年度と同様に麻黄配合漢方処方を調製し、それぞれ処方間でエフェドリン系アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）含量に違いがあるのかどうかについても検討を開始した。

## B. 研究方法

### 1. 生薬材料

本研究では、すべて日本薬局方の規定を満たした刻み生薬を（株）ツムラおよび大晃生薬（有）より購入して用いた。本研究では、すべての実験を通して同一ロットの生薬を用いた。

### 2. 漢方方剤の調製

麻黄配合漢方処方については、新一般用漢方処方の手引（じほう社）に基づき、32 処方を選出した。本年度は、そのうち改訂 4 版漢方業務指針（日本薬剤師会編）に記載されている処方をベースに 19 処方についてエキスを調製した。

エキスの調製には、漢方業務指針に則り、それぞれ構成生薬を秤量し、600 ml の精製水を加えて、マイコン煎じ器（ハリオ社製）を用いて 1 時間、約半量になるまで煎じた。煎じ液は、残渣をろ過後、放冷して pH を測定し、その後凍結乾燥した。

### 3. エフェドリン、プソイドエフェドリン含量の測定

各凍結乾燥エキスを 50 mg 正確に秤量し、50 ml の精製水に溶解し、0.45  $\mu$ m メンブランフィルター処理して HPLC サンプルとした。

HPLC の測定条件は、以下の通りである。

カラム：Inertsil-ODS3（5  $\mu$ m、4.6 mm I.D. x 150 mm）

移動相：ラウリル硫酸ナトリウム 5 g にアセトニトリル 350 ml を加えて振り混ぜた後、水 650 ml 及びリン酸 1 ml を加えて溶かしたもの。

流量：1.0 ml/min

検出波長：210 nm

カラム温度：40°C

### 4. 使用動物および投与スケジュール

実験動物として、雌性 BALB/c マウス（7～8 週齢、SLC）を用い、18 時間絶食後、漢方方剤をヒト常用量の 10 倍量となるよう経口投与し、各時間に全血を採取した。得られた血液は室温で 30 分間放置し、3,000 rpm、15 分間の遠心処理を行い、血清とした（-80°C 保存）。

### 5. 前処理方法および血中グリチルレチン酸の定量

血清 200  $\mu$ l に対し、2-methylanthraquinone (10 ng) を内部標準として用い、アセトニトリル (1,800  $\mu$ l) を加えて除タンパクを行った。4°C、10,000 rpm、10 分間の遠心処理を行い、上清 (1,800  $\mu$ l) を回収した。この上清を減圧乾固し、残渣にメタノール (100  $\mu$ l) を加えて溶解し、その 30  $\mu$ l を HPLC 分析に供した。

HPLC の測定条件は、以下の通りである。

カラム：COSMOSIL 5C18-AR-II (5  $\mu$ m, 4.6 mm I.D. X 150 mm)

移動相：CH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>OH-2% acetic acid = 48 : 10 : 42

流速：1.0 ml/min

検出波長：254 nm

カラム温度：40°C

## C. 結果及び考察

### 1. 甘草配合漢方処方におけるグリチ

ルレチン酸 (GA) 血中濃度推移について

まず、甘草単味エキスを作製し、雌性 BALB/c マウスにヒト常用量の 10 倍量の投与量で投与し、血中主代謝物であるグリチルレチン酸 (GA) の血中濃度を検討した。また、同様に、標準品のグリチルリチン酸 (GL) を用いて、甘草湯ヒト常用量の 10 倍量相当量 (43.3 mg/kg) を経口投与して血中 GA 濃度を比較した。

その結果、標準品 GL 投与においては投与後 8 時間と 12 時間に二つの大きなピークをもつ血中 GA 濃度推移が観察され、甘草湯では投与後 3 時間に出現した GA は 8 時間後に大きなピークを示し、その後 24 時間後に緩やかなピークを示した後、48 時間後に向けて徐々に低下した (Fig.1)。標準品における第一のピークは、投与された GL が腸内細菌叢による糖鎖の加水分解を受け、生じたアグリコンの GA を吸収した際の挙動を示し、また第二のピークはその GA が肝臓でグルクロン酸抱合を受け、胆汁排泄されたものが再び腸内細菌叢による加水分解を受けた後吸収された、いわゆる腸肝循環を示すピークと考えられた。一方、甘草湯では、等量の GL を含有するにもかかわらず、血中 GA 濃度の経時変化は一致せず、含有される他の成分の影響を受けることが推察された (Fig. 2)。

次に、小柴胡湯と小青竜湯についても、ヒト常用量の 10 倍量をそれぞれマウスに経口投与し、血中 GA 濃度を測定した。その結果、両処方

における血中 GA 濃度の推移は異なる結果を示し、小柴胡湯投与時よりも小青竜湯投与時の方が早期に明瞭な血中 GA 濃度のピークが認められた (Fig.3、4)。

健常人ボランティアによる先行研究においても、甘草単味エキスと小青竜湯は類似した GA の血中濃度推移が報告されており、小柴胡湯投与では血中 GA 濃度の経時変化が異なることが示されている。ヒトとマウスという種差はあるものの、甘草単味エキス・小青竜湯と小柴胡湯では異なる経時変化をもつことが明らかになったと考えている。

また、これらの GA の血中濃度について速度論的に解析を行った結果を Table 1 に示した。興味深いことに、小柴胡湯と小青竜湯の結果を比較すると、GL としての投与量の少ない小青竜湯において  $C_{max}$  や  $AUC_{0-48}$  が大きな値を示し、GL 含量よりも甘草関連副作用報告数と相関する結果となった。これらの結果は、甘草に起因する副作用を予測する上で、甘草自体の配合量や GL 含量だけでなく、処方として投与した際の血中 GA 濃度についても考慮に入れる必要性を示唆している。

以上の検討から、同じ甘草配合量であり、同程度の GL を含有するという結果を示すにもかかわらず、副作用の報告件数が異なる処方については、マウスやラットを用いた血中 GA 濃度についても検討する必要があるのではないかと考えている。

## 2. 麻黄配合漢方処方におけるエフェドリン系アルカロイド含量について

### 2-1. 使用した麻黄のエフェドリン系アルカロイド含量について

まず、実験に供した麻黄の刻み生薬におけるエフェドリン系アルカロイド含量について、第一六改正日本薬局方 (JP16) に則り定量した。すなわち、麻黄を粉末化し、その約 0.5 g を精密に量り、薄めたメタノール (1 → 2) を加えて抽出操作を行い、その抽出液を HPLC 分析に供した。その結果、本研究に用いたロットの麻黄は、生薬の乾燥物 1 g に対し、それぞれ  $7.28 \pm 0.07$  mg および  $3.28 \pm 0.03$  mg のエフェドリンおよびプソイドエフェドリンを含有することが明らかとなった (Fig. 5、n=3)。

### 2-2. 抽出時の条件によるエフェドリン系アルカロイドの抽出効率について

つぎに、昨年度甘草においても検証したが、生薬から目的成分を抽出する場合、一般に材料の比表面積が大きいほど抽出効率が高いとされる。そこで、漢方方剤を調製する際、刻み生薬の大きさによってエフェドリン系アルカロイドの煎じ液への抽出効率が変わるかどうか検証した。すなわち、検討予定の麻黄配合処方を考慮して、最も一般的な配合量である 4 g の刻みあるいは粉末麻黄を正確に量り、600 ml の精製水を用いて、漢方方剤を調製する場合と同様に煎じ、得られたエキスを凍結乾燥した後、収量ならびにエフェドリン系アルカロイドを定量した。

その結果、収量については刻み麻黄で  $0.85 \pm 0.02$  g、粉末麻黄で  $1.16 \pm 0.02$  g となり、やはり粉末においてエキス収量が多かった (Fig. 6)。また、アルカロイド含量においても、刻み麻黄エキスでは麻黄 1 g あたりそれぞれ  $5.44 \pm 0.09$  mg のエフェドリンと  $2.34 \pm 0.03$  mg のプソイドエフェドリンが含まれることが判明し、粉末麻黄エキスでは  $7.20 \pm 0.18$  mg と  $3.21 \pm 0.06$  mg 含有されることが判明した (Fig. 5)。粉末化した麻黄を用いた場合、ほぼ 100% 程度のエフェドリン系アルカロイドが抽出されるのに対し、刻み麻黄では 80% 強しか抽出されないことが明らかとなったため、以降の麻黄配合漢方処方の調製時には用いる刻みの大きさに留意し、粉末のごとく細かな麻黄は使用しないようにした。

さらに、甘草の場合、グリチルリチン酸の抽出効率は煎じ液の pH に依存することを昨年度明らかにした。エフェドリンやプソイドエフェドリンはアルカロイドであるため、酸性条件下ではカチオンとなって存在することから、麻黄からの抽出効率が抽出液の pH によって影響を受けることも考えられた。そこで、pH=2.0 から 8.0 までの 100 mM 緩衝液を作製し、粉末麻黄を用いて JP16 における抽出法に準じて抽出効率を検証した。

その結果、エフェドリン、プソイドエフェドリンともに pH=2 あるいは 3 において、わずかに抽出効率は上昇するものの、ほとんど影響は受けないことが明らかとなった (Fig. 7、8)。

2-3. 麻黄配合漢方処方 19 種のエフェドリン系アルカロイド含量について

医療用および一般用漢方エキス製剤 294 処方において、麻黄配合処方 32 処方を数え、旧 210 処方においては 17 処方を数える。まずは、漢方業務指針に記載されているように、構成生薬の割合が明確な 17 処方（葛根湯、葛根湯加川芎辛夷、独活葛根湯、杏蘇散、桂麻各半湯、五虎湯、五積散、小青竜湯、小青竜湯合麻杏甘石湯、小青竜湯加石膏、秦艽羌活湯、神秘湯、防風通聖散、麻黄湯、麻杏甘石湯、麻黄薏苡仁湯、薏苡仁湯）と医療用エキス製剤が存在することで構成生薬の割合がわかっている 2 処方（越脾加朮湯（蒼朮・白朮の 2 種類）、麻黄附子細辛湯）を併せ、19 処方のエキスを作製し、エフェドリン系アルカロイドの定量を行った。

その結果、防風通聖散と秦艽羌活湯においては、プソイドエフェドリンに相当するピークに夾雑ピークが存在し、現在の分析条件では正確な定量ができなかった。現在、その夾雑ピークの同定ならびに前処理による分離を検討している。その他の 17 処方では、エフェドリンならびにプソイドエフェドリンは良好な分離を示し、その定量値は Fig. 9、10 のようであった。

それぞれ処方の麻黄配合量 (g) とエフェドリン、プソイドエフェドリン含量 (mg) とをプロットしたところ良好な直線性を示し (Fig. 11、12)、麻黄配合漢方処方中のエフェドリン系ア

ルカロイド含量は麻黄の配合量で推測することができることが明らかとなった。

#### D. 結論

本年度は、まず、前年度検討した結果をもとに、小青竜湯投与後血中 GA 濃度について甘草単味エキスや小柴胡湯を対照に検討し、小青竜湯では小柴胡湯に比較して GL 含量は低いものの、血中 GA 濃度については Cmax、AUC<sub>0-48</sub> ともに高い値を示すことを明らかにした。この結果は、副作用の予測に資するデータを確立していくためには、当該生薬の配合量や処方中の成分含量だけでなく、当該成分やその主代謝物の体内動態をも考慮する必要があることを示している。

また、本年度新たに麻黄配合漢方処方のエフェドリン系アルカロイドの定量分析を行ったところ、当該 32 処方中 17 処方を終えて、エフェドリン、プソイドエフェドリンともに配合麻黄量に対して非常に良好な直線性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、同一ロットの麻黄を用いた場合、麻黄配合漢方エキス製剤におけるエフェドリン系アルカロイド量は配合麻黄量により推定することができ、さらにエフェドリン系アルカロイドに起因する副作用の予測には配合麻黄量を第一義的に用いることができることを示している。

#### 参考論文

- 1) 能勢充彦、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政策研究事業 「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生薬・漢方製剤の安全使用に関する研究」(H27-医薬-指定-009) 平成 27 年度総括・分担研究報告書、73-86、2016.
- 2) 宮村充彦、小野正英、京谷庄二郎、西岡 豊、薬学雑誌、116、209-216、1996.

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表等

論文等

投稿準備中

学会等

発表準備中

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

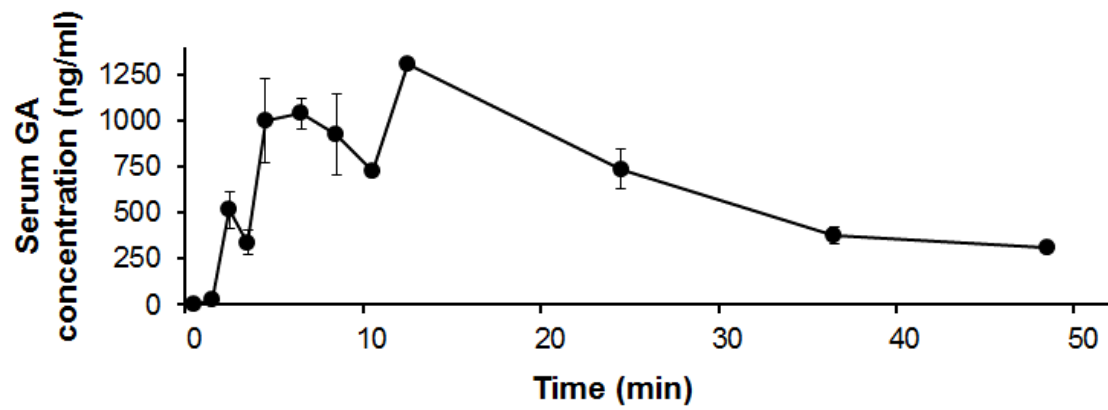


Fig. 1 グリチルリチン酸（標準品）経口投与後における  
血中グリチルレチン酸（GA）濃度推移

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of three mice.



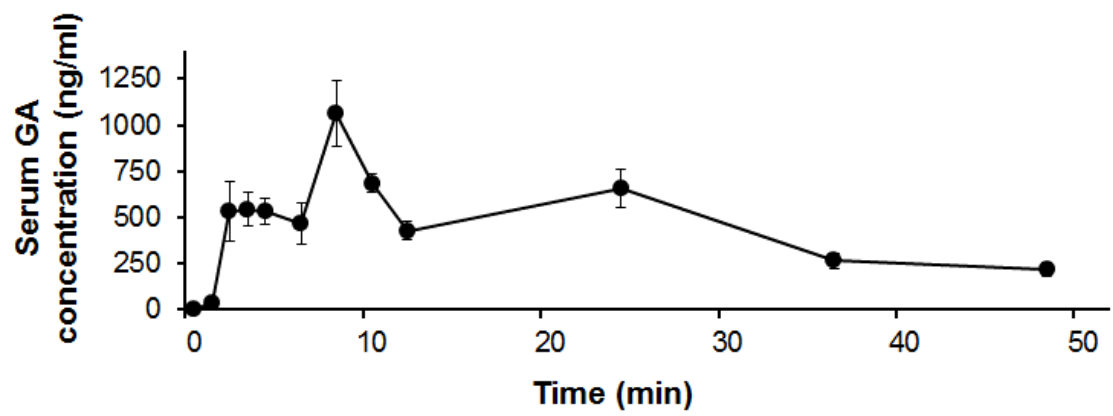


Fig. 2 甘草単味エキス経口投与後における血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of three mice.

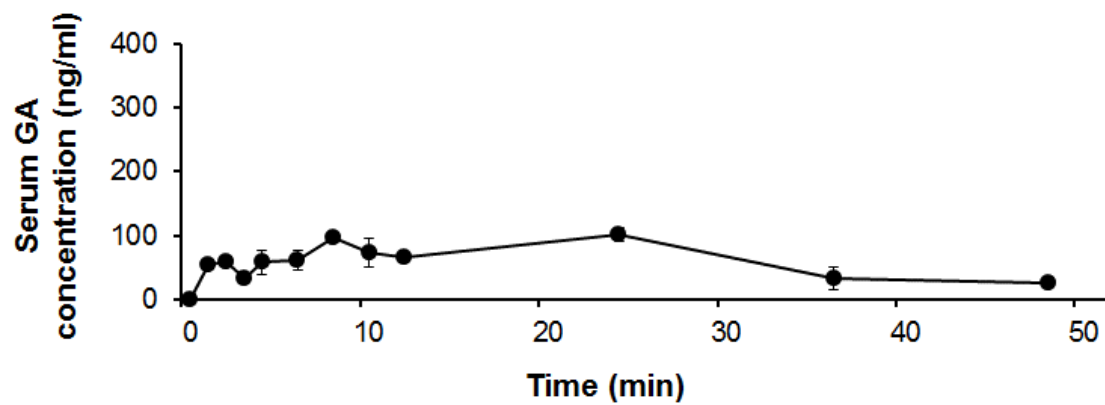


Fig. 3 小柴胡湯経口投与後における血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of three mice.

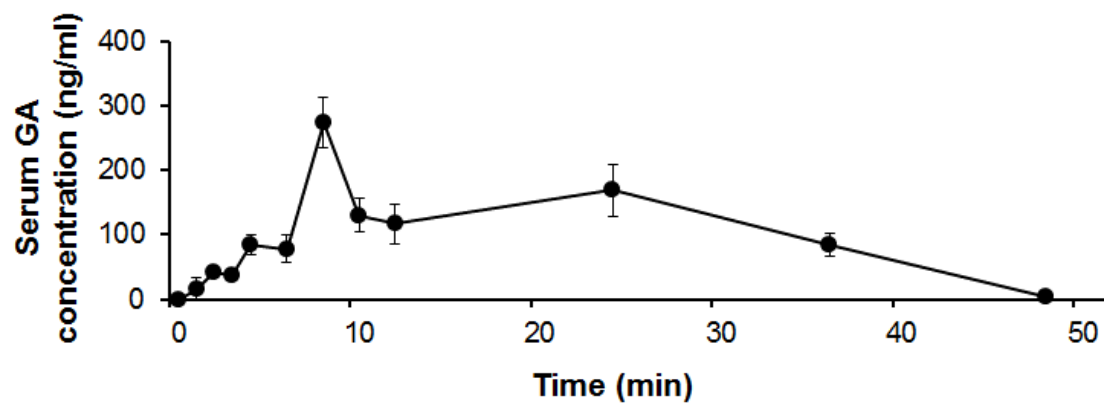


Fig. 4 小青竜湯経口投与後における血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of three mice.

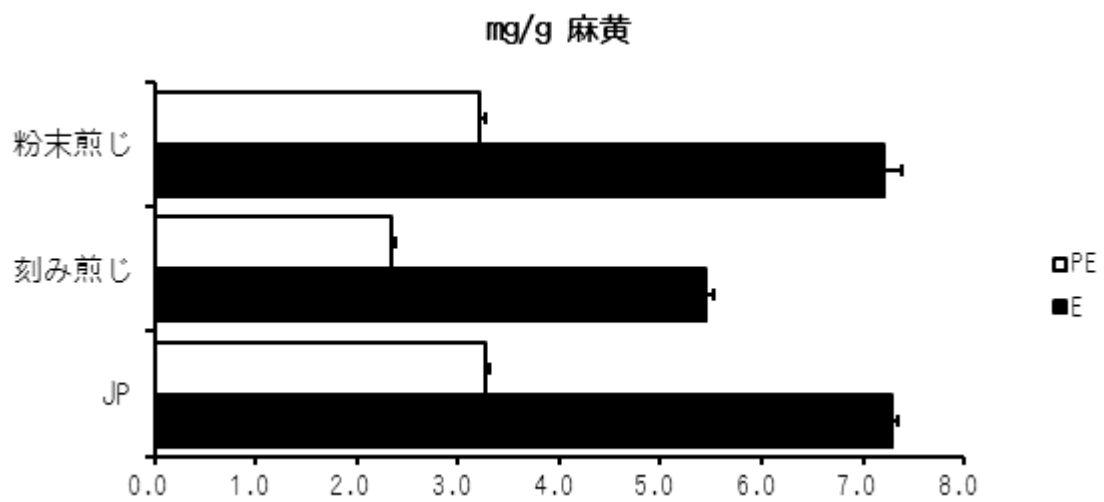


Fig. 5 実験に使用した麻黄のエフェドリン系アルカロイド含量および刻み生薬と粉末生薬を煎じた際のエキス中エフェドリン系アルカロイド含量  
E, エフェドリン ; PE, プソイドエフェドリン

Each column represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

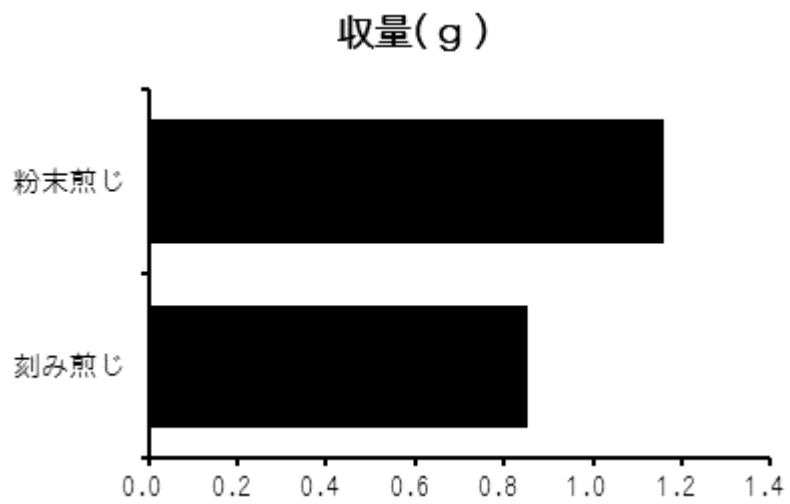


Fig. 6 刻み生薬と粉末生薬を煎じた際のエキス収量  
Each column represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

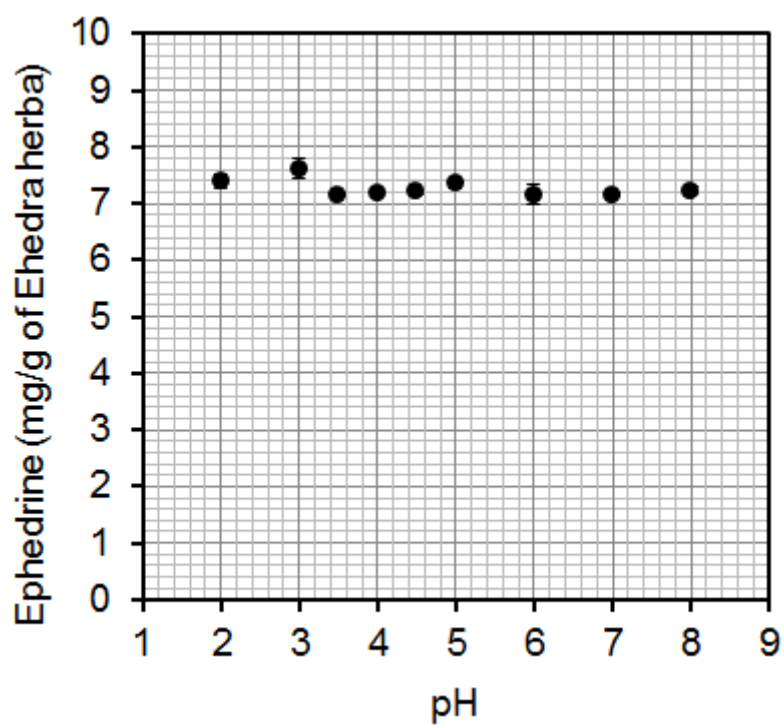


Fig. 7 麻黄からのエフェドリン抽出効率に及ぼす pH の影響  
Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

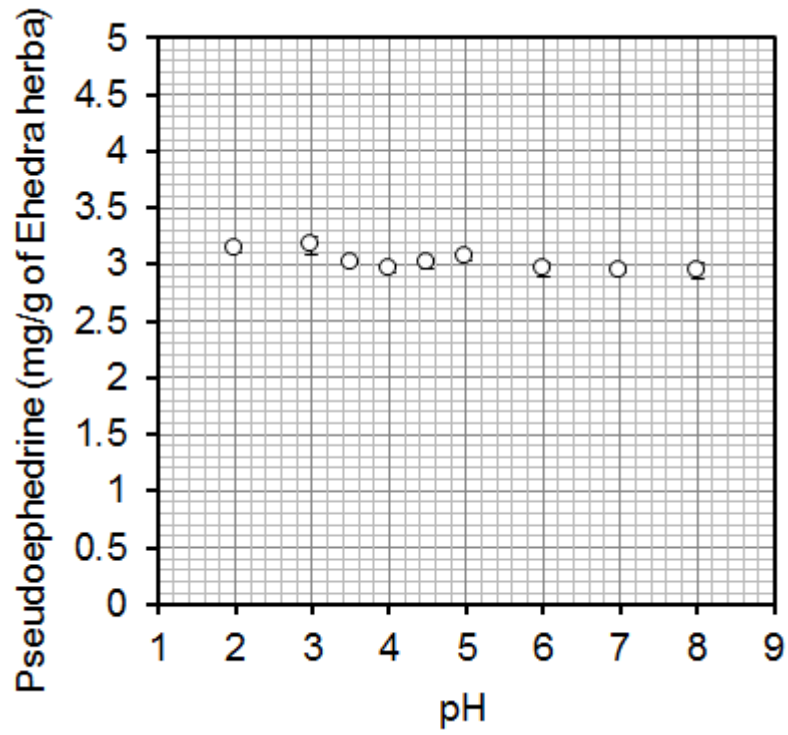


Fig. 8 麻黄からの pseudoephedrine 抽出効率に及ぼす pH の影響  
Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

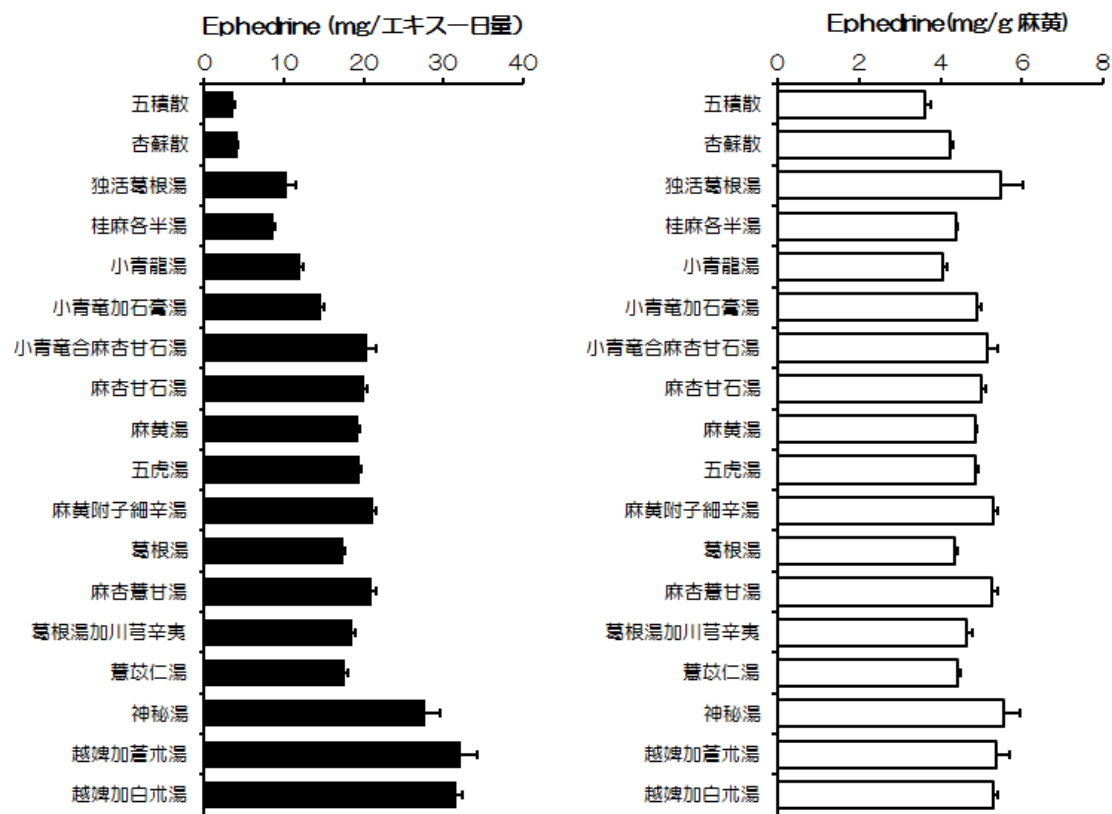


Fig. 9 麻黄配合漢方処方 17 種のエフェドリン含量

Each column represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

但し、越婢加朮湯は、朮として蒼朮を用いたもの（越婢加蒼朮湯）と白朮を用いたもの（越婢加白朮湯）の二つを作製し、定量分析も行った。



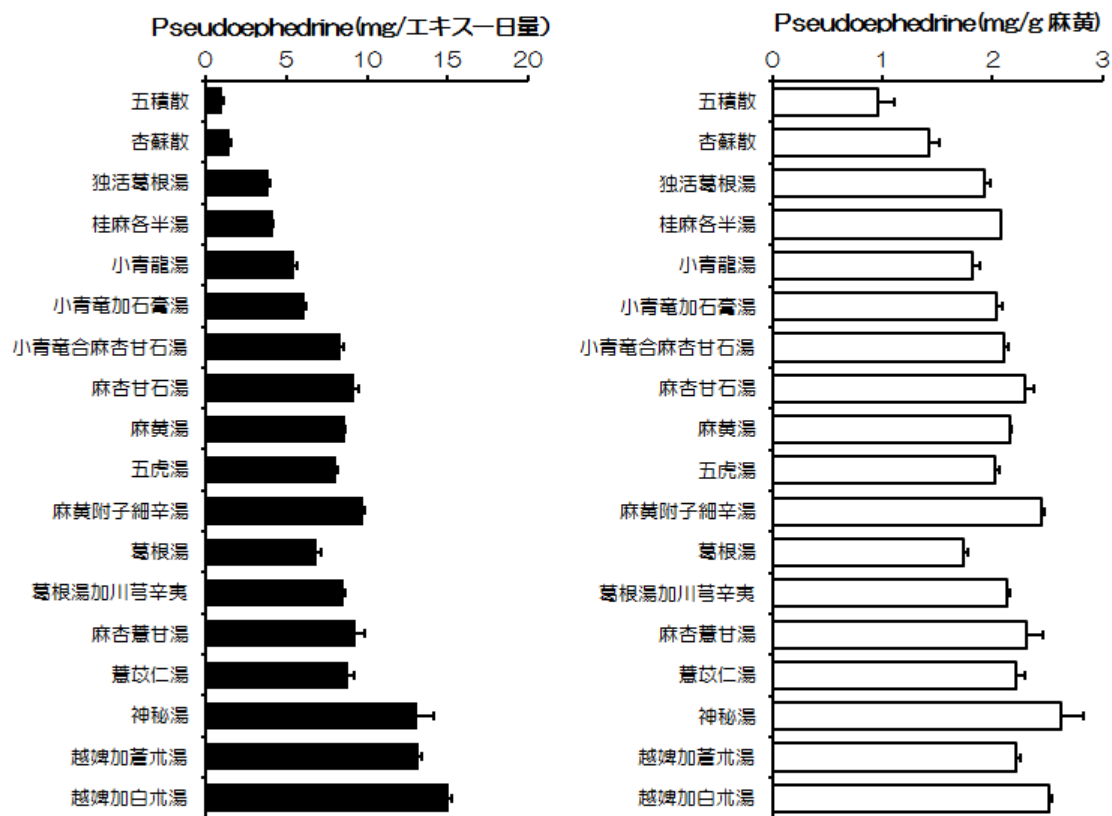


Fig. 10 麻黄配合漢方処方 17 種の pseudoephedrine 含量

Each column represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

但し、越婢加朮湯は、朮として蒼朮を用いたもの（越婢加蒼朮湯）と白朮を用いたもの（越婢加白朮湯）の二つを作製し、定量分析も行った。

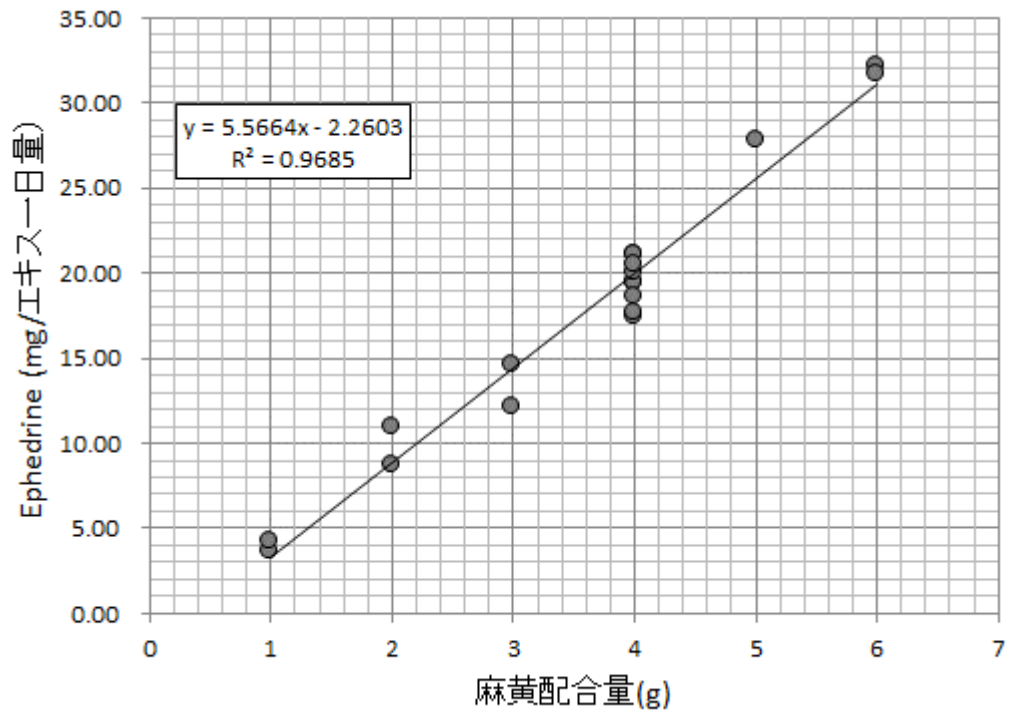


Fig. 11 麻黄配合漢方処方 17 種のエフェドリン含量と麻黄配合量の相関

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.

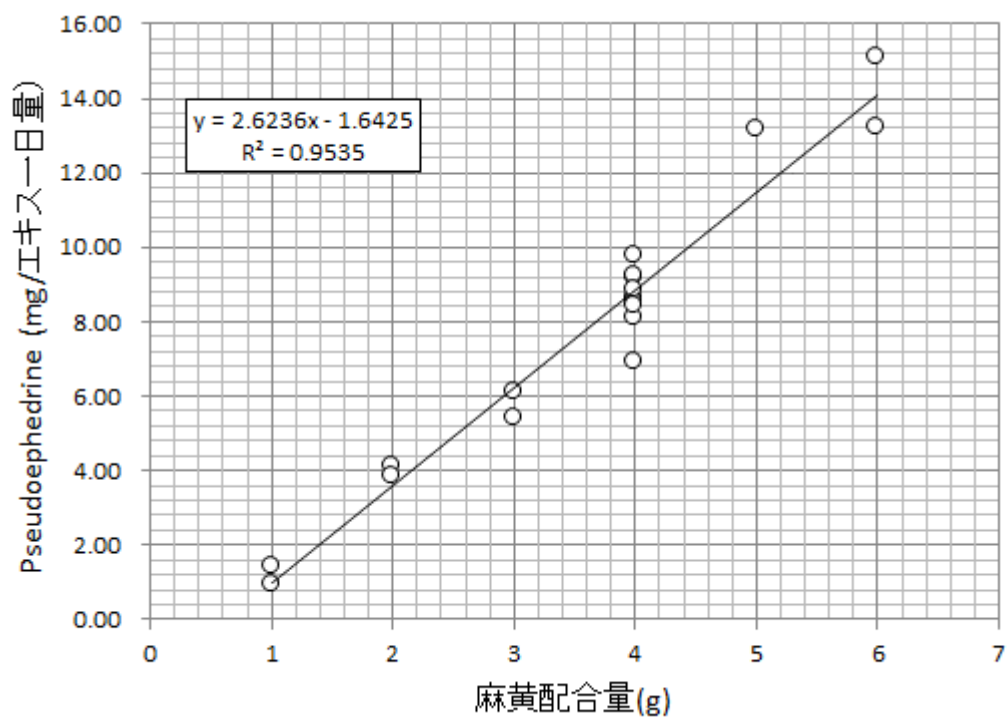


Fig. 12 麻黄配合漢方処方 17 種のプソイドエフェドリン含量と麻黄配合量の相関

Each point represents the Mean  $\pm$  S.E.M. of triplicate samples.