

厚生労働行政推進調査事業補助金
(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)
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 カンゾウ配合漢方エキスにおいて、小柴胡湯と小青竜湯ではグリチルリチン酸含有量と血中グリチルレチン酸動態が相関しないという結果の詳細を解析すべく、投与時の溶液の pH がグリチルレチン酸血中濃度に与える影響を検討した。その結果、投与されたグリチルリチン酸の主代謝物であるグリチルレチン酸の動態は pH によって影響を受けることが判明したものの、小柴胡湯と小青竜湯の血中グリチルレチン酸動態の違いを説明できるまでには至らなかった。小柴胡湯投与時のグリチルレチン酸濃度には配合されるオウゴンもまた影響し、複数の要因が処方ごとに成分の吸収・代謝・排泄に影響を与えていることが示唆された。カンゾウ配合漢方処方の有効性や安全性を確実に担保していくためには、投与時の血中グリチルレチン酸濃度推移などについても処方ごとに検討し、データを整備する必要があるのではないかと考えられる。

A. 研究目的

本研究は、平成 30 年度厚生労働行政推進調査事業補助金(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)「一般用漢方製剤の使用上の注意の整備と安全使用に関する研究」の中で、「漢方製剤の安全性確保に関する研究」として実施しているものであり、副作用が懸念される生薬ならびにその成分について、漢方エキスの製造工程における当該成分の抽出効率や投与後の血中濃度など体内動態における差異について検討を重ねている。

本年度は、従前の厚生労働科学研究にて明らかとなったカンゾウに関する検討を引

き続き進めた。すなわち、これまでにカンゾウ配合漢方薬エキスの製造工程におけるグリチルリチン酸(GL)の抽出効率について、代表的な 25 種類の処方について定量解析を行い、エキス一日量中に含有される GL 量は概ね配合カンゾウ量に依存することを明らかとしたものの、ゴミシとの配合時には煎出液の pH がゴミシに含有される有機酸の影響を受けて低下し、GL の抽出効率が低下することを見出した¹⁾。また、ゴミシ以外の果実を原料とする生薬についても、GL の抽出効率への影響を検討したところ、ゴシュユとの併用時には煎液の pH の低下を認めたものの、GL の抽出効率はあまり影

響を受けず、汎用される果実生薬の中ではゴミシがカンゾウからの GL の抽出効率に強く影響することが明らかとなった。そこで、カンゾウ・ゴミシ共配合漢方エキス 12 種をすべて作製し、GL 含量に及ぼすゴミシ配合の影響を検証したところ、カンゾウ・ゴミシ配合漢方処方においては、一日量における GL 含量はカンゾウの配合量に相関するものの、GL の抽出効率については各処方煎出時の pH に強く相関することが確認された。以上の結果は、カンゾウ配合漢方エキスの製造工程において、各処方エキスの GL 含量は基本的には配合カンゾウ量と相関するものの、ゴミシなどエキスの pH が低下する場合には予想よりも低い GL 含量となることを示唆している。また、医療用漢方エキス製剤においては、インタビューフォームの製剤に関する情報の中に pH の記載があり、カンゾウに由来する副作用を予測する目的で GL 含量を推定する場合には、配合されるカンゾウ量と処方の pH をもとに考えることができると考えられる。

一方、先行研究においては、健常人ボランティアによる服用後の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度の推移について興味深い知見が報告されている。Miyamura らによると²⁾、カンゾウ単味エキスや小青竜湯を服用した場合と小柴胡湯を服用した場合では血中 GA 濃度の AUC_{0-24} や C_{max} は大きく変わらないものの、 T_{max} はカンゾウ単味エキスや小青竜湯で約 2 時間に対し、小柴胡湯では約 7 時間と大幅な遅延を認めている。この理由として、小柴胡湯には GL と同様にグルクロン酸を頭部に有するバイカリン (BA) が比較的多量に存在し、腸内細菌叢による加水分解において GL と BA が競合するこ

とで血中への出現を遅らせているからではないかと推定されている。この報告は、漢方エキス製剤中の含有成分の体内動態が処方によって異なることを示した興味深い事例であり、カンゾウあるいは GL に危惧される偽アルドステロン症といった副作用を回避するための安全情報として、代表的なカンゾウ配合漢方エキスを投与した際の血中 GA 濃度推移を明らかにする必要があるのではないかと考えた。

そこで、従前の厚生労働科学研究では、改めてカンゾウ配合漢方エキス投与時の血中 GA 濃度推移について、マウスを用いた基礎データの集積を目指し、まずは先行研究における小柴胡湯と小青竜湯投与後の血中 GA 濃度推移をマウスで再現可能かどうか検証したところ、両処方投与後の血中 GA 濃度推移がヒトとはまた異なる傾向を示したものの、両処方中の GL 含量と投与後の血中 GA 動態が逆転するといった興味深い結果となった。エキスの調製時に、煎出液の pH がその抽出効率に影響したことを考えると、投与後の消化管内における GL の挙動についてもエキスの pH が影響する可能性が想像されたため、本研究ではまず投与時の溶液の pH が血中 GA 濃度推移に与える影響から検討を開始した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験動物として、雌性 BALB/c マウス (8 週齢) を用いた (Japan SLC)。マウスは、名城大学薬学部実験動物センターにて飼養し、適宜実験に供した。すなわち、温度・湿度ともに制御されている SPF 環境下で、個別喚起飼育ケージ内で飼育し、餌 (MM-3、

フナバシファーム製)と水(RO水)は自由摂取とした。実験動物センターに到着後、少なくとも7日間の馴化を行い、各実験に供した。尚、動物の飼育管理ならびにすべての動物実験については、名城大学薬学部の定める規定を順守して実施した。

2. 試薬

GLは、名古屋市立大学薬学部名誉教授荻原幸夫博士から供与されたものを用いた。血中濃度の分析に用いた試薬は、すべてHPLCグレードのものを用い、それ以外の試薬は特級のものを使用した。

3. 実験スケジュール

雌性BALB/cマウスは、18時間絶食し、実験に供した。GLは、精製水あるいは各種pHの緩衝液に溶解あるいは懸濁して経口投与した。投与後、結果に示す時間に1.5%イソフルラン麻酔科で採血し、室温下30分~60分放置した後、3,000rpm、15分間の遠心処理をして血清とした。血清は、GAのHPLC分析まで、-35℃にて保存した。

4. 血中グリチルレチン酸濃度の測定

血清200µLに、内部標準である2-methylanthraquinone(MAQ)を10ng添加し、HPLC用アセトニトリル(1,800µL)を加えて氷上に放置し、除タンパクを行った。その後4℃、10,000rpm、10分間の遠心処理を行い、得られた上清(1,800µL)を回収した。この上清を減圧乾固し、得られた残渣にHPLC用メタノール(100µL)を加えて溶解し、その30µLをHPLC分析に供した。

HPLC条件は、以下のとおりである。

カラム：COSMOSIL 5C18-AR-II (5µm、4.6mm I.D. × 150mm)

移動相：CH₃CN-CH₃OH-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. 結果および考察

1. グリチルレチン酸投与における血中グリチルレチン酸濃度推移について

GLは経口投与された後、消化管内で腸内細菌叢による加水分解を受け、アグリコンであるGAとして吸収されることが知られている。吸収されたGAは肝臓で代謝を受け、3位がグルクロン酸抱合されたグリチルレチン酸-3-O-モノグルクロナイド(3MGA)が主に生成する。このグルクロン酸抱合体は、胆汁とともに十二指腸へと排泄され、再び腸内細菌叢による加水分解を受けるといった腸肝循環に入るとされる。実験動物として雌性BALB/cマウス(8週齢)を用い、絶食下で標準品のグリチルレチン酸(43.3mg/kg; 甘草湯ヒト一日量中のGL相当量)を経口投与したところ、投与後6時間と12時間をピークとした二峰性の血中GA濃度推移が観察された(Fig.1)。マウスの場合、この一番目のピークは、GLが加水分解された後、生じたGAが吸収されたものであり、二番目のピークはその後の腸肝循環の中で吸収されたGAのピークであると考えられ、その後腸肝循環を繰り返しながら、徐々に消化管から排泄され、48時間まで血中GA濃度は減衰するといった経時変化を示す(Fig.1)。ヒトにおいては、マウスのような明らかな二峰性の経時変化は観察されていないものの、GLあるいはカンゾウエキスを経口投与した場合、投与後数時間以降にGAが血中に出現し、その後

徐々に血中濃度が減少するなど、消化管内における構造変換や腸内細菌叢による代謝が確認されている³⁻⁶⁾。

2. 小柴胡湯、小青竜湯投与時の血中グリチルレチン酸濃度推移について

Miyamura らは、健常人ボランティアによる漢方エキス製剤服用後の GA 濃度推移を検討し、処方によって挙動が違うことを報告した。われわれは、マウスを用いて小柴胡湯あるいは小青竜湯について、ヒト常用量の 10 倍量を投与して血中 GA 濃度を測定したところ、小青竜湯では T_{max} である 8 時間に小柴胡湯の約 3 倍近い血中濃度を観察した (Fig. 2)。また、小青竜湯はゴミシの配合により、カンゾウ配合量に比して低い GL 含量となっており、小柴胡湯と比較すると投与量では低い値となっているものの (小青竜湯では GL として 3.6 mg/kg、小柴胡湯では GL として 4.9 mg/kg)、 AUC_{0-48} では小青竜湯で $5.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、小柴胡湯で $2.9 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ と逆転した。ヒトでの結果とは厳密には異なるものの、投与時の溶液の pH が GL の消化管内での挙動に影響を与える可能性を検証することとした。

3. グリチルレチン酸投与時の pH が与える血中グリチルレチン酸濃度への影響について

実験動物として、18 時間絶食した雌性 BALB/c マウス (8 週齢) を用いて、pH=3.5 の酢酸緩衝液 (100 mM) と pH=5.0 のリン酸緩衝液 (100 mM)、さらには精製水を用いて GL を溶解あるいは懸濁して投与し、投与後各時間に採血して血中 GA 濃度を測定した。

それぞれ pH の設定は、小青竜湯エキスの pH が 3.5 であり、小柴胡湯エキスの pH

が 5.0 であったことによる。また、それぞれの pH に応じた緩衝液を用い、イオン強度を揃えるために 100 mM とした。

その結果、pH=3.5 においては、10 mg/kg の場合には血中に GA が出現する時間が遅れ、6 時間後から血中に認められた。また、100 mg/kg の場合では投与後 4 時間から血中に GA が出現し、どちらの投与量においても投与後 8 時間をピークとした血中濃度が観察され、その後 48 時間後まで血中 GA 濃度はほぼ直線的に減少した。一方、pH=5.0 においては、どちらの投与量においても GA は pH=3.5 の場合よりも早く血中に出現し、12 時間後までその血中濃度は増加する。その後、24 時間まで血中濃度は維持され、その後 36 時間後までに急速に減少し、10 mg/kg 投与の場合 48 時間には血中から消失した (Fig. 3 および Table 1)。

両 pH 条件において、100 mg/kg 投与量の場合には C_{max} は若干 pH=3.5 の方が高かったものの、 AUC_{0-48} は同程度であった。一方、10 mg/kg の投与量においては、より顕著に pH の影響が観察され、pH=3.5 では投与後 8 時間と 12 時間に見かけ上二峰性の経時変化を示し、pH=5.0 では血中濃度のピークが 12 時間に現れ、その後 24 時間まで血中濃度は高く維持され、 AUC_{0-48} は pH=5.0 の方が約 3.4 倍高かった。小柴胡湯よりも GL 含量が低い小青竜湯投与において、 AUC_{0-48} が大きい値を示した理由を投与する溶液の液性から検証するという試みであったが、両処方中の GL 含量に近い投与量では pH=5.0 の方が、つまり小柴胡湯の液性条件で、より GA が血中に存在することが明らかとなった。

また、精製水に溶解して投与した際の血

中 GA 濃度推移と比較すると、10 mg/kg の投与量では pH=5.0 の方が C_{max} も高いことが判明した。GL の消化管内構造変換としての腸内細菌叢による加水分解を検証した先行研究によると、ヒトでは GL から GA への糖部の加水分解反応は代表的な腸内細菌である *E.coli* などではなく、比較的存在比の低い腸内細菌、例えば *Eubacterium* 属の細菌などによって生じることが報告されており⁷⁾、またその至適 pH は 5.6 であることも明らかとされている⁸⁾。また、ラットにおいても腸内容物を用いた実験において、同様に GL から GA への加水分解反応が進行することも証明されており⁹⁾、本研究で認めているようにマウスの腸内細菌叢もまた pH=5.0 の条件で、より多くの加水分解反応が生じ、GL やグルクロン酸抱合体から GA がより多く生成して吸収される GA が多いため、 C_{max} も高値を示し、かつ持続的な経時変化を示したのではないかと考えられる。

さらに、興味深いことに、精製水に溶解して投与した場合には、10 mg/kg、100 mg/kg の両投与量で二峰性の経時変化を示すものの、pH を厳密に固定すると 100 mg/kg では二峰性の経時変化ではなく、連続した経時変化となることも明らかとなった。この理由は現在のところ明らかではなく、腸内細菌叢による加水分解速度など構造変換における反応性の違いによるのか、あるいは生成した GA の消化管吸収もまた pH による影響を受けるのかについては今後の研究課題である。

また、わが国の高齢者では胃酸分泌の低下した無酸症を呈する 경우가多く、消化管内における pH が若干上昇した環境であるとすれば、本研究における pH=5.0 の結果

と近くなる可能性が考えられる。一般的に、カンゾウの副作用である偽アルドステロン症の危険因子として、過量、長期間投与、高齢者、女性の 4 つが挙げられるが、高齢者については副作用の発現が血中アルブミン濃度の低下と相関することが抑肝散を例に報告されたことから¹⁰⁾、加齢に伴うアルブミン産生の低下により、遊離の GA が血中に増加するからではないかと考えられている。もし、無酸症による血中 GA 濃度の上昇が重なれば、高齢者の血中 GA 濃度が高く維持されることが副作用の発症に関わる可能性も考えられるのではないかと推定している。

4. グリチルリチン酸経口投与における線形性・非線形性について

先の検討において、GL の低投与量においては血中 GA 濃度の AUC_{0-48} が pH による影響を受け、高投与量においては pH の影響をあまり受けなかったのはどういう理由なのかを解析する目的で、精製水に溶解した GL を用い、投与量を 10、50、100 mg/kg の 3 パターンで血中 GA 濃度推移を検討した。

Fig. 4 に示すように、すべての投与量で概ね二峰性の経時変化を示し、投与後 8 時間に第一ピークを、そして 12 時間に第二のピークを示し、48 時間後にはその大半が消失していた。さらに、投与量を横軸にして AUC_{0-48} をプロットしたところ、両者の関係は線形性を示さないことが明らかとなり、その形状から投与量を増加させた場合代謝が飽和する傾向が示唆された (Fig. 5)。この結果から、100 mg/kg の場合に AUC_{0-48} において、pH による影響が観測されなかったのは、この飽和現象が影響しているの

はないかと考えられる。

5. 小柴胡湯投与時の血中グリチルレチン酸濃度に及ぼすオウゴンの影響

マウスに小青竜湯あるいは小柴胡湯を投与した場合、ヒトの場合とも異なる血中 GA 濃度推移を示した。ヒトの場合、 T_{max} が遅延する要因として、GL と同じくグルクロン酸配糖体である BA を含有するオウゴンとの配合が挙げられている。そこで、マウスの場合においてもオウゴンの影響がどれほどあるのかについて検証した。

小柴胡湯からオウゴンを除いたエキスあるいは小柴胡湯の構成生薬の比率でカンゾウ・オウゴンエキスを作製し、それぞれのエキス収量からヒト常用量の 10 倍量として投与して血中 GA 濃度を測定した (Fig. 6)。

GL としての投与量が異なるため、直接的な比較は難しいが、小柴胡湯投与時と比べて、 T_{max} が投与後 6 時間をピークと若干早くなり、かつ C_{max} が増大した。さらに、24 時間後に観察されていた二番目のピークも早まり、全体として見かけ上一峰性の経時変化となった。

さらに、カンゾウとオウゴンの二味のエキスを調製し、マウスに投与したところ、GL としての投与量は増加しているにもかかわらず、明らかな血中 GA 濃度のピークは失われ、投与後 6 時間後から 36 時間後まで一定の血中 GA 濃度を保ち、その後減少していくといった経時変化が観察された。以上の結果は、オウゴンが配合されることにより、カンゾウの GL から GA への加水分解に BA などグルクロン酸配糖体が競合阻害することにより GA の血中濃度に遅延を生じさせることが推定された。

D. 結論

本研究では、GL 投与時の溶液の pH が血中 GA 濃度推移に及ぼす影響を検討し、100 mg/kg の投与量では pH=3.5 と 5.0 の条件で AUC_{0-48} は変わらないものの、pH=3.5 で T_{max} は早く、 C_{max} は高くなることが明らかとなった。一方、10 mg/kg のときには T_{max} は pH=3.5 で同様に早くなったものの、 C_{max} や AUC_{0-48} は pH=5.0 の方が高く、小柴胡湯よりも小青竜湯で C_{max} や AUC_{0-48} が高値を示した理由がエキスの pH の低さによるものではないと考えられた。一方、小柴胡湯における血中 GA 濃度推移に関しては、ともに配合されるオウゴンによる影響がマウスにおける検討でも確認された。カンゾウ配合漢方処方薬の有効性や安全性を確実に担保していくためには、投与時の血中 GA 濃度推移などについても処方ごとに検討し、データを整備する必要があるのではないかと考えられる。

参考文献

- 1) M. Nose, M. Tada, R. Kojima, K. Nagata, S. Hisaka, S. Masada, M. Homma, T. Hakamatsuka, Comparison of glycyrrhizin content in 25 major kinds of Kampo extracts containing Glycyrrhizae Radix used clinically in Japan, *J. Nat. Med.*, **71**, 711 – 722 (2017) .
- 2) 宮村充彦、小野正英、京谷庄二郎、西岡豊、甘草配合漢方エキス中のグリチルリチンの物性とエキス投与後のグリチルレチン酸の血中濃度推移、*薬学雑誌*、**116**、209 – 216 (1996) .
- 3) Y. Yamamura, J. Kawakami, T. Santa, H. Kotaki, K. Uchino, Y. Sawada, N.

Tanaka, T. Iga, Pharmacokinetic profile of glycyrrhizin in healthy volunteers by a new high-performance liquid chromatographic method, *J. Pharmaceut. Sci.*, **81**, 1042 – 1046 (1992) .

4) G. Cantelli-Forti, F. Maffei, P. Hrelia, F. Bugamelli, M. Bernardi, P. D'Intino, M. Maranesi, M.A. Raggi, Interaction of licorice on glycyrrhizin pharmacokinetics, *Environ. Health Perspec.*, **102**, 65 – 68 (1994) .

5) Q. Zou, P. Wei, J. Li, Z.X. Ge, P. Ouyang, Simultaneous determination of 18 α - and 18 β -glycyrrhetic acid in human plasma by LC-ESI-MS and its application to pharmacokinetics, *Biomed. Chromatogr.*, **23**, 54 – 62 (2008) .

6) T. Suzuki, M. Tsukahara Y. Akasaka, H. Inoue, A highly sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of glycyrrhizin and its active metabolite glycyrrhetic acid: Application to a human pharmacokinetic study after oral administration, *Biomed. Chromatogr.*, **31**, e4032 (2017) .

7) T. Akao, T. Akao, K. Kobashi, Glycyrrhizin β -D-glucuronidase of *Eubacterium* sp. From human intestinal flora, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 705 – 710 (1987) .

8) T. Akao, Effect of pH on metabolism of glycyrrhizin, glycyrrhetic acid and glycyrrhetic acid monoglucuronide by

collected human intestinal flora, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1108 – 1112 (2001) .

9) T. Akao, T. Hayashi, K. Kobashi, M. Kanaoka, H. Kato, M. Kobayashi, S. Takeda, T. Oyama, Intestinal bacterial hydrolysis is indispensable to absorption of 18 β -glycyrrhetic acid after oral administration of glycyrrhizin in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **46**, 135 – 137 (1994) .

10) S. Shimada, T. Arai, A. Tamaoka, M. Homma, Licorice-induced hypokalemia in patients treated with Yokukansan preparations: identification of the risk factors in a retrospective cohort study, *BMJ Open*, **15**, e014218 (2017) .

E. 研究発表

1 . 論文発表

投稿審査中および投稿準備中。

2 . 学会発表

小林里沙、多田百花、日坂真輔、政田さやか、袴塚高志、本間真人、能勢充彦、漢方処方の科学的解析(第24報)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及び抽出効率について、日本生薬学会第65回年会(2018.9、広島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

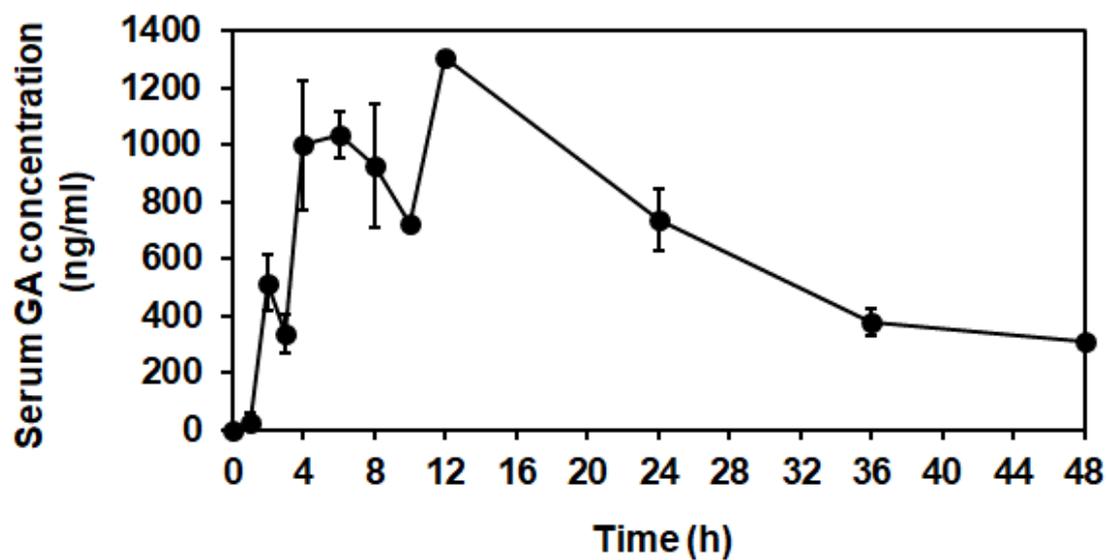


Fig. 1 グリチルリチン酸 (GL) 投与時の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移
 グリチルリチン酸は甘草湯のヒト常用量の 10 倍量の投与量相当量とした (43.3 mg/kg)。
 Each point represents the mean \pm S.E.M. of three mice.

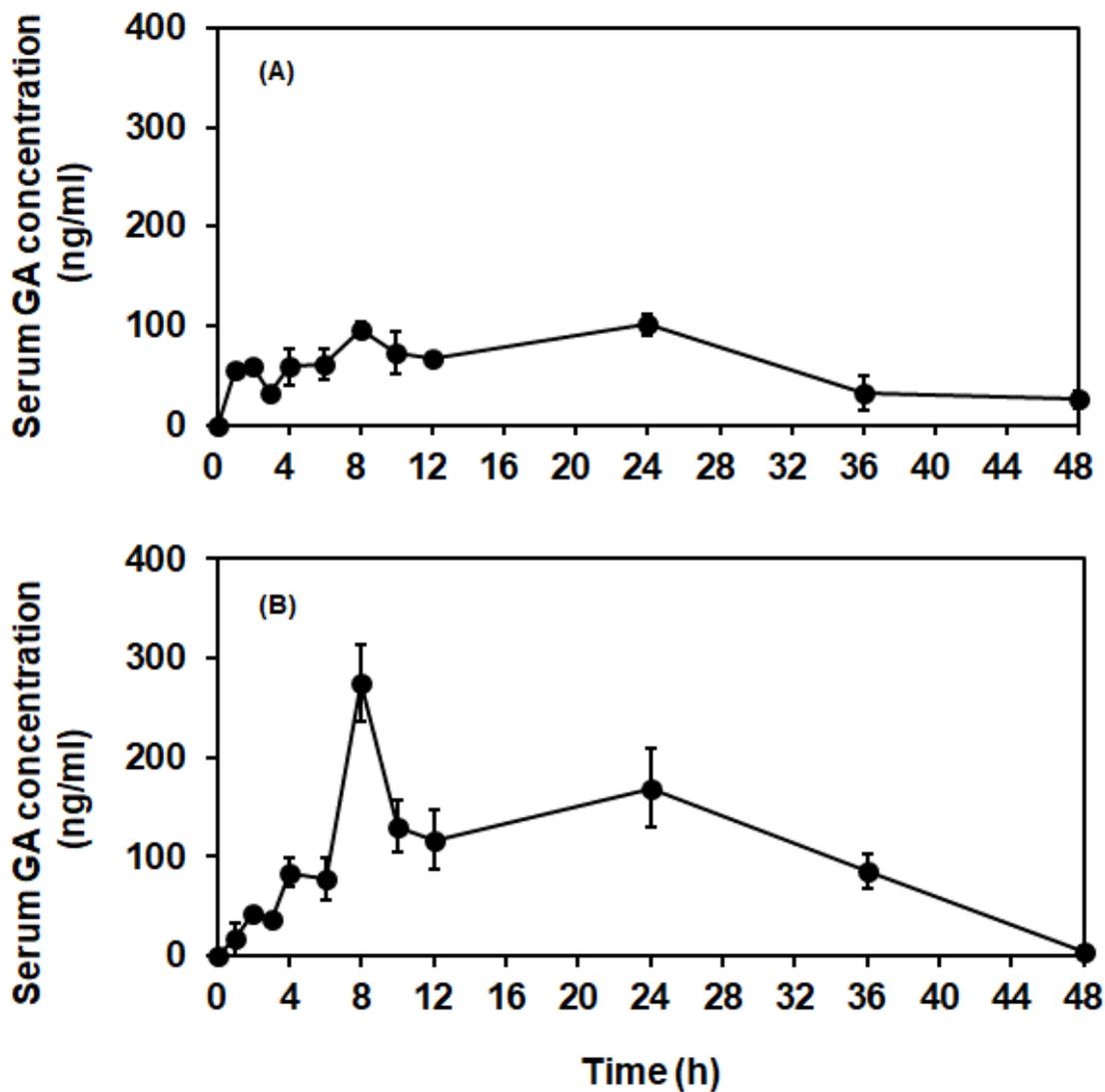


Fig. 2 小柴胡湯あるいは小青龙湯投与時の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移
 (A) 小柴胡湯投与 (ヒト 10 倍量、グリチルレチン酸として 4.9 mg/kg)
 (B) 小青龙湯投与 (ヒト 10 倍量、グリチルリチン酸として 3.6 mg/kg)
 Each point represents the mean \pm S.E.M. of three mice.

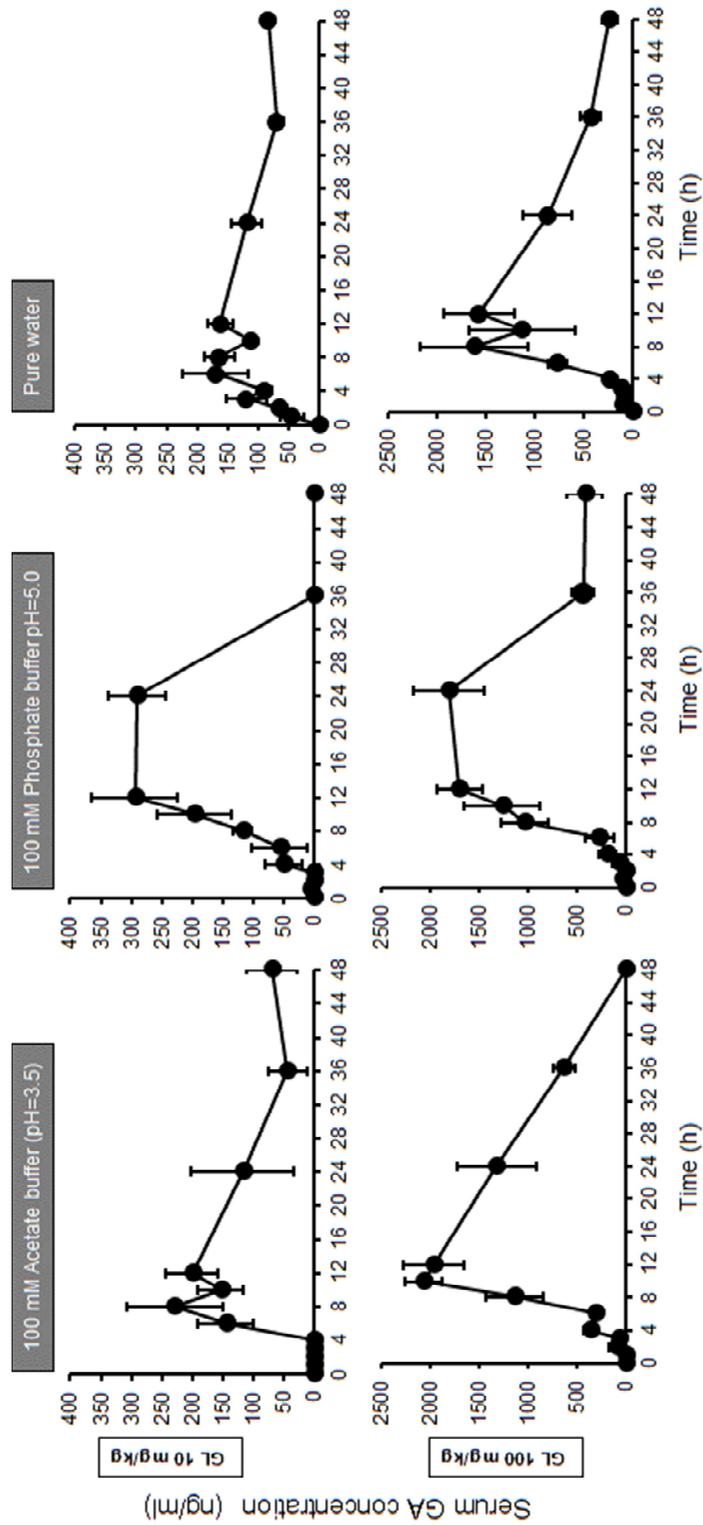


Fig. 3 血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移に及ぼす pH の影響
 Each point represents the mean \pm S.E.M. of three mice.

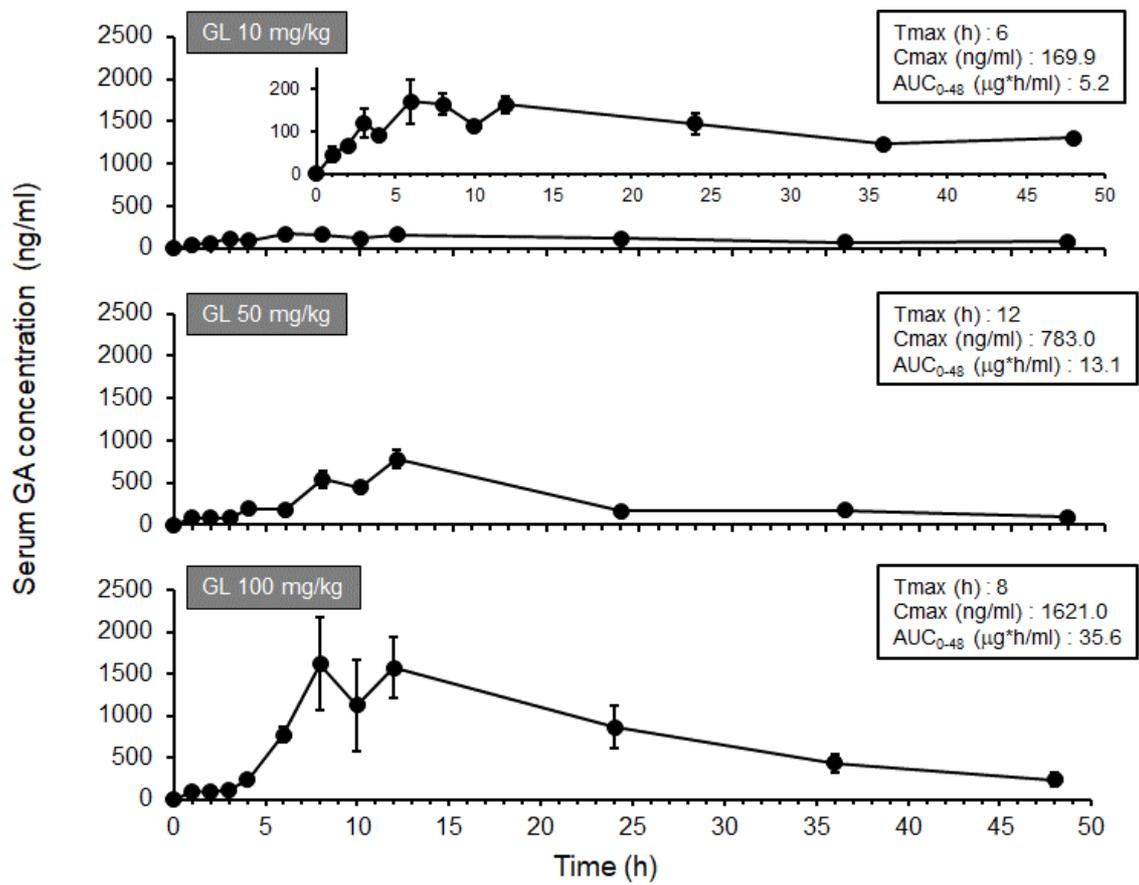


Fig. 4 グリチルリチン酸 (GL) 投与における線形性・非線形性の検討
 Each point represents the mean ± S.E.M. of three mice.

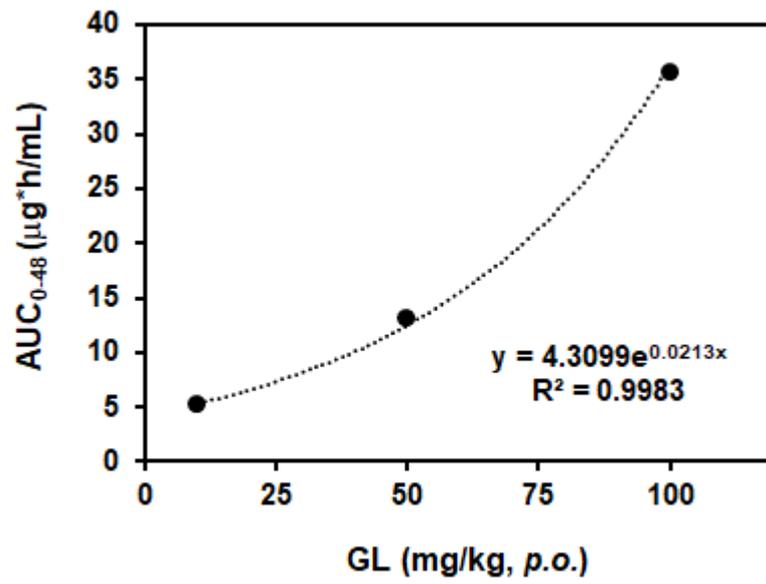


Fig. 5 グリチルリチン酸 (GL) 投与量と AUC₀₋₄₈

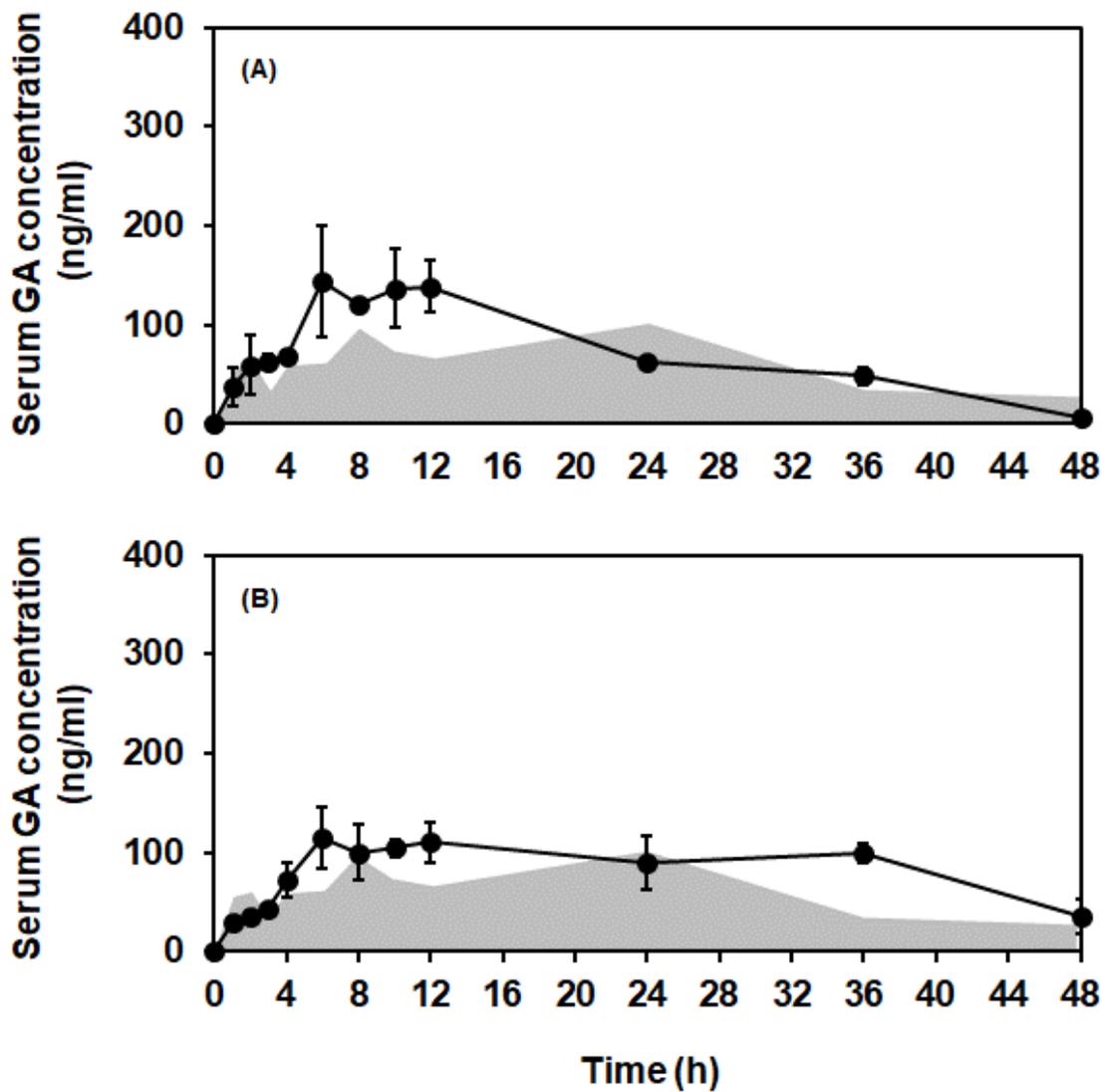


Fig. 6 小柴胡湯投与時の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移に及ぼすオウゴンの影響
 (A) 小柴胡湯去オウゴン、(B) カンゾウ・オウゴン二味エキス
 グラフの影は小柴胡湯投与の結果

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

Table 1. 血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移に及ぼす pH の影響

GL (mg/kg)	pH	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₄₈ (μg*h/mL)
10	3.5	8	229.5	1.9
10	5.0	12	293.9	6.4
10	-	6	169.9	5.2
100	3.5	8	2073.6	45.0
100	5.0	24	1812.3	47.0
100	-	8	1621.0	35.6

Table 2. 小柴胡湯投与時の血中グリチルレチン酸 (GA) 濃度推移に及ぼす
オウゴンの影響

サンプル	GL 投与量 (mg/kg)	T _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₄₈ (μg*h/mL)
小柴胡湯去 オウゴン	5.3	6	144.1	3.4
カンゾウ・オウ ゴン二味エキス	7.6	6	114.2	4.1
小柴胡湯	4.9	8	96.1	2.9
小青竜湯	3.6	8	274.3	5.1