

氏名・（本籍）	かんもと としひろ 神本 敏弘（山口県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲第 4194 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	薄層クロマトグラフィーを用いた生薬の確認試験に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 木内 文之（薬学博士） （副査）教授 須貝 威（農学博士） 教授 中村 智徳（博士（薬学））

## 論文内容の要旨

漢方薬とは、日本の漢方医学に用いられる製剤であり、漢方理論や臨床経験に基づき、所定の生薬が定められた量配合されたものである。近年、漢方に対する医師の関心が高まり、漢方薬は西洋薬とならび日本の医療を支える重要な薬となっている。また、漢方処方エキス（日本薬局方）への収載も進められており、第 16 改正日本薬局方（日局）第 2 追補までに 28 処方（日本薬局方）が収載されている。現在、漢方製剤の日本国内の売上高上位 50 処方を日局に収載することが、漢方関連業界の課題となっている。日局収載漢方処方エキスの規格は、原料として日局に適合する生薬を用いることを前提に設定しており、漢方処方エキスの有効性及び安全性を担保するには、その処方に配合される生薬の品質管理が必須となる。現在、日局及び日本薬局方外生薬規格 2012（局外生規）を合わせると、200 種以上の生薬について公的な規格が定められており、生薬の性状、確認試験などによって品質が担保されている。

日局生薬には、基原となる植物が規定しており、その鑑定は、生薬の性状（外部形態、内部形態）と確認試験で判別している。前者は、生薬そのものを直接見て判別する方法であるが、その判別には高度な専門的知識を要し、習得するのに多くの経験が必要とされる。一方、後者の生薬の確認試験においては、その生薬を特徴づける成分の検出や類似生薬との判別を行うための試験法が設定されている。日局の確認試験は「医薬品又は医薬品中に含有されている主成分などを、その特性に基づいて確認するための試験である」と通則に規定されているが、生薬の品質を化合物レベルでコントロールするためには、化合物レベルでの確認試験を設定することが重要であり、生薬の確認試験は、その生薬に特徴的な化合物を指標として品質を確認すること、また、修治する生薬については、修治過程で生成する化合物を指標として確実に修治できていることを確認できる方法であることが望まれる。しかし、一部の生薬においては、化合物群を検出する試験法が設定されており、公定書の規格に確認試験が設定されていない生薬も存在する。

生薬は、その産地、収穫時期、乾燥方法などにより、含有成分の種類や量が変化することがあり、さらに個体による差も大きいため、成分パターンが異なることがある。従って、個々の生薬に特徴的な成分を指標とした確認試験を設定するにあたっては、市場に流通している生薬を広く集め、その生薬に特徴的な成分または成分を見出すとともに成分変化の範囲を明らかにすることから始めなくてはならない。また、規定された基原植物以外でも、同属植物の中には類似した成分挙動を示すものもあり、規定された基原種との差別化を含め、同一基本骨格を持つ類縁物質の存在及びその成分挙動や含量を把握しつつ、指標となる成分の選定や特徴的な確認試験法を見出す必要がある。生薬の確認試験には、簡便な試験方法である薄層クロマトグラフィー（TLC）法が多く採用されているが、TLC による確認試験に於いては、指標となる成分と共存する成分との判別や  $R_f$  値の安定性の問題が存在する。これらの問題は標品を同時に展開することで解決できるが、指標成分が天然物であるため純粋な標品が用意できないこともあり、指標成分に特徴的な検出方法を用いるなど、試験方法を工夫して特異性を持たせる必要がある。さらに、生薬の成分には、生薬中ではある程度安定な状態で存在していても、試料調製により抽出されることで不安定になり構造が変化してしまうなど、抽出法によって結果が異なることもあることから、サンプルの調製法も課題となる。

本研究では、公定書に TLC による確認試験が設定されていない、シャカンゾウ、シヨウバク、ジオウ、タクシャ、レンギョウの5つの生薬について、それぞれの生薬に特徴的な成分を見出し、その成分を指標とした TLC による確認試験法を設定するための検討を行った。

## 1. シャカンゾウ

シャカンゾウは、「炙甘草湯」に配合される重要な生薬である。日本の漢方で用いられるシャカンゾウ（Prepared Glycyrrhiza）は、「日本薬局方カンゾウを煎ったものである」とされている。シャカンゾウの製法は固定されたものではなく、一般的には、切断した日局「カンゾウ」を、褐色～淡褐色に色調が変化するまで焙煎（120～160℃、15～30分間）して製されているが、シャカンゾウを特徴付ける化学的指標は報告されていない。また、本研究を開始した時点では、その確認試験についても規定はなく、日局「カンゾウ」の確認試験を準用し、グリチルリチン酸を確認するのが一般的であった。このことから、シャカンゾウを日局に収載するための基礎研究として、シャカンゾウに特異的に確認される成分で、とりわけカンゾウとの差異が認められる成分の探索を、生薬の確認試験として日局で多用されている TLC を用いて行った。その結果、シャカンゾウのクロマトグラムにおいて、カンゾウには認められない3つのスポットを見出し、これらの成分の構造をそれぞれ phloretic acid、2,6-anhydrofructofuranose、4-methylpyrrole-3-carboxamide と決定した。Phloretic acid は、その前駆物質である 4-hydroxybenzylmalonic acid の脱炭酸により、2,6-anhydrofructofuranose は fructose 並びに

sucrose の脱水環化により，4-methylpyrrole-3-carboxamide はアミノ酸と糖から，加熱の過程で生じると考えられた．2,6-Anhydrofructofuranose 及び 4-methylpyrrole-3-carboxamide は糖とアミノ酸を含む多くの生薬で加熱により生成すると考えられ特異性に乏しい．これに対して 4-hydroxybenzylmalonic acid は，*Glycyrrhiza* 属植物のみから単離が報告されていることから，この化合物から生成する phloretic acid は，シャカンゾウに特異的な成分と判断し，これを指標成分とした TLC によるシャカンゾウの確認試験を設定した．

## 2．ショウバク

ショウバクは，イネ科 (*Gramineae*) のコムギ *Triticum aestivum* Lam. の種子を乾燥したものであり，「甘麦大棗湯」に配合される生薬である．現在，ショウバクには公的な規格が設定されておらず，局外生規への収載が検討されている．ショウバクについては食品としての観点から，主にグリセロ糖脂質などの分析が報告されているが，グリセロ糖脂質自体は植物の細胞膜由来の成分であることから，確認試験の指標成分とすることには，特異性の面から問題がある．そこで，グリセロ糖脂質以外の成分について検討した．その結果，ショウバクに特徴的な成分として，天然のフェノール性脂質（アルキルレゾルシノール類）の一種である 5-heneicosylresorcinol を見出した．アルキルレゾルシノール類は，穀類の表皮などに含まれることから，ショウバク以外の植物においても検出される可能性があるが，ショウバクは原形で流通していることから，生薬の性状の項と合わせて確認することで判別が可能と判断し，5-heneicosylresorcinol を指標とした TLC による確認試験法を設定した．

## 3．ジオウ

ジオウは，日局に収載されている「牛車腎気丸」などに配合される重要な生薬である．ジオウは調製法の違いにより，乾ジオウあるいは熟ジオウとして別々に市場に流通しており，中国ではその他に生地黄（鮮地黄，生の根）も用いられる．日局では，ジオウを「本品はアカヤジオウ *Rehmannia glutinosa* Liboschitz var. *purpurea* Makino 又は *Rehmannia glutinosa* Liboschitz (*Scrophulariaceae*) の根（乾ジオウ）又はそれを蒸したもの（熟ジオウ）である」と規定しており，乾ジオウと熟ジオウは区別して記載されている．本研究を開始した時点では日局「ジオウ」には確認試験が規定されていなかった．そこで，乾ジオウと熟ジオウを化合物レベルで区別できるような確認試験の設定が可能か検討を行った．

ジオウに含まれる成分としては，イリドイド配糖体，フェネチルアルコール類，多糖類などが知られている．しかし，イリドイド配糖体は不安定な成分であり，フェネチルアルコール類は特異性に乏しい成分である．そこで多糖類成分に着目して乾ジオウと熟ジオウの差を検討し，乾ジオウについてはジオウに特徴的な四糖類である stachyose を，

熟ジオウについてはstachyoseが分解して生成する三糖類のmanninotrioseと単糖類のfructoseを指標としたTLCによる確認試験を設定した。

#### 4. タクシャ

タクシャは、日局で「オモダカ科 (*Alismataceae*) のサジオモダカ *Alisma orientale* Juzepczuk の塊茎で、通例、周皮を除いたもの」とされており、「牛車腎気丸」、「五苓散」、「八味地黄丸」などの水分代謝を調節する処方に配合されている重要な生薬である。現在、市場では福建省を主産地とする“建沢(建沢瀉)”及び四川省を主産地とする“川沢(川沢瀉)”の主として2つに区分され流通している。沢瀉の成分としては、トリテルペノイドであるアリソール類、セスキテルペノイドなどが報告されており、“建沢”よりも“川沢”の方が、成分含量が高い傾向にある。

現在、日局「タクシャ」には確認試験が設定されていないが、タクシャ配合処方エキスにおいては alisol A を指標としたタクシャの確認試験が設定されている。そこで、処方エキスのタクシャの確認試験をベースにして、タクシャに特異的な成分で、TLC で明瞭に認められ、比較的安定かつ市販品が利用できる alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate を指標成分の候補として、市場流通品 35 ロットについて検討を行った。その結果、市場流通品は様々な TLC パターンを示し、alisol 類 3 種の中の 1 つの化合物のみを指標とすると、指標成分を検出できない(確認試験不適)ものがあり、単一成分での確認試験の設定は困難であると判断した。そこで、alisol 類 3 種の混合溶液を用い、いずれかのスポットを確認する確認試験方法を設定した。しかし、一般的にはその生薬に特異的な 1 つの成分で確認することが望ましいことから、タクシャの粉末を、酸及びアルカリで処理することにより、alisol 類を alisol A のスポットに集約する方法を考案した。更にこの方法を用いて簡便にタクシャ中の alisol 類の含量を求め、市場品中の alisol 類の含量は約 0.1 ~ 0.5%であることを示した。

#### 5. レンギョウ

レンギョウは、モクセイ科 (*Oleaceae*) レンギョウ *Forsythia suspensa* Vahl またはシナレンギョウ *F. viridissima* Lindl. の成熟果実を乾燥したものである。レンギョウは「十味敗毒湯」などに配合される生薬であり、その成分としては、トリテルペノイド、リグナン及びその配糖体、フラボノイド、フェネチルアルコール配糖体、環状アルコールなどが報告されている。現在、日局「レンギョウ」の確認試験としては、2 種類の化合物群の呈色反応が規定されているが、確認試験としては特徴的な単一化合物で確認する方法が望ましい。そこで、上記の成分の中でレンギョウに特徴的な成分である renyol を指標成分としてレンギョウの TLC による確認試験を設定した。

本研究で設定した確認試験のうち、シャカンゾウ並びにジオウの確認試験は、日本薬

局方原案審議委員会での審議を経て、第 16 改正日本薬局方第 2 追補に収載されており、タクシャとレンギョウの確認試験についても日本薬局方原案審議委員会での審議が終了し、第 17 改正日本薬局方に収載される予定である。さらに、ショウバクの確認試験はショウバクの局外生規への収載に際して採用される予定である。本研究において、公定書に TLC による確認試験が設定されていない 5 つの生薬について、その生薬に特徴的な成分に基づいた確認試験を設定できた。また、修治する生薬については、修治で生成する特徴的な成分により原料生薬との科学的識別が実現できた。このことは生薬の品質管理の観点から非常に有意義なことである。今後、本研究と同様に、TLC による確認試験が設定されていない生薬についても化合物レベルで検討し、漢方薬の基盤となる生薬の品質向上に役立てることが必要である。

## 論文審査結果の要旨

博士論文発表は、平成 27 年 2 月 19 日（木）13 時 40 分から、慶應義塾大学薬学部 1 号館地下 1 階マルチメディア講堂にて、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。なお、本発表の前に、副査 2 名による事前の個人面接が行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びにそこにある問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の諮問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

論文申請者は、株式会社ツムラ生産本部の漢方製剤開発センター漢方品質設計部に勤務しながら、当大学院薬学研究科の社会人博士課程の学生として研究を実施してきた。本研究は、生薬の品質を担保するための規格の一つである確認試験を、簡便な操作で個々の生薬に特徴的な成分を検出可能な薄層クロマトグラフィー（TLC）分析を用いて行うために必要な検討を行ったものである。本研究では、シャカンゾウ、ショウバク、ジオウ、タクシャ、レンギョウの 5 種の生薬について、各生薬を確認するのに適切な指標成分を見出し、これを TLC で確認するのに適切な試験条件（抽出、展開溶媒、検出法）を検討して確認試験法を構築している。特にシャカンゾウについては、カンゾウを焙煎してシャカンゾウを調製する過程で新たに生成する 3 つの成分の構造と生成過程を明らかにすることによって、カンゾウとシャカンゾウを明確に区別することを可能とするとともに、これまで経験に頼ってきたシャカンゾウを調製する際の加熱条件に明確な指標を与えた点は、高く評価できる。また、ジオウの根をそのまま乾燥した乾ジオウと蒸してから乾燥した熟ジオウについては、蒸す過程で変化する成分に着目して両者を区別できる試験法を構築した。生薬には成分パターンが異なるものが存在するが、多様な成分パターンを示すタクシャについては、市場品調査に基づいて代表的な 3 つの成分のいずれかを検出する試験法を構築するとともに、これらの成分を一つの成分に誘導す

るための簡便な処理法を構築した。この方法は、処方エキス中のタクシャの確認試験への応用が可能である。さらに、ショウバクとレンギョウについても各生薬に特徴的な成分を見出し、TLCによる確認試験法を構築した。

本研究の成果に基づいた確認試験法は、日本薬局方の生薬の規格の一部として既に日本薬局方に採用或は採用が決まっており、非常に実用性の高い成果であるとともに、シヤカンゾウの調製過程で新たに生成する成分とその生成過程を明らかにするなど、学術的にも高く評価できる内容である。漢方治療に用いられる漢方処方、現代日本の医療の中で広く使われるようになっており、処方エキスの日本薬局方への収載が進められているが、漢方処方の品質の基礎となるのは処方を構成する個々の生薬の品質であり、その品質を保証するのが公定書に定められた生薬の規格である。本研究は、生薬の品質を保証する科学的基盤の一部となるものとして高く評価できる。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

副査(A): 論文査読・発表以前には、TLC分析は、あくまでも簡便・予備的な手法ではないか、定量性や再現性等は大丈夫だろうか、と、懐疑的な立場から臨んだが、実際に討論を重ね、分析の特異性が非常に高いことがわかった。TLC分析で新たに検出されたスポットについて、単離・構造決定、別法合成による構造確認も徹底的になされており、信頼性が高い。学術論文に筆頭著者として公刊された、本研究に関わる実験や解析の内容について、著者自身の寄与が非常に大きいことも確認した。また、予備討論の段階で指摘した箇所について、論文の修正・口頭発表や質疑応答において適切に反映されていた。

副査(B): 我が国では、漢方薬を処方する医師が8割を超え、漢方エキス製剤だけでなく、「刻み生薬」を巧みに組み合わせた「煎剤」で治療に当たる医師もあり、その構成生薬の品質管理は薬剤師の重要な任務と言える。しかし、その化合物レベルでの品質管理は、従来のTLCによる定性的分析では十分に生薬を鑑別できず、本論文に示されたTLC分析手法は、起原生薬の「修治」を判別できるという点で画期的といえる。またTLC法は、高速液体クロマトグラフィー装置など高額機器を備えることが出来ない調剤薬局や中小病院での確認試験にも有用である。したがって、本論文は今後も他の多くの生薬の鑑別手法の確立に期待ができ、さらに医療分野での有用性と汎用性を兼ね備えた内容であり、博士論文としての価値を十分有するものと評価できる。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する審議が行われた。その結果、神本敏弘君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが全員一致で決定された。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

- 1 . 神本敏弘，余村かおり，菊地祐一，平倉一弘，牧野文昌，橋本和則，西村浩昭，碓井公利，袴塚高志，合田幸広，川原信夫，木内文之；TLC による炙甘草と甘草の化学的識別，生薬学雑誌，**68**(2), 70-77 (2014).
- 2 . Kammoto T., Yomura K., Kikuchi Y., Katsuhara T., Nishimura H., Yamamoto T., Morota T., Makino B., Hashimoto K., Hirakura K., Kawahara N., Wakana D., Hakamatsuka T., Kiuchi F.; Characteristic Chemical Components of Prepared Glycyrrhiza, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス，2015年1月13日受理
- 3 . 神本敏弘，余村かおり，中村雄一，菊地祐一，平倉一弘，西村浩昭，袴塚高志，合田幸広，川原信夫，木内文之；TLC による乾ジオウと熟ジオウの化学的識別，生薬学雑誌，**69**(2)，2014年12月15日受理