

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	神本敏弘
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p style="text-align: center;">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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】</p> <p>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も高まり、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、漢方処方エキスの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(以降、日局)第2追補までに28処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。</p> <p>日局収載漢方処方エキスの規格は、日局に適合する生薬を用いることを前提に設定してあり、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(以降、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。</p> <p>日局生薬には、基原となる植物が規定してあり、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。</p> <p>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。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(以降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の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、生薬中にあるとき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から、サンプルの調製法も課題となる。</p> <p>【目的】</p> <p>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、ショウバク、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</p>			

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。

【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。

【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 確認試験法を設定した。

【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」には確認試験が収載されていなかった。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単糖類の fructose 及び三糖類の mannitriose を指標とした確認試験を設定した。

【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。

【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確認試験を設定した。

【まとめ】

本研究では、5 種の生薬（シャカンゾウ、ショウバク、ジオウ、タクシャ及びレンギョウ）について、各生薬を特徴付ける成分を検索し、その結果に基づいて各生薬の TLC による確認試験を設定した。第 1 章では、カンゾウとシャカンゾウの成分を比較し、シャカンゾウに特徴的な成分として phloretic acid を見出し、これを指標としたシャカンゾウの確認試験を設定するとともに、シャカンゾウを調製するのに必要な温度並びに時間を明らかにした。また、第 2 章では、ショウバクに特徴的な成分である 5-heneicosylresorcinol を指標として、第 3 章では、乾ジオウについては stachyose を、熟ジオウについては stachyose が分解して生成する manninotriose と fructose を指標として TLC による確認試験を設定した。第 4 章では、タクシャの確認試験を alisol A, alisol B 及び alisol B monoacetate の混合溶液を用い、そのいずれかのスポットを TLC で確認する確認試験を設定した。さらに、生薬に簡単な前処理を行うことで、alisol 類を alisol A のスポットに集約する条件を見出し、この前処理を行うことで alisol A のスポットを確認可能であることを明らかにした。また、こうして得た alisol A のスポットを用いて簡便にタクシャ中の alisol 類含量を求めることが可能であり、市場品中の含量は約 0.1～0.5%であることを示した。第 5 章では、レンギョウに特徴的な成分である renyol を指標としたレンギョウの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、既に日本薬局方に収載されており、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努めることが必要である。