

【原 著】

HPLCによる漢方薬成分の多成分同時分析について

Multi-component Analysis of Chinese Drugs

by High Performance Liquid Chromatography

横 田 洋 一 江 尻 千 鶴 子 斉 藤 晴 夫
 Youichi YOKOTA Chizuko EZIRI Haruo SAITO

富山県薬事研究所
 Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

漢方薬の理化学的品質評価法として、指標成分の分析に高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) が繁用されているが、その HPLC 条件のほとんどはアイソクラチック溶出法によるもので、個々の配合生薬中の類似の性質を持つ指標成分、例えば塩基性成分や酸性成分を別々の HPLC 条件で定量するものである。したがって、従来のアイソクラチック溶出法で漢方薬中の多種類の指標成分の分析するには多種類の HPLC 条件が必要となり非常に煩雑である。またパターン分析として指標成分以外の成分の動向を把握することも困難である。そこで、グラジエント法¹⁾²⁾を用い、異なる性質を持つ指標成分の同時分析を目的として検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

実験の部

機器

ポンプ：CCPM (東ソー)

検出器：UV-8000 (東ソー)

インテグレーター：CP-8000 (東ソー)

HPLC条件

カラム：メルク社製 Hibar LiChrosorb
 Rp-select B (ID 4×250mm)

移動相：A液, 0.05M Na₂HPO₄/ AcCN
 (9:1)

B液 0.05M Na₂HPO₄/ AcCN
 (4:6)

A液(100%)→ B液(100%)75分間の直線グラジエント

流量：0.9ml/min カラム温度：45°

検出波長：254nm 及び 280nm

漢方処方名	麻黄湯	柴胡桂枝湯	小柴胡湯	小青龙湯	麻黄湯	黄連解毒湯	三黄泻心湯	半夏泻心湯	調経加味散
オウゴン		2	3			3	1	2.5	2.5
オウレン						1.5	1	1	
オウバク						3			
カッコン	8								
カンゾウ	2	2	2	2	2			2.5	
キョウニン					4				
ケイヒ	3	3		3	3				3
ゴミシ				3					
サイコ		5	7						5
サイシン				3					
サンシシ						3			
シャクヤク	3	3		3					
ショウキョウ	1	1	1	2				2.5	0.8
タイソウ	4	2	3					2.5	2.5
ダイオウ							1		1
ニンジン		2	3					2.5	2.5
ハンゲ		4	5	5				5	4
ブクリョウ									3
ボレイ									2.5
マオウ	4			3	4				
リュウコウ									2.5

Table.1 漢方処方及び構成生薬

標準品

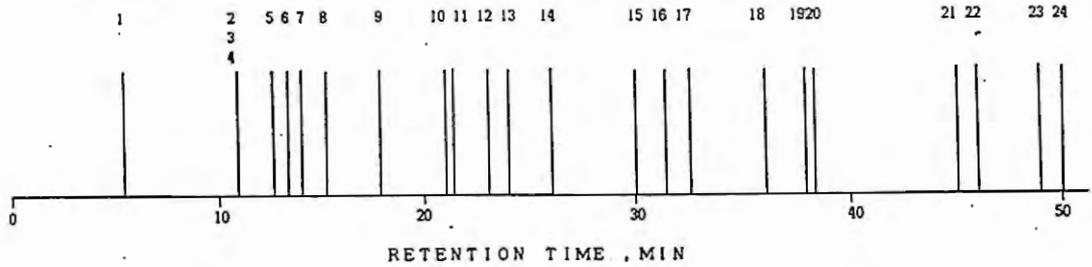
baicalin, chrysin 7-O-glucuronide, oroxylin-A 7-O-glucuronide, wogonin 7-O-glucuronide, baicalein 7-O-glucoside は北陸大学 富森教授より供与, albiflorin は富山医科薬科大学 吉崎助教授より供与された。saikosaponin a, saikosaponin d, saikosaponin c, paeoniflorin, cinnamaldehyde, cinnamic acid, glycyrrhizin, 6-gingerol, berberine, coptisine, palmatine, sennoside A, sennoside B, puerarin, daidzin, daidzein, gardenoside, geniposide は市販の生薬試験用標準品を用いた。

原料生薬 オウゴン, サイコ, ダイオウ, オウレン, カンゾウ, シャクヤク, サンシシ, ケイヒ, ショウキョウ, カッコソ (板カッコソ, 角カッコソ), オウバク, キョウニン, ゴミシ, サイシン, タイソウ, ニンジン, ハンゲ, ブクリョウ, ボレイ, マオウ, リュウコツは市販の日局品 (カット生薬) を用いた。

● 漢方処方 葛根湯, 柴胡桂枝湯, 小柴胡湯, 小青龍湯, 麻黄湯, 黄連解毒湯, 三黄瀉心湯, 半夏瀉心湯, 柴胡加龍骨牡蛎湯について検討した。その構成生薬及び比率を Table. 1 に示す。

葛根湯エキス製剤

製剤原料: AとBは乾燥エキス, A'は軟エキス, Cは顆粒, DとEはドリンク, Fは医療用



1. gardenoside 2. puerarin 3. geniposide 4. sennoside B 5. albiflorin 6. sennoside A 7. paeoniflorin 8. daidzin 9. baicalin
10. chrysin 7-O-glucuronide 11. oroxylin-A 7-O-glucuronide 12. wogonin 7-O-glucuronide 13. cinnamic acid 14. baicalein 7-O-glucoside
15. daidzein 16. coptisine 17. glycyrrhizin 18. cinnamaldehyde 19. palmatine 20. berberine 21. saikosaponin c₂ 22. saikosaponin b₂
23. saikosaponin b₁ 24. 6-gingerol

HPLC Conditions

Pump : CCPM(TOSO)
Integrator : CP-8000(TOSO)
Column : Hibar LiChrosorb RP-Select B(5 μ m) ϕ 4 \times 250mm (Cica-MERCK)
Mobile phase : A, 0.05M NaH₂PO₄-AcCN(90:10) B, 0.05M NaH₂PO₄-AcCN(40:60) A(100%) \rightarrow B(100%)
75min
Flow rate : 0.9ml/min
Temperature : 45 $^{\circ}$
Detection : 254nm, 280nm

Fig. 1 標準品の保持時間

試料溶液の調整法

1. 生薬 カット生薬 5 g に 100 ml の水を加え 30 分以上かけて約半量になるまで加熱し, ガーゼろ過後水を加えて 100 ml とした。遠心分離後, フィルター (0.5 μ m) ろ過し試料溶液とした。サイコの場合はその 1 ml を取り減圧で水分を留去し, 0.2% 水酸化カリウム・メタノール溶液 1 ml を加え超音波抽出し, その 0.5 ml を取り 4% 塩酸 0.5 ml を加え 25 $^{\circ}$ 16 時間放置し, フィルター (0.5 μ m) ろ過し, 総 saikosaponin c₂ (c の酸分解物), b₂ 及び b₁ の定量用とした。また, さきの試料溶液で求めた saikosaponin b₁, c₂, b₂ 量を差し引くことで saikosaponin a, c, d の量を求めた。
2. 湯液 原則として漢方処方一日量に 20 倍量の水を加え約 1 時間かけ約半量になるまで加熱し, ガーゼろ過後水を加え一定量とし, 遠心分離後, フィルター (0.5 μ m) ろ過し試料溶液 (1) とした。なお, 三黄瀉心湯の場合は 3 分間沸騰振り出しとした。サイコ配合処方の場合はその 1 ml を取りサイコの場合と同様に酸処理し試料溶液 (2) とし, ここで求めた総 saikosaponin b₁, c₂, b₂

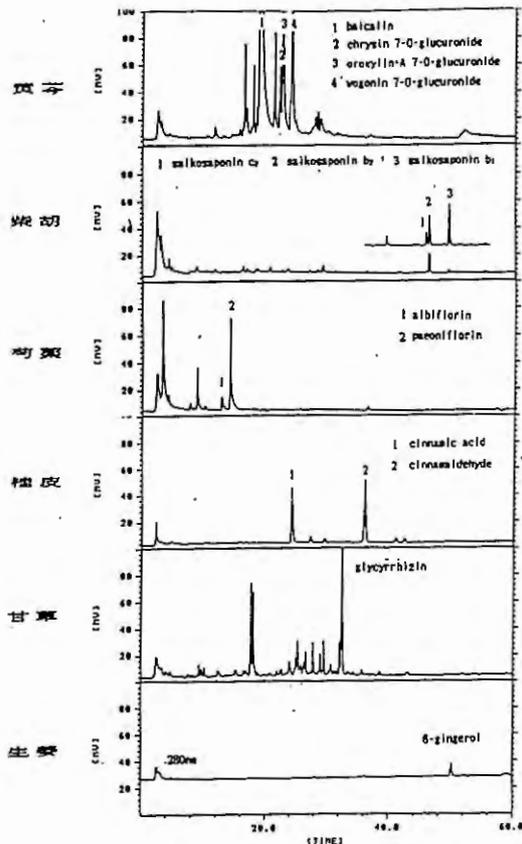


Fig.2-1 構成生薬のクロマトグラム(1)

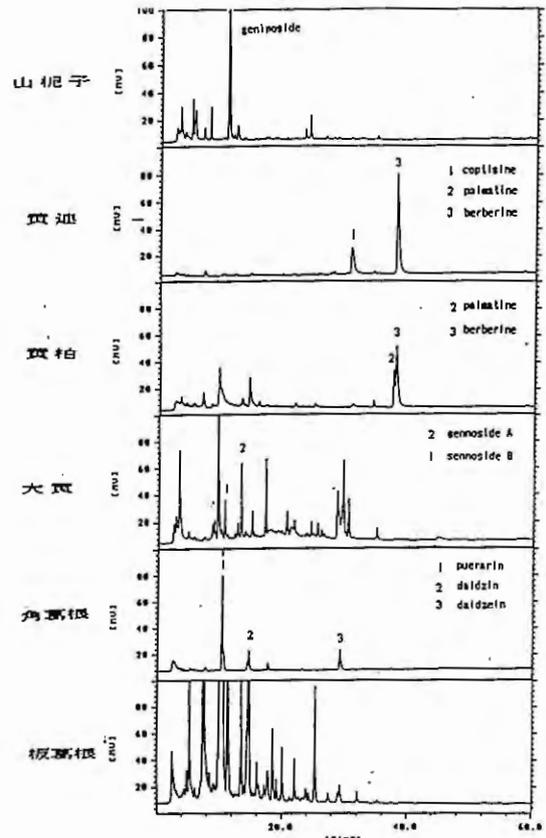


Fig.2-2 構成生薬のクロマトグラム(2)

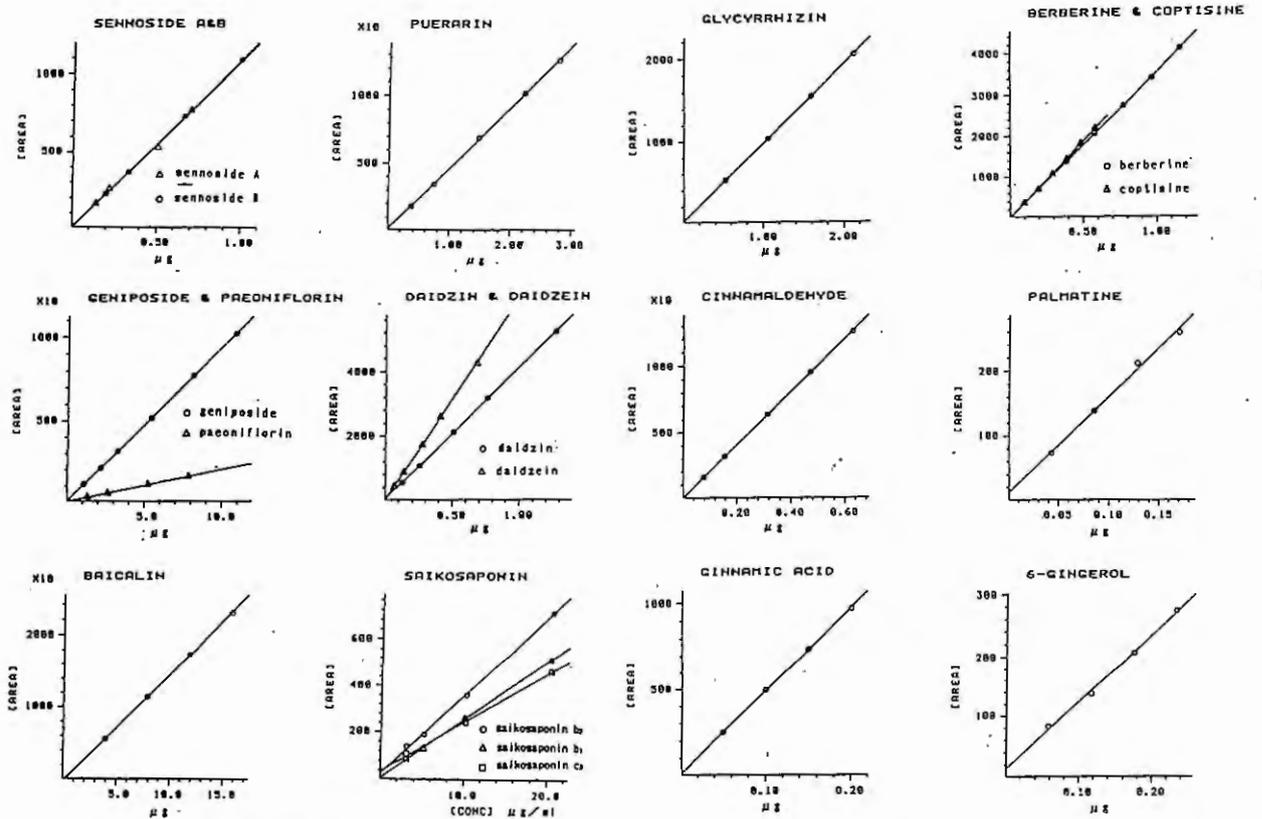


Fig.3-1 Calibration curve(1)

Fig.3-2 Calibration curve(2)

の量から試料溶液(1)で求めた saikosaponin b_1, c_2, b_2 量を差し引くことで saikosaponin a, c, d の量を求めた。オウレン、オウバク配合処方では沈殿を生じたものは、遠心分離して得られた沈殿を一定量の50%メタノールまたはアセトンで抽出し、フィルター(0.5 μ m)ろ過し試料溶液(3)とした。

3. エキス製剤 サイコ、オウレン及びオウバク配合処方の場合は水で、その他の処方は50%メタノールで抽出し、後は湯液と同様に操作した。

結果及び考察

HPLC 条件について種々検討した結果、カラムについては ODS カラムより Rp-select B のほうが短時間で良い分離能を示した。これはこのカラムが C_{18} であり、また塩基性物質分析用であるからと思われる。移動相については主に水溶性成分の分離を目的としてアセトニトリルの比率を10%から60%に増加させる直線グラジエントを試みた。

この HPLC 条件で各標準品について保持時間を求めたところ、Fig. 1 に示すように puerarin, geniposide 及び sennoside B が重なる他はほぼ満足のいく分離が得られた。なお、6-gingerol については280nmで測定した。つぎに、各生薬の水抽出液の分離を試みた。その結果、Fig. 2 に示すようにオウゴン、サイコ、シャクヤク、ケイヒ、カンゾウ、ショウキョウ、サンシシ、オウレン、オウバク、ダイオウ及びカッコンでは、指標成分の良い分離が見られた。ただし、オウレンの coptisine のピークには jateorrhizin と思われるピークと重なっていることが他の HPLC 条件³⁾で確かめられた。なお、その他の生薬キョウニン、ゴミシ、サイシン、タイソウ、ニンジン、ハンゲ、ブクリョウ、ボレイ、マオウ、リュウコツには妨害となるピークは見られなかった。

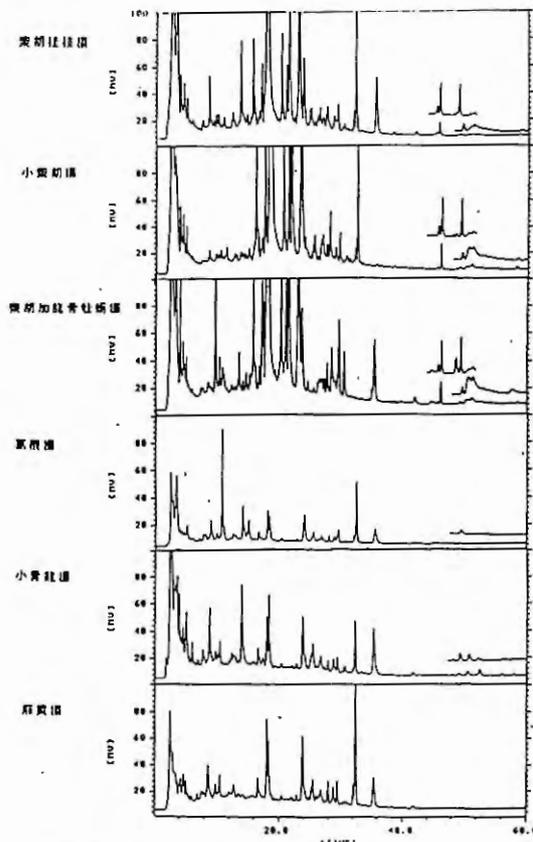


Fig.4-1 各漢方処方のクロマトグラム(1)

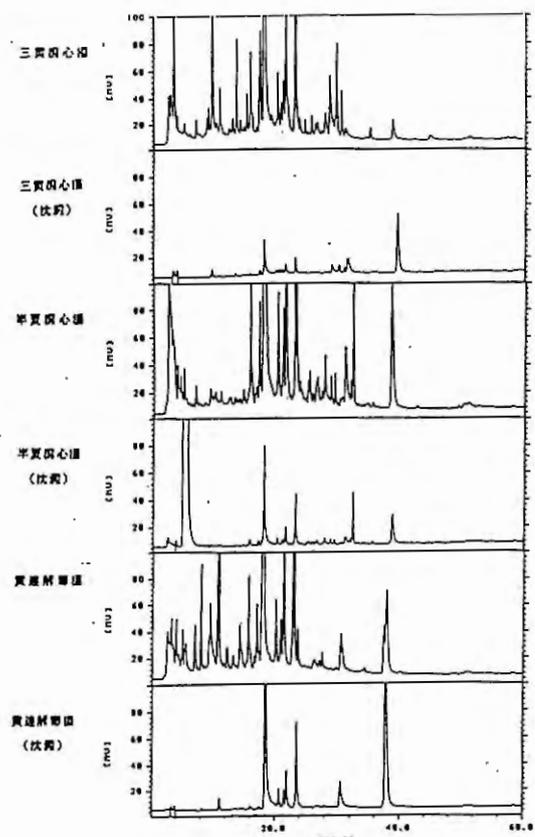


Fig.4-2 各漢方処方のクロマトグラム(2)

次に本グラジエント法の定量性を見るため主な指標成分について検量線を作成したところ、Fig. 3 に示すように原点を通り良好な直線性を示した。なお、saikosaponin 類については a, c, d を酸処理し b₁, c₂, b₂として作成した。以上の結果から本法は生薬の品質評価法として使用できると考えられる。

次に漢方処方湯液に本法を応用して得られたクロマトグラムをFig. 4に示す。その結果、柴胡桂枝湯では paeoniflorin, cinnamaldehyde, cinnamic acid, baicalin, glycyrrhizin, saikosaponin a, c, d, b₁, c₂, b₂, 6-gingerol, 小柴胡湯では baicalin, glycyrrhizin, saikosaponin, a, c, d, b₁, c₂, b₂, 6-gingerol, 柴胡加龍骨牡蛎湯では, sennoside A, cinnamaldehyde, cinnamic acid, baicalin, saikosaponin a, c, d, b₁, c₂, b₂, 6-gingerol, 葛根湯では puerarin, daidzin, daidzein, cinnamaldehyde, cinnamic acid, glycyrrhizin, 小青龍湯では paeoniflorin, cinnamaldehyde, cinnamic acid, glycyrrhizin, 麻黄湯では cinnamaldehyde, cinnamic acid, glycyrrhizin が良く分離した。また、三黄瀉心湯では sennoside B, A, baicalin, berberine, 半夏瀉心湯では baicalin, glycyrrhizin, berberine 黄連解毒湯では geniposide, berberine, palmatine, baicalin 等の同時分析が可能であった。沈殿については三黄瀉心湯及び黄連解毒湯では berberine, オウゴン成分, 半夏瀉心湯では berberine, glycyrrhizin, オウゴン成分が認められた。なお、オウゴンにカンゾウが配合される場合には、baicalin のピークに若干のカンゾウ成分の重なりが認められた。

次に、繁用漢方処方の一つである葛根湯エキス製剤の品質評価を本法を用いて行った。その結果から Table. 2 に示すように、これらの製剤に使用されている葛根は、板葛根であることが判明した。⁴⁾

まとめ

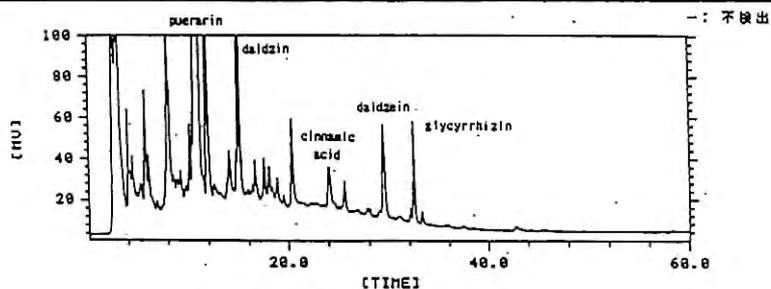
今回用いたグラジエント法では、短時間で生薬の指標成分の良い分離が得られた。こ

れは、カラムに塩基性物質分析用の C₈系の Rp-select B を用い、またポンプに高圧グラジエント用を用いたため、みかけの理論段数が 10万段をこえるきわめて高い値が得られ、性質の異なる成分の同時分析が可能となったためである。そのため従来同時分析が困難であった berberin のような塩基性物質と glycyrrhizin 及び baicalin に代表される酸性物質の同時分析が可能となった。また、従来のアイソクラチック溶出法における複雑な前処理をせずに、漢方湯液中の saikosaponin c₂, b₂, b₁の同時分析が可能となった。さらに、このような高理論段数が得られた結果、生薬ごとや漢方処方ごとにグラジエント条件やカラム等の条件を替えることなしに同一の HPLC 条件で多成分分析が可能となった。よって、本法は種々の漢方処方の迅速な理化学的品質評価法として有用であると考えられる。

Table. 2 市販葛根湯製剤の品質評価

市販葛根湯製剤中の成分含量 (mg/1日量)

成分	A	A'	B	市販製剤 C	D	E	F
puerarin	115.1	130.1	129.8	85.4	135.5	152.8	87.6
daidzin	20.3	22.8	22.4	14.6	27.4	34.2	12.8
daidzein	4.09	5.31	5.99	4.31	2.19	7.08	0.45
cinnamic acid	1.44	2.78	0.07	0.85	3.37	2.97	-
cinnamaldehyde	-	-	-	-	-	-	-
glycyrrhizin	28.3	23.8	31.0	35.8	37.8	39.2	33.2



市販葛根湯製剤のクロマトグラム

謝 辞

貴重な標準品を恵与された北陸大学教授 富森 毅氏及び富山医科薬科大学助教授 吉崎正雄氏に感謝します。

文 献

- 1) 山本恵一, 近藤由美子, 鐘葉百味算笥, 第21号, p.14 (1987)
- 2) 兼松洋一, 赤田良信, 日本薬学会第107 年会講演要旨集, p.441 (1987)
- 3) 相楽和彦, 伊藤祐二, 尾島光春, 大島俊幸, 村山晋, 第14回生薬分析討論会講演要旨, p.8 (1985)
- 4) 早川順子, 野田直希, 山田貞二, 宇野圭一: 生薬及びその製剤の理化学的品質評価に関する研究(第一報) 葛根及び葛根湯の分析, 薬誌, 104,50 (1984)

【原著】

ε-アミノカプロン酸の蛍光ラベル化による HPLC 定量法の検討

Fluorometric Determination of ε-Aminocaproic acid by HPLC

立本 純子 堀地 茂 能登 満
 Junko TACHIMOTO Shigeru HORICHI Mitsuru NOTO
 前田 淑恵 前古 豊
 Sumie MAEDA Yutaka ZENKO

東亜薬品株式会社 試験開発部
 Research Laboratories, TOA Medicine Co., Ltd.

抗プラスミン剤である ε-アミノカプロン酸は、アレルギー症状や炎症性病変の原因になっているキニンやその他の活性ペプチド等がプラスミンにより生成されるのを抑制し、抗アレルギー及び抗炎症作用を発現する薬物である。

ε-アミノカプロン酸を配合した医薬品の開発に当たり問題となる定量法については、ニンヒドリン反応による比色定量法や、蛍光ラベル化しての HPLC 法等が考えられる。ニンヒドリン反応による比色定量法は、ピリジン等の有害な試薬を用いることや、アミノ基を有する他の薬剤の共存下では定量できないなどの欠点がある¹⁾。今回、ε-アミノカプロン酸の蛍光ラベル化による HPLC 法を検討し、良好な結果を得ることが出来たので報告する。

OPERATING CONDITIONS

A

HPLC system: Shimadzu LC-6A, SIL-6A, CTO-6A,
 RF-630, CR-6A, SCL-6A
 Detector : Fluorescence Photometer
 Column : Chemcosorb 5-ODS-H φ4.0mmX150mm
 Col. Temp. : 40°
 Carrier : MeOH:0.01M H₃PO₄ (3:1)
 Flow Rate : 0.85 ml/min
 Wave Length: EX 365nm, EM 500nm
 Injection : 20μl

実験方法

- 1 試薬 ε-アミノカプロン酸：
 第一化学薬品 (株)
 バンシルクロライド：
 東京化成工業 (株)
 ダンシルクロライド：
 東京化成工業 (株)²⁾
 γ-アミノ酪酸：
 和光純薬工業 (株)
 アスパラギン酸：
 和光純薬工業 (株)
 アミノエチルスルホン酸：
 相互薬工 (株)

2 分析条件及び装置

本実験において、カラムはケムコ
 ソルブ 5-ODS-H, 内径 4 mm,
 長さ 150 mm のものを使用した。カラ

B

ANALYTICAL METHOD

{ ε-Aminocaproic acid 50μg / ml
 γ-Amino-n-butyric acid 40μg / ml }

100μl
 — 3mg/ml NaHCO₃ 100μl
 — Bansyl chloride 1ml
 (in Aceton 0.15mg/ml)

Reaction 45' 60min
 Injection to HPLC 20μl

Table.1 分析条件と操作方法

ム温度は40°，移動相はメタノール・0.01Mリン酸混液(3:1)とし，流量は1分間0.85mlで行った(Table 1A)。

3 操作方法

操作方は，Kamimura et al. の方法³⁾を参考に，50 μ g/mlに調整した ϵ -アミノカプロン酸溶液100 μ lを採取し，これに3 mg/mlの炭酸水素ナトリウム溶液100 μ lを添加，攪拌した。その後，バンシルクロライド-アセトン溶液1 mlを添加，攪拌し，45°で60分間反応させ，これをオートサンプラーで20 μ l注入した。炭酸水素ナトリウム溶液の添加は溶液中のアモニアを除去する目的である。

4 内部標準物質の検討

内部標準物質の検索にはアミノ基を有するアスパラギン酸，アミノエチルスルホン酸，及び γ -アミノ酪酸を用いて同一モル濃度で検討した。

5 定量精度の検討

10~100 μ g/mlの濃度範囲で， ϵ -アミノカプロン酸のピーク高さ比及びピーク面積比により検量線を求め，その精度を調べた。検討は，各濃度3回行った。

6 添加回収実験

ϵ -アミノカプロン酸を目薬に配合した場合，他の成分が ϵ -アミノカプロン酸の定量に影響を及ぼすかどうかについて6回の添加回収実験により検討した。目薬の組織は ϵ -アミノカプロン酸，メチル硫酸ネオスチグミン，グリチルリチン酸ニカリウム，コンドロイチン硫酸ナトリウム，マレイン酸クロルフェニラミン，酢酸d- α -トコフェロールとした。

実験結果

1 内部標準物質の検討

内部標準物質として，アミノ基を有するアスパラギン酸，アミノエチルスルホン酸及び γ -アミノ酪酸について検討を行った。その結果，9.5分にアスパラギン酸，12.3分にアミノエチルスルホン酸，12.4分に γ -アミノ酪酸が溶出し， ϵ -アミノカプロン酸は15.8分に溶出した(Fig.1)。

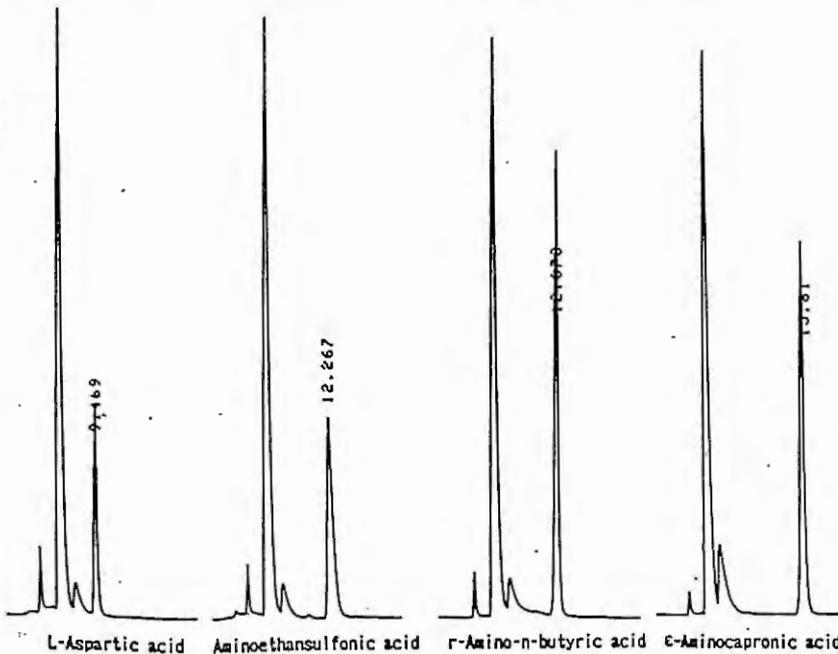


Fig.1 内部標準物質の検索

これらの内アスパラギン酸のピークは不純物ピークと重なり，また，アミノエチルスルホン酸のピークはテーリングが認められた。 γ -アミノ酪酸は不純物ピークとの重なりや，テーリングが認められず，さらに，同一濃度での感度が最も高かったことから本実験の内部標準物質に決定した。 γ -アミノ酪酸を内部標準物質とした定量操作を Table 1 B に示す。つまり， ϵ -アミノカプロン酸を50 μ g/ml， γ -アミノ酪酸を40 μ g/mlに調整した溶液100 μ lを採取し，上記の操作方法に従って，バンシルクロライドと反応させ，オートサンプラーで注入した。

2 定量精度の検討

本法における定量精度を検量線により調べた。Fig.2A に ϵ -アミノカプロン酸(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のクロマトグラムを示す。約12分に γ -アミノ酪酸が溶出し、約15.5分に ϵ -アミノカプロン酸が溶出した。各濃度のピーク高さ比の平均と C.V.値、及び検量線を Fig.2B 及び Fig.2C に示す。 ϵ -アミノカプロン酸の検量線は、ピーク高さ比で $Y=0.0203X+0.0180$ 、 $r=0.9999$ 、ピーク面積で $Y=0.0242X+0.0206$ 、 $r=0.9999$ と共に、良好な直線性を示し、ばらつきも C.V.値でほぼ 1% であり定量の精度も良かった。

3 添加回収実験

6回の試験の各3回の測定値の平均と C.V.値、及び回収率を Table.2 に示した。添加回収では目薬に配合したいずれの成分も ϵ -アミノカプロン酸の定量を妨害せず、回収率もほぼ 100% であった。また、ばらつきにおいても C.V.値がほぼ 1% と良好な結果が得られ、精度良く定量することができた。

	Peak height ratio	C.V.(%)	Recovery (%)
Standard	1.0104 \pm 0.0133	1.32	-
Test 1	1.0139 \pm 0.0102	1.01	100.35
Test 2	1.0219 \pm 0.0125	1.22	101.38
Test 3	1.0095 \pm 0.0115	1.14	99.91
Test 4	1.0124 \pm 0.0111	1.10	100.19
Test 5	1.0074 \pm 0.0176	1.75	99.70
Test 6	1.0034 \pm 0.0137	1.37	99.31

Table.2 添加回収率とバラツキ

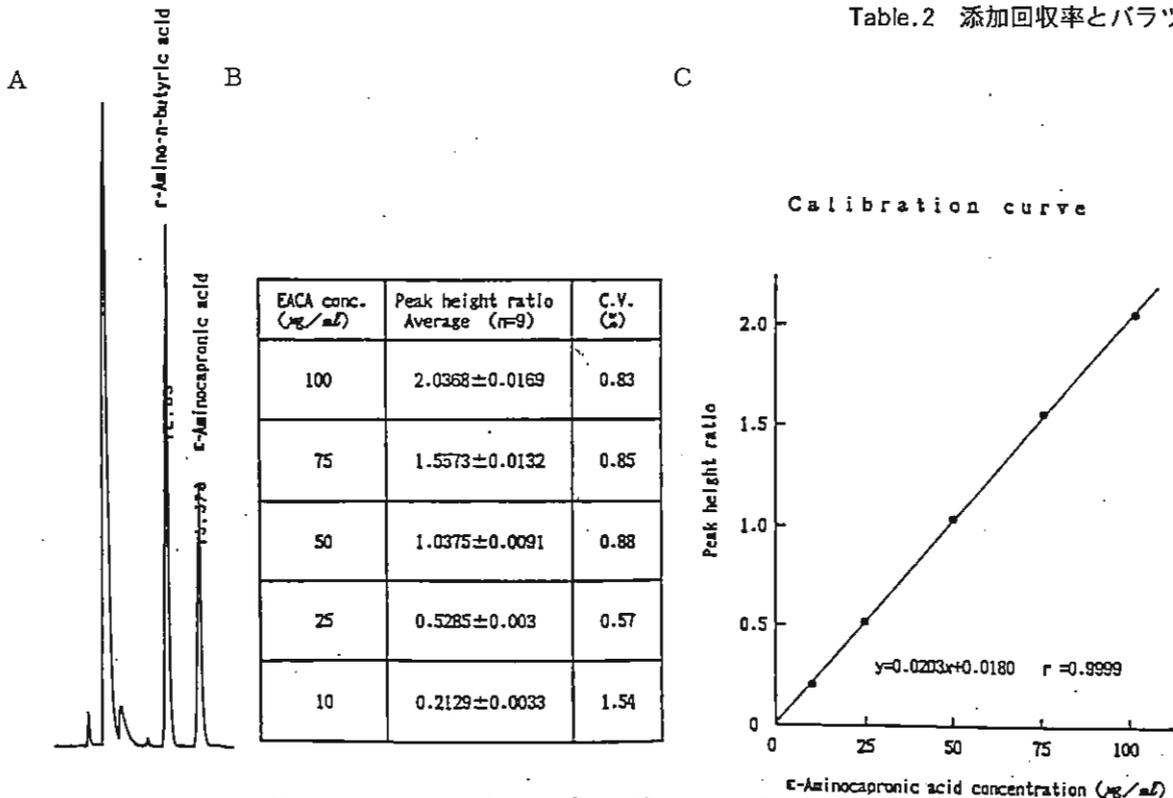


Fig.2 A ϵ -アミノカプロン酸と γ -アミノ酪酸のクロマトグラム
B " " の定量値
C " " の検量線

考 察

ϵ -アミノカプロン酸を高感度で容易に定量するために、蛍光ラベル化する方法が考えられる。種々の蛍光ラベル化剤のうち、ダンシルクロライドは広く知られているが、これに構造の類似した試薬としてバンシルクロライドがある⁴⁾。この2種の試薬を用いて、 ϵ -アミノカプロン酸を蛍光ラベル化し比較したところ、バンシルクロライド誘導体は約16分に溶出した。これに対し、ダンシルクロライド誘導体は最初に出現する不純物ピークに混在した。ダンシルクロライドとバンシルクロライドは構造上同一の基本骨格を有するが、バンシルクロライドは長い側鎖をもつ。この構造の

違いが2つの誘導体の極性に影響し、保持時間の違いとなって現れたと考えられる。

内部標準物質として γ -アミノ酪酸が適していた理由としては、 ϵ -アミノカプロン酸と非常に構造が似通っているために反応性が類似していたことが考えられる。

バンシルクロライドを蛍光ラベル化剤として用いた本定量法においては精度、及び再現性とも良好であった。従来のニンヒドリン反応による比色定量法に比べ操作上安全であり、またアミノ基を有する他薬剤の共存下においても分離定量が可能であるという点において優れていると考えられる。さらに、機器分析による定量の自動化を行う上においても有用と思われる。

参考文献

- 1) 井上哲男, 立沢政義, 日本公定書協会会報 第25号 PP.57-64 (1969)
- 2) Frei, R.W., Lawrence, J.F. J.Chromatography, 83:321-330 (1973)
- 3) KAMIMURA, H., SASAKI, H. and KAWAMURA, S. J.Chromatography, 225:115-121 (1981)
- 4) Seilr, N., Schmidt-Glenewinkel, T. and Schneider, H.H. J.Chromatography, 84:95-107 (1973)

【原 著】

プラスチック容器中の酢酸トコフェロールの安定性

Stability of Tocopherol acetate in Vessls of Each Plastic Species

青 木 貴 彦

Takahiko AOKI

テイカ製薬株式会社 開発部

Teika Seiyaku Co., Ltd.

Research and Development Division

<緒 言>

酢酸トコフェロールはその抗酸化作用，抗炎症作用，血行促進作用などにより，近年点眼剤等に繁用されている。しかしながら酢酸トコフェロール配合剤の製剤上の問題点として，この化合物が強い親油性を持つことからこれをいかに水に均一に分散溶解し，安定化させるかが製剤化の重要なポイントとなる。

一方点眼剤の容器の材質にはポリエチレンテレフタレート，ポリカーボネート，ポリエチレン及びポリプロピレン等のプラスチックがあり，このうち，容器中栓として繁用されているポリエチレン及びポリプロピレンへの酢酸トコフェロールの収着について鮫島¹⁾らが報告しているように，製剤の安定化に対して収着の問題もまた無視できない factor である。

今回，酢酸トコフェロールのプラスチックへの収着について検討した結果，若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 標準品：酢酸 d- α -トコフェロール(甘糟化学産業 Lot 11203)

2) プラスチック材料：低密度ポリエチレン

高密度ポリエチレン

イソタクチックポリプロピレン

アタクチックポリプロピレン

ポリエチレンテレフタレート

ポリカーボネート

12-ナイロン

3) 実験装置：高速液体クロマトグラフ装置

検出器	島津製作所	SPD-6A
-----	-------	--------

ポンプ	島津製作所	LC-6A
-----	-------	-------

記録計	島津製作所	C-R6A
-----	-------	-------

カラムオープン	ウォーターズ	TMC
---------	--------	-----

2. 酢酸トコフェロールの定量

定量法：HPLC法で行った。(絶対検量線法)

(条件)

カラム：RP-18 (Merck社製, 4mm ID × 25cm, 粒径10 μ)

カラム温度：40°

移動相：メタノール・水混液(98:2)

検出器：紫外吸光光度計(280nm)

流量：1ml/min

3. 実験方法 (酢酸トコフェロールの安定性試験)

1) プラスチックの種類による安定性

Table.1に示したモデル液30mlに各種プラスチック片の表面積6cm²(1g)の試料を浸漬し、90°で8時間保存後、モデル液中の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

2) ポリエチレンの量による安定性

モデル液30mlに低密度ポリエチレンそれぞれ表面積3.5cm²(0.33g), 7cm²(0.66g)及び10.5cm²(0.99g)の試料を浸漬する。90°で8時間保存後、モデル液中の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

3) 温度による安定性

酢酸トコフェロール濃度が0.1, 0.5, 0.8mg/mlの濃度の水溶液を調製し、それぞれの溶液を60°, 70°及び90°で保存し、経時後の酢酸トコフェロール水溶液中の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

4) 溶解補助剤の種類及び添加量と安定性

モデル液中の二つの溶解補助剤の配合割合を変え、エタノールを30~200mg/100mg, ポリソルベート80を100~375mg/100mlで25種の組み合わせからなる酢酸トコフェロール水溶液を調製し、それぞれの溶液30mlに低密度ポリエチレン1gを浸漬し、90°で8時間加温後の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

得られたデータより二因子の乱塊法による分散分析を行う。

5) 緩衝塩添加時の安定性

モデル液30mlに4種類の緩衝塩をそれぞれ加え、低密度ポリエチレン7cm²(0.66g)を浸漬し、90°で8時間加温後、モデル液中の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

6) イオン強度による安定性

モデル液30mlに塩化ナトリウムまたは塩化カリウムのイオン強度を変えて加え、低密度ポリエチレン7cm²(0.66g)を浸漬する。90°で8時間加温後、モデル液中の酢酸トコフェロール残存率を測定する。

成分名	含量 (mg)
酢酸d- α -トコフェロール	10
ポリソルベート 80	150
エタノール	60
精製水	適量
全量	100ml

Table.1 酢酸トコフェロール モデル水溶液

結 果

1. 検量線

酢酸トコフェロール100 μ g/ml以下で作成した検量線は原点を通る良好な直線性を示し、相

関係数0.999を得た。(Fig. 1)

2. プラスチックの種類による酢酸トコフェロールの安定性

ポリエチレンやポリプロピレンなどのポリオレフィン類を浸漬したときの酢酸トコフェロール残存率が低く、ナイロンなどのポリアミド類や、ポリエチレンテレフタレートとポリカーボネートなどのポリエステル類での残存率は比較的高い結果が得られた。浸漬したプラスチック

の表面を一定にしたので、表面積以外の factor としては、密度の低いプラスチックの方が密度の高いプラスチックよりも残存率が低かった。(Table. 2)

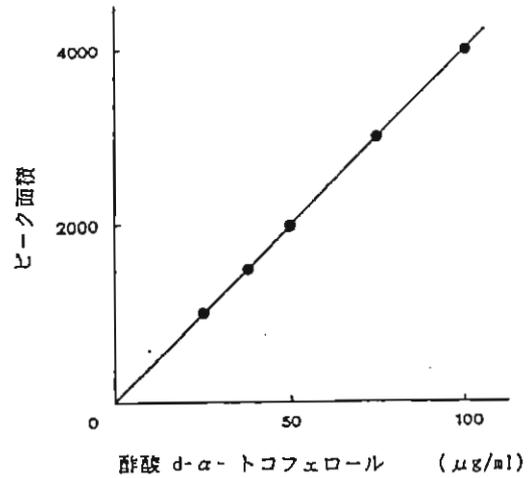


Fig.1 Calibration Curve

プラスチック材質	密度	構造	VE残存率 (%)
低密度ポリエチレン	0.92	$-(\text{CH}_2 \text{CH}_2)_n -$	25.5
高密度ポリエチレン	0.96	$-(\text{CH}_2 \text{CH}_2)_n -$	37.8
イソタクチックポリプロピレン	0.90	$-(\text{CH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3))_n -$	39.3
アタクチックポリプロピレン	0.90	$-(\text{CH}_2 \text{CH}(\text{CH}_3))_n -$	36.6
12-ナイロン	1.01	$-(\text{NH C}_{11}\text{H}_{22} \text{CO})_n -$	84.0
ポリエチレンテレフタレート	1.34	$-(\text{O C}_2\text{H}_4 \text{COO Ph CO})_n -$	97.6
ポリカーボネート	1.20	$-(\text{O Ph C}_6\text{H}_4 \text{Ph COO})_n -$	98.0
Control			99.8

Table.2 各種プラスチック浸漬時における酢酸トコフェロールの安定性

3. ポリエチレンの量による酢酸トコフェロールの安定性

ポリエチレンの浸漬量により液中の酢酸トコフェロール残存率が変化した。すなわち、ポリエチレンの浸漬量を増すと残存率は低下した。これは主に浸漬するポリエチレンの表面積に関連しているものと考えられる。(Fig. 2) なお、酢酸トコフェロール収着率=100-酢酸トコ

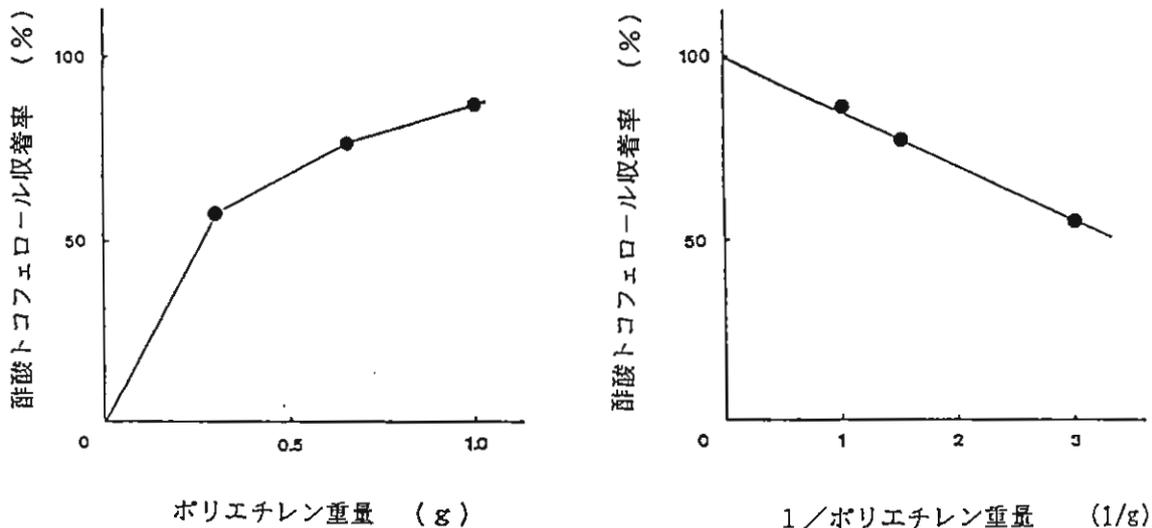


Fig.2 ポリエチレン浸漬時における酢酸トコフェロールの安定性

酢酸トコフェロール濃度 (mg/100ml)	10mg		50mg		80mg	
30ml中の 酢酸トコフェロール量(mg)	3mg		15mg		24mg	
保存温度・保存時間	収量(mg)	収率(%)	収量(mg)	収率(%)	収量(mg)	収率(%)
60° 72H	0.42	(14.0)	0.73	(4.9)	1.21	(5.0)
60° 120H	0.94	(31.3)	2.36	(15.7)	3.27	(13.6)
60° 240H	1.33	(44.3)	3.79	(25.3)	5.61	(23.4)
60° 432H	1.36	(45.3)	4.09	(27.3)	6.46	(27.0)
70° 5H	0.12	(4.0)	0.63	(4.2)	0.98	(4.1)
70° 12H	1.20	(40.0)	5.31	(35.4)	6.91	(28.8)
70° 24H	1.76	(58.7)	7.79	(51.9)	9.36	(39.0)
90° 2H	1.74	(58.0)	7.01	(48.7)	9.36	(39.0)
90° 4H	2.34	(78.0)	10.14	(67.6)	12.34	(51.4)
90° 6H	2.62	(87.3)	10.74	(71.6)	13.50	(58.3)
90° 7H	2.69	(89.7)	11.25	(75.0)	13.70	(57.1)

Table.3 各温度における酢酸トコフェロールの収着

		ポリソルベート80の配合量 (mg/100ml)				
		375	300	250	150	100
エタノールの 配合量 (mg/100ml)	200	26.5	22.7	18.9	21.7	17.1
		18.3	17.5	15.4	11.3	15.5
		19.0	17.2	11.4	15.3	12.8
	150	22.3	22.6	20.9	19.5	22.4
		17.3	16.7	13.5	10.7	11.5
		19.6	16.1	17.9	12.3	17.9
	100	22.4	22.5	19.4	18.4	24.0
		17.6	17.4	18.3	13.2	12.4
		18.9	17.2	16.2	15.3	13.6
	60	22.3	20.4	21.3	23.8	27.0
		17.4	19.2	14.9	13.2	11.5
		18.6	14.0	12.7	13.9	19.0
	30	22.9	20.3	22.0	16.7	21.0
		19.1	17.9	15.0	12.0	12.5
		18.3	14.2	14.8	14.6	17.5

酢酸トコフェロール 残存率(%)

Table.4 溶解補助剤量と酢酸トコフェロールの安定性

計算式①

$$Y = k C^n \quad \text{.....①}$$

$$\log Y = n \log C + \log k$$

Y : 平衡吸着量

C : 平衡時の溶液濃度

n, k : 定数

VE 初濃度 (mg/100ml)
 ■ 80
 ▲ 50
 ● 10

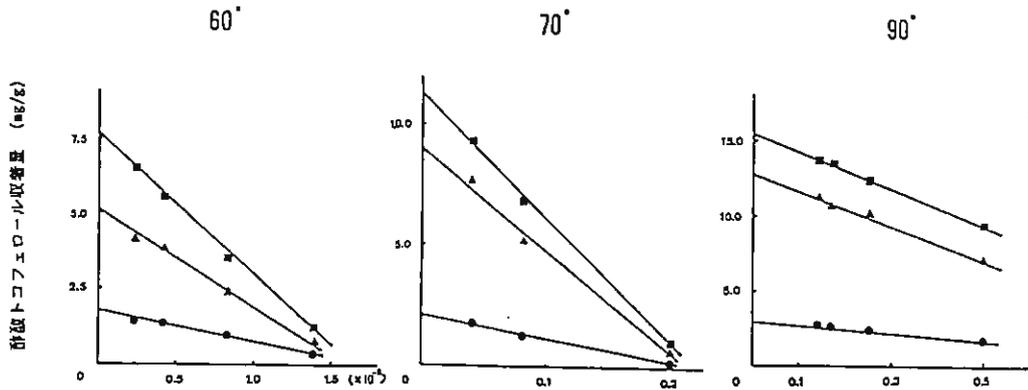


Fig. 3 各温度における酢酸トコフェロールの吸着量 1/経時 (1/hr)

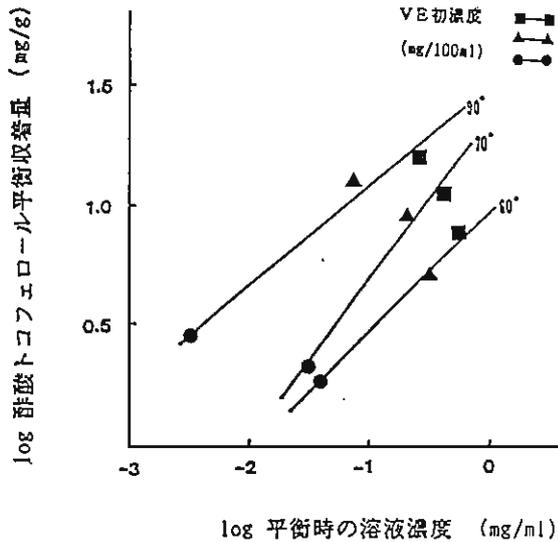


Fig. 4 Freundlich plot

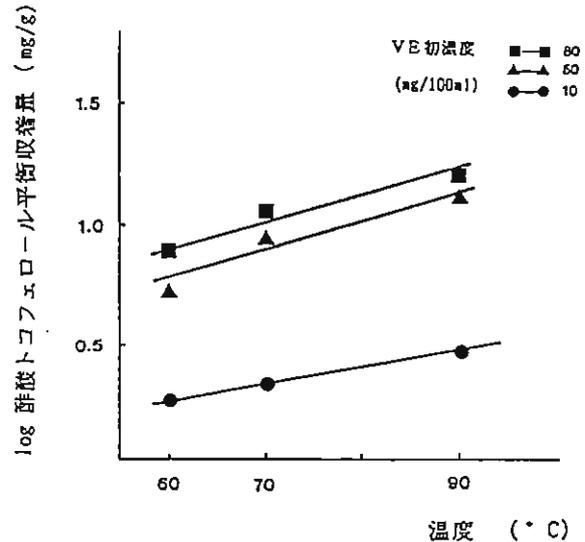


Fig. 5 平衡吸着量と温度の関係

	変動	自由度	不偏分散	F 値
エタノール	5.7	4	1.4	0.087
ポリソルベート80	185.8	4	46.5	2.822*
交互作用	65.9	16	4.1	0.250
誤差	823.3	50	16.5	
合計	1080.7	74		

Table.5 分散分析法

F(4, 24, 0.05)=2.76

F(16, 24, 0.05)=2.90

フェロール残存率 (%) とした。

4. 温度による酢酸トコフェロールの安定性

Table. 3 に示したように、ポリエチレンへの酢酸トコフェロール収着率は保存温度及び液中の酢酸トコフェロールの濃度によって大きく異なる。加熱時間の逆数と酢酸トコフェロール収着量の関係を図に示すと (Fig. 3) 直線が得られ、Y軸切辺から平衡収着量が得られる。一般に溶液中の溶質の固体への吸着は Freundlich 吸着等温式が成り立つ。(①式) そこで本実験より得られた値をプロットしたところほぼ直線関係が得られた。(Fig. 4) 従ってポリエチレンへの酢酸トコフェロール収着は Freundlich の吸着等温式に従って進行するもの考えられる。また、酢酸トコフェロール収着は Fig. 5 に示すように温度にも依存していると考えられる。

塩濃度 (mg/100ml)	緩衝塩の種類			
	クエン酸	リン酸	ホウ酸	アスパラギン酸
500	78.7	77.3	33.8	66.7
1000	73.1	79.8	49.3	68.5
1500	73.1	70.6	51.0	76.3
2000	75.2	78.1	50.1	63.7

酢酸トコフェロール 残存率 (%)

Table.6 緩衝塩添加時の酢酸トコフェロールの収着

5. 溶解補助剤の種類及び添加量と酢酸トコフェロールの安定性

Table. 4 をもとに分散分析を行ったところ、ポリソルベート80の配合量が多いとき、酢酸トコフェロールの残存率が有意に減少した。(Table. 5) 即ち、収着は液中の酢酸トコフェロールの分散溶解状態に相関することが考えられる。

6. 緩衝塩添加時の酢酸トコフェロールの安定性

緩衝塩濃度差による酢酸トコフェロールの収着差は、クエン酸、リン酸及びアスパラギン酸緩衝塩ではみられないが、ホウ酸緩衝塩を配合した場合に酢酸トコフェロール残存率の低下が見られた。(Table. 6)

塩濃度 (mol/l)	塩の種類	
	NaCl	KCl
0.1	64.0	69.1
0.15	72.6	74.1
0.3	79.0	79.7
0.6	72.2	66.2

酢酸トコフェロール 残存率 (%)

Table.7 イオン強度と収着の関係

7. 溶液のイオン強度による酢酸トコフェロールの安定性

酢酸トコフェロール水溶液のイオン強度が酢酸トコフェロールのポリエチレンへの収着に及ぼす影響はみられなかった。(Table. 7)

考 察

ポリエチレンへの酢酸トコフェロールの収着はポリエチレン表面積に比例せず、表面への吸着のみでは説明がつかない。おそらくポリエチレンへの吸着が同時に進行しているものと考えられる。また製剤中の酢酸トコフェロールの溶解分散状態により収着量が異なり、温度と酢酸トコフェロール濃度に依存して経時的に進行する。

今回の収着の傾向が低温条件（室温22°）にも適合すると仮定し、モデル液からの低密度ポリエチレンへの収着を予測してみる。Fig. 3 より、酢酸トコフェロール初濃度が10mg/100mlのモデル液の60°、70°、90°での平衡収着量はそれぞれ最小自乗法で得られた直線の切辺より、1.62($r=-0.992$)、2.12($r=-0.996$)、3.04($r=-0.997$)mg/gである。これをプロットするとFig. 5の直線となる。 $(y=8.93 \times 10^{-3} x^{-0.315}, r=0.994)$ この式を利用してモデル液の室温22°における低密度ポリエチレンへの平衡収着量を予測すると、平衡収着量は0.76mg/gとなる。

$$(8.93 \times 10^{-3} \times 22^{-0.315} = -0.11854, \log x = -0.11854)$$

モデル液を15mlの容器に充填し、中栓に低密度ポリエチレン(0.33g)を使用すると、中栓への平衡収着量は0.251mgである。ここで酢酸トコフェロール処方濃度10mg/100mlの90%（規格下限）量は1.35mg/15mlである。中栓への平衡収着量を考慮して90%を保証するには1.601mg/15ml（処方濃度に対して106.7%）にする必要がある。この結果より、モデル液の酢酸トコフェロール濃度を10.67mg/100ml、すなわち6.7%割り増しすれば22°以下では規格量は保証できると判断される。

今回、高温条件下での収着について検討を加えたが、低温条件下での収着が高温条件下と同様の傾向となるならば、酢酸トコフェロール配合液剤の製剤設計において収着等温式による解析は酢酸トコフェロールの収着予測の有効な手段と考える。

文 献

- 1) 鮫島康能ら：第一回医薬品包装シンポジウム講演要旨集 20～24 (1987)

【原著】

フトゲツツガムシ幼虫に対するディート 及びムシペール12の忌避及び麻痺効果

Effects of Deet and Mushipale 12 in perellency
and paralysis of *Leptotrombidum pallidum* Larvae

森井 勇

Isamu MORII

株式会社池田模範堂 開発部

Development Division, Ikeda Mohando Co., Ltd.

角坂 照貴 金子 清俊

Teruki KADOSAKA Kiyotosi KANEKO

愛知医科大学 寄生虫学教室

Department of Parasitology, Aichi Medical University

緒 言

つつが虫病は明治から昭和20年頃にかけて新潟や秋田、山形などに限られた川沿いの地域で発生した一つの風土病であった。

昭和40年代には患者数は激減し幻の病気になりかけていた。ところが、昭和51年頃から復活しはじめ、古来の発生地のみならず全国各地で多発するようになった。新潟、秋田、山形で夏に発生していた従来のつつが虫病はアカツツガムシによるもので、古典的つつが虫病と呼ばれ、近年全国至るところで発生しているものはフトゲツツガムシやタテツツガムシによるもので新型つつが虫病と呼ばれている。¹⁾ 社会的に見てこれらのつつが虫病の予防対策が大変重要な課題となってきている。

今回我々は吸血害虫に対する最も代表的な忌避剤であるディート及びそのディートを配合する害虫忌避剤ムシペール12を用いて、フトゲツツガムシ未吸着幼虫に対する実験的忌避効果と麻痺効果について検討したので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) ツツガムシ

愛知医科大学寄生虫学教室で累代飼育しているフトゲツツガムシ未吸着幼虫を使用した。昆虫類の卵を餌として25℃で発育、産卵、孵化させた幼虫で炭酸ガスに対して運動性を示す個体のみを使用した(写真-1)。

2) 被検体

ディート(昭和電工), ムシペール12(ディートを12%含有する害虫忌避剤, 池田模範堂),

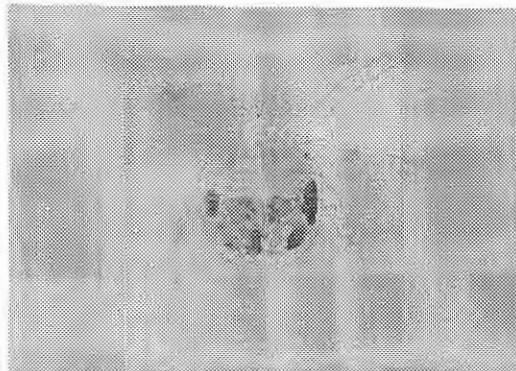


写真1 フトゲツツガムシ幼虫

塩酸ケタミン（ケタラール，三共），エタノール（和光純薬）を用いた。

2. 実験方法

1) 忌避効果試験

(1) Ring - paper test ²⁾

外径7 cm, 内径5 cm, 幅1 cmのリング形の濾紙（Whatman No.1）を作成し，これに忌避剤を均等に滴下し，室温（24～25℃）で10分間乾燥した後，直ちに黒紙上に両面テープで貼付した。

中央の薬剤無処置域に一匹のツツガムシを放し，行動を10分間観察した。濾紙にはほぼ接触するまで接近し，これを越えず引き返す行動の回数を数えた。コントロール群（N=30）では最高2回で平均0.7回の引き返し行動を示したので3回以上の引き返し行動を認めた個体を有効とみなした。

(2) マウスの耳介での吸着阻止試験 ³⁾

7～10週令の ddy 系マウスをホルダーの中に入れ四肢と耳を固定し直径1 cmの穴を開けた濾紙を耳に当て，約10cm離れたところから忌避剤を耳介の隆起部に向かってスプレーした。スプレー後固定をときホルダーから開放し，各時間経過後，ケタラールを筋注し再度ホルダーに固定し，その耳介隆起部にツツガムシを30匹強制的に付着させ，その30分後に吸着しているツツガムシの数を実体顕微鏡下にてカウントした。

尚，吸着阻止率は以下の式にて計算した。

$$\frac{C - T}{C} \times 100$$

C：Control側の耳に吸着したツツガムシの数

T：忌避剤をスプレーした側の耳に吸着したツツガムシの数

(3) マウスでの忌避試験 ³⁾

7～10週令の ddy 系マウスを用いた。対照群2匹は無処置コントロール群とし，他の2匹には忌避剤を全身にはほぼ均一にスプレーし，それぞれ小さな個別金網ケージに入れた。28cm×34cmの板上に活性炭末加石膏をひき，その四隅にマウスを入れた個別金網ケージを配置し，その中央に400匹のツツガムシを3時間放置し，それぞれのマウスから体液を吸って満腹したツツガムシを落下させその数を実体顕微鏡下にてカウントした。

尚，忌避率は以下の式にて計算した。

$$\frac{C - T}{C} \times 100$$

C：コントロール群の満腹落下ツツガムシ数

T：忌避剤をスプレーした群の満腹落下ツツガムシ数

2) 麻痺試験

濾紙（Whatman No.1）に忌避剤を1 ml滴下し，室温にて30分間放置し乾燥した。その後濾紙上に10匹のツツガムシを放置し，5分後回収したツツガムシを黒紙上に移し5分間歩行状態を観察した。全く動かないもの，動けるが蛇行するもの，ぐるぐるの回りはじめるもの等しっかりした正常な前進歩行のできないものを麻痺個体とした。

結果

1. 忌避効果試験

(1) Ring - paper test

1) ディートの用量-反応関係

ディートを0.025mg/cm²から0.5mg/cm²の間で8用量にて忌避効果を検討したところ図1に示したように用量に依存して忌避効果が増強し、そのED₅₀は0.107mg/cm² (0.082~0.135mg/cm²)であった。

2) ムシペール12の忌避効果とその持続時間

ムシペール12の忌避効果はディートの場合と同様に明らかに認められ、ムシペール12を滴下した後24時間放置した濾紙においても90%の高い忌避効果が認められた。48時間では60%と忌避効果が減少した。(表1)

3) マウスの耳介での吸着阻止試験

ムシペール12を一回スプレー (0.068ml) することにより、マウスの耳介にてツツガムシの吸着行動が明らかに阻止されることが認められた。その吸着阻止効果の持続時間は3時間後では99.2%であり、6時間後では87.6%、8時間後では74.8%の効果が認められた。(表2)

4) マウスでの忌避試験

無処置コントロール群では81匹のツツガムシが満腹落下し、明らかに吸着することが確かめられた。一方、ムシペール12をスプレーした群で全く吸着されず100%の忌避効果が認められた。(表3)

2. 麻痺試験

ムシペール12による麻痺効果は明らかなものであり、ムシペール12を濾紙に滴下した後24時間放置後において100%の麻痺効果が認められ、48時間後でも80%と強い効果が認められた。(表4)

持続時間*	1時間	3時間	6時間	24時間	48時間
忌避数/10匹 (%)	9/10 (90)	10/10 (100)	9/10 (90)	9/10 (90)	6/10 (60)

*: ムシペール12の滴下後の放置時間

表1 ムシペール12の忌避効果とその持続時間

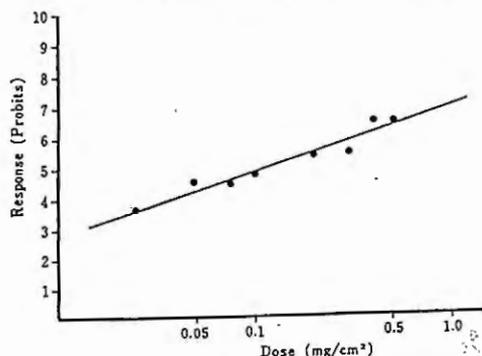


図1 Deetのフトゲツツガムシに対する忌避効果の用量-反応直線

持続時間	対照**	3時間	6時間	8時間	12時間	24時間
吸着数/300*匹	242	2	30	61	125	226
忌避率 (%)	0	99.2	87.6	74.8	48.3	6.6

*: ツツガムシ30匹/マウス、マウス10匹使用

** : 無処置の耳

表2 ムシペール12の吸着阻止効果とその持続時間

実験回数	誘餌落下数		忌避率*
	A. 対照群	B. ムシペール12群	
1	38匹	0匹	100%
2	43匹	0匹	100%
計	81匹	0匹	100%

*忌避率: (A-B) / A × 100

表3 ムシペール12の忌避効果

持続時間	正常匹数	麻痺匹数	麻痺率(%)
24時間	0/40	40/40	100.0
48時間	8/40	32/40	80.0
72時間	24/40	16/40	40.0
96時間	15/30	15/30	50.0
120時間	9/10	1/10	10.0

持続時間: ムシペール12落下後の放置時間

麻痺率: 麻痺匹数 / 使用ツツガムシ数

室内温度: 25~27°C

室内湿度: 60~75%

表4 ムシペール12の麻痺効果とその持続時間

考 察

つつが虫病は病原体の *Rickettsia tsutsugamushi* を保有するツツガムシ幼虫に刺咬されることにより発症する発疹性熱性疾患である。

ツツガムシは分類上、節足動物門、蛛形綱、ダニ目、前気門類のツツガムシ科に属しており日本では80種類以上が確認されているが、人に吸着し、かつリケッチアを媒介すると考えられるのはアカツツガムシ、フトゲツツガムシおよびタテツツガムシの3種類と言われている。新型つつが虫病はフトゲツツガムシとタテツツガムシの幼虫によって主に伝播される。¹⁾

全国各都道府県衛生部によるアンケート調査の結果によるとつつが虫の届出数は昭和59年には28都県で948名、昭和60年には33都府県で882名となっている。¹⁾ また、昭和61年には34都府県で763名、昭和62年には33都府県で804名が届けられている。⁴⁾

ヒトへの刺咬を阻止できればつつが虫の予防に大きく貢献することが出来る。今回、全国至るところに生息していて被害を及ぼしているフトゲツツガムシを用いて、忌避効果の試験方法の開発と害虫忌避剤 Deet およびそれを主成分とする害虫忌避剤 ムシペール12について忌避効果と麻痺効果を検討した。

濾紙を用いた Ring-paper test による忌避試験ではディートの用量に依存して忌避効果が増大することにより、定量的な生物反応モデルとして評価することができ、その ED_{50} は 0.107 mg/cm^2 であった。Buescher ら⁵⁾ はツツガムシ (*Leptotrombidium fletcheri*) に対してディートの忌避効果を認め、その ED_{50} は 0.019 mg/cm^2 と報告しているが、その方法は忌避剤をしみこませた濾紙のうゑにアルミ製の皿を載せその上にツツガムシを放ち濾紙上に降りるかどうかを観察し、降りない個体を忌避個体としてしいる。我々の場合はツツガムシの忌避行動として引き返し行動を観察した点で彼らと異なっている。また、同じツツガムシでも *L. pallidum* と *L. fletcheri* では種類を異にしている。 ED_{50} 値の違いは方法とツツガムシの種類の違いが主なる原因であろう。

ムシペール12による忌避効果実験では24時間後まで90%と高い効果が認められムシペール12に含まれるディートの濃度は十分な量と考えられた。また、48時間後では60%と効果が減退していることはディート分子が濾紙上から微かずつ揮散しているものと推察される。

マウスの耳介での吸着阻止実験はツツガムシを強制的に付着させている。これは自然界におけるフィールドでの吸着条件から見ればマウスにとってはかなり厳しい条件である。それにも関わらず、ムシペール12をスプレーした6時間後においても87.6%の高い吸着阻止効果が得られたことは動物の皮膚上においても濾紙と同じようにディート分子が少しずつ揮散しながら効果を発揮しているも

のと考えられる。しかし、濾紙上での結果と比べ持続時間が短いのはマウスの耳にムシペール12をスプレーした後自由にケージの中を動き回っているため、その時に周囲に耳が触れたり、手足で耳を触ったり、体温でディートが揮散したり、あるいは経皮吸収されたりする等の理由によるものと推察される。マウスの忌避試験においては毛の生えている全身に塗り残しのないようにムシペール12をスプレーするため10回スプレーした。1回のスプレー量は約65mg (0.068ml) であるので10回では約650mg (0.68ml) となる。

人と比べマウスの場合、全身が毛で被われておりその毛自身は水を弾く性質があるのと1本1本の毛自身の表面積等も塗布面積として影響してくるので理論的に比較することは難しいが、塗り残しのないようにということでやや多めの10回スプレーとした。

ムシペール12をスプレーした群ではツツガムシと3時間暴露させたが100%の忌避効果が認められた。この方法は実験室とはいえツツガムシが自由に行動しているという点でフィールドの条件に近い方法と考えられる。

次に濾紙上での麻痺効果についてであるがツツガムシはディート分子と接触することにより直ちに麻痺状態となる。ディートの濃度に依存していて高濃度の場合は2～3日経過後でもまだ麻痺状態が続き、回復するのに時間を要した。

低濃度の場合は数時間で回復した。角坂ら²⁾によると、Deet のフトゲツツガムシに対する麻痺効果は室内湿度に影響され湿度が下がると効果は増加し、上がると減少すると報告している。これらのことからフィールドでは気温や湿度が一定ではなく、Deet 分子の蒸散状態が常に変動しているものと考えられ、ムシペール12の忌避効果、特に持続性に微妙に影響してくるものと予測される。

以上のように Deet およびムシペール12はツツガムシ幼虫に対して忌避効果および麻痺効果を有していることより、ツツガムシの刺咬の阻止に対して有効な薬剤であると評価することができる。

文 献

- 1) 須藤恒久, つつが虫病—総論, 化学療法の領域, 3 (1), 12 (1987)
- 2) 角坂照貴, 金子清俊, 森井 勇, Deet およびムシペール12のフトゲツツガムシ幼虫に対する忌避, 麻痺効果, 薬理と治療, 15(12), 483 (1987)
- 3) 角坂照貴, 金子清俊, Deet を主成分とする忌避剤のフトゲツツガムシ幼虫に対する忌避および吸着阻止効果, 第40回日本衛生動物学会 (1988年4月1日, 名古屋)
- 4) 厚生省の指標, 35(4), 55 (1988) および35 (12), 58 (1988)
- 5) M.D.Buescher, L.C.Rutledge, R.A.Wirtz, J.H.Nelson, J.L.Inase, Repellent tests against LEPTOTROMBIDIUM (LEPTOTROMBIDIUM) FLETCHERI (ACARI : TROMBICULIDAE), J. Med. Entomol. 21(3), 278 (1984)

【原 著】

葛根湯及びその構成生薬のウサギ赤血球 加熱溶血の対する作用

Effect of kakkon-to and Its Component Crude Drugs on Heat-induced
Hemolysis of Rabbit Erythrocyte

川 筋 透 上 野 美 穂 齊 藤 晴 夫
Toru KAWASUJI Miho UENO Haruo SAITO

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

赤血球加熱溶血抑制試験は抗炎症薬の *in vitro* のスクリーニングに用いられるもので、加熱による赤血球からのヘモグロビン遊離を測定し、その抑制をいわゆる膜安定化作用として抗炎症作用の指標とするものである。この赤血球膜安定化作用はリソゾーム膜安定化作用とともにインドメタシンなど多くの酸性非ステロイド系抗炎症薬にみられ、リソゾーム膜を安定化することが炎症の進行（リソゾーム膜の破壊→消化性酵素の遊離→細胞溶解）を抑えることになることから、膜安定化作用が抗炎症作用メカニズムの1つにあげられている。今回、抗炎症効果などが期待される葛根湯製剤について、加熱溶血抑制試験がその簡易な薬効評価法となりえるかどうかなどを検討する目的で、葛根湯及びその構成生薬についてウサギ赤血球加熱溶血抑制試験を行い、若干の知見が得られたので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 被験物質

インドメタシン（和光）、フルフェナム酸（和光）、イブプロフェン（日清化学）、アスピリン（三井東圧化学）、クロルプロマジン塩酸塩（半井化学）、ペントバルビタールナトリウム（東京化成）、ジフェンヒドラミン塩酸塩（和光）、テオフィリン（和光）、プレドニゾロン（国立衛試標準品）、アミノピリン（住友化学工業）、クロモグリク酸ナトリウム（Sigma, Cromolyn, 以下 DSCG と略す）、ケイヒアルデヒド（東京化成）、ケイヒ酸（和光）、ケイヒアルコール（和光）、エフェドリン塩酸塩（大日本製薬）、プソイドエフェドリン塩酸塩（富士薬品工業）、メチルエフェドリン塩酸塩（富士薬品工業）、ジンゲロール（半井化学）、グルチルリチンアンモニウム（和光、食品添加物試験用）、タンニン酸（半井化学）、ルチン（岩城製薬）、クエルセチン（和光）、ヘスペリジン（アルプス薬品工業）ほかを用いた。

2) 生 薬

葛根湯（混合比：葛根8，麻黄4，大棗4，桂皮3，芍薬3，甘草2，生姜1）の構成生薬（延寿堂）のうち大棗はカット生薬のまま用い、その他の生薬は粉末生薬あるいはカット生薬を粉末にして用いた。これを材料として抽出、分画を行い、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解または懸濁して試験に用いた。ただし、メタノール抽出残渣の水抽出分画などにみられた大量の DMSO 不溶物は遠心除去した。

2. 実験方法

1) ウサギ赤血球浮遊液の調製

体重2.8~4.5kgの日本白色種雄性ウサギをペントバルビタールナトリウム (25mg/kg i.v.) 及びエーテルで麻酔し、頸動脈からポリエチレンチューブを介して採血した。ACD-A液 (100ml中にクエン酸ナトリウム 2.2g, クエン酸 0.8g及びブドウ糖 2.2gを含む抗凝固血液保存液) を血液 1mlあたり0.15ml加え、150×gで10min遠心分離し上層の多血小板血漿を除き5°で保存した。この血液に0.15Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を加え 2,000rpm 20min で4回遠心洗浄し、沈渣を緩衝液で希釈して5%ウサギ赤血球浮遊液を調製した。

2) 加熱溶血抑制率の算出

各種濃度の被験薬0.2mlに赤血球浮遊液3.8mlを加えてゆるやかに混和した後、53°で20min加熱した。氷水で急冷し、3,000rpm 15minで遠心分離した後、上清の540nmにおける吸光度を測定した。被験薬による上清の吸光度の減少から加熱溶血に対する抑制率を算出した。なお被験薬の溶媒として用いたDMSO (最終濃度5%)はウサギ赤血球をわずかに溶血させたが、加熱による溶血で上清の吸光度はその15~25倍程度となった。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{1 - (\text{加熱検体の吸光度} - \text{非加熱検体の吸光度})}{\text{加熱DMSOの吸光度} - \text{非加熱DMSOの吸光度}} \times 100$$

結果及び考察

1. 酸性非ステロイド系抗炎症薬

のうちインドメタシン、フルフェナム酸に強い加熱溶血抑制作用がみられ、イブプロフェンにも抑制作用がみられたが、アスピリンにはわずかな作用しかみられなかった (Fig. 1)。他の薬剤ではケミカルメディエータ遊離抑制剤のDSCGにやや弱い抑制作用がみられたが、クロルプロマジン、ペントバルビター、ジフェンヒドラミン、ステロイド系抗炎症薬のプレドニゾンなどには抑制作用はほとんどみられなかった (Fig. 1, Table. 1)。

2. 桂皮、麻黄、生姜のメタノールエキスは比較的濃度で抑制作用を示し、葛根湯やその他の構成生薬のメタノールエキスにも抑制作用がみられた (Fig. 2)。葛根湯メタノールエキスの灰分には作用がみられなかったことから、抑制成分は金属イオンなどの無機塩類ではないと考

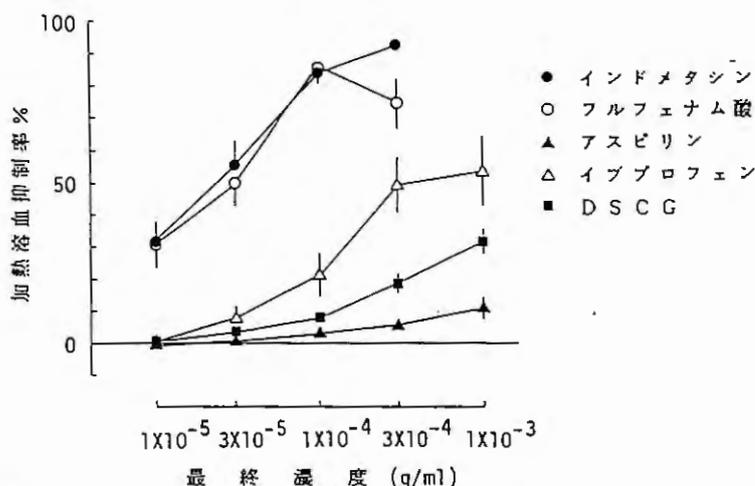


Fig.1 ウサギ赤血球加熱溶血に対する非ステロイド系抗炎症薬及びDSCGの作用 (個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

被 験 薬	抑制% ± S.E.
クロルプロマジン塩酸塩	-35.1 ± 10.3
ペントバルビタールナトリウム	-7.6 ± 0.3
ジフェンヒドラミン塩酸塩	5.1 ± 4.9
テオフィリン	-2.8 ± 0.3
プレドニゾン	-13.3 ± 2.2
アミノピリン	-5.2 ± 2.2

最終濃度 3x10⁻⁴g/ml, n = 4

Table.1 ウサギ赤血球加熱溶血に対する種々薬剤の作用

えられた。

3. 桂皮成分のケイヒアルデヒド, ケイヒ酸, ケイヒアルコール, 麻黄成分のエフェドリン, プソイドエフェドリン, メチルエフェドリン, 生姜成分のジンゲロール, 甘草成分のグルチルリチンにはほとんど作用がみられないか, わずかな抑制しかみられなかった (Fig. 3-1~3-4)。

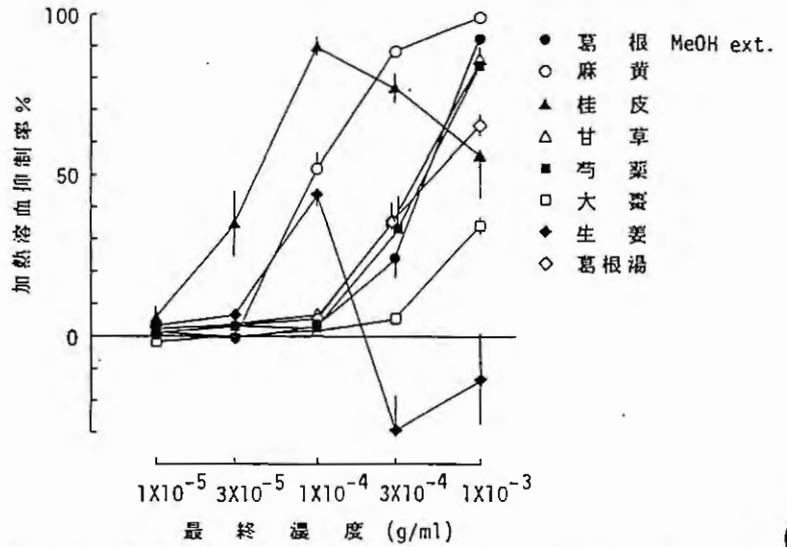


Fig. 2 ウサギ赤血球加熱溶血に対するメタノールエキスの作用
(個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

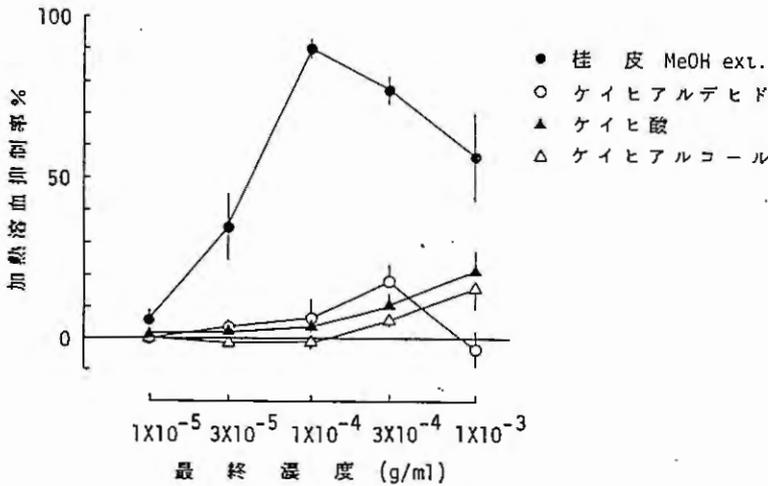


Fig. 3-1 ウサギ赤血球加熱溶血に対する桂皮成分の作用
(個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

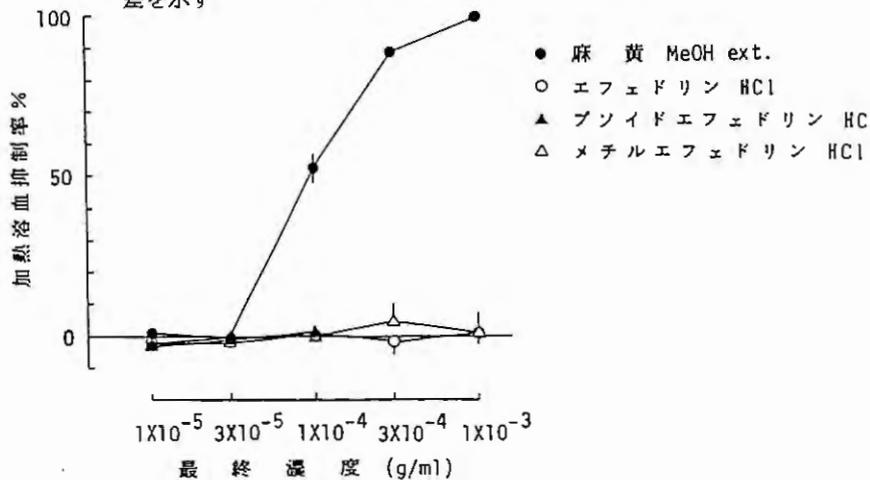


Fig. 3-2 ウサギ赤血球加熱溶血に対する麻黄成分の作用
(個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

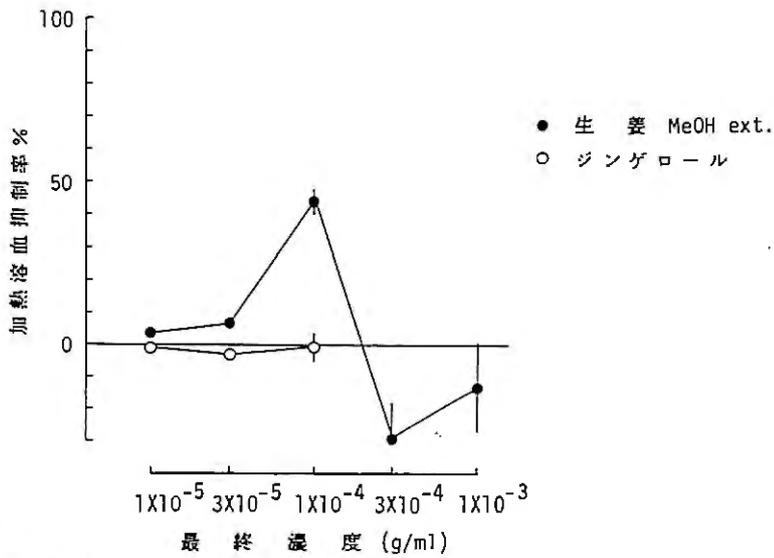


Fig. 3-3 ウサギ赤血球加熱溶血に対する生姜成分の作用
(個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

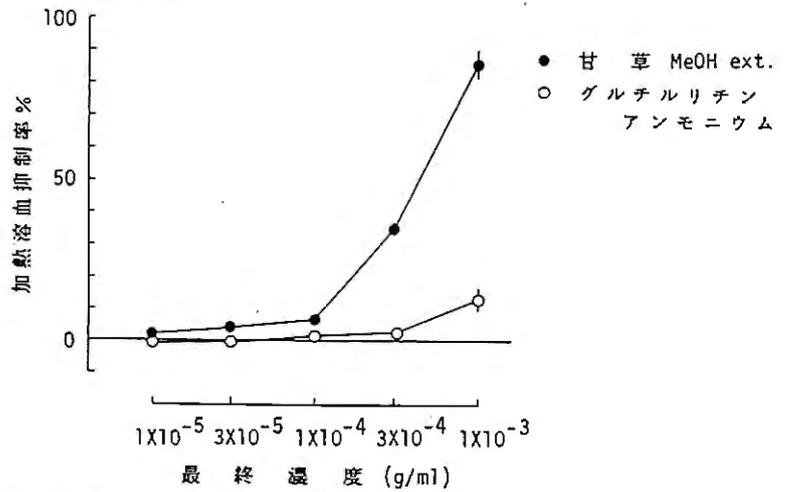


Fig. 3-4 ウサギ赤血球加熱溶血に対する甘草成分の作用
(個々の成分は5例の平均値±標準誤差を示す)

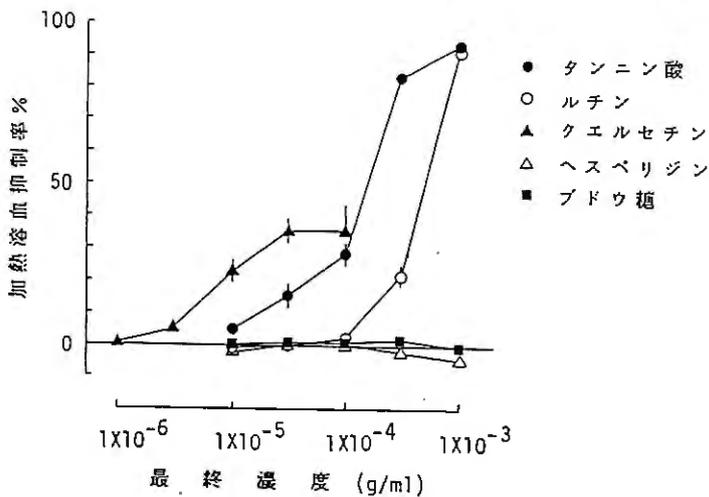


Fig. 4 ウサギ赤血球加熱溶血に対するタンニン、フラボノイドなどの作用 (個々の点は5例の平均値±標準誤差を示す)

4. タンニン酸は高い抑制率を示し、クエルセチン、ルチンにも抑制作用がみられた (Fig. 4)。タンニンやフラボノイドは植物に広く分布していることから、葛根湯の構成生薬に含まれるある種

のタンニンやフラボノイドが加熱溶血抑制作用に関与している可能性が示唆された。

5. Chart 1 に示した方法により葛根湯の分画を行った場合、水抽出液をブタノールで分配抽出して得たブタノール可溶部 (Fr. 1, Fr. 3) に高い抑制率が得られたが、ブタノール不溶部 (Fr. 2, Fr. 4) にはほとんど作用はみられなかった (Fig. 5)。このことから葛根湯の加熱溶血抑制物質は水及びブタノールに可溶性の物質と考えられた。しかし、水にかなり難溶な部分である Fr. 5 に、より低濃度で抑制作用がみられたことから、葛根湯には成分的に異なる 2 種類以上の加熱溶血抑制作用を示す物質の存在が示唆された。

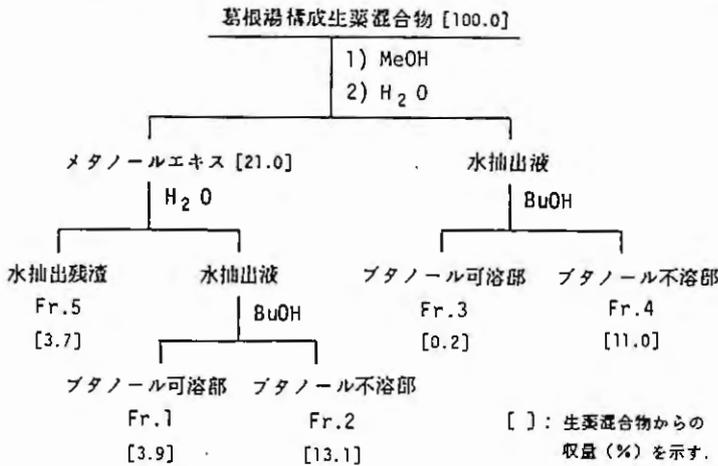


Chart 1 葛根湯の分画

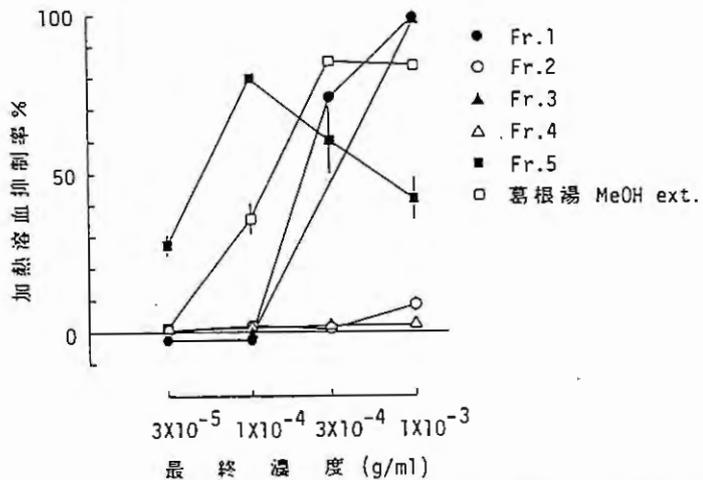


Fig. 5 ウサギ赤血球加熱溶血に対する葛根湯分画の作用

(個々の点は平均値±標準誤差を示す (n=3)
Fr. 4, Fr. 5は DMSO 可溶部(遠心上清)を実験に用いた)

6. 葛根湯水抽出液のブタノール可溶部はやや高濃度であるが高い抑制率を示した (Fig. 6)。一方、市販の葛根湯乾燥エキスのブタノール可溶部にも弱い抑制作用がみられたが、軟エキスのブタノール可溶部にはほとんど作用は認められなかった (Fig. 7)。

インドメタシンなどの酸性非ステロイド系抗炎症薬の多くが、低濃度で加熱溶血抑制作用¹⁾²⁾、いわゆる膜安定化作用を示し、この作用とカラゲニン浮腫抑制作用など *in vivo* の抗炎症作用との間に、ある程度の相関性³⁾⁴⁾があるといわれている。しかし、葛根湯などの生薬抽出物について *in vitro* の加熱溶血抑制作用と *in vivo* の抗炎症作用との相関性は不明であり、今後種々検討する必要があるが、今回の実験で葛根湯水抽出液のブタノール可溶部などに加熱溶血抑制作用がみられ、これに対して市販の乾燥エキスや軟エキスのブタノール可溶部の作用はかなり弱い

か、ほとんど作用がみられなかったことから、市販の葛根湯製剤の中には抗炎症効果の面からみて、本来方剤中に含まれている有効成分が必ずしも保持されていない可能性が考えられた。

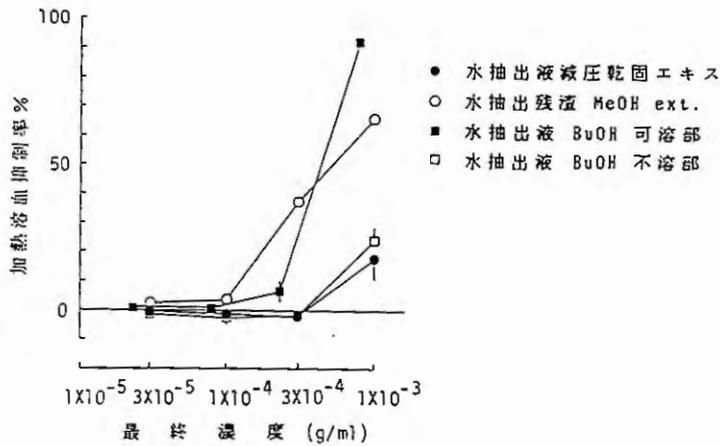


Fig. 6 ウサギ赤血球溶血に対する葛根湯水抽出液の作用

個々の点は平均値±標準誤差を示す (n=3)
 (減圧乾固エキス及び BuOH 不溶部は DMSO)
 可溶部 (遠心上清) を実験に用いた

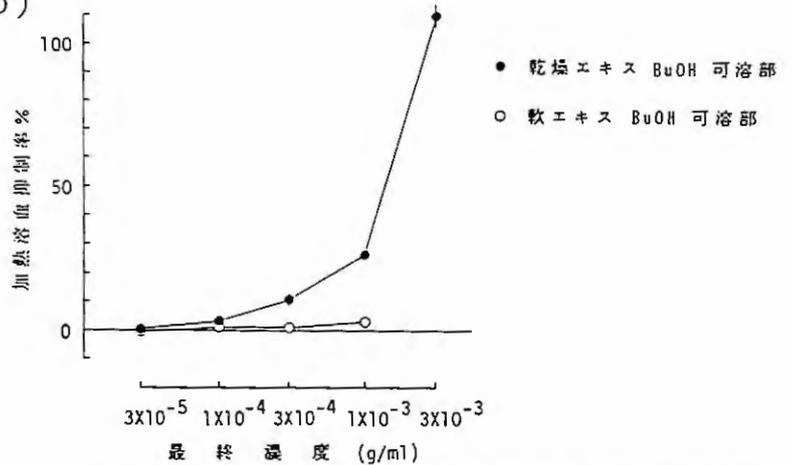


Fig. 7 ウサギ赤血球加熱溶血に対する葛根湯製剤ブタノール可溶部の作用

(個々の点は平均値±標準誤差を示す (n=3))

文 献

- 1) J.H. Brown, H.K. Mackey, D.A. Riggilo: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125, 837 (1967)
- 2) E.M. Glenn, B.J. Bowman, J.C. Koslowski: Biochem. Pharmacol. Supplement, 27 (1968)
- 3) 中西美智夫, 今井 博, 後藤一洋: 薬誌, 90, 548 (1970)
- 4) Y.T. Ninomiya, Y. Yamada, M. Onitsuka, Y. Tanaka, T. Maeda, H.B. Maruyama: Chem. Pharm. Bull., 28, 2553 (1980)

2. 動物および飼育条件

1) マウス

生後4週齢で購入した Crj : CD-1 (ICR) 雌雄マウス (静岡実験動物) を室温 $23 \pm 1^{\circ}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ に調節した飼育室内 (バリアースystem) で1週間にわたり予備飼育した後, 一般状態に異常の認められなかった動物を試験に供した。検体投与前の絶食期間を除く全試験期間を通じて固型飼料 (MM-3, 船橋農場) と水道水を自由に摂取させた。

2) ラット

生後4~5週齢で購入した SD 系雄性ラット (静岡実験動物) をマウスの場合と同様にバリアースystemで1週間予備飼育した後, 一般症状に異常の認められなかった動物を試験に用いた。

3. 群分けおよび投与方法

1) マウス

雌雄動物とも体重別層化無作為組分け法により1群6匹からなる3群に分け, あらかじめ18時間絶食を行った後, 各群の投与量が体重100g当り2mlになるように注射用蒸留水に溶解し, 対照群には注射用蒸留水のみを投与した。なお, 5000mg/kgの投与量は本被検物質のマウスにおける単回投与の投与限界量である。

2) ラット

試験開始 (被検物質投与) 24時間前に採血し, 各群の血糖値の平均がほぼ均等になるように群分けを行った。被検物質および対照薬は投与に際して, 各群の投与量が100g当り0.5~2.0mlになるように生理食塩水または注射用蒸留水に溶解し, 腹腔内または経口投与した。なお, 検体の調整はすべて投与当日に行った。

4. Streptozotocin 誘発高血糖ラットの作成

18時間絶食したラット (体重97~129g) に STZ 50mg/kg をクエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解して尾静脈内に投与し, STZ 投与後6日目に採血を行い高血糖を示した動物のみを1群8匹ずつ用いた。

5. 急性毒性試験

観察および病理学的検査

検体の投与日を第1日として以後14日間にわたって各動物の中毒症状と一般状態の観察を行い, 3ないし4日毎に体重の測定を行った。また, 15日目に病理解剖を行い, 臓器の異常の有無を観察した。

6. 茶抽出粉末の血糖降下作用

1) 腹腔内投与による正常ラットに対する作用

ラット (体重126~148g) を1群5匹ずつ実験に用いた。BEX は10, 30, および100mg/kg を一回腹腔内に投与した後, 7および24時間後に尾静脈より採血し, 血しょう中の Glucose 濃度を測定した。

2) 経口投与による正常ラットに対する作用

18時間絶食したラット (体重96~114g) を1群5匹ずつを実験に用いた。BEX は300, 1000および3000mg/kg を強制経口投与し7および24時間後に尾静脈より採血し, 血しょう中の

Glucose 濃度を測定した。なお、被検物質投与後は水と飼料を自由に与えた。

3) STZ 誘発糖尿病ラットに対する作用

BEX は300および1000mg/kgを1日1回、5回連続強制経口投与した。採血は検体投与後1, 2, 4日目(最終投与前)および最終投与5時間後に行い、血しょう中の Glucose 濃度を測定した。

4) 正常ラットに対する糖負荷試験

18時間絶食したラット(体重163~196g)を1群5匹ずつ用いた。BEX は300および1000mg/kg、塩酸ブフォルミンは200mg/kgを強制経口投与し、30分後に Glucose を4g/kg強制経口投与(糖負荷)した。糖負荷後、30, 60, 120および180分に尾静脈より採血し、血しょう中の Glucose 濃度を測定した。

5) 採血および血糖値の測定法

ラットをエーテルで軽麻酔した後、尾静脈からヘパリン処理した注射筒を用いて約0.1mlずつ採血を行った後、できるだけ速やかに3000rpm, 15分間遠心し、血しょう中の Glucose 濃度を Glucose C-test wako (和光純薬)を用いて測定した。

6) 統計学的解析

各データの統計処理は Student の t-検定により行った。

実験結果

1. 急性毒性試験

1) 死亡率

雌雄とも3000および5000mg/kgのいずれの投与群においても14日間の観察期間中に死亡した例は認められなかった。

2) 体重変化 (Fig. 2)

投与後の体重変化は雌雄とも3000および5000mg/kg投与群において、3~4日毎の体重測定の結果、いずれも順調な増加が認められ、対照群と比較し有意な差は認められなかった。

3) 中毒症状および病理学的所見

検体の投与直後および14日間の観察期間中に被検物質の投与に起因したと考えられる中毒症状は見られなかった。また投与後15日目に行った病理解剖においても被検物質の投与に起因したと思われる各臓器の肉眼的な異常は認められなかった。

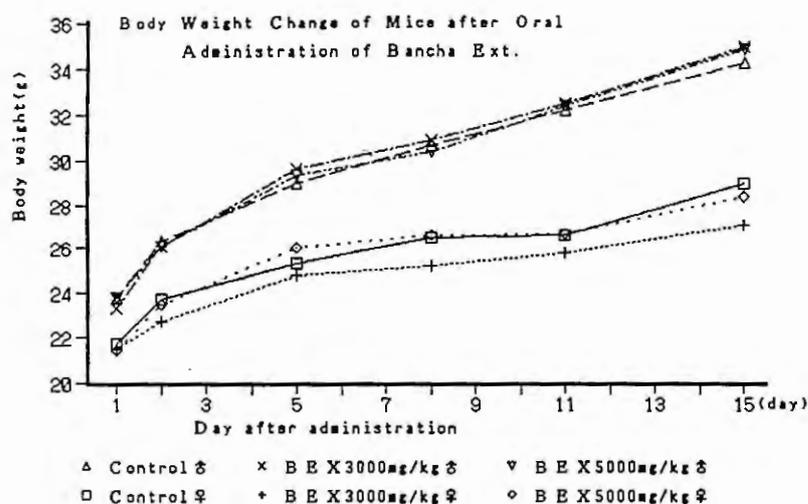


Fig. 2

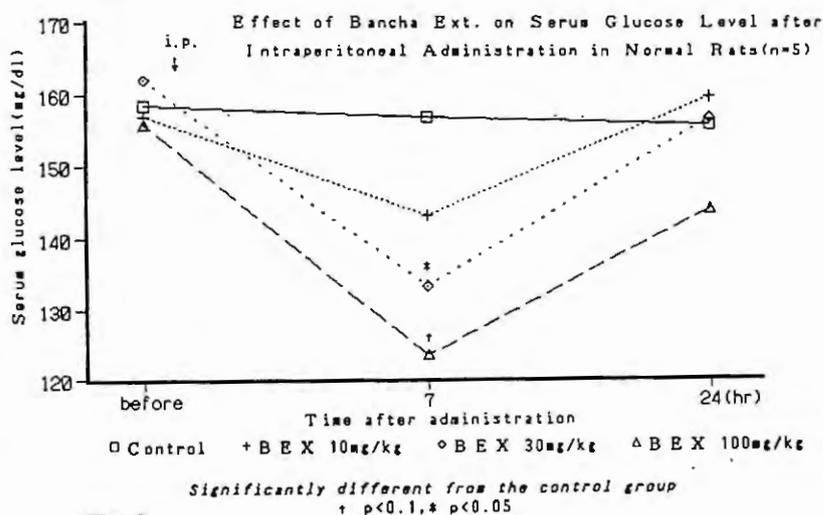


Fig. 3

2. 血糖降下作用

1) 腹腔内投与による正常ラットに対する作用

正常ラットに BEX を10, 30および100mg/kg腹腔内に1回投与した結果, 投与7時間後に血糖値は明らかに用量依存的に降下し, 対照群と比較して有意差が認められたが, 24時間後では100mg/kg投与群を除いて対照群とほぼ同程度に回復した。

(Fig. 3)

2) 経口投与による正常ラットに対する作用

正常ラットに BEX を300, 1000および3000mg/kg経口投与(1回)した結果, 投与7時間後には300および3000mg/kg投与群は対照群と比較して降下傾向が認められたが, 1000mg/kg投与群は降下作用は弱く用量依存性は示さなかった。(Fig. 4)

3) STZ 誘発糖尿病ラットに対する作用

Streptozotocin 高血糖ラットを作成し, BEX を300および1000mg/kgを1日1回5日間連続経口投与した結果, 血糖値は用量依存的に降下しているが, 対照群との間には有意差は認められなかった。(Fig. 5)

4) 正常ラットに対する糖負荷試験

正常ラットに BEX を300, 1000mg/kgおよび塩酸ブフォルミン 200mg/kg経口投与し, 30分後に糖負荷を行った結果, 糖負荷後血糖値は対照群および BEX 投与群は共に30分後に最高値を示し, 以後減少し投与3時間後にはほぼ糖負荷前の値までに低下したが, 対照群と比較して全く有意差は認められなかった。陽性対照として用いた塩酸ブフォルミン 200mg/kg投与群では30分後から明らかな血糖上昇の抑制を示した。(Fig. 6)

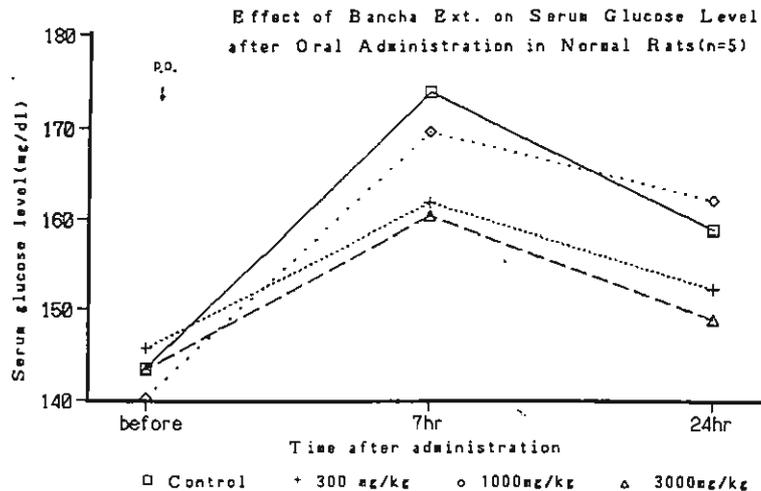


Fig. 4

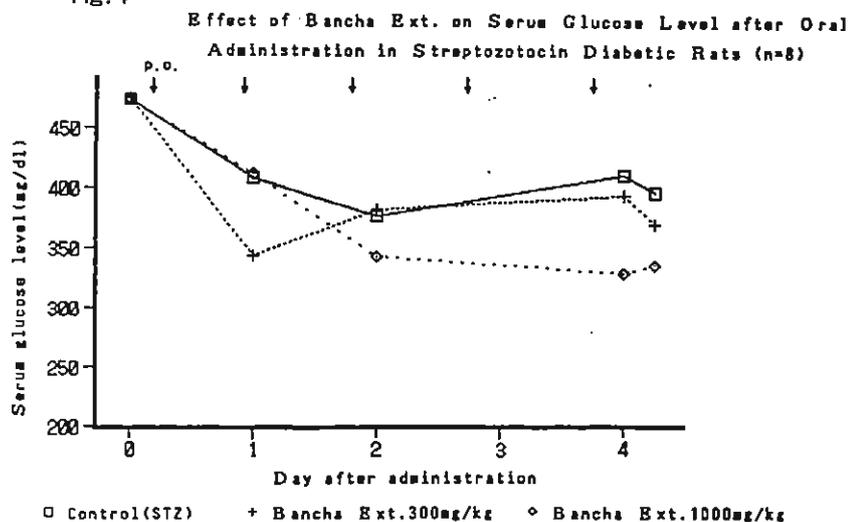


Fig. 5

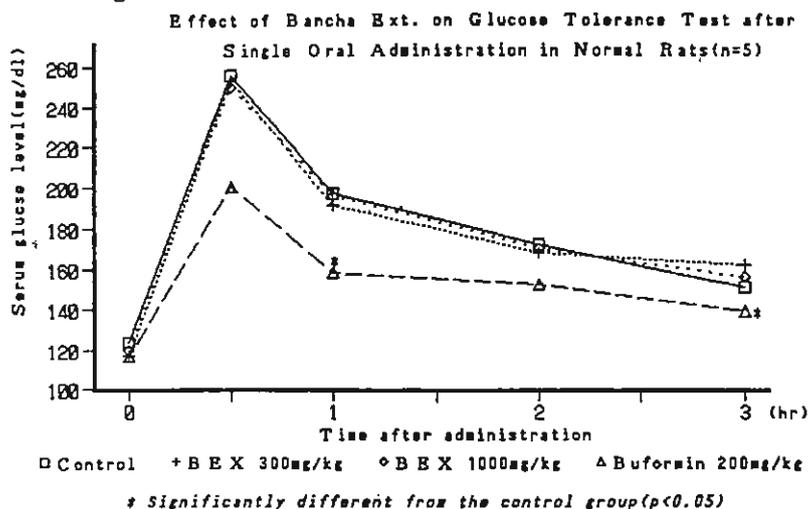


Fig. 6

考 察

番茶より抽出した B E X (主成分：平均分子量4万の polysaccharide) についてその毒性および血糖降下作用について検討した。

B E X をマウスに3000および5000mg/kgを経口投与した結果、いずれも全観察期間中に死亡した例は認められず、また中毒症状および病理解剖においても各臓器に肉眼的な異常は認められなかった。

故に番茶エキス粉末(主成分： polysaccharide) の LD_{50} 値は5000mg/kg(投与限界量)以上と考えられる。

正常または Streptozotocin (S T Z) 誘発高血糖ラットに対する血糖降下作用を検討した結果、正常ラットでは投与経路により著しく血糖降下作用に差が認められ腹腔内投与では用量依存的な有意な差が認められたが、経口投与では弱い血糖降下傾向を示したに過ぎなかった。また S T Z 高血糖ラットに B E X を5日間連続経口投与することにより用量依存的に血糖降下作用を示したが、対照群と有意差は認められなかった。また耐糖能においても全く差は認められなかった。

古くから民間的に糖尿病の治療に有効であると云われているお茶から工業的にその活性成分の一つである分子量1~5万画分(平均分子量4万)の polysaccharide を分離し、血糖降下作用のあることを動物試験で確認した。また、薬理試験の結果から B E X は膵臓に対する直接的な作用の可能性は少なく、その他の機序、例えば解糖系への作用、インシュリン様の作用等が考えられるが、今後更に検討する予定である。

文 献

- 1) 清水岑夫 他, 日本茶の血糖降下作用成分に関する研究, 薬学雑誌, 108 (10), 964-970 (1988)

【原著】

漢方製剤の品質に関する研究 (第3報)
— 大黃甘草湯 —

Studies on Quality Evaluation of Kanpo Medicine III
— Daiokanzo - To -

成川 一郎 西本 初博 吉井 美矢子
Ichiro NARIKAWA Hatsuhiro NISHIMOTO Miyako YOSHII
中田 るり子 石田 裕子 舟川 昌代
Ruriko NAKADA Yuko ISHIDA Masayo FUNAKAWA

東亜製薬株式会社 試験研究室
Research Institute, Toa Pharmaceutical Co., Ltd.

「大黃甘草湯」は大黃4g, 甘草1gの2味からなり, その原典「金匱要略」には「食し終われば即ち吐すものは, 大黃甘草湯之を主る」とあり, 嘔吐に用いられていたが, 現在は一般に常習便秘薬として用いられている。

今回, 我々は「大黃甘草湯」の抽出条件とエキス収率の関係並びに抽出液中の遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAの経時的動向について検討し, 若干の知見を得たので報告する。

実験の部

1. 被験材料

大黃, 甘草

2. 試験方法

1) 各種抽出条件による大黃甘草湯エキス収率比較

下記に示す各種抽出条件により, それぞれ乾燥エキス量を求めて収率を比較した。

(1) 水製乾燥エキス

大黃甘草湯25g (5日分, 大黃20g, 甘草5g) に水250mlを加え, 30°及び45°加温並びに沸騰の各条件でそれぞれ1時間抽出し, 抽出液を日局エキス剤の製法を準用して, 40~50°で減圧濃縮後, 50°で真空乾燥して製した。

(2) 30 v/v %エタノール製乾燥エキス

大黃甘草湯25g (5日分, 大黃20g, 甘草5g) に30 v/v %エタノール 250mlを加え, 30°及び45°加温並びに沸騰の各条件で水製乾燥エキスの場合と同様に操作して製した。

2) 各種抽出条件による大黃甘草湯中の大黃活性成分の抽出量比較

上記1)の実験で得た各乾燥エキスにつき下記に示す方法により遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAの含量を求めて比較した。

(1) 遊離型アントラキノン (比色法)

試料に水を加え, 超音波抽出→1N塩酸1滴を加え, クロロホルム抽出→クロロホルム層を減圧濃縮乾固→酢酸マグネシウム・メタノール溶液 (1→200) を加えて波長510nmにて比色定量

(2) 総結合型アントラキノン (比色法)

(1)で得た水層をとり、炭酸水素ナトリウム試液、塩化第二鉄溶液(1→5)を加え、沸騰水浴中で加温→塩酸を加え加温→冷後エーテル抽出→減圧濃縮乾固→酢酸マグネシウム・メタノール溶液(1→200)を加えて波長510nmにて比色定量

標準品は1,8-ジヒドロキシアントラキノンをを用いた。

(3) センノサイドA (HPLC法)

試料に水を加えて溶かし、一定量にした液を試料溶液として、HPLCにより定量
標準品は生薬試験用センノサイドAを用いた。

HPLC条件

カラム: リクロカート Lichrosorb RP-18 (メルク社製) $\phi 4.0 \times 250$ mm

移動相: $H_2O \cdot CH_3CN \cdot CH_3COOH$ (80:20:1)

流量: 1.5 ml/min

カラム温度: 室温

測定波長: 340nm

3) 大黃甘草湯湯液中の大黃活性成分の経時的傾向

大黃甘草湯を下記に示す各条件で抽出し、各湯液中へ移行する大黃中活性成分の経時的動向を検討した。

(1) 45°加温時の各成分の移行率

大黃甘草湯100g(20日分, 大黃80g, 甘草20g)に水1000mlを加え, 45°の水浴中にて抽出, 抽出開始10, 20, 30, 60及び90分後に一定量を採取し, 2)の試験方法を準用して遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAを定量した。

また, 別に大黃80gに水1000mlを加え, 大黃甘草湯の場合と同様に操作し, 遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAを定量した。

(2) 沸騰水浴中での各成分の移行率

大黃甘草湯100g(20日分, 大黃80g, 甘草20g)に水1000mlを加え, 沸騰後10, 20, 30, 60及び90分後に一定量を採取し, 2)の試験方法を準用して遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAを定量した。

また, 別に大黃80gに水1000mlを加え, 大黃甘草湯の場合と同様に操作し, 遊離型アントラキノン, 総結合型アントラキノン及びセンノサイドAを定量した。

3. 試験結果

1) 各種抽出条件による大黃甘草湯のエキス収率比較

各種抽出条件による乾燥エキスの収率比較は Fig.1 に示した。

これによれば水抽出によるエキス収率は16~23%, 30%v/vエタノールによるエキス収率は20~26%であった。

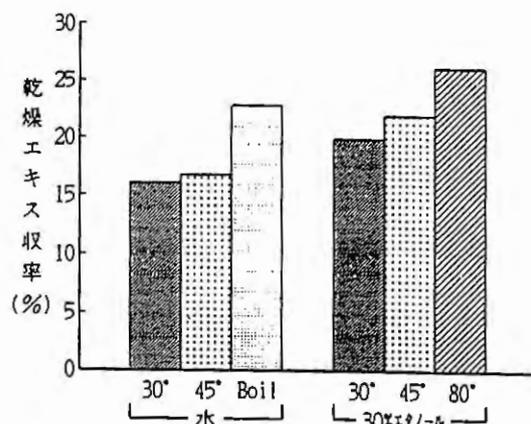


Fig.1 大黃甘草湯のエキス収率
抽出条件: 10倍量の溶媒 1時間

2) 各種抽出条件による大黄甘草湯中の大黄活性成分の抽出量比較

各種抽出条件による遊離型アントラキノン及び総結合型アントラキノンの抽出量比較は Fig. 2 に、センノサイドAの抽出量比較は Fig. 3 に示した。

これによれば水抽出における遊離型アントラキノン量はいずれも約5mgでほぼ一定であるが、30%v/vエタノール抽出では10~15mgとなった。また、総結合型アントラキノン量は水抽出では45~53mg、30%v/vエタノール抽出では55~72mgで45°加温抽出時(72.1mg)が最も多かった。また、センノサイドAの量は、水抽出の場合、45°加温抽出では約16mgを得たが、沸騰抽出の場合は約9mgと大きく減少した。

一方、30%v/vエタノール抽出では水抽出に比較してエキス収率も高いため、センノサイドAの量は20~22mgで、45°加温抽出時が最も高い値(22.1mg)を示した。

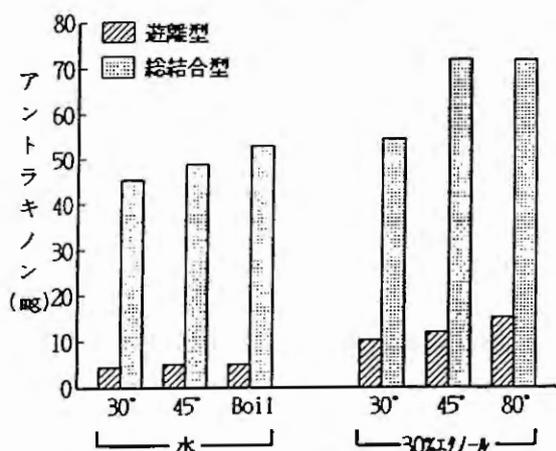


Fig. 2 大黄甘草湯エキス中の遊離型及び総結合型アントラキノン量(1日量)

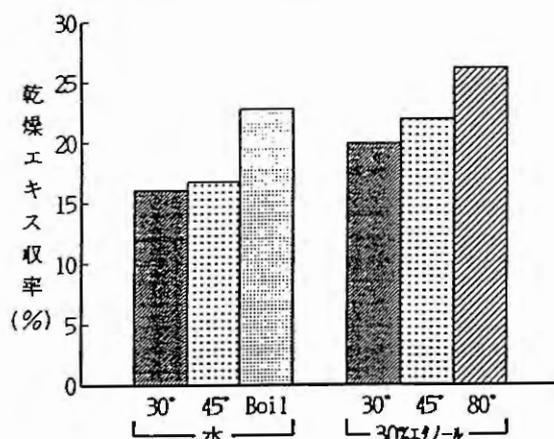


Fig. 3 大黄甘草湯エキス中のセンノサイドAの量(1日量)

3) 大黄甘草湯湯液中の大黄活性成分の経時的動向

45°加温時及び沸騰抽出時の総結合型アントラキノンの湯液中への移行率を Fig. 4 に示した。なお、以下の移行率は使用した大黄の総結合型アントラキノン定量値(93.2mg/大黄甘草湯1日量)を基準値とした。

45°抽出では抽出開始10分後には62%が移行し、その後2時間連続抽出により57%となり5%の減少を認めた。

一方沸騰抽出では加熱開始後約30分に沸騰したが、沸騰10分後74%が移行し、その後90分連続沸騰により約60%に大きく減少した。

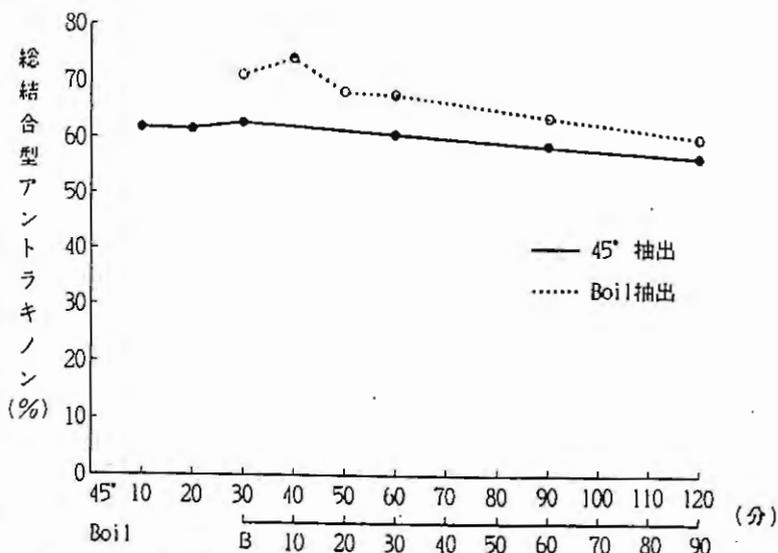


Fig. 4 大黄甘草湯中の総結合型アントラキノンの湯液中への移行率

次に45°加温時における活性成分の総結合型アントラキノンとセンノサイドAの移行率につき大黄甘草湯と大黄を比較して Fig. 5 に示した。

総アントラキノンは大黄甘草湯では抽出開始30分後に、大黄では60分後にピークを示し、そ

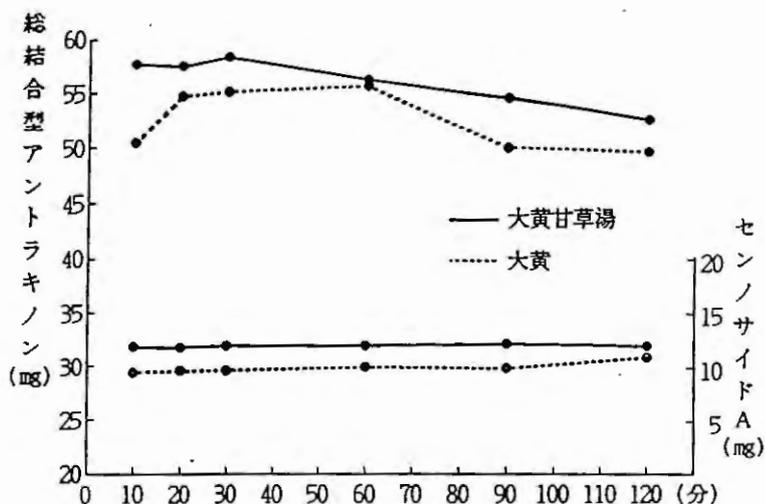


Fig. 5 大黃甘草湯及び大黃の湯液中の活性成分の動向 (1日量) 45° 抽出

の後いずれも漸減し、大黃甘草湯の場合はピーク時 (53mg) に比較して120分後には約5mgの減少を認めた。

また、センノサイドAは抽出開始10分後から2時間後までいずれもほぼ一定の値を示し、減少は認められなかった。

総結合型アントラキノン量、センノサイドAの量ともに大黃よりも大黃甘草湯の方がやや高い値を示した。

同様に沸騰抽出時の動向を比較して Fig. 6 に示した。

総結合型アントラキノン量、センノサイド量ともに大黃甘草湯と大黃はほぼ同様の動向を示し、総結合型アントラキノンは沸騰後10分でピークを示した後漸減して90分後には大黃甘草湯の場合10mgの減少が認められた。また、センノサイドAは沸騰時に12mgで60分後には半減し、90分後には4.5mgと大きく減少した。

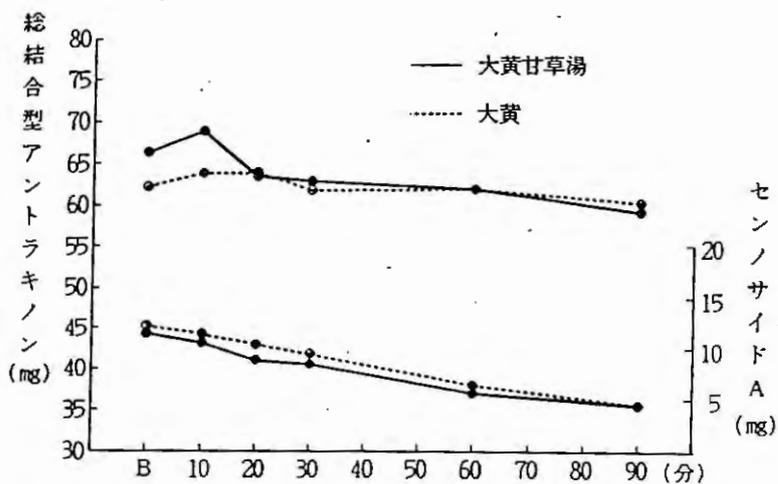


Fig. 6 大黃甘草湯及び大黃の湯液中の活性成分の動向 (1日量) Boil 抽出

考 察

今回の実験結果から大黃甘草湯を45°で加温抽出した場合と沸騰抽出した場合のエキス収率並びに活性分量を比較して Table. 1 に示した。

エキス収率については沸騰抽出のほうが1.4倍高かったが、瀉下成分とされている総結合型アントラキノンに大差はなく、センノサイドAにおいては45°抽出のほうが1.7倍多かった。

また、抽出時の経時的動向をみた場合、沸騰抽出60分後の総アントラキノンの減少率がピーク時の10~15%であったのに対して、45°抽出60分後では3%の減少にとどまったことから長時間の加熱による活性成分の分解が予想され、大黃甘草湯の抽出条件としては45°1時間抽出が適当と判断した。便秘の症状には個人差が比較的大きく、一般に常習便秘の患者はそれぞれに適した便秘薬とその服用量を個々に選択しているのが実情である。

大黃甘草湯の場合、使用する原料の品質並びに湯液の調製方法によって瀉下成分の含量が変動す

Table.1 大黃甘草湯の45°抽出と Boil 抽出の比較

	45° 抽出		Boil抽出
エキス収率	16%	<	23%
遊離型アントラキノン	5.2mg	=	5.2mg
総結合型アントラキノン	49.0mg	<	53.2mg
センノサイドA	16.3mg	>	9.4mg

る。これらのことを十分考慮して一定規格のエキス製剤が作られれば服用する側にとって使いやすいものとなり、これがエキス製剤化の目的に他ならない。

現在のところ一般用漢方製剤の品質規格には各社の製剤設計や製剤技術の差異等によりかなりの差異が認められ、従って薬理活性も異なっている。

一般消費者に選択を任されている一般用漢方製剤において、大黃甘草湯に限らず同一処方名で内容が異なるという紛らわしい製剤間格差があってはならないものとするべきである。

【原 著】

薬用植物の形質転換と有用物質の生産

Production of Valuable Substances using Transformed Medical Plant

竹 内 二三雄

Fumio TAKEUCHI

株式会社廣貫堂 研究開発部

Research Laboratory, Kokando Co., Ltd.

秋 山 和 幸 安 田 一 郎

Kazuyuki AKIYAMA Ichiro YASUDA

東京都立衛生研究所

The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

浅 水 哲 也

Tetsuya ASAMIZU

富山県薬事研究所

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

土壌細菌の一種である *Agrobacterium rhizogenes* は植物組織に毛状根病を起こす原因菌で、広い範囲の双子葉植物に感染し、毛状根という形質転換組織を形成する。これは本菌が持つ Ri プラスミドの一部 (T - DNA) が植物細胞内の遺伝子ゲノムに入り込み、安定した遺伝子表現型を作り、形質転換細胞で生産される内生ホルモンのバランスを制御し、その結果非常に急速に成長する器官系が作られるためである。

この毛状根における二次代謝産物の生産性が検討され、特に薬用植物における有用物質の生産の場として近年注目を集めている。今回、生薬「決明子」の原植物であるエビスグサにおいて毛状根を作り、この毛状根の大量培養を行うと共に、それに伴う二次代謝産物アントラキノン類の生成について調査したので報告する。

実験の部

1. 実験材料

1) 細菌材料

毛状根病菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) は ATCC 15834 を用いた。

2) 植物材料

エビスグサ (*Cassia obtusifolia* Linn.) の種子は富山県薬用植物指導センターより入手した。

2. 実験方法

1) 毛状根の誘導

(1) 無菌植物の作成

エビスグサの種子を0.02%塩化ベンザルコニウム液で30分間処理し、滅菌水で3回洗い、70%エタノールで30秒間処理し、更に滅菌水で3回洗った後、10%次亜塩素酸ナトリウム液で15分間処理し、滅菌水で5回洗い、滅菌水で一晩振とうした。翌日再び10%次亜塩素酸ナトリウム液で15分間処理し、滅菌水で5回洗った後、500mlの角型培養瓶中の滅菌済みのパーミキュライトに播種して25℃、500~1,000Luxの照明下で培養し、無菌的に発芽させた。発芽後約1週間して芽生えを無機塩類を1/2濃度とした Murashige - Skoog¹⁾ 培地 (以下 1/2 MS) に0.2%ジュランガム添加の固形培地20mlの入った試験管 (25mm×150mm) に1ケずつ移し、25℃、500~1,000 Lux の照明下で1~2週間培養した。

(2) 菌の感染

A. rhizogenes (ATCC 15834) を0.8% Nutrient broth, 0.1% Yeast extract, 0.4%ショ糖を含む Nutrient broth 栄養培地 (pH 7.0, 以下 NYS 培地) 5mlに加え、27℃で48時間培養した菌液10 μ lを1mgの注射器を用いて、芽生えの子葉の真下の胚軸へ接種し、25℃、500~1,000 Lux の照明下で培養した。

2) 毛状根の培養

(1) *A. rhizogenes* の除菌

菌接種後約2週間で発生した毛状根を約1カ月後に切り出し、除菌培地に移した。4種の抗生物質混液 (Penicilline-G 160 μ g/ml, Tetracycline 10 μ g/mg, Polymyxin-B 10 μ g/ml 及び Vancomycin 100 μ g/ml) を含む Murashige-Skoog¹⁾ 培地20mlに3%ショ糖及び0.8%寒天添加の固形培地で25℃、500~1,000 Lux の照明下で約1カ月間培養した。

無菌の確認は組織の一部をとり、ミニ遠沈管中で良く潰した後、NYS 培地に0.8%寒天添加の固形培地に画線し、27℃で48時間培養して行った。

(2) 毛状根の大量培養

無菌が確められた毛状根は1/2MS培地に3%ショ糖及び0.8%寒天 (又は0.2%ジュランガム) 添加の固形培地で静置培養すると共に、1/2MS培地に3%ショ糖添加の液体培地で巡回培養を行った。

(3) 毛状根の成長曲線

1/2MS培地に3%ショ糖添加の液体培地100mlに生重量約3gの毛状根をそれぞれ加え、25℃、500~1,000 Lux の照明下で巡回培養した。培養期間が5, 9, 12, 16, 19, 23, 26, 及び30日の毛状根を取り出し、それぞれの生重量を量ると共に、凍結乾燥してその乾重量を測定した。

4) アントラキノン類の定量²⁾

(1) 試料溶液の調製

凍結乾燥した先の毛状根をそれぞれ粉末とし、その約500mgずつを精密に量り、メタノール40mlを加え15分間振とう抽出した後、遠心分離し上澄液を分取した。更に同様の操作を2回繰り返して上澄液を合わせてろ過した後、減圧下、40℃以下で溶媒を留去し、メタノールを加えて正確に25mlとし試料溶液とした。尚、試料の調製は用時行った。

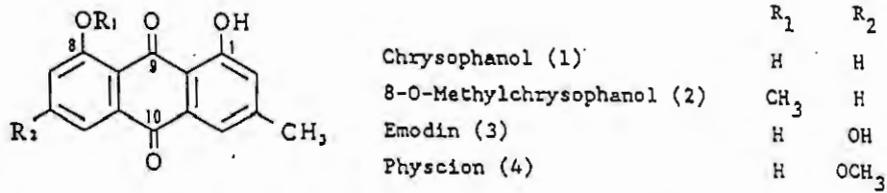


Fig. 1 Chemical Structure of Anthraquinones

(2) 標準溶液及び検量線の作製

安田ら²⁾によりエビスグサ毛状根より単離・同定された(1)~(4)の4成分 (Fig. 1) をそれぞれ約10mgずつ精密に量り、メタノールを加えて溶かし正確に100mlとし標準溶液とした。

各標準溶液をアセトニトリル・水・酢酸・トリエチルアミン混液 (300:100:1:1) でそれぞれ希釈し、2~50 μ g/mlの範囲で検量線を作成した。

(3) HPLC 法による定量

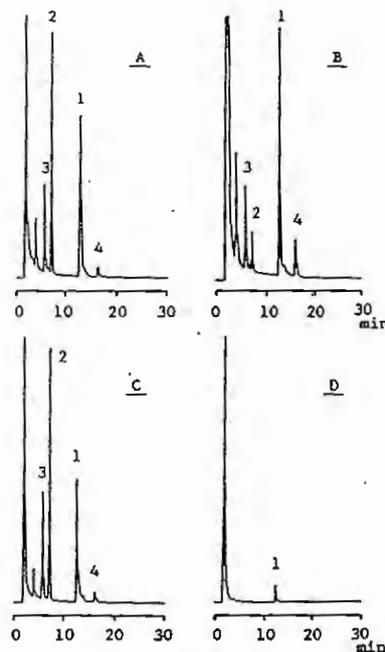
試料溶液及び標準溶液 5 μ lにつき、絶対検量線法によりアントラキノン類の定量を行った。HPLC 装置は 880-P U (日本分光)、検出器は870型波長可変紫外外部可視部検出器、インジェクターは7125型 (レオダイン)、インテグレーターはC-R 6 A (島津)を用い、測定条件は Fig. 4 に示したとおりである。



Fig. 2 静置培養中の毛状根



Fig. 3 旋回培養中の毛状根



A: the Hairy Roots B: the Stems at Germination
C: the Roots at Germination D: the Roots at Growth
HPLC Conditions: column, YMC-Pack AM-312, 6x150mm, ODS 5 μ m, 60Å; mobile phase, acetonitrile-water-acetic acid-triethylamine (300:100:1:1); flow rate, 1.0ml/min; detection, VIS 420nm; range, 0.02
1: Chrysophanol 2: 8-O-Methylchrysophanol 3: Emodin 4: Physcion

Fig. 4 HPLC of The Several Parts of *Cassia obtusifolia*

結 果

1. 毛状根の培養

エビスグサにおいて毛状根を誘導し、固形培地での継代培養に至った。(Fig. 2)

更に成長した毛状根を液体培地での

巡回培養で大量培養を行い、物質生産試験を行った。

(Fig. 3)

培養法として予め培地の組成を検討したが、無機塩類を1/2濃度にした Murashige - Skoog¹⁾培地で最大の成長を示した。

2. 毛状根中のアントラキノン類

形質転換によって得られた毛状根には、4種類のアントラキノン (Chrysophanol , 8-O-Methylchrysophanol , Emodin , Physcion) を確認した。これら4成分は芽生えの一次根の成分と構成、含量とも良く似ていた。しかし、圃場にて採取したエビスグサの地下部には Chrysophanolの1成分しか検出されなかった。(Fig. 4)

3. 毛状根の成長とアントラキノン類の生産

培養毛状根の生重量 (○…○) は指数関数的に増加し、20日目以後鈍化した。一方、乾重量 (●—●) は約12日目をピークにその後減少した。アントラキノン類の含量 (△…△) は乾重量が最大になる12日目に減少し、16日目に最大となりその後減少し、23日目以後は一定となった。(Fig. 5)

成分毎の変異は 8-O-Methylchrysophanol (○…○) 及び Chrysophanol (△…△) が16日前後を境に減少するのに対し、Emodin (●—●) 及び Physcion (□…□) は26日より30日目にかけて増加した。(Fig. 6)

培養中の培地への成分の排出についても検討したが、ほとんど糖類が検出されるだけで、アントラキノン類の排出はなかった。

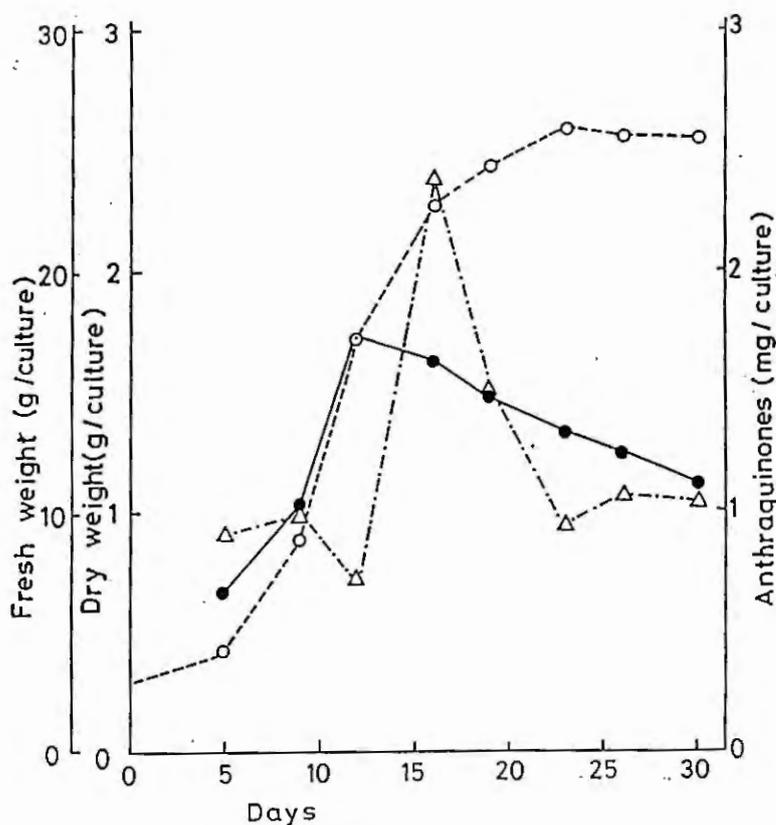


Fig. 5 Yields of Dry Weight and Anthraquinones in *Cassia obtusifolia* Hairy Roots in Shaking Culture

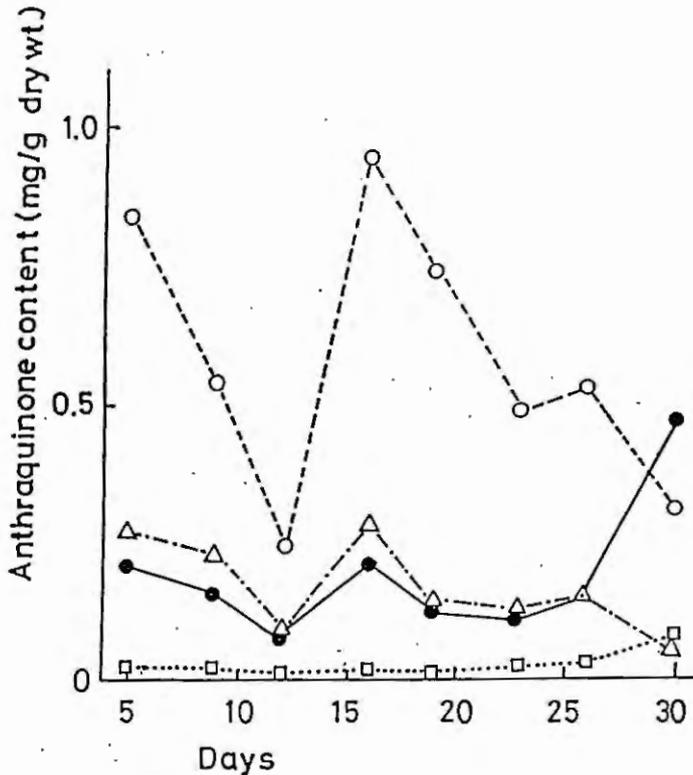


Fig. 6 Changes in Contents of Anthraquinones (mg/ g Dry Weight) *Crassia obtusifolia* Hairy Roots

た。これは細胞が aging に向う定常期初期にアントラキノンが液胞中に排出され、蓄積が最大となるためと考える。その後、総アントラキノン類の含量はほぼ一定であるにもかかわらず、成分毎に増減が見られることから、毛状根の成長定常期では代謝が進み、成分の二次的修飾の可能性が考えられる。

以上より、毛状根において特定の化合物を効率良く生産するには培養の条件等、さらに研究が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究にあたり、8-O-Methylchrysophanol の標品を分与して下さった日本大学薬学部北中進博士と滝戸道夫教授に感謝します。又、実験の一部を担当した掛見佳代子氏に感謝します。

この実験の一部は(財)ヒューマンサイエンス振興財団の長寿関連基礎研究事業の研究費で行った。

参考文献

- 1) T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. Plant.*, 15, 473-497 (1962)
- 2) 安田一郎, 浜野朋子, 高野伊知郎, 瀬戸隆子, 秋山和幸, 浅水哲也, 東京都立衛生研究所年報, 39 (1988) 印刷中
- 3) M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.*, 6, 398 (1958)
- 4) H. E. Flores, *ASC Symposium Series* 334, 66-86 (1987)

考 察

形質転換によって得られたエビスグサの毛状根は成長が速く、アントラキノン類の生産が確められ、有用物質生産の可能性が示唆された。しかし、これら毛状根は遊離のアントラキノンを多く含むものの、配糖体はほとんど含まず、アントラキノンの配糖体を多く含む種子³⁾ (「決明子」とは成分的に異なるものであった。

毛状根の成長と物質生産については Flores による研究⁴⁾ があり、それによると毛状根の成長は速く、それに平行して二次代謝産物を生産しているとされている。しかし、エビスグサの毛状根ではアントラキノンの生産は成長に平行ではなく、対数増殖期後半に最低となり、定常期の初期に最大となっ