

氏 名 (本籍) ひら やま ひで き
平 山 秀 樹

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 1 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 12 年 3 月 2 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 題 目 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 新 規 安 定 性 評 価 法 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査)
教授 水 柿 道 直 教授 後 藤 順 一
教授 山 添 康

論文内容要旨

近年の高齢化社会の到来に伴い、高齢者の患者は、更年期障害や栄養不良などを抱え、常に不眠、苛立ち、腰痛、泌尿器疾患などの症状で苦しんでいる。漢方医療ではこのような症状に対して、漢方エキス製剤（医療用）が長期にわたって投与される場合が多く、その効果は合成医薬品に比べるとマイルドではあるが、時間を追って確実に現れることが知られている。また、これらの製剤は、西洋医薬では対応が困難とされてきた疾患やその補完治療としての役割に期待が高まり、各種疾患への適用と共に薬剤使用量も増加し、医療への貢献においてその使用意義がますます高まってきた。漢方エキス製剤は、天産物である生薬に由来する多種多様な有機化合物複合体から構成されるために、合成医薬品に比べると品質確保の難しい薬剤である。そこで、昭和57年度から厚生省の主導による漢方エキス製剤（医療用）の品質確保のための厚生科学研究が開始された。昭和60年度になってその研究成果に基づく漢方エキス製剤（医療用）の品質確保と承認審査の方針に関する指針が公示されるに至り、漢方製剤メーカー各社による品質の充実が図られた。

以上のような経緯・状況を背景にして、漢方エキス製剤（医療用）の品質管理は現在、生薬中の主要成分である glycyrrhizic acid（甘草成分）、ephedrine（麻黄成分）、paeoniflorin（芍薬成分）、berberine（黄连・黄柏）などの品質指標成分の定量試験、色・味・においなどの性状試験、TCL法などによる確認試験、エキス含量試験、純度試験、製剤試験、微生物試験、並びに各社自主設定試験などによって行われている。また、製品出荷後の製剤の経時的安定性の確保は、市場流通の品質を保証する上で重要な課題であり、最終製品などについては、適切な品質指標を設定して安定性試験を実施することが必要とされている。医薬品は一般に、安定性試験実施方法のガイドラインに準じ、長期保存試験、加速試験及び苛酷試験が実施され、有効成分の含有量などの分析結果から貯蔵方法や有効期間が設定されている。しかし、漢方エキス製剤は、多種多様な有機化合物の複合体であるために安定性の評価と判定が難しく、これまで上記のような承認企画を中心とした品質管理指標を個々に分析評価して安定性が判定されてきた。現在、医療の場で汎用されている漢方エキス製剤（医療用）については、承認規格に基づく安定性データなどから3～5年の使用期限（自主認定）が設定されている。しかし、製品出荷後の市場流通時には過度の加熱や高温保存に晒されることもあり、製剤の苛酷条件下での安定性が危惧される。

最近になって、安定性が個々に異なる成分の複雑な複合体である漢方エキス製剤に対し、乾燥エキス粉末を一つの有効成分とする薬剤としてとらえ、外的環境（温度、湿度、光など）によって影響されやすい指標を導入して評価することによって、製剤設計時あるいは最終製品の安定性や劣化度を迅速かつ簡便に予測・推定する評価法の開発が望まれている。近年、化合物の化学反応に伴う電子エネルギー順位間の遷移によって起こる光エネルギーの放出、すなわち化合物の安定性に深く関わる「化学発光」（ケミルミネセンス：chemiluminescence/CL）が、広範な研究領域において注目され、成果が次々に報告されている。極微弱化学発光計測法とは、これらの中で励起状態から基底状態への電子エネルギー順位間の遷移に伴って生じる極微弱な化学発光を微細なエネルギーとして直接感知することのできる計測技術である。光エ

クトロニクス の 進 歩 , 特 に 稲 葉 ら に よ る 単 一 光 電 子 計 数 法 (single photoelectron counting method) の 確 立 を 契 機 に し て 高 感 度 フォ ト マ ル が 開 発 さ れ , こ れ を 搭 載 し た 極 微 弱 化 学 発 光 検 出 装 置 (ケ ミ ル ミ ネ ッ セ ン ス ア ナ ラ イ ザ ー) が 市 販 さ れ る に 至 り , 極 微 弱 化 学 発 光 (extra-weak chemiluminescence/CL) が 精 度 よ く , か つ 容 易 に 計 測 で き る よ う に な っ た 。 そ の 結 果 , 農 学 ・ 医 学 ・ 化 学 の 各 領 域 に お け る 各 種 基 礎 及 び 応 用 研 究 , 薬 学 分 野 に お け る 生 体 組 織 な ど の 脂 質 過 酸 化 に 関 す る 研 究 な ど に 加 え , 極 微 弱 化 学 発 光 計 測 法 の 品 質 評 価 へ の 試 み と し て 医 薬 品 の 安 定 性 評 価 へ の 応 用 の 可 能 性 を 示 す 研 究 成 果 が 報 告 さ れ た 。

以 上 の よ う な こ と か ら , 有 機 化 合 物 複 合 体 か ら な る 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 品 質 評 価 , 特 に 安 定 性 評 価 に お い て , 化 合 物 の 化 学 反 応 性 (安 定 性) に 深 く 関 わ る 極 微 弱 化 学 発 光 計 測 法 を 適 用 す る こ と は 有 用 と 思 わ れ た 。

そ こ で , 漢 方 エ キ ス 製 剤 の CL を 計 測 し , 合 わ せ て 各 種 品 質 指 標 の 安 定 性 を 強 制 加 熱 劣 化 試 験 に よ り 検 討 す る こ と に よ っ て , 漢 方 エ キ ス 製 剤 に お け る CL の 由 来 を 解 析 す る と 共 に , 極 微 弱 化 学 発 光 計 測 法 が 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 安 定 性 評 価 に 適 用 可 能 か ど う か を 明 ら か に す る 目 的 で 本 研 究 を 行 っ た 。

そ の 結 果 , 極 微 弱 化 学 発 光 計 測 法 は , 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 安 定 性 評 価 の た め 迅 速 か つ 簡 便 な 計 測 法 と し て 利 用 で き る こ と を 明 ら か に し た 。

第 1 章 で は , 極 微 弱 化 学 発 光 計 測 法 の 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 安 定 性 評 価 へ の 適 用 生 を 評 価 す る 目 的 で , 産 婦 人 科 領 域 や 老 人 性 痴 呆 症 な ど の 脳 神 経 科 領 域 で 利 用 さ れ , CL 発 光 強 度 の 高 い 当 歸 芍 薬 散 エ キ ス 顆 粒 (TJ-23) を 被 験 試 料 と し て 選 び , 強 制 加 熱 劣 化 試 験 に よ っ て 製 剤 の 安 定 性 と CL と の 関 係 に つ い て 検 討 を 行 っ た 。

そ の 結 果 , 保 存 温 度 及 び 保 存 期 間 の 増 加 に 伴 い 製 剤 の 着 色 化 (褐 変 化) が 進 み , 品 質 指 標 成 分 の paoniflorin 及 び ferulic acid の 含 有 量 の 低 下 が 認 め ら れ た 。 ま た , CL は 製 剤 の 劣 化 と 共 に 変 動 し , そ の デ ー タ か ら 化 学 反 応 速 度 論 に お け る 活 性 エ ネ ル ギ ー に 対 応 す る CL パ ラ メ ー タ (ΔA) を 算 出 し た 。 そ の 値 と 各 種 品 質 指 標 と の 関 係 に つ い て 検 討 を 行 っ た と こ ろ , 10日 間 加 熱 保 存 し た 各 資 料 の ΔA と 着 色 度 (色 差 ΔE^* (ab)) と の 間 に 良 好 な 相 互 関 係 が 認 め ら れ , CL は 加 熱 保 存 に お け る 初 期 の 着 色 化 に 関 係 す る こ と が 明 ら か に な っ た 。

そ こ で , 第 2 章 で は CL に 関 係 す る TJ-23 の 褐 変 化 の 原 因 を 明 ら か に す る 目 的 で , 加 熱 保 存 に お け る 高 分 子 成 分 及 び 糖 類 と ア ミ ノ 酸 の 挙 動 , 更 に そ れ ら 含 有 量 と ΔE^* (ab) と の 関 係 に つ い て 検 討 し た 。 そ の 結 果 , 製 剤 の 着 色 化 に 伴 う 着 色 高 分 子 成 分 の 生 成 増 加 並 び に 糖 類 と ア ミ ノ 酸 の 含 有 量 低 下 が 確 認 さ れ た 。

漢 方 エ キ ス 製 剤 の 生 薬 抽 出 時 の 着 色 化 は Maillard 反 応 に 関 係 す る こ と が 既 に 報 告 さ れ て お り , TJ-23の 加 熱 保 存 に お け る 着 色 化 も こ れ と 同 様 の 反 応 に 基 づ く も の と 考 え ら れ た 。 こ の こ と か ら , 漢 方 エ キ ス 製 剤 の 高 温 保 存 に お け る 劣 化 (着 色 化) に Maillard 反 応 が 関 与 す る こ と が 推 定 さ れ た 。 糖 類 及 び ア ミ ノ 酸 を お よ そ 普 遍 的 に 含 む 生 薬 か ら な る 漢 方 エ キ ス 製 剤 で は , TJ-23以 外 の 他 の 品 目 に お い て も 同 様 の 反 応 に よ る 着 色 化 , 並 び に 同 じ 由 来 に よ る CL の 発 光 現 象 が 関 係 し て い る も の と 考 え ら れ た 。

第 3 章 で は , 漢 方 エ キ ス 製 剤 に お け る CL と 安 定 性 及 び Maillard 反 応 と の 関 係 を 明 ら か に す る 目 的 で , CL 発 光 強 度 の 異 な る 数 種 の 漢 方 エ キ ス 製 剤 を 被 験 試 料 と し て 選 ん で 検 討 を 行 っ た 。

臨 床 で 使 用 さ れ て い る 漢 方 エ キ ス 製 剤 120種 類 の CL 計 測 結 果 か ら , 高 い CL 発 光 強 度 を 示 す 品 目 と し て TJ-23に 加 え 防 己 黄 耆 湯 エ キ ス 顆 粒 (TJ-20) と 桂 枝 加 竜 骨 牡 蛎 湯 エ キ ス 顆 粒 (TJ-26) を , 低 い CL 発 光 強 度 を 示 す 品 目 と し て

黄連解毒湯エキス顆粒 (TJ-15) と大黄甘草湯エキス顆粒 (TJ-84) を選んだ。各試料の CL を計測すると共に、加熱保存後の ΔE^* (ab), 指標成分・着色高分子成分・糖類・アミノ酸の各含有量を安定性の品質指標として測定し、両者の関係について検討した。その結果, CL 発光強度の高い品目では各品質指標の変化が著しいのに対し, CL 発光強度の低い品目ではほとんど変化していないことが明らかになった。すなわち, CL の計測によって漢方エキス製剤の安定性の違いを評価・判定できることを明らかにした。また, CL 発光強度の高い品目 (TJ-20, -23, -26) での褐変化と CL の発光現象は, ΔE^* (ab) と着色高分子成分増加量及び糖類・アミノ酸減少量との間の相関, 並びに CL と ΔE^* (ab) との間の相関が認められたことなどから, 糖類とアミノ酸との Maillard 反応の初期過程に関係しているものと推定された。よって, 漢方エキス製剤の加熱保存での劣化は, Maillard 反応などによって生成したラジカルなどの活性分子種が, 連鎖反応を繰り返しながら着色高分子成分を生成し, 最終的に分子量の大きな褐変物質 (メラノイジン) を生成して安定化していく現象と推定した。

以上のことから, 漢方エキス製剤の CL は, Maillard 反応などに基づく初期の製剤劣化 (着色化) に由来すると共に, 分包開封後の自動酸化反応を反映していることを明らかにした。

したがって, 極微弱化学発光計測法は, Maillard 反応などに由来する漢方エキス製剤の安定性を推定・評価できる有用な計測法であることが明らかになった。すなわち, 本法を用いることにより, 多種多様な有機化合物複合体からなる漢方エキス製剤に対し, 薬剤開発の製剤設計段階における安定化剤の検索や試作品の安定性の推定・評価保存条件の設定, あるいは既存製剤の安定性の評価や劣化度の推定を, 迅速かつ簡便に行うことができることを明らかにした。

審査結果の要旨

近年、漢方エキス製剤は作用が緩和で副作用が少ない治療薬として、その使用量が増加している。これら製剤は動植物由来であり、その品質は育成環境、採取場所、保存条件などに影響を受け易く、常に一定の治療効果を得るには適正な品質管理が求められる。現在、品質管理は、各製剤毎に品質指標成分を定めその定量試験や色、味、香などヒトの五感による性状試験によって行われているが、迅速簡便に品質を評価する有用な手法は開発されていない。そこで、本研究では、漢方エキス製剤中の多種多様な化学反応によって生成する極微弱な光 (chemiluminescence : CL) を指標とする品質評価への応用を起案している。すなわち、高感度フォトマルを用いた極微弱化学発光検出装置を用い、漢方エキス製剤の品質評価への可能性について検討し、以下の成果を挙げた。

第1章では、各保存温度で加熱劣化した各当帰芍薬散エキス顆粒 (TJ-23) の各測定温度の CL 値 (対数値) が直線性を示すことから、CL 値を反応速度と仮定すると、直線の傾き (ΔA 値) は、化学反応速度論における Arrhenius の式の活性化エネルギーに対応する。その ΔA 値が、加熱保存初期の着色度 [$\Delta E^*(ab)$] と相関していることを明らかにし、安定性を評価するための指標としての有用性を示唆した。

第2章では、第1章の加熱劣化に伴う着色の原因を明らかにするため、各10日間加熱劣化した TJ-23 の高分子成分量 (ピーク面積値)、更に糖類とアミノ酸の含有量を各々定量した結果、 $\Delta E^*(ab)$ は高分子成分のピーク面積値と相関性を有し、ブドウ糖、リジンやアルギニンなどのアミノ酸に著しい低下が認められた。これらの結果から、 $\Delta E^*(ab)$ は、糖とアミノ酸の反応であるメイラード反応による褐変化と推察した。

第3章では市販されている漢方エキス製剤120種類の中から、高い CL 値を計測した防己黄耆湯エキス顆粒 (TJ-20)、桂皮加竜骨牡蛎湯エキス顆粒 (TJ-26) と低い CL 値を示した黄連解毒湯エキス顆粒 (TJ-15)、大黄甘草湯エキス顆粒 (TJ-84) を選択し、5℃ 保存品と加熱劣化品の着色度、高分子成分、品質指標成分、糖類及びアミノ酸の含有量について検討した結果、CL 値の高い製剤では5℃で保存した製剤の計測値と比較して著しい差を認めた。また、CL 値の高い製剤の ΔA 値と $\Delta E^*(ab)$ との間に相関性を認め、更に加熱劣化に伴う高分子成分の増加と糖類及びアミノ酸の著しい減少を明らかにした。以上の結果、漢方エキス製剤の生成する CL は、メイラード反応など初期反応で生成するラジカルによる、分包開封後の自動酸化反応を反映しているものと結論づけた。

極微弱化学発光計測法は、簡便かつ高感度にメイラード反応などに由来する漢方エキス製剤の安定性を評価できる有用な方法と判断される。

よって本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。