

高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの品質評価法に関する研究

申請代表者	内山 奈穂子	国立医薬品食品衛生研究所・生薬部	第二室長
研究統括者	東田 千尋	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	教授
所内共同研究者	稲田 祐奈	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	助教

■背景・目的

現代において、単味生薬や漢方製剤は広く医薬品として使用されているが、現行の日本薬局方収載生薬の用途はほとんどが漢方製剤の製造原料であり、単味の医薬品としての承認は少ない。しかし、有効性と安全性のエビデンスを備えた単味生薬エキスが、医薬品として承認されるための制度整備が徐々に進められている。その一つとして、単味生薬製剤の承認審査に具備すべく特性を考慮した「生薬のエキス製剤の製造販売承認申請に係るガイダンスについて」が発出された（薬生審査発 1225 第 6 号，平成 27 年 12 月 25 日）。本ガイダンスの発出後，例えば，効能効果として中年期以降の物忘れの改善が示されたオンジエキスについては，OTC として市販されている。

一方，富山大学和漢研・東田らは，高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスの薬理的検討(in vitro, in vivo, ヒト試験を含む)を行ってきた。例えばニクジュヨウエキスに関しては，脊髄損傷の受傷後慢性期から投与しても機能を回復させる活性があることを見出した（特許出願中）。また廃用性筋萎縮マウスにニクジュヨウエキスを投与すると歩行機能が改善することも見出した [1]。脊髄損傷マウスにおいては，ニクジュヨウエキスは経口投与でも筋肉注射でも運動機能回復効果を示したが，少なくとも筋肉注射の場合の活性成分は *verbascoside* (*acteoside*) であることが示された [2]。

さらに東田らは，臨床研究として「ロコモティブシンドロームに対するニクジュヨウエキスの予防及び改善効果の研究」を実施し，ニクジュヨウエキス 12 週間投与により歩行機能が改善する結果を得た [3]。これら基礎研究と臨床研究の結果を踏まえて，現在は新たに，富山大学附属病院において，特定臨床研究「頸椎症性脊髄症に対するニクジュヨウエキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」が進行中であり，ニクジュヨウエキスが脊髄症の機能障害改善に有効かどうかを検証することになっている。

神経機能の活性化において，ニクジュヨウエキス中の活性成分は *verbascoside* (*acteoside*) と *echinacoside* であることを東田らは既に見出しており，日本薬局方で規定されているニクジュヨウのうち，これら 2 化合物の含有量が高いことが報告されている *Cistanche tubulosa* を基原とするニクジュヨウを用い，また 30% エタノールエキスでの抽出を採用しており，この製法によるエキスを上述の臨床研究でも用いている。

ニクジュヨウエキスに関しては，今後，医師主導型治験の実施も想定されており，そこで成果が出た場合の，承認申請まで想定すると，ニクジュヨウエキスの医薬品としての品質評価法の確立が必要である。そこで，本共同研究では，ニクジュヨウ 30% エタノールエキスの品質評価法の確立を目的として，確認試験，定量法等の試験法の検討を行った。

■結果・考察

高齢者疾患をターゲットとした生薬エキスとして，*C. tubulosa* を基原とするニクジュヨウを用いた 30%

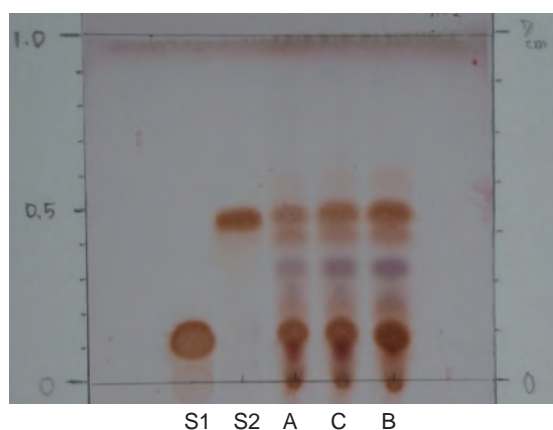
種目（特定研究）

エタノールエキスについて、以下の通り、品質評価に関する確認試験、定量法等の試験法の検討を行った。

- 1) 各国公定書（日本薬局方、中国薬局方、香港生薬標準など）での生薬ニクジュヨウの規格を参考として、活性成分である verbascoside 及び echinacoside を指標成分としたニクジュヨウエキスの確認試験及び定量法の検討を行う。特に 30%エタノールエキスであることから、指標成分の抽出効率等を考慮した試験法とする。
- 2) 確認試験：ニクジュヨウ 30%エタノールエキスを用いた確認試験として、TLC での検討を行う。複数のロットを用いて、展開条件、発色試薬等の検討を行う。
- 3) 定量法：HPLC を用いた試験法を検討する。複数ロットを用いて試料調製法及び分析条件等を検討する。
- 4) 含量規格値の設定：確立した試験法により複数ロットでの定量分析を行い、定量指標成分の含量規格値を設定する。
- 5) その他の品質評価項目として、乾燥減量や灰分のデータも複数ロットを用いて同時に取得する。
- 6) 上記検討結果を反映させたニクジュヨウ 30%エタノールエキスの品質評価法案を作成する。

【確認試験】

ニクジュヨウ 30%エタノールエキスについて、TLC を用いた確認試験法を検討した。複数ロットでの TLC の結果を図 1 に示す。試料 0.2 g を用いて調製を行い、確認指標成分としては、日局生薬ニクジュヨウと同じくベルバスコシドを選択した。エキナコシドは参考までにスポットした。エキス 3 ロットについて 3 回試験した結果、いずれも標準溶液から得たスポット（ベルバスコシド）と色調及び Rf 値が等しかった。



- 標準溶液:スポット量 10 μ L
- S1:エキナコシド標準溶液(1mg/mL)
- S2:ベルバスコシド標準溶液(1mg/mL)→確認成分
- ニクジュヨウ 30%エタノールエキス(0.2 g):スポット量 5 μ L
- A:Lot. A
- B:Lot. B
- C:Lot. C

(図 1) ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの TLC 結果

以上の結果から、ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの確認試験（案）は、以下の通りとした。

<確認試験（案）>

試料に水 5 mL 及び 1-ブタノール 5 mL を加え、15 分間振り混ぜた後、遠心分離し、1-ブタノール層を試料溶液とする。

別に薄層クロマトグラフィー用ベルバスコシド 1 mg をメタノール 1 mL に溶かし、標準溶液とする。

これらの液につき、薄層クロマトグラフィー（2.03）により試験を行う。試料溶液 20 μ L 及び標準溶液 10 μ L を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/ギ酸/水混液（8:1:1）を展開溶媒として約 7 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに噴霧用チモール・硫酸・メタノール試液を均等に噴霧し、105 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱するとき、試料溶液から得た数個のスポットのうち 1 個のスポットは、標準溶液から得たスポットと色調及び Rf 値が等しい。

【定量法】

種目 (特定研究)

ニクジュヨウ 30%エタノールエキスについて、HPLC を用いた定量法を検討した。定量指標成分としてエキナコシドとベルバスコシドを選択し、両成分についての定量法を検討した。現時点での定量法の試験条件は、以下の通りである。当初、エキナコシドとベルバスコシドを別々に分析する定量法を検討していたが、最終的に、エキナコシド及びベルバスコシドを同時定量する方法とした。

項目	エキナコシド及びベルバスコシド定量法
試料溶液調整方法	本品 0.2g → 25mL 10%メタノール抽出 上澄み 2mL → 20mL メスアップ (1回抽出)
標準溶液調整方法	エキナコシド及びベルバスコシド エキナコシド 10mg 及びベルバスコシド 5mg → 100mL (溶媒:0.02mol/L リン酸塩緩衝液 (pH 3.5):メタノール混液 (9:1))
試験条件	
検出器	紫外吸光光度計 (330nm)
カラム	ODS, 4.6×150mm, 5µm
カラム温度	60°C付近の一定温度
移動相	水/アセト/ギ酸混液 (1810:190:1)
注入量	10 µL
流量	エキナコシドの保持時間: 約 15 分 (参考:ベルバスコシドの保持時間: 約 37 分)
システム適合性	理論段数, シンメトリ係数:未定 6 回の RSD:1.5% 以下

【含量規格値の設定】

事前検討として、当初の2成分個別分析での定量法(案)を用いて、生薬ニクジュヨウ及び30%エタノールエキスの成分含量を測定した (data not shown)。その結果、生薬ニクジュヨウについて複数ロットで測定した成分含量は、エキナコシド、ベルバスコシドともにロット間のばらつきが大きかった (data not shown)。そのため、30%エタノールエキスについてもロット間のばらつきがある可能性が示唆された。従って、含量規格値については、今後、上記定量法(案)を最終的に確立した後、ニクジュヨウ 30%エタノールエキスを定量し設定する予定である。

【乾燥減量】

乾燥減量については、以下3点を検討した。

1. 乾燥時間の設定: 処理時間 5 時間→6 時間で乾燥減量値の差が 0.0% となったため、乾燥時間は 6 時間とした。
2. 併行精度 (試料量の確認含む): 試料秤取量を 1.6g, 2.0g, 2.4g とし、各 n=3 で分析し、計 9 検体の乾燥減量値の相対標準偏差を確認した。最終的に、試験条件: 試料秤取量 2g, 温度 105°C, 6 時間と設定した。
3. 複数ロットデータ: <乾燥減量> 平均=2.94% (n=5), 平均+3SD=6.33%。

以上の結果から、乾燥減量の規格案は以下の通りである。

<乾燥減量 (案) >

乾燥減量 (5.01) (6.0~)8.0%以下(1 g, 105°C, 6 時間)。

【灰分】

灰分については、以下2点を検討した。

種目 (特定研究)

1. 併行精度 (試料量の確認含む) : 試料秤取量を 1.6g, 2.0g, 2.4g とし, 各 n=3 で分析し, 計 9 検体の灰分値の相対標準偏差を確認した. 最終的に, 試験条件: 試料秤取量 2g と設定した.
2. 複数ロットデータ : <灰分> 平均=8.96% (n=5), 平均+3SD=14.8%.

以上の結果から, 灰分の規格案は以下の通りである.

<灰分 (案) >

灰分 (5.01) 15.0%以下 (2 g).

■結論

本研究では, 基礎研究でエビデンスが得られ, また特定臨床研究が進行中のニクジュヨウエキスに関して, その開発研究が将来的に, 治験, 承認申請へとプロセスを進めようとした時に対応できるよう, ニクジュヨウ 30%エタノールエキスの品質評価法の検討を行った.

検討の結果から, 品質評価法として, 確認試験, 定量法, 乾燥減量, 灰分の規格案を作成した. 確認試験: 確認指標成分はベルバスコシドを選択し, TLC を用いた. 定量法: 定量指標成分は, ベルバスコシド及びエキナコシドを選択し, HPLC を用いて 2 成分を同時定量する方法 (案) を確立した. 定量法及び含量規格値の設定については, 今後も検討が必要である.

[参考文献]

- [1] Kodani A, Kikuchi T, Tohda C. *J Neurotrauma*. 2019;36(12):1935-1948.
- [2] Kimbara Y, Shimada Y, Kuboyama T, Tohda C. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019;2019:9283171.
- [3] Inada Y, Tohda C, Yang X.. *Nutrients*. 2021;13(1):E264.

研究協力機関: アルプス薬品工業株式会社