

Zymogen 活性化刺激物質の解析方法^{*1}

上 川 浩

株式会社 廣 貫 堂^{*2}

Hiroshi KAMIKAWA

一般的に食物として摂取された蛋白質は、消化性酵素プロテアーゼによりペプチドからアミノ酸に分解されて吸収される。このプロテアーゼは、膵臓中で不活性な酵素前駆体 (Zymogen) として合成される。この前駆体が小腸に分泌される際、小腸に由来する活性化因子の作用を受けて、初めて活性型の酵素に変換される。この活性化の機構の例として、膵臓中の不活性なトリプシノーゲンが小腸中の活性化因子であるエンテロキナーゼの作用によって活性型のトリプシンに変換され、このトリプシンが残りのトリプシノーゲンはもちろんのこと、他の酵素前駆体をも段階的に活性化させるという機構が考えられている¹⁾

そこで著者は、かかる Zymogen 活性化機構におよぼす生薬成分の影響について、特に試験管内解析方法の確立について検討した。更にそれを応用して、胃腸薬として使用されている代表的な生薬および和漢薬方剤について測定した結果、興味ある知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

実験動物として C^{3H}/He 系雄性マウスを用い、これらの膵臓を酵素前駆体、小腸を活性化因子としてそれぞれ使用した。実験に用いる生薬材料は、水で2回加熱抽出し、一定濃度に濃縮して使用した。また基質として1%カゼイン溶液 (1gを $1/15$ Mリン酸ナトリウム溶液に加熱溶解した後水で100mlとする) を用いた。

まず膵臓および小腸を摘出し、洗浄後それぞれ水を加えてホモジナイザーにかけ、15,000回転で30分間遠心した後、上清をとり20% (W/V) 摩砕液を調製する。両者を適当な濃度に希釈、混合した後、ここに生薬エキスを20mg (原生薬換算量) 加える。これを37°で一定時間インキュベーションしてプロテアーゼを活性化させる。ここに1%カゼイン溶液1mlを加え、さらに37°で30分間インキュベーションして蛋白質を分解させる。この後0.8Mトリクロル酢酸を1ml加えて未分解の蛋白を沈殿させる。これを室温で20分間放置後、3,000回転で30分間遠心し、上清を1mlとる。ここに0.4M炭酸ナトリウム5mlと1Nフェノール試薬1mlを加え、37°で20分間インキュベーションして呈色させる。この青色の660nmにおける吸光度を測定し、分解された蛋白質の量とする²⁾この際、酵素溶液、基質および生薬中のフェノール試薬呈色物による吸光度を差し引いて補正する。

実験の最適な測定条件を決めるために、まず活性化因子の濃度について検討した (Fig.1)。その結果、吸光度の変化の大きい部分が適していることから、これより0.4%以下の濃度を以後の実験で用いることにした。次に活性化の時間を変えて測定した (Fig.2)。これより吸光度が測定しやすい値となる、60分を活性化の時間と定めた。

*1 第4回家庭薬開発研究会シンポジウム発表, (富山, 1984年12月6日)

*2 〒930 富山市梅沢町2-9-1 TEL 0764 (24) 2271

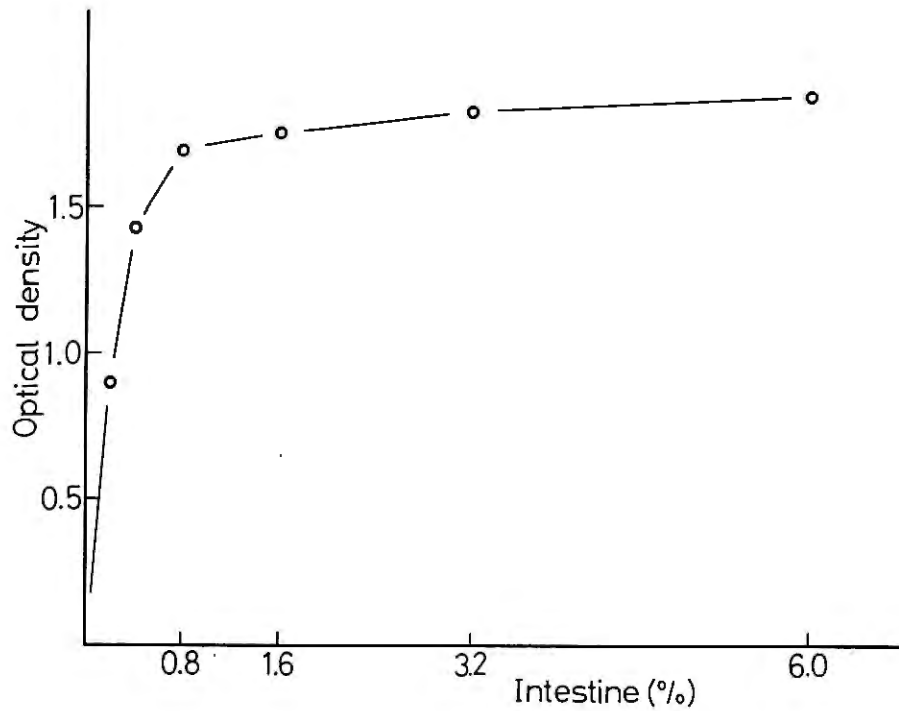


Fig.1. 活性化因子の濃度による吸光度の変化

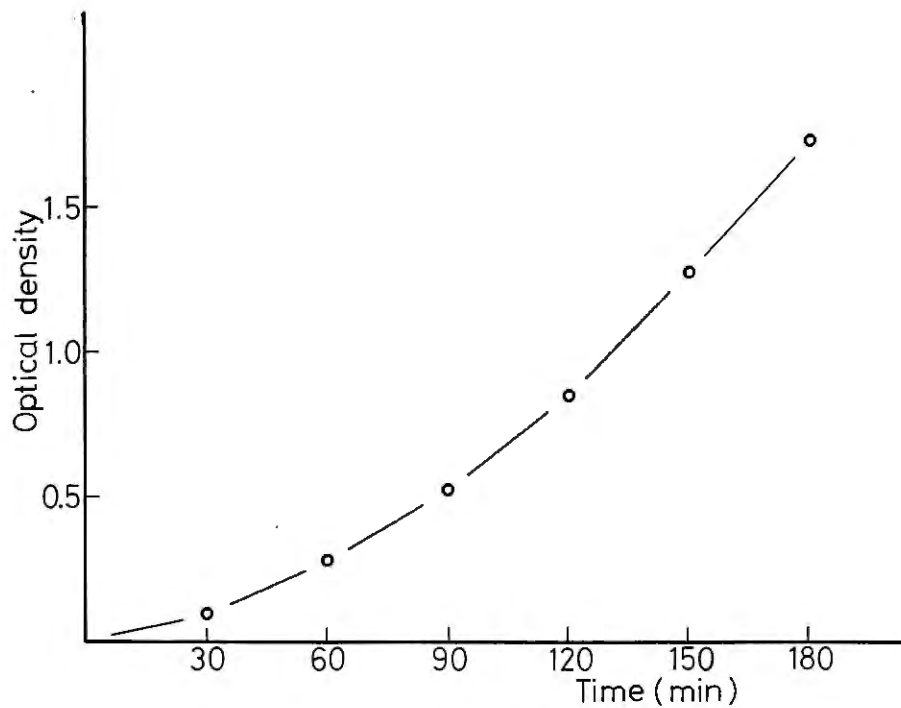


Fig.2. 活性化時間による吸光度の変化

実験結果

まず胃腸薬として用いられる代表的生薬として、ベルベリン系アルカロイドを主成分とするオウレンとオウバクについて、プロテアーゼの活性化機構におよぼす影響について検討した。このとき標準としてベルベリン硫酸塩を用いた (Fig.3)。オウレンおよび標準ベルベリンでは、コントロールと比較して活性化の増強効果がみられたが、オウバクについては逆にこの活性が低下を示した。

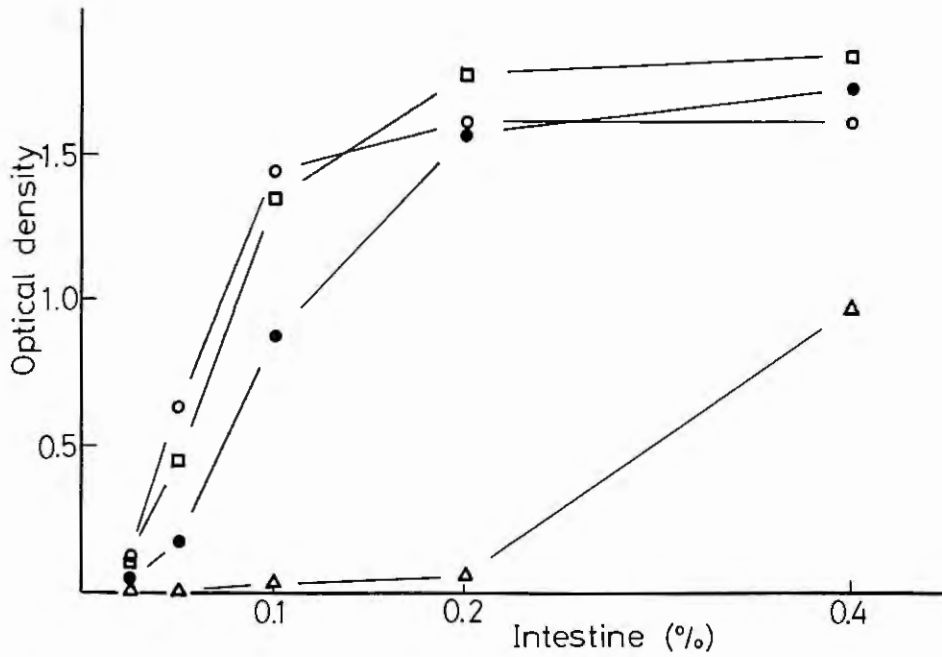


Fig.3. オウレン、オウバクおよび硫酸ベルベリンのプロテアーゼ活性化機構に対する効果：(—●—)コントロール、(—○—)硫酸ベルベリン、(—□—)オウレン、(—△—)オウバク

このことは、活性化因子の量を増すにしたがい酵素活性が再び現れることから、オウバク中の成分の何かが活性化因子に直接結合し、その活性化作用を阻害していると推察される。

ついで苦味健胃薬としてのセンブリとゲンチアナについて検討した (Fig.4)。センブリ、ゲンチアナ共に明らかに活性化の増強効果を示している。苦味健胃生薬については、それに含まれる苦味物質が胃腸への働きに大きな役割を果していると考えられる。その作用機序について、苦味の脳を

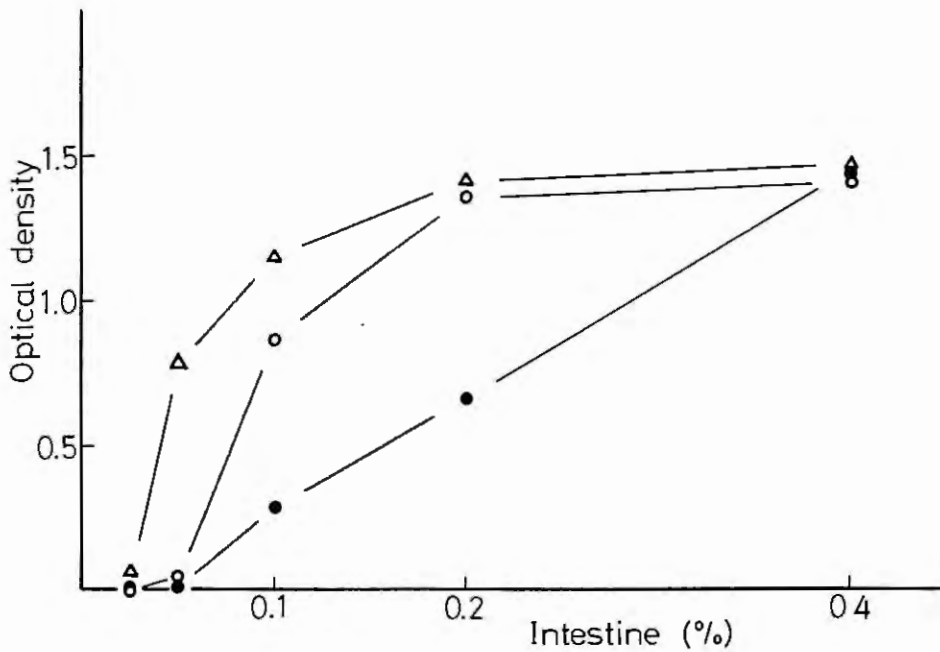


Fig.4. センブリおよびゲンチアナのプロテアーゼ活性化機構に対する効果：(—●—)コントロール、(—○—)センブリ、(—△—)ゲンチアナ

介しての反射機構による胃腸への働きが有力なものとされている。上記の実験結果によれば、センブリ、ゲンチアナの各成分がベルベリンと同様にプロテアーゼ活性に関与していることがわかった。すなわちセンブリ、ゲンチアナの胃腸への効果について、反射作用は別の問題として、少なくともベルベリン以外の成分が酵素系に関与し、作用していることが明らかである。

更にその他繁用される生薬について検討した (Fig.5)。ゲンノショウコではこの活性化機構に対して特に影響がみられなかった。また、アカメガシワについてオウバクと同様な抑制作用がみられ

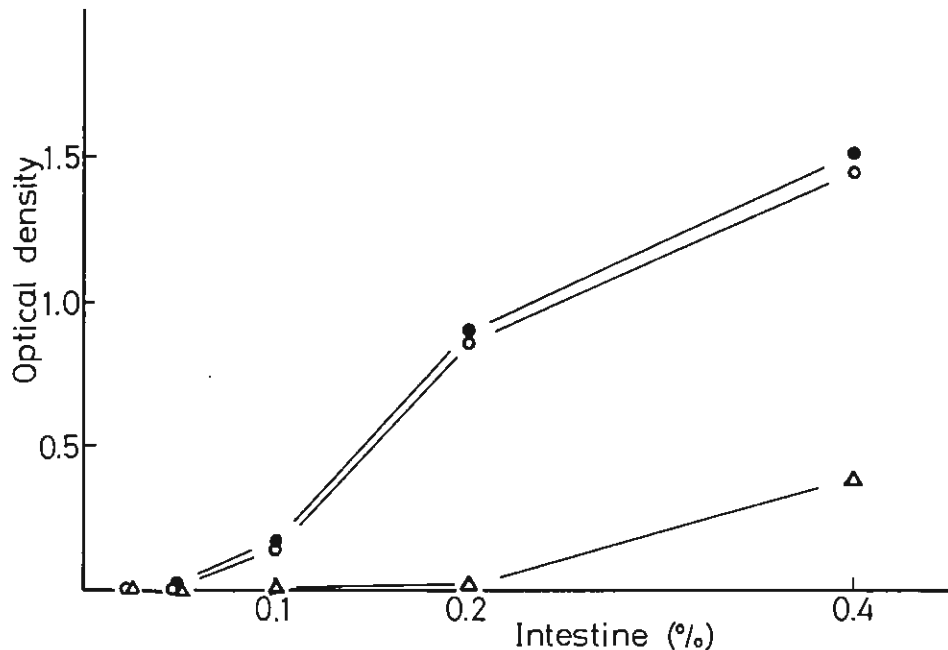


Fig.5. ゲンノショウコおよびアカメガシワのプロテアーゼ活性化機構に対する効果：(—●—)コントロール、(—○—)ゲンノショウコ、(—△—)アカメガシワ

た。

ついで、種々の生薬を配合した和漢胃腸薬のモデル製剤A、Bを選んだ

(Table)。Aにはオウバクがオウレンの約5倍、Bには約7倍と活性阻害効果の顕著なオウバクが相当量含まれている。しかもAにいたっては抑制の強いアカメガシワが更に多量に含まれている。しかし、これらの活性化に対する効果を調べたところ (Fig.6)、A、B共にコントロールに比較して活性を

増強することがわかった。このように、個々の生薬では抑制効果の強いものでも、種々の生薬の組合せにより活性が強くなることは、和漢薬方剤の妙味といえる。

ここで和漢胃腸薬以外のものとして、小柴胡湯についての活性化に対する効果を検討した結果 (Fig.6)、製剤A、Bよりも更に強い増強効果のあることがわかった。

そこで小柴胡湯を構成する生薬を代表するものとして、ニンジンとサイコについて検討した (Fig.7)。ニンジンではほとんど効果がみられないが、サイコはかなり強い活性化増強効果が認め

Table 1. 和漢胃腸薬のモデル製剤

製剤 A (1日量)		製剤 B (1日量)	
オウレン	70mg	ゲンノショウコ	530mg
オウバク	380mg	オウレン	100mg
センブリ	70mg	オウバク	720mg
ゲンチアナ	200mg	ヨウバイヒ	200mg
ダイオウ	200mg	ロートエキス	50mg
ウコン	350mg	動物胆	50mg
アロエ	150mg		
アカメガシワ	2500mg		
動物胆	50mg		

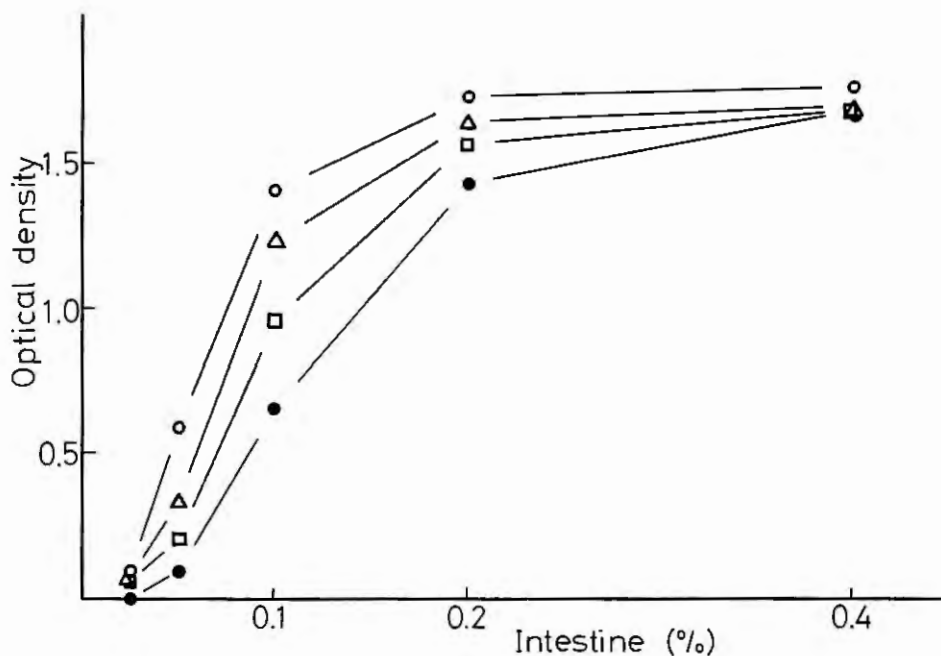


Fig.6. モデル製剤A, Bおよび小柴胡湯のプロテアーゼ活性化機構に対する効果：(—●—)コントロール、(—□—)製剤A、(—△—)製剤B、(—○—)小柴胡湯

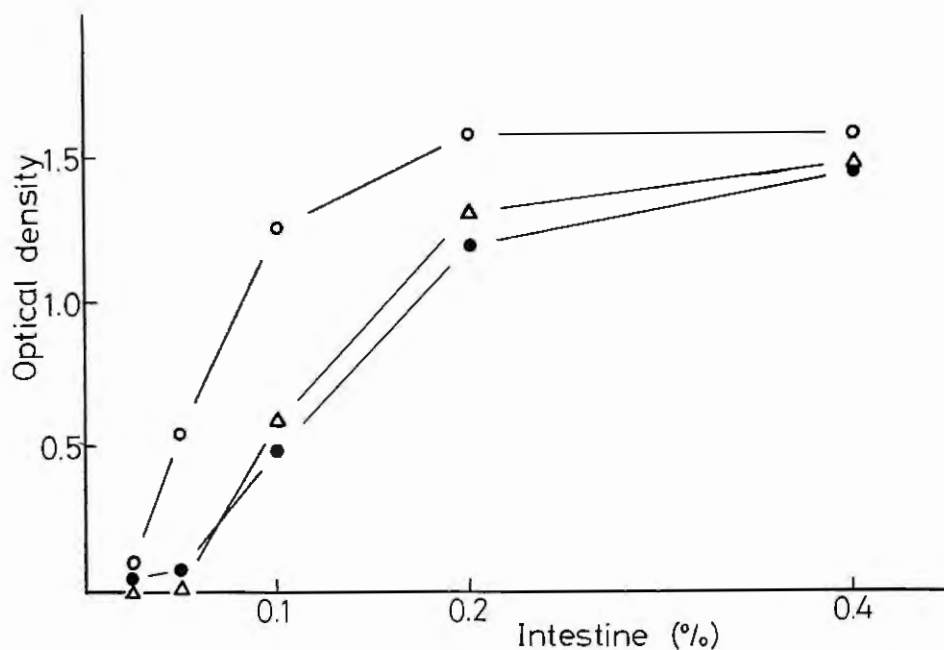


Fig.7. ニンジンおよびサイコのプロテアーゼ活性化機構に対する効果：(—●—)コントロール、(—△—)ニンジン、(—○—)サイコ

られた。

結論および考察

ベルベリン系アルカロイドを含有するオウレンとオウバクが、プロテアーゼの活性化機構に対しては、一方は増強的に、もう一方は抑制的に働くという相反する効果があらわれたということは、非常に興味深い現象といえる。著者は、オウバクの成分を分画して、抑制作用と化学的成分との関

係, またこの抑制作用が活性化因子に直接作用しているものか, 更にプロテアーゼ酵素そのものに対するものなのか, 今後検討して明らかにしたい。

今回確立した実験系について, さらに種々の検討を重ね, 和漢胃腸薬の効果判定の一助にしたいと考えている。また今後の新しい方剤の開発になるものと期待している。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 御指導いただきました富山医科薬科大学 和漢薬研究所 病態生化学部門 荻田善一教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Kunitz, M. : Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase.
J. Gen. Physiol., 22, 429-446 (1939)
- 2) Lowry, O. H., N. J. Rosenbraugh, A. L. Farr and R. J. Randall : Protein measurement with folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)

ベラドンナエキスの皮膚適用による鎮痛効果^{*1}

元 山 貢・杉 林 毅 宏
リードケミカル株式会社 研究開発部^{*2}
Mitsugu MOTOYAMA
Takehiro SUGIBAYASHI

ベラドンナエキスは、従来軟膏や坐剤として局所の鎮痛に用いられてきたロートエキスと同様に、アトロピン、スコポラミン等のトロパンアルカロイドを含有している。

今回筆者らは、従来のサリチル酸メチルを主成分とするパップ剤中に配合したベラドンナエキスの鎮痛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) 使用動物

生後6～7週齢のWistar系雄性ラットを使用した。ラットは温度22±1℃、湿度50～60%の飼育室で飼育し、飼料としてラット用固形飼料（船橋農場製、MM-3）を用い、飼料、水ともに自由に摂取させた。なお、ラットは1週間予備飼育した後実験に供した。

2) 使用薬物

dry yeast（オリエンタル酵母）

3) 被験貼付剤

① 基剤

パップ剤用含水性基剤。以下の被験貼付剤の基剤として用いた。

② 0.08, 0.2, 0.5, 1.25% B-EX

基剤中に当該濃度のベラドンナエキスを含有させた。

③ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0% S-P

基剤中に当該濃度のサリチル酸メチルを含有させた。

④ 0% AQ-Z

基剤中にサリチル酸メチル1.5%、*dl*-カンフル1.0%、*l*-メントール0.8%及びサリチル酸ジフェンヒドラミン0.1%を含有させた。

⑤ 0.2% AQ-Z

0% AQ-Zにベラドンナエキス0.2%を配合した。

上記の被験貼付剤は、いずれも実験に先立ち3.5×4cm²に裁断して使用した。

2. 実験方法

1) ベラドンナエキスの鎮痛作用

Randall-Selitto法を一部変更して実施した。

ラット（体重150～170g）を1群9匹使用し、実験前日左側後肢足蹠の被毛を電気剃刀で

*1 第4回家庭薬開発研究会シンポジウム発表（富山，1984年12月6日）

*2 〒930 富山市日俣77-3 TEL 0764 (25) 1973

剪毛した。実験当日剪毛足蹠の walking pad の一つを通して 10% yeast 水溶液 0.1 ml を足蹠皮下に注入した。起炎 2 時間後同部位に被験貼付剤として基剤並びに 0.08, 0.2, 0.5, 1.25% B-E X を貼付した。被験貼付剤適用 1, 2, 3 及び 4 時間後に各炎症足の圧痛閾値を Analgesy Meter (Ugo-Basile 社) で測定し、各群毎の全測定値の和を当該群の鎮痛閾値として次式により鎮痛係数を求めた。

なお、被験貼付剤は測定時取り除き、測定後直ちに新たな同種貼付剤を貼付した。実験中ラットは首に保護紙を適用し絶食絶水とした。実験のデータについての統計処理はすべて Student の t 検定で行った。

$$\text{鎮痛係数} = \frac{\text{各貼付剤群の鎮痛閾値}}{\text{control 群の鎮痛閾値}}$$

2) S-P の鎮痛作用

ラット (体重 160 ~ 180 g) を 1 群 8 匹使用し、実験 1) の方法に準じて、基剤並びに 0.25, 0.5, 1.0, 2.0% S-P の鎮痛効果を比較した。

3) A Q-Z の鎮痛作用

ラット (体重 160 ~ 180 g) を 1 群 10 匹使用し、実験 1) の方法に準じて、基剤並びに 0.2% B-E X, 0% A Q-Z, 0.2% A Q-Z の鎮痛効果を比較した。

3. 実験結果

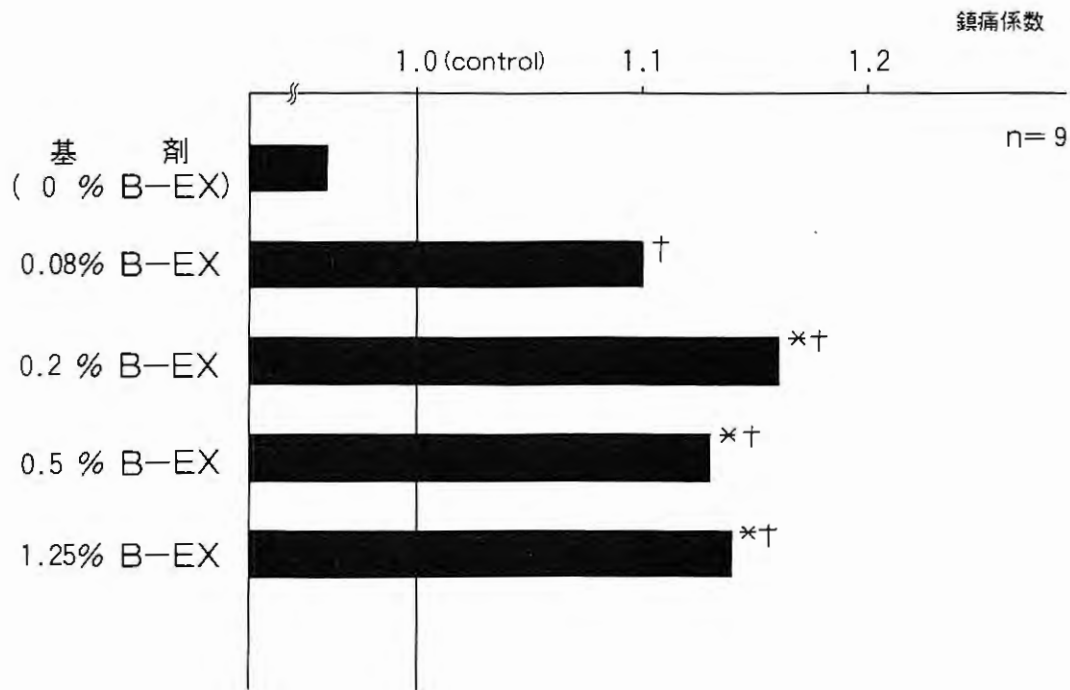
1) ベラドンナエキスの鎮痛作用

基剤中にベラドンナエキスのみを 0, 0.08, 0.2, 0.5 及び 1.25% 含有させた 0, 0.08, 0.2, 0.5 及び 1.25% B-E X の鎮痛効果を Table 1 及び Fig. 1 に示した。これによればベラドンナエキス 0.2% 以上で control 並びに基剤に対して有意な鎮痛効果が認められ、同時にその効果はほぼ plateau に達した。

Table 2. ベラドンナエキスの鎮痛効果

群	圧痛閾値 (× 10 g)		鎮痛係数
	Mean	± S. E.	
Control (無処置)	24.3	± 1.0	—
基剤 (0% B-E X)	23.3	± 1.0	0.96
0.08% B-E X	26.7	± 1.0 +	1.10
0.2% B-E X	28.1	± 1.2 *+	1.16
0.5% B-E X	27.5	± 1.1 *+	1.13
1.25% B-E X	27.8	± 1.0 *+	1.14

n = 9
* P < 0.05 (control に対して)
+ P < 0.05 (基剤に対して)



* $P < 0.05$ (controlに対して) † $P < 0.05$ (基剤に対して)

Fig. 1. ベラドンナエキスの鎮痛効果

2) S-Pの鎮痛作用

基剤中にサリチル酸メチルのみを0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0%含有させた0, 0.25, 0.5, 1.0及び2.0% S-Pの鎮痛効果を Table 2 及び Fig. 2 に示した。これによればサリチル酸メチル0.5%以上でcontrol並びに基剤に対し、有意でかつ用量依存的な鎮痛効果が認められた。

Table 2. S-Pの鎮痛効果

群	圧痛閾値 ($\times 10^9$)		鎮痛係数
	Mean	\pm S. E.	
control (無処置)	20.1	\pm 1.2	-
基剤 (0% S-P)	19.7	\pm 1.3	0.98
0.25% S-P	21.8	\pm 0.9	1.08
0.5% S-P	23.8	\pm 0.9 * †	1.18
1.0% S-P	25.2	\pm 0.5 ** ††	1.25
2.0% S-P	26.3	\pm 1.1 ** ††	1.31

n = 8

* $P < 0.05$ (controlに対して) + $P < 0.05$ (基剤に対して)

** $P < 0.01$ (controlに対して) ++ $P < 0.01$ (基剤に対して)

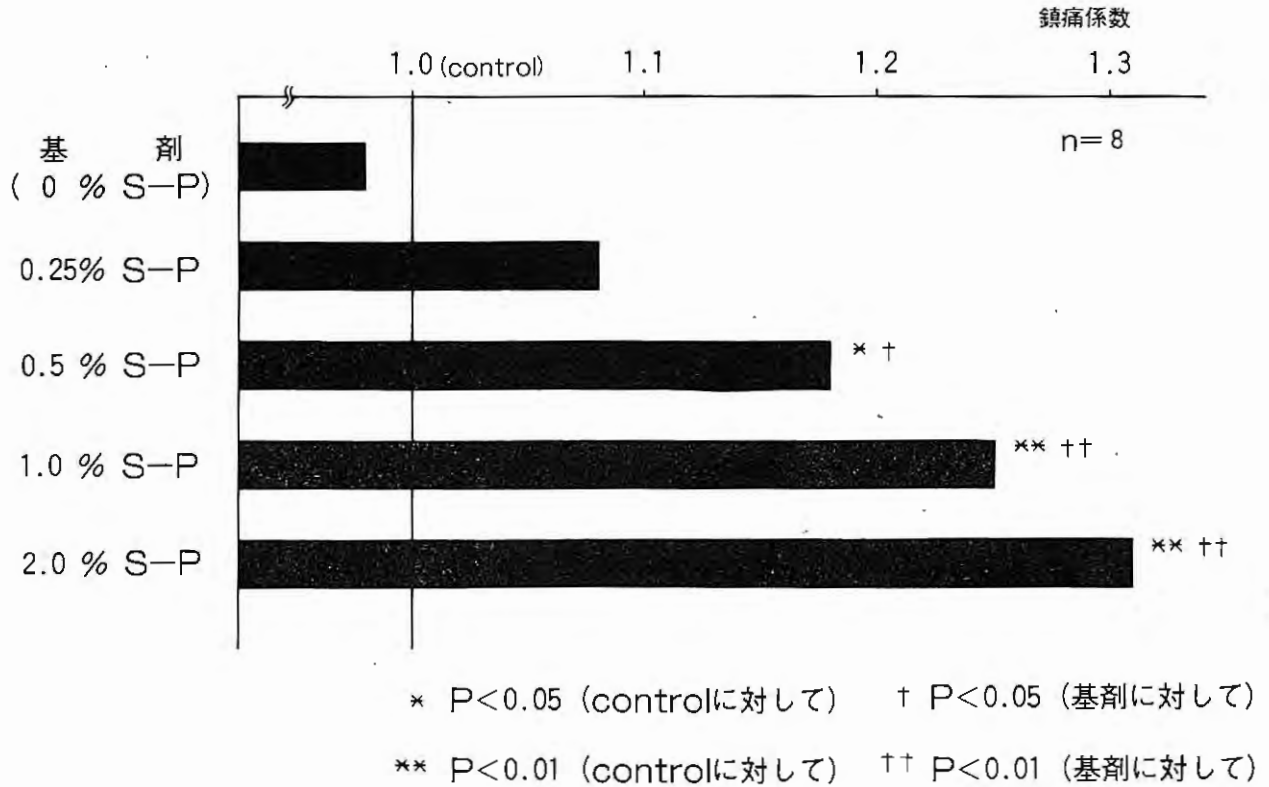


Fig.2. S-P の鎮痛効果

3) A Q-Z の鎮痛作用

被験貼付剤として基剤並びに基剤中にベラドンナエキスのみを0.2%含む0.2% B-E-X, 基剤中に有効成分としてサリチル酸メチル1.5%, dl-カンフル1.0%, l-メントール0.8%, サリチル酸ジフェンヒドラミン0.1%を含有する0% A Q-Z, 更にこれにベラドンナエキスを0.2%配合した0.2% A Q-Zを用い, これらの鎮痛効果についてはTable 3及びFig. 3に示した。これによれば0.2% B-E-X, 0% A Q-Z及び0.2% A Q-Zはいずれもcontrol及び基剤に対して有意な鎮痛効果が得られた。また0.2% A Q-Zは0% A Q-Zに比べて鎮痛効果が増大した。

Table 3. A Q-Z の鎮痛効果

群	圧痛閾値 ($\times 10^9$)		鎮痛係数
	Mean	± S.E.	
control (無処置)	21.8	± 1.2	-
基剤	22.0	± 1.6	1.01
0.2% B-E-X	27.8	± 1.4 **	1.27
0% A Q-Z	27.7	± 1.1 **	1.27
0.2% A Q-Z	29.3	± 0.7 ***	1.34

n = 10

** P<0.01 (controlに対して) ++ P<0.01 (基剤に対して)
 *** P<0.001 (controlに対して) +++ P<0.001 (基剤に対して)

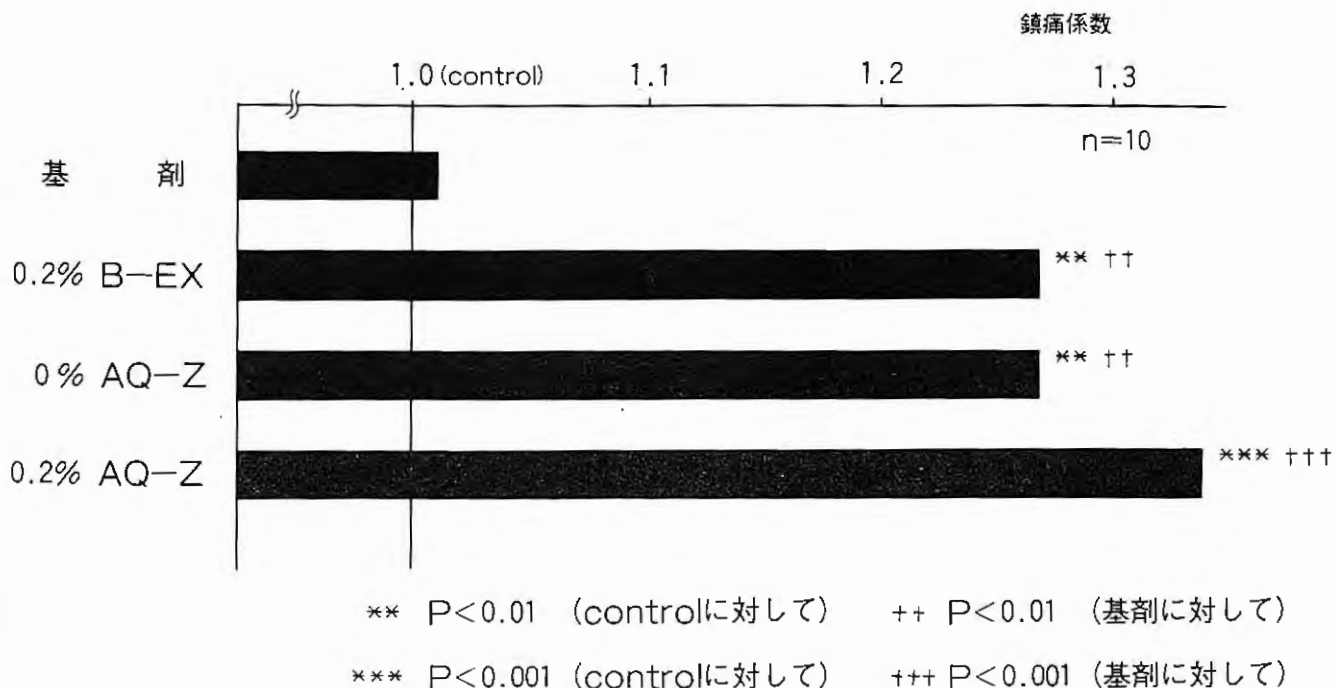


Fig.3. AQ-Zの鎮痛効果

考 察

今回の実験の結果、ベラドンナエキスのみをパップ剤基剤に含有させた場合、ベラドンナエキスの濃度0.2%以上で有意な鎮痛効果が認められた。一方、従来のパップ剤では主成分のサリチル酸メチルの濃度0.5%以上で有意な鎮痛効果が認められ、これにベラドンナエクス0.2%を配合をせることによって効果は増大した。

Lim¹⁾らは化学的発痛物質によって引き起こされる痛みに対する鎮痛剤の作用をヒト及び動物を用いて検討した結果、麻薬性鎮痛剤の作用が中枢性であるのに対して、解熱鎮痛薬アスピリンの作用は末梢性であると説明した。また、Ferreira²⁾は実験によりプロスタグランジンがブラジキニン等の発痛物質による痛みに対して痛覚過敏を起こすことを明らかにした。アスピリン等の酸性非ステロイド性抗炎症薬は体内でシクロオキシゲナーゼの活性を抑制することから、プロスタグランジンの生合成を阻害するとされており、パップ剤中のサリチル酸メチルも局所適用により皮膚吸収³⁾されて同様の効果を発揮するものと考えられる。

一方、InnesとNickersonはベラドンナエクス中のアトロピンと局所麻酔薬のコカインの構造式が類似しているところから、アトロピンは副交感神経遮断作用と局所麻酔作用を有すると説明した。

したがって、サリチル酸メチルとベラドンナエクスはそれぞれ異なった作用機序により鎮痛効果を発揮するものであり、これらを合わせてパップ剤に配合することはパップ剤の効果を高める上で意義あることと判断した。

文 献

- (1) Lim, R. K. S. : Pain. Ann. Rev. Physiol. 32, (1970)
- (2) Ferreira, S. H. : Nature, New Biology. 240, (1972)
- (3) 北川晴雄, 斉藤晴夫, 酒井健, 江角凱夫, 三沢幸一, 関根定夫, 石井典子, 森政雄, 田添龍一 : 応用薬理. 18, (1979)

〔原著〕

γ -オリザノールの外用薬への応用^{*1}

押田 勝, 鹿熊 武, 森井 勇
藤縄知昭, 富樫 茂, 中橋 孝
吉田裕一

株式会社 池田模範堂^{*2}
開発部, 研究所

Masaru OSHIDA	Takeshi KAKUMA
Isamu MORII	Tomoaki FUJINAWA
Shigeru TOGASHI	Takashi NAKAHASHI
Yuichi YOSHIDA	

γ -オリザノールは米糠油中から分離抽出されたもので、医療用の内服薬として自律神経失調症等に使用されている。

一方、外用による効果としては皮脂分泌促進作用、皮膚温上昇作用、局所血流量増大作用などが認められている。

今回、 γ -オリザノールの皮脂分泌促進作用に注目しその至適濃度を選定し、動物及びヒトでの毒性及び安全性試験の後、臨床試験にて外用薬としての有用性を検討した。

実験の部

1. 皮脂分泌試験

1) 試験試料

γ -オリザノールを0.1%, 1%及び2%配合する親水性軟膏及びその軟膏基剤の4試料を外観上見分けのつかぬ同じチューブに入れ試験に供した。

2) 試験対象

基剤と0.1%, 基剤と1%, 0.1%と1%及び1%と2%の4つの組み合わせの群をつくり、それぞれ健常者の左右前腕屈側で比較した。各組み合わせは10例とし、計40例とした。

3) 試験方法

試験対象者の左右前腕屈側(40cm²)の面積より皮脂を採取し、その後左右前腕屈側にあらかじめat randomに割りつけた試験試料を毎日朝晩2回外用せしめた。1回の塗布量は約200mgとした。

1カ月間外用を続け、外用終了の2日後に両被検部の皮脂をcup methodにより採取した。小林ら¹⁾の方法に準じてクロム酸酸化法により測定し比較した。

2. 動物による毒性及び安全性試験

1) 急性毒性試験

体重24g前後の5週齢のDDYS系マウス(静動協産育)、体重140g前後の6週齢のWistar JCL系ラット(日本クレア, SPFラット)及び体重280g前後の5週齢のHartley系モルモット(静動協産育)を用い、いずれも1群雌雄各10匹とした。 γ -オリザノール原末の場合はマウス、ラットに経

*1 第4回家庭薬開発研究会シンポジウム発表, (富山, 1984年12月6日)

*2 〒930-03 富山県中新川郡上市町横法音寺24 TEL 0764(72)1133

口投与、皮下注射及び筋肉注射した。1% γ -オリザノール軟膏の場合はラット、モルモットのあらかじめ除毛した背部皮膚のほぼ全面 ($7 \times 10 \text{cm}$) に 2g/kg の量で60秒間ガラス製のヘラにて塗擦した。投与後6時間まで症状観察を行い、以後1日1回、7日間ほぼ一定時刻に死亡発現の有無症状変化ならびに生存例の体重を記録した。

なお、死亡例及び7日後の生存例は剖検し、内部臓器組織の肉眼的観察を行った。LD₅₀ 及びその95%信頼限界は1週間後の死亡率からLitchfield and Wilcoxon法²⁾により算出した。

2) 亜急性毒性試験

5週齢のWistar-JCL系ラット(日本クレア産育, SPFラット)を搬入後1週間予備飼育して環境に馴らしたのち使用した。

投与開始時の体重は健常皮膚群では雄で約150g, 雌で約135gであり、損傷皮膚群, すなわち、電気バリカンにて除毛後schickの安全カミソリにて剃毛し、鉄製ヤスリにて擦傷を作製した群では雌のみで約145gであった。

また、いずれの場合も10匹を1群とした。飼育室は温度22~23℃, 湿度55~65%に保ち、5連ゲージに1匹ずつ入れて飼育し、飼料は日本クレア固型試料CE-2を、水は地下水を自由に摂取せしめた。

試験試料は γ -オリザノールを0.1%, 1%, 5%を配合する親水性軟膏及びその基剤で、それらはあらかじめ除毛あるいは除毛・損傷処置をした背部皮膚の $7 \times 10 \text{cm}$ の範囲に、 2g/kg の量で毎日30秒間ヘラにて塗擦した。投与期間は30日間とした。試験期間を通じて一般症状及び塗布局所の皮膚症状観察を行うとともに、体重、摂餌量及び摂水量等を観察した。更に投与期間終了翌日に全例採血後放血致死せしめ、内部臓器の剖検を行い、ついで臓器重量及び病理組織学的な検索を行った。

また、各種血液学的検査及び血清生化学的検査についても実施した。

3) 皮膚刺激性試験

体重140g前後の6週齢のWistar-JCL系ラット(日本クレア産育)、体重280g前後の5週齢のHartley系モルモット(静岡協産育)及び体重2.0kg前後の日本白色種ウサギ(静岡協産育)を用いた。ラットとモルモットは1群雌雄各10匹、ウサギは雌雄各6匹とした。

1% γ -オリザノール軟膏はあらかじめ除毛あるいは除毛・損傷処置した背部皮膚に一定量を一定時間ヘラにて単純塗擦した。

塗布後1, 3及び5時間目、更に1日目から7日目まで連日観察した。判定はDraize³⁾の判定基準にて評価した。

4) 眼粘膜刺激性試験

体重2.0kg前後の正常眼を有する日本白色種ウサギ(静岡協産育)を用い、1群各6匹とした。

右眼の下瞼の囊中に1% γ -オリザノール軟膏0.1gを点眼後閉眼させ、約10秒間軽くマッサージを行った。左眼を対照とし、点眼1時間後及び1, 2, 3, 5, 7日後肉眼及び拡大鏡により観察を行った。判定はDraizeら⁴⁾の判定基準にて評価した。

5) 抗原性試験

(1) 感作濃度の選定

体重280g前後のHartley系モルモット(静岡協産育)10匹を1群とし、あらかじめ剪毛した背部に生理食塩液で0.1~10%に調整した1% γ -オリザノール軟膏または同基剤の懸濁液を 0.05ml/site 皮内注射し、24時間後に皮膚を剥離し、注射部位を裏面より透見して紅斑の程度をDraize⁵⁾の判定基準にて評価し弱度起炎濃度及び中等度起炎濃度を選んだ。

また、positive controlとして4% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) 軟膏を用いた。

(2) 感作試験

モルモットを雌雄それぞれ30匹1群とし、試験試料の感作濃度は弱度起炎濃度及び中等度起炎濃度を用いた。1日1回6日間連続皮下注射して感作を試みた。初回から3回目までは、Freund's complete adjuvantとの等量混液0.1 mlを毎回部位を変えて皮下注射した。

最終感作から4週後に感作に用いた試料の $1/100 \sim 1/5$ の濃度のものを誘発抗原とし、それぞれ0.05 ml/siteを除毛した背部皮内に注射した。24時間、48時間及び72時間後に誘発部位の紅斑の程度と直径を測定した。

6) 光毒性試験

体重2.5 kg前後の雄性白色ウサギ(静動協産育)を用い、背部を電気バリカンで除毛後更に脱毛剤で処理した。紫外線光源としてFL-20SE型ランプ(波長280~320 nm)とFL-20SBLB型ランプ(波長300~400 nm)を用い、脱毛24時間後ウサギの背部5カ所に20cmの距離から1分、2分、3分、4分及び5分間それぞれ照射した。24時間後、軽度の紅斑が認められる照射時間とMED(minimum erythema dose)とした。試験試料0.3 gを背部6カ所に塗布し、24時間遮光被覆し固定した。その後このパッチを除去し試験試料塗布部の紅斑の有無を判定した後、それぞれの塗布部位の半分をアルミホイルで覆い、MED測定の場合と同様に照射した。照射24、48及び72時間後に照射部位及び非照射部位の皮膚反応をDraize³⁾の判定基準にて評価し、光毒性の有無を判定した。

なお、positive controlとしては10% anthracene軟膏を用いた。

7) 光アレルギー性試験

体重300 g前後のHartley系モルモット(静動協産育)の雌雄それぞれ15匹を1群とした。

(1) 感作法

紫外線光源としてFL-20SBLB型ランプ(波長300~400 nm)を用いた。モルモットの背部に1日1回10日間感作用試験試料0.1 gを30秒間ヘラで塗擦した。塗布30分後、皮膚面と光源との距離を12 cmとして90分間照射した。光照射は48時間ごとに5回繰り返した。

(2) 誘発法

最終塗擦の14日後に背部右側を除毛し、感作に用いた試料ならびにその $1/2$ 及び $1/10$ 濃度のものを誘発抗原とし、それぞれ0.01 gを30秒間塗擦した。

ついで感作時に紫外線照射を行ったモルモットには60分間照射した。塗擦24、48及び72時間後に皮膚反応の有無と程度をDraize³⁾法にて観察した。

positive controlとしては10% 3, 4', 5-tribromosalicylanilide (TBS)軟膏を用いた。

3. 変異原性試験

1) 直接変異原性試験

Nutrient broth中で培養した*Salmonella typhimurium* TA 98又はTA 100の0.1 mlを共栓付試験管に入れ、0.1 Mリン酸緩衝液及び各種濃度の試験化合物のDMSO溶液を加え、素早く攪拌後37°に20分間インキュベーションした。

ついで上記菌混液に軟寒天2 mlを加え、攪拌したのち寒天培地上に重層し、37°で48時間培養した。試験化合物の変異原性は出現したHis⁺復帰コロニー数を計測し判定した。

2) 代謝的活性化条件下での変異原性試験

上記変異原性試験で用いた菌混液と同種のもを調製し、これにS9 Mix 0.5 mlを加え素早く攪拌したのち20分間インキュベーションした。ついで1)と同様な操作で試験化合物の変異原性を判定した。

なお、本試験は東京薬科大学第二衛生化学(渡部 烈教授)にて実施した。

4. パッチテスト

健常者(35例)及び皮膚疾患患者(37例)を対象として上腕屈側で48時間クローズドパッチテストをした。

被験試料は調製直後のものと、経時変化の影響をみるために苛酷試験（55℃，30日間）したもののについてもパッチテストした。テスト用パッチ絆はトリイ絆を使用した。判定はパッチ絆除去1時間後と24時間後に行った。また光の影響を知る目的で除去1時間後の判定終了後に、BLB型ランプ（波長300～400nm）を用い35cmの距離から10分間光照射を施行した。

判定基準は本邦における基準⁵⁾に従った。すなわち、

無反応	----- (-)	0 点
わずかな紅斑	----- (±)	0.5 点
明らかな紅斑	----- (+)	1 点
紅斑十丘疹又は浮腫	----- (++)	2 点

と評点し刺激指数を下記の式⁶⁾から算出した。

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{除去1時間後又は24時間後における、より反応の強い評点の総和}}{\text{全例数}} \times 100$$

なお、本試験は名古屋大学医学部皮膚科（早川律子講師）にて実施した。

5. 臨床試験

1) Open control test

(1) 試験実施施設

名古屋大学医学部皮膚科他7施設

(2) 被験外用剤

r-オリザノール1%を配合する親水性軟膏

(3) 対象疾患と試験例数

老人性乾皮症，尋常性魚鱗癬，小児乾燥型湿疹，進行性指掌角皮症等を対象とし症例数は1施設当たり10症例を目標とした。

(4) 外用方法

1日3回ずつ（朝，夕，就寝前）単純塗擦した。

(5) 外用期間

いずれの対象症例においても12週間を試験外用期間とした。

(6) 皮膚所見の観察と評価

① 観察日

開始日，治療開始2週後，4週後，6週後，8週後，10週後及び12週後に記録した。治療前と比較した全般改善度についても同様に行った。

② 皮膚所見

症状の程度を高度4，中等度3，軽度2，軽微1，なし0の5段階に分けた。

③ 全般改善度

治療前と比較して，治癒卍，著しく軽快卍，かなり軽快卍，やや軽快+，不変0，増悪×の6段階で評価した。

(7) 副作用

すべて記録し，高度卍，中等度卍，軽微+，なし-の4段階に分けた。

(8) 有用性の判定

試験終了後に皮膚所見，全般改善度，副作用を参考として有用性の判定を行った。

2) Semi double blind test

(1) 試験実施施設

名古屋大学医学部皮膚科他7施設

(2) 被験外用剤

① 親水性の1% γ -オリザノール軟膏 (以後 r と略)

② 同基剤 (以後 b と略)

(3) 被験外用剤の包装と割付け

r と b は同じ外観のチューブに入れ, 各薬剤の割付けと Key code の保管はコントローラー (一橋大学高島己千雄講師) が担当した。

(4) 対象疾患と試験例数

尋常性魚鱗癬, 老人性乾皮症, 小児乾燥型湿疹, 進行性指掌角皮症を対象とし, 左右対称性に同一程度の皮疹を有する症例各 48 例を目標とした。

(5) 外用方法

右用の被験外用剤を右側の病変部位に, 左用の被験外用剤を左側の病変部位に 1 日 3 回ずつ (朝夕, 就寝前) 単純塗擦した。

(6) 外用期間

いずれの対象疾患においても 6 週間を原則とした。

(7) 皮膚所見の観察と評価, 副作用, 有用性の判定

いずれも Open control test の場合と同様にして行った。

(8) 結果の解析

Key open したのち χ^2 検定, Stuart-Maxwell の検定, Wilcoxon の検定などの手法にて行った。

実験結果

1. γ -オリザノール配合軟膏の皮脂分泌促進作用⁶⁾

皮脂分泌量は基剤及び 0.1% γ -オリザノール軟膏ではほとんど増加をみないが, 1% γ -オリザノール軟膏では明らかな増加を認めた ($P < 0.01$)

ただし, 1% γ -オリザノール軟膏と 2% γ -オリザノール軟膏の間には有意の差は認められなかった。

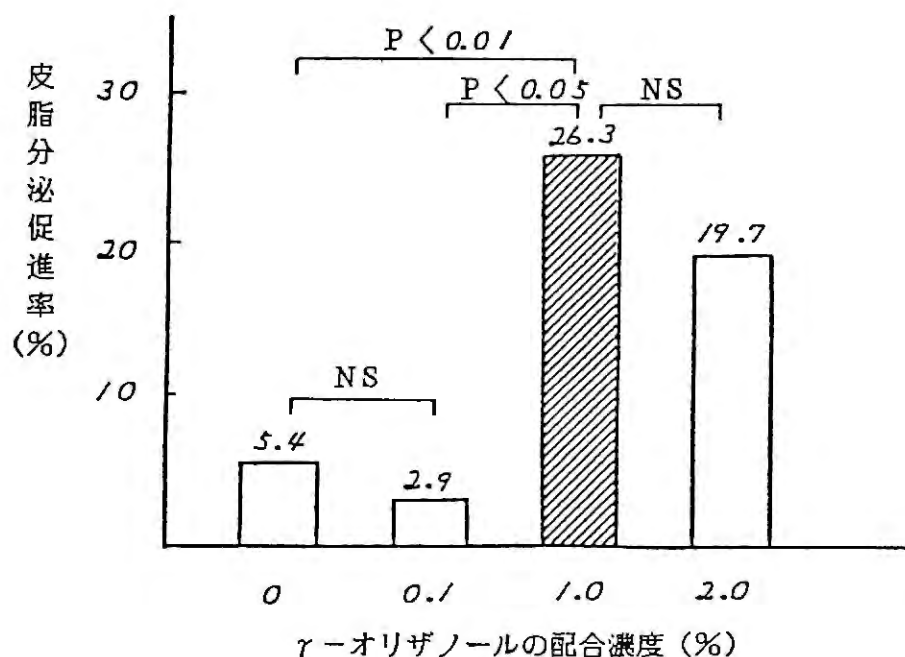


Fig.1. 親水性軟膏中の γ -オリザノールの配合濃度と皮脂分泌促進作用

2. 急性毒性試験⁷⁾

γ -オリザノールの原末ではマウスの雌雄及びラットの雌雄において経口投与、皮下注射及び筋肉注射のいずれの投与方法によっても全く死亡例は認められず、そのLD₅₀値は2,000 mg/kg から4,000 mg/kg以上であった (Table)。

1% γ -オリザノール軟膏の塗布による急性毒性ではラット (雌雄) の健常皮膚群、損傷皮膚群、モルモット (雌雄) での健常皮膚群のいずれにおいても死亡例は全く認められなかった (Table. 1)。

3. 亜急性毒性試験⁷⁾

Table. 2 に示したように健常皮膚群 (雌雄)、損傷皮膚群 (雌) ともいずれの実験群においても γ -オリザノール配合軟膏による死亡例は全く認められず、一般症状においても特異な変化は観察されなかった。また、摂餌・摂水量・体重変化においても対照群と比較し差は認められなかった。尿検査、血液検査、血清生化学的検査においても正常範囲内での変化しか認められなかった。更に臓器重量、剖検所見、病理組織学的検査においても対照群と差は認められず、 γ -オリザノールに基づくと思われる毒性は観察されなかった。

4. 皮膚刺激性試験⁸⁾

ラット及びモルモットでの健常皮膚群のいずれにおいても1% γ -オリザノール軟膏の皮膚刺激性はほとんど認められなかった (Table. 3)。

5. 眼粘膜刺激性試験⁸⁾

角膜及び虹彩に対して1% γ -オリザノール軟膏は点眼直後から7日間にわたって何ら異常は認めなかった。結膜においてはごく軽度の充血が生じたが2日後には完全に消失した (Table 3)。

Table 1. 急性毒性試験

1、 γ -オリザノール (原末) LD₅₀ (mg/kg)

投与経路	性	マウス	ラット
経口投与	♂	>4000	>4000
	♀	>4000	>4000
皮下注射	♂	>4000	>4000
	♀	>4000	>4000
筋肉内注射	♂	>4000	>2000
	♀	>4000	>2000

2、1% γ -オリザノール軟膏 (塗布)

動物	群	性	死亡率
ラット	健常皮膚群	♂	0/10
		♀	0/10
	損傷皮膚群	♂	0/10
		♀	0/10
モルモット	健常皮膚群	♂	0/8
		♀	0/8

Table 2. γ -オリザノール配合軟膏の30日間経皮投与による亜急性毒性

評価項目	健常皮膚群 (♂・♀)					損傷皮膚群 (♀)				
	対照	γ -オリザノール濃度(%)				対照	γ -オリザノール濃度(%)			
		0	0.1	1	5		0	0.1	1	5
死亡率	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
症状変化	対照群と差なし					対照群と差なし				
摂餌・摂水量	"					"				
体重変化	"					"				
尿検査	正常範囲					正常範囲				
血液検査	"					"				
血清生化学検査	"					"				
臓器重量	対照群と差なし					対照群と差なし				
剖検所見	正常範囲					正常範囲				
病理組織	特記すべき変化なし					真皮、皮下組織、軽度の繊維化				

Table 3. γ -オリザノール配合軟膏の皮膚刺激性、抗原性試験
および変異原性試験

試験方法	動物	皮膚	性	結果
皮膚刺激性	ラット	健常	♂	(-)
			♀	(-)
		損傷	♂	(-)
			♀	(-)
	モルモット	健常	♂	(-)
			♀	(-)
		損傷	♂	(-)
			♀	(-)
	ウサギ	健常	♂	(-)
			♀	(-)
眼粘膜刺激性	ウサギ	健常	♂	(-)
			♀	(-)
抗原性	モルモット	健常	♂	(-)
			♀	(-)
光毒性	ウサギ	健常	♂	(-)
光アレルギー性	モルモット	健常	♂	(-)
			♀	(-)
変異原性	ネズミ大腸菌	直接法	TA-98	(-)
			TA-100	(-)
		代謝活性化法	TA-98	(-)
			TA-100	(-)

6. 抗原性試験⁹⁾

低濃度感作群及び中濃度感作群のいずれの群においても誘発注射によって非感作群と同程度の紅斑症状を認めたのみで、浮腫、水疱、出血、潰瘍などの症状は全く認められなかった (Table 3)。一方、4% DNCB 軟膏では明らかな強い紅斑が認められた。

7. 光毒性試験¹⁰⁾

1% γ -オリザノール軟膏の塗布部位における uv 照射 24, 48 及び 72 時間後の皮膚反応は uv 照射部と uv 非照射部との間に全く差異は認められなかった (Table 3)。

一方、10% anthracene 軟膏の塗布部位では uv 非照射部でごく軽度の紅斑を示すにすぎなかったが uv 照射部では紅斑は明らかに増強し、72 時間後においても回復しなかった。

8. 光アレルギー性試験¹⁰⁾

感作期間中において試験試料の塗布またはuv照射処置のみによる刺激性及び光毒性と思われる皮膚反応は認められなかった。

誘発処置後、試験試料塗布群では対応する誘発試料によって皮膚反応は惹起されず、またuv照射部及びuv非照射部には差異は認められなかった (Table 3)。

一方、10%TBS軟膏塗布群のuv非照射群では感作期間と同様に何らの皮膚反応も認められなかったが、uv照射群では明らかな紅斑症状が認められた。

9. 変異原性試験¹¹⁾

γ -オリザノールは各種濃度において *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 に対して直接的な変異原性活性は認められなかった。

また、ラット肝 9000 × g 上清画分中の酵素により代謝されて、上記両菌株に対し変異原性を示す活性代謝物を産生しなかった (Table 3)。

10. パッチテスト⁶⁾

調製直後試料における1% γ -オリザノール軟膏の刺激指数は低く、健常者群及び皮膚疾患患者群いずれにおいても同基剤と比較してほとんど差を認めず、類似他社市販品及び日局白色ワセリンとも差を認めなかった。

ただし、皮膚疾患患者の刺激指数は健常者群より高い値を示した。また苛酷試験試料の場合においても1% γ -オリザノール軟膏の刺激指数は1.7と低く、調製直後試料の場合と差は認められなかった (Table 4)。

11. 臨床試験

1) Open control test¹²⁾

解析対象例の総数は87例であった。

いずれの対象疾患においても明らかな皮膚所見の改善が認められた。Fig. 2に示されるように2, 4, 6, 8, 10, 12週と経過するに従い改善率は順次上昇した。

特に12週後において落屑性湿疹では100%, 各種皰糠疹では約90%, 老人性乾皮症, 各種乾皮症及び尋常性魚鱗癬では約70%, 毛孔性苔癬では約65%の改善効果を示したのに比し進行性指掌角皮症, アトピー性皮膚炎に伴う乾燥及び小児乾燥型湿疹では約50%の改善効果が認められたのみであった。

落屑性湿疹, 各種皰糠疹, 老人性乾皮症, 各種乾皮症及び尋常性魚鱗癬の皮膚所見を症状別に経過をまとめたものがFig. 3である。乾燥粗糙化及び鱗屑症状の改善が他の症状に比して明らかであ

Table 4. 皮膚刺激指数

被 験 試 料	調 製 直 後 試 料		苛酷試験試料
	健 常 者 群	皮 膚 疾 患 患 者 群	健 常 者 群
1% γ -オリザノール軟膏	2.9	14.9	1.7
基 剤	1.4	13.5	0
類似他社市販品	1.4	18.9	0
日局白色ワセリン	0	6.8	0

った。

副作用は87例中2例に軽度な紅斑と湿疹化をみた。その発現率は2.3%であった。

いずれの対象疾患においても有用性の高いことが認められた。すなわち、やや有用以上を有効率とすると老人性乾皮症、毛孔性苔癬、各種枇糠疹、落屑性湿疹及びアトピー性皮膚炎に伴う乾燥では100%，尋常性魚鱗癬では88.9%，小児乾燥型湿疹では88.5%，各種乾皮症では87.5%更に進行性指掌角皮症においても86.7%の高い有用性が得られた (Table 5)。

2) Semi double blind test⁶⁾

解析対象例は204例であった。背景要因の等質性については性別及び年代別によるrとbの左右割付症例数に有意な偏りはなかった。いずれの対象疾患においても2週、4週、6週と経過とともに明らかな改善効果を認めた。rとbの優劣比較においてはTable 6に示したように老人性乾皮症及び尋常性魚鱗癬の2週、4週、6週後及び全経過のいずれにおいて、rの方がbに比べやや優る傾向にあるが有意差を認めなかった。これらと小児乾燥型湿疹を加える疾患全体としてまとめてみると、4週後においてのみr有意の傾向を認めた (P<0.1)。

副作用は204例中r 1例、b 1例 rとb 4例に軽度な丘疹、紅斑、痒痒をみたのみであった。

有用性についてはrとbの間に有意差が認められなかったが、いずれの対象疾患においてもrの方がやや高い傾向にあった。

考 察

今までr-オリザノールを配合した軟膏剤(クリーム剤)は医薬部外

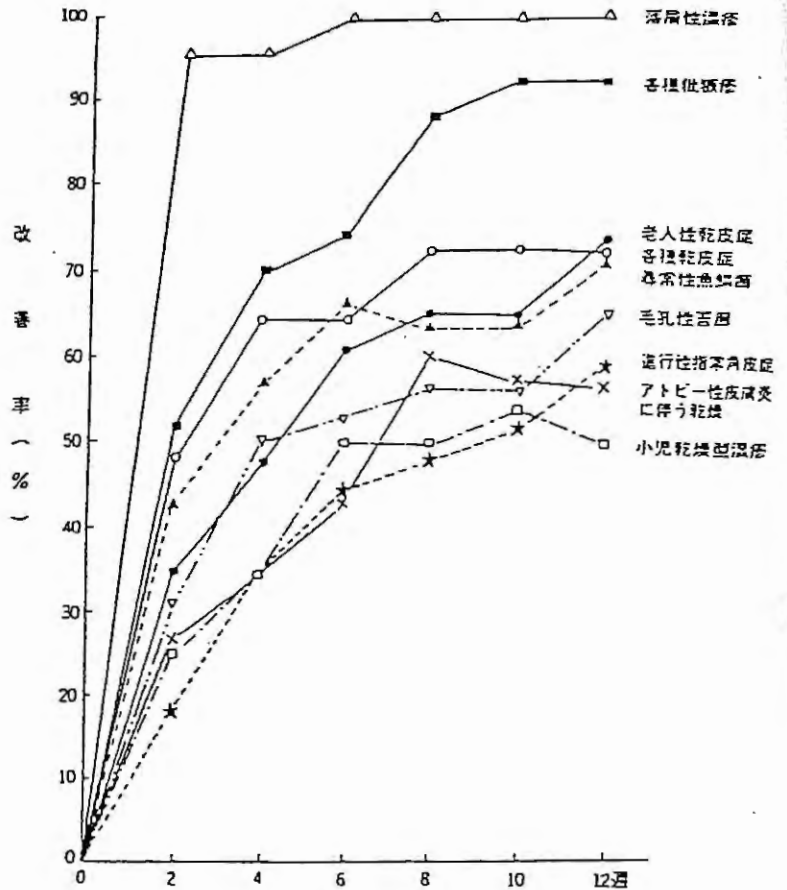


Fig.2. 1% r-オリザノール配合軟膏による皮膚所見の改善効果

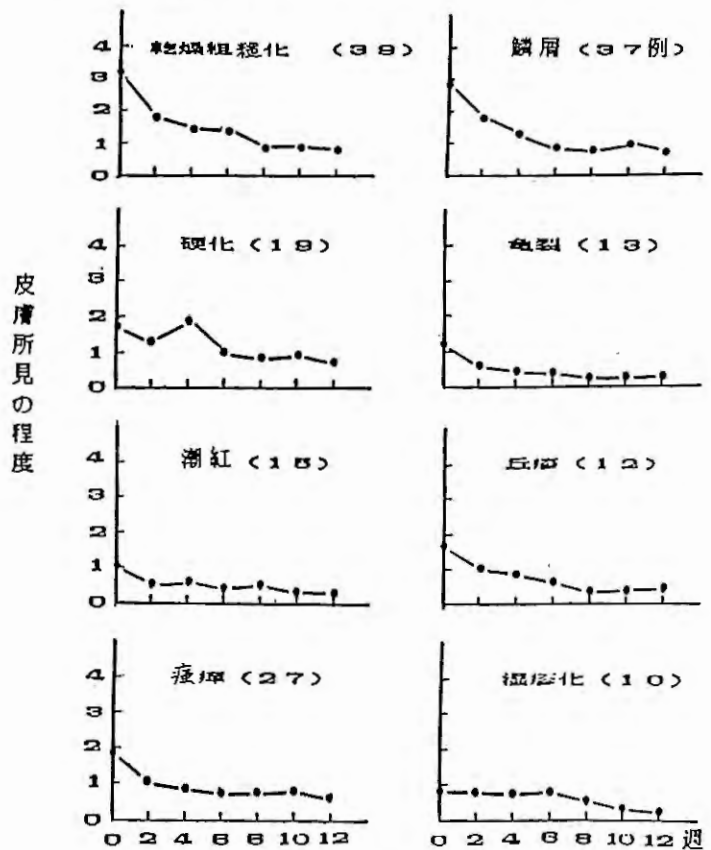


Fig.3. 1% r-オリザノール配合軟膏による皮膚症状の変化

Table 5. 1% γ -オリザノール配合軟膏の各種皮膚疾患における有用性の判定

	極めて有用	有用	やや有用	無用	やや有害	有害	計
老人性乾皮症	2 (15.4)	6 (61.5)	5 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	13 (100.0)
各種乾皮症	4 (50.0)	3 (87.5)	0 (87.5)	1 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	8 (100.0)
毛孔性苔癬	1 (20.0)	4 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	5 (100.0)
尋常性魚鱗癬	2 (22.2)	6 (88.9)	0 (88.9)	0 (88.9)	1 (100.0)	0 (100.0)	9 (100.0)
各種批癩疹	2 (50.0)	2 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	4 (100.0)
落屑性湿疹	2 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	2 (100.0)
小児乾燥型湿疹	5 (19.2)	10 (57.7)	8 (88.5)	2 (96.2)	0 (96.2)	1 (100.0)	26 (100.0)
アトピー性皮膚炎に伴う乾燥	2 (40.0)	2 (80.0)	1 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	5 (100.0)
進行性指掌角皮症	3 (20.0)	7 (66.7)	3 (86.7)	2 (100.0)	0 (100.0)	0 (100.0)	15 (100.0)
計	23 (26.4)	40 (72.4)	17 (92.0)	5 (97.7)	1 (98.9)	1 (100.0)	87 (100.0)

() : 累積率

Table 6. 1% γ -オリザノール配合軟膏と同基剤との優劣比較

疾患	評価日	$\gamma \gg$	$>$	$=$	$<$	$\ll b$	計	検定 Wilcoxon(1)
老人性乾皮症	第1 (2 W)	1	2	32	5	0	40	NS
	第2 (4 W)	1	9	25	4	0	39	NS
	第3 (6 W)	1	6	27	3	0	37	NS
	全経過	1	9	25	5	0	40	NS
尋常性魚鱗癬	第1 (2 W)	0	4	31	4	0	39	NS
	第2 (4 W)	0	7	27	3	1	38	NS
	第3 (6 W)	0	6	27	2	0	35	NS
	全経過	0	8	26	4	1	39	NS
小児乾燥型湿疹	第1 (2 W)	0	5	36	0	1	42	NS
	第2 (4 W)	0	7	27	5	1	40	NS
	第3 (6 W)	0	5	28	5	2	40	NS
	全経過	0	6	29	5	2	42	NS
老人性乾皮症 尋常性魚鱗癬 小児乾燥型湿疹	第1 (2 W)	1	11	99	9	1	121	NS
	第2 (4 W)	1	23	79	12	2	117	+ ($\gamma > b$)
	第3 (6 W)	1	17	82	10	2	112	NS
	全経過	1	23	80	14	3	121	NS

NS : 有意差なし + : $P < 0.1$

品及び化粧品として0.5%あるいはそれ以下の濃度を配合したものが市販されていた。

今回、 γ -オリザノールの外用薬への応用として、皮脂の分泌促進効果を充分期待しうる至適濃度を皮表皮脂量を測定することにより検討したところ1%が適切であることがわかった。そこで、親水性の γ -オリザノール軟膏の安全性を動物試験として急性毒性、亜急性毒性、皮膚刺激性、眼粘膜刺激性、抗原性、光毒性及び光アレルギー性について検討したところ、いずれの試験においても γ -オリザノール軟膏の安全性については特に問題はなかった。また、発癌性の評価として変異原性試験を検討したところ全くnegativeであった。更に、ヒトによるパッチテストでも特に問題がなく安全性の高いものとして評価した。

次に、臨床試験にて1% γ -オリザノール軟膏の有用性について皮脂腺の機能が低下している老人性乾皮症、尋常性魚鱗癬等を中心にOpen control test及びSemi double blind testにて検討したところ、連続塗布により明らかな皮疹の改善効果が認められた。また、基剤との比較においては1% γ -オリザノール軟膏の方がやや優る傾向が認められた。

一方、副作用の発現率はOpen control testでは2.3%、Semi double blind testでは2.9%と低く、その症状は軽微なものであった。

以上のことより、1% γ -オリザノール軟膏は遅効性ではあるが皮脂腺に働きかけて皮脂膜の形成を促し、皮膚の乾燥や肌あれを予防する効果のあることが認められた。

なお、今回の検討にあたって終始ご指導賜った名古屋大学名誉教授小林敏夫、名古屋保健衛生大学教授上田 宏、名古屋大学講師早川律子、京都薬科大学学長藤村 一、岐阜薬科大学教授江田昭英、東京薬科大学教授渡部 烈の諸先生方に、また、 γ -オリザノールの提供にご好意を賜った山下栄次氏に深謝致します。

文 献

- 1) 小林美恵, 早川律子, 上田 宏, 小林敏夫: 西日皮膚, 35, 566 (1973)
- 2) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F.: J. pharmacol. Exp. Ther. 96, 99 (1949)
- 3) Draize, J. H., "Appraisal of the safety of chemicals in Foods, Drug and Cosmetics," P. 46 (AOAC) (1965)
- 4) Draize, J. H., et al.: J. pharmacol. Expt. Therapeut. 82, 377 (1944)
- 5) 須貝哲郎: 皮膚, 19 (2), 210 (1977)
- 6) IKD- γ 研究班 (小林敏夫, 早川律子): 皮膚, 21 (2), 123 (1979)
- 7) 藤村 一, 森井 勇, 平松保造, 宮本 誠, 藤縄知昭, 中橋 孝, 鹿熊 武: 薬理と治療, 7 (5), 71 (1979)
- 8) 藤村 一, 森井 勇, 藤縄知昭, 富樫 茂, 鹿熊 武: 薬理と治療, 7 (5), 85 (1979)
- 9) 江田昭英, 藤縄知昭, 富樫 茂, 森井 勇, 鹿熊 武: 薬理と治療, 7 (5), 97 (1979)
- 10) 江田昭英, 藤縄知昭, 富樫 茂, 森井 勇, 鹿熊 武: 薬理と治療, 7 (5), 105 (1979)
- 11) (株)池田模範堂開発部資料, 未発表
- 12) IKD-504 研究班 (小林敏夫, 上田 宏, 早川律子): 皮膚, 21 (4), 463 (1979)

各種制酸剤の配合比率と簡

単な胃模型内での pH 推移*¹

吉岡 毅, 正川康明, 清水正彦

株式会社 廣貫堂 製薬部*²

Takeshi YOSHIOKA

Yasuaki MASAKAWA

Masahiko SHIMIZU

一般に胃腸薬を設計する場合においては、制酸作用を期待して各種の制酸剤を配合する場合が多い。今回簡単な胃模型を作成し、使用頻度が高いと思われる数種の制酸剤について pH の変化を観察し、更に、得られた単品の制酸剤の pH 曲線から、それらを組み合せた場合の pH 曲線のある程度予測することが出来たのでその結果を報告する。

実験の部

1. 装置 (胃模型) 及び実験方法

Fig. 1 の装置を用い、ビーカーに日局「一般試験法36崩壊試験法」の第 1 液 50 ml を入れ、マグネチックスターラーを用いて約 300 rpm で攪拌しながら制酸剤を投入する。制酸剤を投入して 10 分後から 30 秒に 1 ml ずつ第 1 液を注加する。

第 1 液の注加により pH が低下してゆき、pH が 3 以下になった時注加を止める。

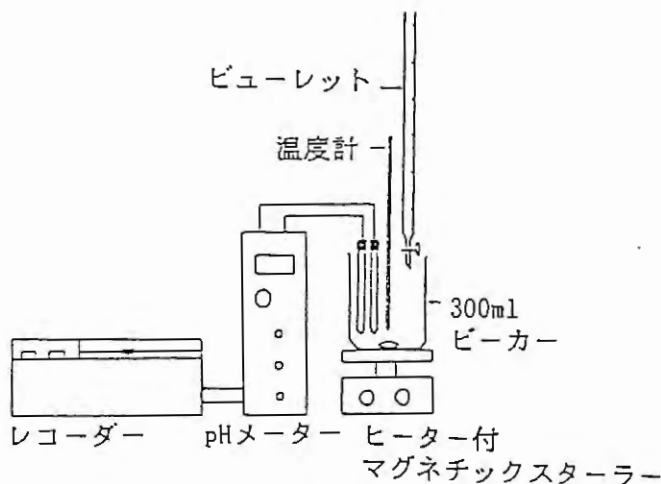


Fig. 1. 装置図

2. 測定値

立ち上り時間	制酸剤を投入してから pH 3 を越えるまでの時間
最高 pH	制酸剤を投入してから 10 分後の pH
維持時間	制酸剤を投入して pH 3 を越えてから第 1 液の注加によって再び pH 3 になるまでの時間

3. 実験試料

一般市場で入手した以下の 7 品目

炭酸水素ナトリウム, 炭酸マグネシウム, 酸化マグネシウム, 沈降炭酸カルシウム, メタケイ酸アルミン酸マグネシウム, 合成ヒドロタルサイト, 水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物

* 1 第 4 回家庭薬開発研究会シンポジウムにて発表, (富山, 1984 年 12 月 6 日)

* 2 〒 930 富山市梅沢町 2-9-1 TEL 0764 (24) 2271

結果及び考察

1. Fuchs法及び岡崎らの方法との比較

制酸剤の胃内でのpH推移を調べるには従来Fuchs法¹⁾と岡崎らの方法²⁾等が知られているが、得られた曲線の精度や操作上の難易さの点から今回用いた方法を採用した。この3法のpH曲線のパターンには本質的に違いはなく、それぞれ各試料ごとに同様のパターンを示している (Fig. 2)。

また、「胃腸薬製造承認基準」の試験法 (昭和 55 年薬審第 523 号 厚生省薬務局審査課長通知) では制酸剤の評価方法として、制酸試験法とpH試験法を規定しているが、以上の3法では各pH

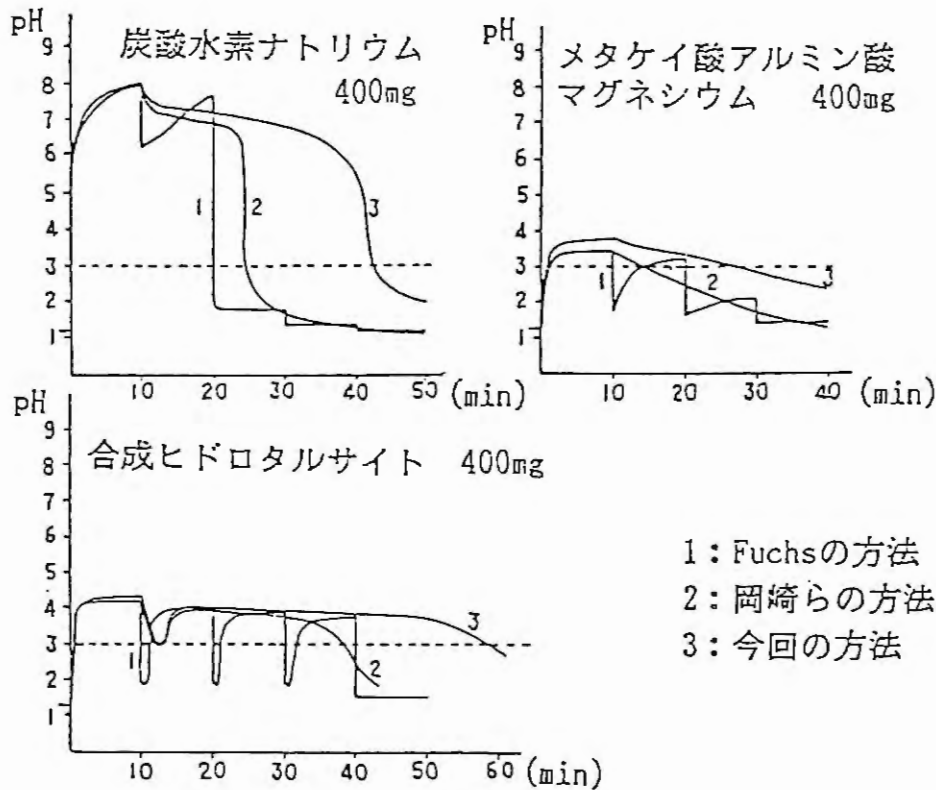


Fig.2. 3法の比較

域での維持時間や反応の遅速等の評価が出来る利点があると思われる。

2. 試料重量を一定 (400 mg) にした場合

炭酸水素ナトリウムは急速にpHが上昇し、最高pHは6.7で、注加によりpH7~6付近を維持した後に急激に下降した。炭酸マグネシウムも急速にpHが上昇し、最高pHは8で、pH7付近を維持した後pH6を過ぎると急激に下降した。酸化マグネシウムも急速にpHが上昇し、最高pHは10で、pH9付近を維持した後pH7を過ぎると急激に下降した (Fig. 3)。

メタケイ酸アルミン酸マグネシウムはpH上昇が鈍く、最高pHは3.5と低いが、下降はなだらかでpH4~3付近をほぼ直線的に下降した (Fig. 4)。

沈降炭酸カルシウムは比較的pH上昇が鋭く、pH6~4にかけての維持時間が長くpH4を過ぎてから下降が速まる (Fig. 5)。

合成ヒドロタルサイトはpH上昇が鈍く、最高pHは4.5と低く、注加により一時的にpHが低下するが、更に注加を続けると再び上昇してpH4付近をほぼ一定に維持した。水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物はpH上昇が合成ヒドロタルサイトよりやや鋭く、同様にpH4付近を維持した (Fig. 6)。

これら7種の原料は、それぞれ特徴のあるpH曲線を示したが、これを4つの典型的なパターンに分類してみるとFig. 7に示す通りとなる。I型は炭酸水素ナトリウム等にみられるものでpH

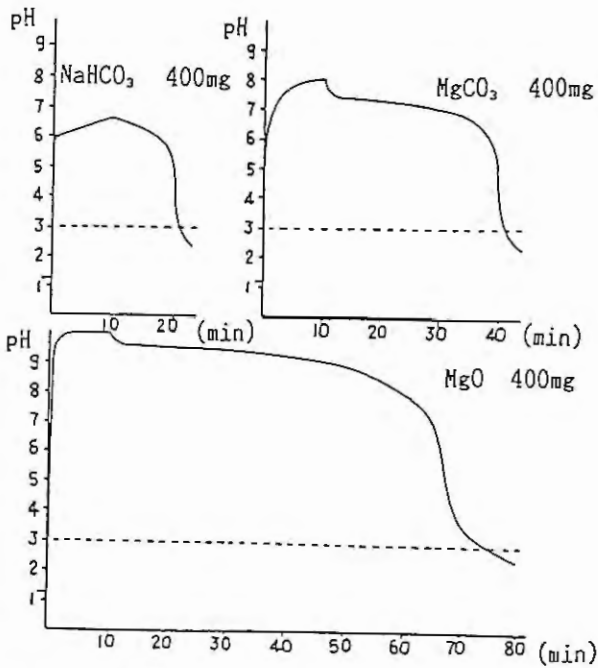


Fig. 3. 炭酸水素ナトリウム400mg, 炭酸マグネシウム400mg, 酸化マグネシウム400mg

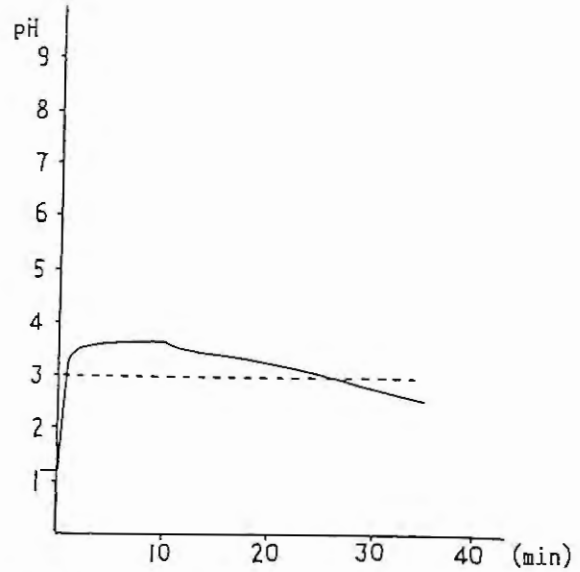


Fig. 4. メタケイ酸アルミン酸マグネシウム400mg

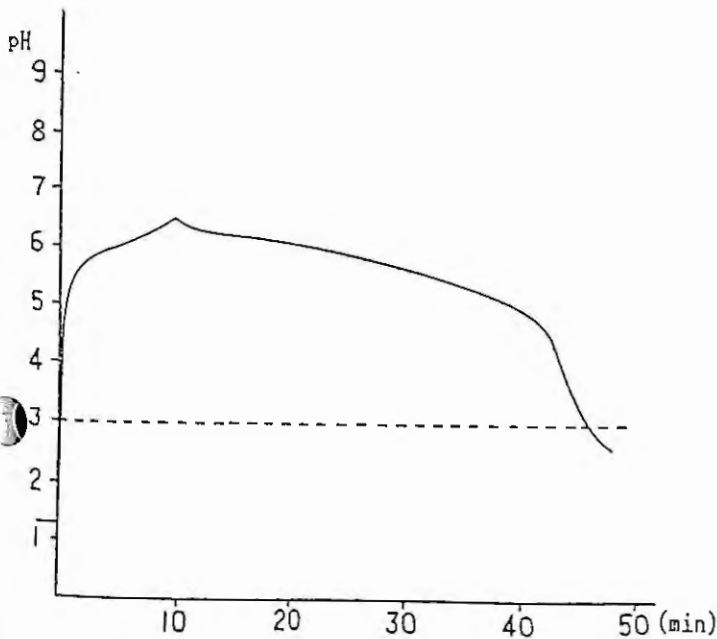


Fig. 5. 沈降炭酸カルシウム 400mg

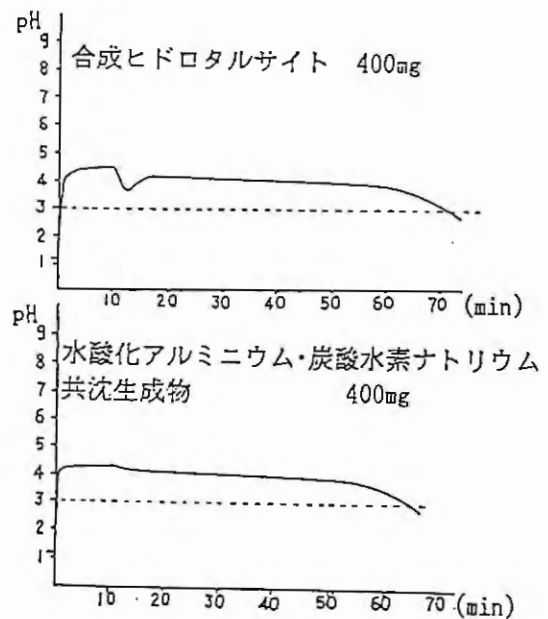


Fig. 6. 合成ヒドロタルサイト400mg
水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム
共沈生成物400mg

上昇が鋭く、高いpH域を維持するが、塩酸との反応も速く中間のpH域が短いもの、Ⅱ型はメタケイ酸アルミン酸マグネシウム等でpH上昇は鈍く、最高pHも低いが、pH 4～3をなだらかに下降するもの、Ⅲ型は沈降炭酸カルシウム等でⅠ型とⅡ型の中間のもの、Ⅳ型は合成ヒドロタルサイト等でpH 4位をほぼ一定に維持するものである。

3. 試料重量を変化させた場合

試料重量を変えた場合に、pH曲線のパターンにどのような変化がみられるか調べるために、

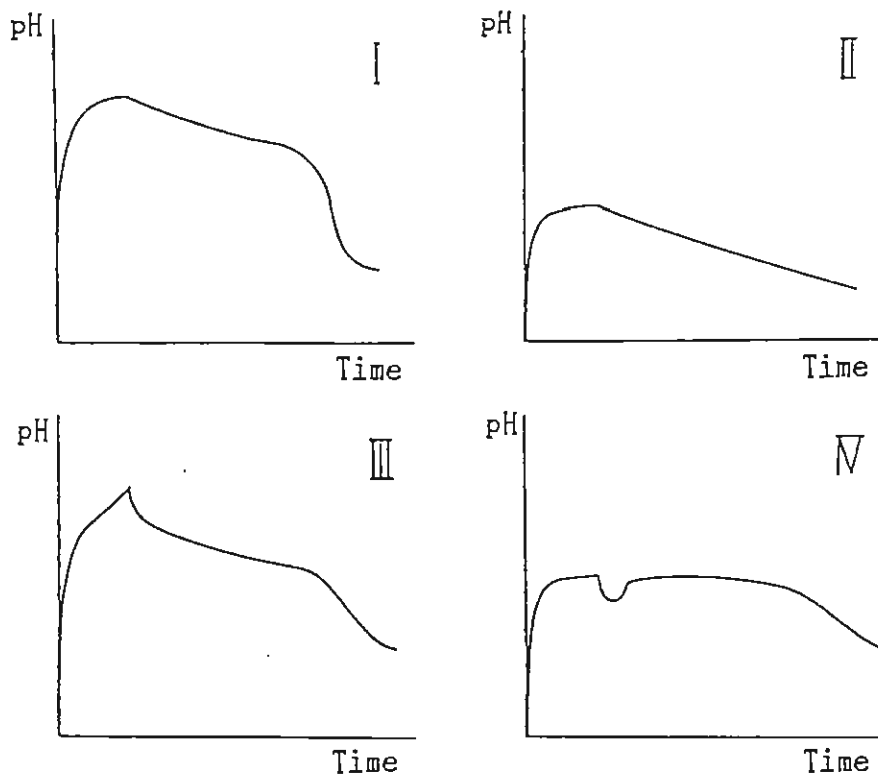


Fig.7. 典型的なパターン

0.1 N 塩酸消費量が 75 ml, 100 ml, 125 ml に相当する各制酸剤を量り, 同様に測定を行った。

I 型の炭酸水素ナトリウム, 酸化マグネシウム, 炭酸マグネシウム (Fig. 8), II 型のメタケイ酸アルミン酸マグネシウム (Fig. 9), III 型の沈降炭酸カルシウム (Fig. 10), IV 型の合成ヒドロタルサイト, 水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物は (Fig. 11) のいずれも立ち上がり時間や最高 pH は近似しているが, 維持時間は比例的に延長している。

このように, 塩酸消費量を変化させても, 個々の制酸剤の pH 曲線は特徴のあるパターンを示した。しかし, 塩酸消費量が一定でも異なる制酸剤のパターンにはずいぶん違いがみられる。また, 塩酸消費量の変化に対する維持時間の延長は Table 1 にまとめたが, 炭酸水素ナトリウムは平均

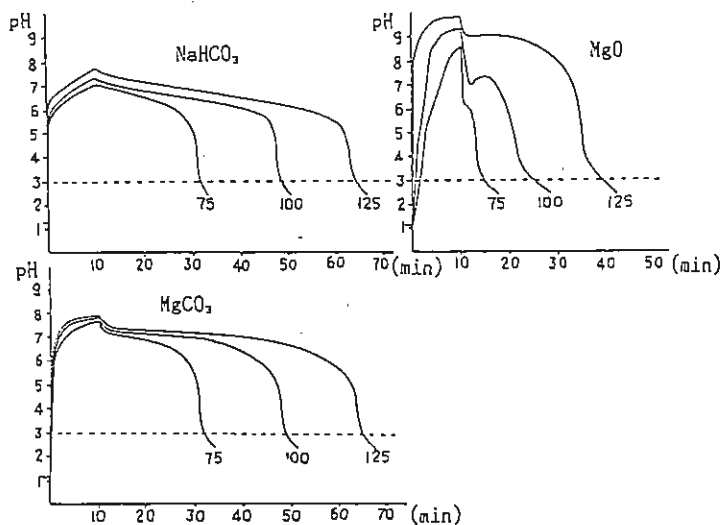


Fig.8. 炭酸水素ナトリウム, 炭酸マグネシウム
酸化マグネシウムの 0.1 N 塩酸消費量
75 ml, 100 ml, 125 ml の場合

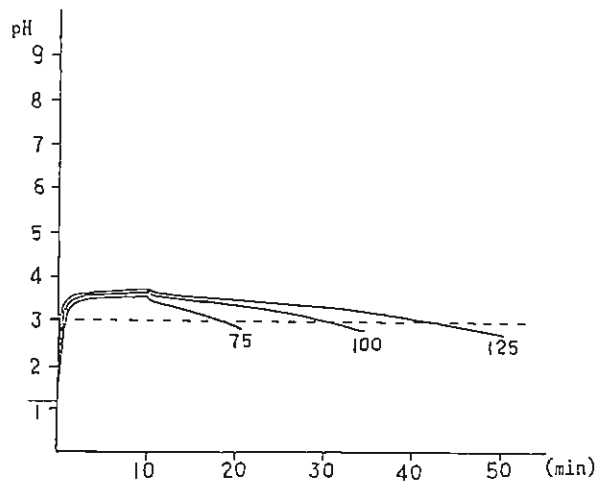


Fig.9. メタケイ酸アルミン酸マグネシウムの
0.1 N 塩酸消費量 75 ml, 100 ml,
125 ml の場合

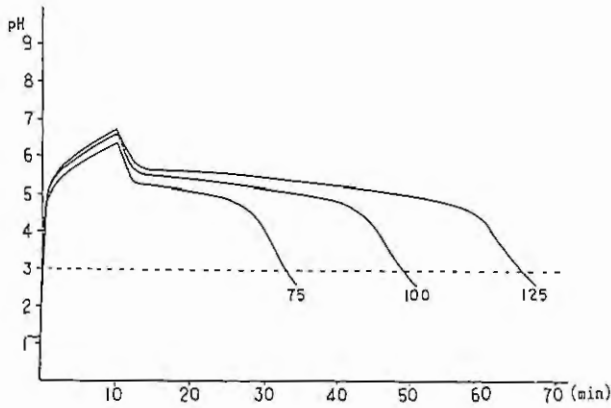


Fig. 10. 沈降炭酸カルシウムの0.1 N塩酸消費量75 ml, 100 ml, 125 mlの場合

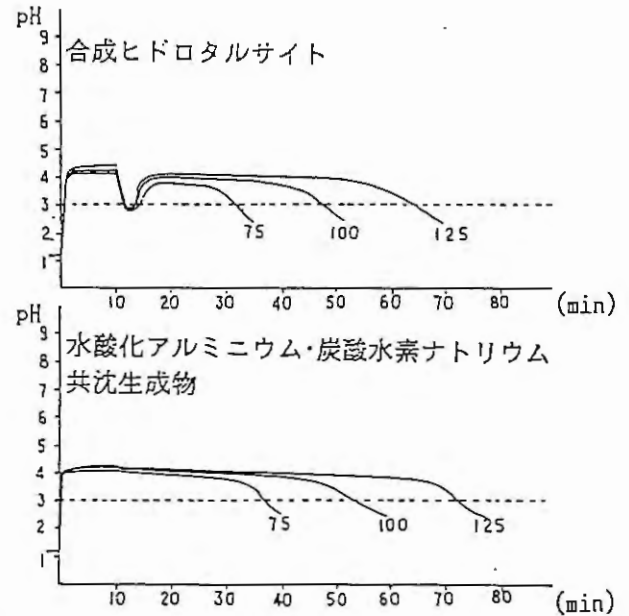


Fig. 11. 合成ヒドロタルサイト, 水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物の0.1 N塩酸消費量75 ml, 100 ml, 125 mlの場合

16分13秒, 炭酸マグネシウムは平均16分32秒, 酸化マグネシウムはばらつきがみられるが平均13分5秒, メタケイ酸アルミン酸マグネシウムは平均12分8秒, 沈降炭酸カルシウムは平均16分23秒, 合成ヒドロタルサイトは平均17分9秒, 水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物は平均17分49秒ずつ0.1 N塩酸消費量25 mlに対して延長している。

4. 予測パターンと実測パターンの比較

胃腸薬には制酸剤と共に消化酵素を配合することがあり, それぞれの消化酵素は特有の活性pH域を有している。更に, 岡崎⁴⁾によるとそれぞれの消化酵素には胃液に対する抵抗力が弱いものもあり, いずれにしても消化酵素を配合する場合には, 服用後胃内を速やかに酵素の至適pHに上昇させ長時間維持させる必要があると考えられる。しかし, 個々の制酸剤単品では一長一短があり条件を満足するものが見当たらない。そこで, 前述の実験結果から, 各制酸剤のpH曲線のパターンや, 塩酸消費量の変化に伴う維持時間の変化, 及び反応の遅速等を考え併

Table 1. 各制酸剤の塩酸消費量を変化させた場合の測定値

品名	0.1 N-HCl消費量 (ml)	立ち上り時間 (秒)	最高pH	維持時間
I 炭酸水素ナトリウム	75	11	7.10	31'37"
	100	4	7.32	48'20"
	125	3	7.71	64'03"
I 重質炭酸マグネシウム	75	13	7.75	31'47"
	100	11	7.86	48'49"
	125	9	7.95	64'51"
I 酸化マグネシウム	75	110	8.60	12'40"
	100	42	9.34	24'00"
	125	9	9.89	38'45"
II メタケイ酸アルミン酸マグネシウム	75	60	3.58	18'30"
	100	36	3.69	30'18"
	125	20	3.73	42'46"
III 沈降炭酸カルシウム	75	13	6.39	32'35"
	100	6	6.64	48'58"
	125	4	6.69	65'20"
IV 合成ヒドロタルサイト	75	53	4.12	28'19"
	100	45	4.24	45'15"
	125	42	4.44	62'36"
IV 水酸化アルミニウム・炭酸水素ナトリウム共沈生成物	75	17	4.06	36'43"
	100	13	4.19	53'29"
	125	10	4.22	72'20"

せて各制酸剤を組み合わせ、理想的なpH曲線を予測し、処方設計の目安がつけられないだろうか考えた。すなわち、I型の制酸剤は立ち上りのpH上昇と高いpH域の維持に、II型やIV型の制酸剤は低いpH域の維持に、そしてIII型の制酸剤は中間域のpH維持に用いるということである。ここで組み合わせモデル処方0.1N塩酸消費量の設定を約105 mlとして予測を行い実測値と比較した。

Fig. 12は炭酸水素ナトリウム200 mgと炭酸マグネシウム400 mgを組み合わせた場合の予測pH曲線(上図点線で示す)と実測pH曲線(下図)である。上図の実線で示したのはFig. 3の炭酸マグネシウム400 mgのpH曲線で、これに炭酸水素ナトリウムを組み合わせることにより立ち上りが鋭くなり、最高pHは同じI型同志なのでやや上昇すると予測した。また、炭酸水素ナトリウム200 mgは炭酸マグネシウムより塩酸と反応し易く、0.1 N塩酸消費量約25 mlに相当するので、注加開始後、先にpH 7~6の維持時間が17分間延長したあとで炭酸マグネシウムのpH曲線に移るであろうと予測した。

Fig. 13は炭酸水素ナトリウム200 mgと沈降炭酸カルシウム400 mgを組み合わせた場合の予測pH曲線(上図点線で示す)と実測pH曲線(下図)である。上図の実線で示したのはFig. 5の沈降炭酸カルシウム400 mgのpH曲線で、これに炭酸水素ナトリウムを組み合わせることにより立ち上りが鋭くなり、最高pHは上昇すると予測した。また、炭酸水素ナトリウム200 mgは沈降炭酸カルシウムより塩酸と反応し易く0.1 N塩酸消費量約25 mlに相当するので注加開始後、先にpH 7~6の維持時間が17分間延長したあとで沈降炭酸カルシウムのpH曲線に移るであろうと予測した。

Fig. 14は炭酸水素ナトリウム200 mg・沈降炭酸カルシウム200 mg・メタケイ酸アルミン酸マグネシウム200 mgの3種の制酸剤を組み合わせた場合の予測pH曲線(上図)と実測pH曲線である。炭酸水素ナトリウムにより立ち上りが鋭く、炭酸水素ナトリウムと沈降炭酸カルシウムにより最高pHが6~7に達すると予測した。また、塩酸と反応し易い順に炭酸水素ナトリウム200 mgは0.1 N塩酸消費量約25 mlに相当するのでpH 7~6を17分間維持し、次に沈降炭酸カルシウム

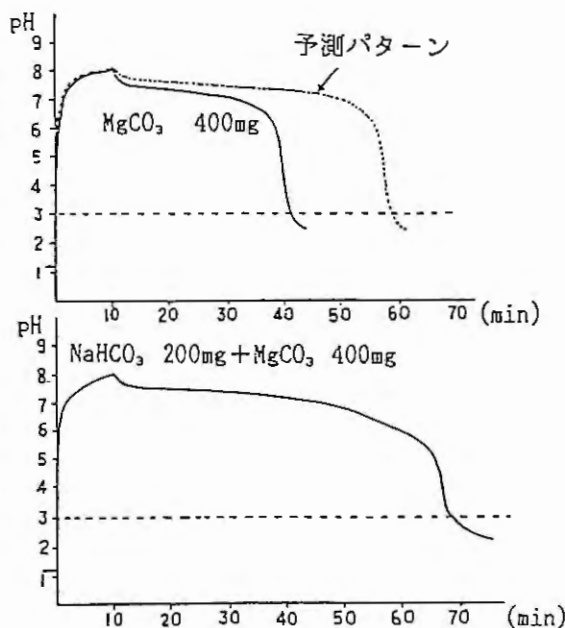


Fig. 12. 炭酸水素ナトリウム200 mg, 炭酸マグネシウム400 mgを組み合わせた場合の予測図と実測図

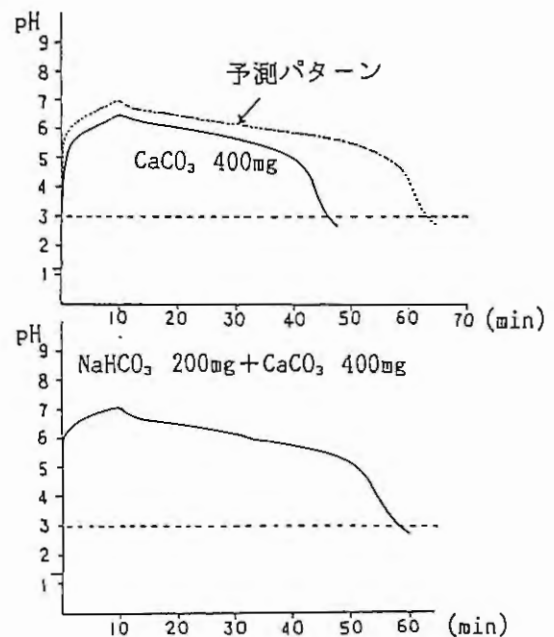


Fig. 13. 炭酸水素ナトリウム200 mg, 沈降炭酸カルシウム400 mgを組み合わせた場合の予測図と実測図

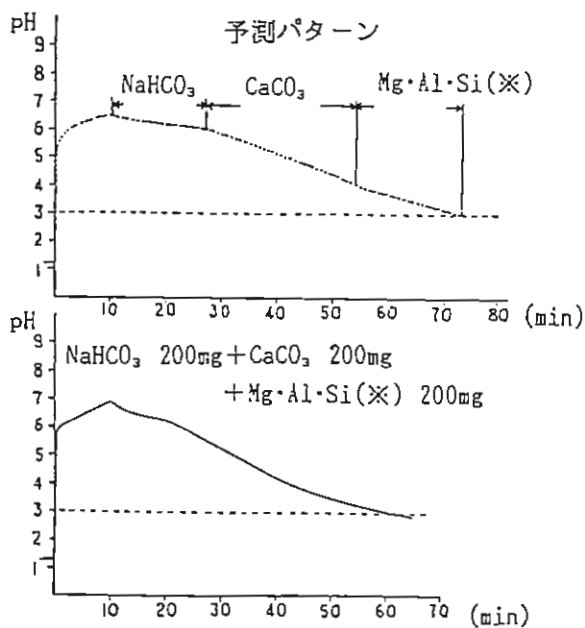


Fig.14. 炭酸水素ナトリウム 200 mg ,
沈降炭酸カルシウム 200 mg ,
メタケイ酸アルミン酸マグネシウム 200 mg
を組み合わせた場合の予測図と実測図

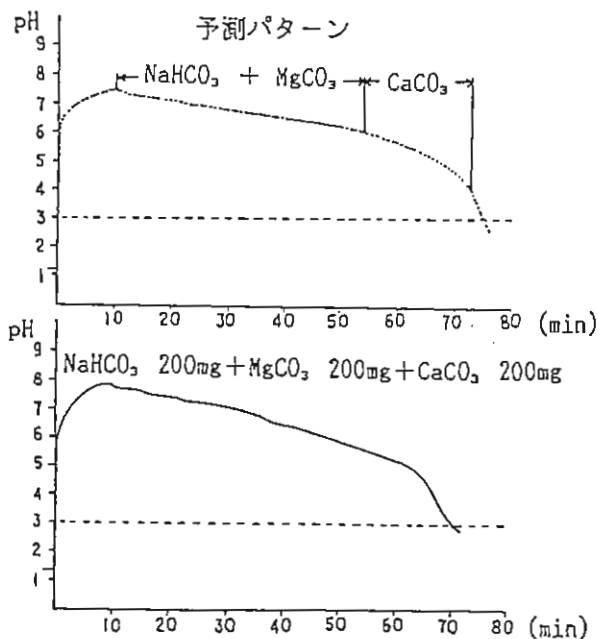


Fig.15. 炭酸水素ナトリウム 200 mg
炭酸マグネシウム 200 mg
沈降炭酸カルシウム 200 mg
を組み合わせた場合の予測図と実測図

200 mg は 0.1 N 塩酸消費量約 40 ml に相当するので pH 6 ~ 4 を 27 分間維持する。最後にメタケイ酸アルミン酸マグネシウム 200 mg は 0.1 塩酸消費量約 42 ml に相当するので pH 4 ~ 3 を 19 分間維持し、初期の 10 分間を加えて維持時間が 73 分間であろうと予測した。

Fig. 15 は炭酸水素ナトリウム 200 mg ・炭酸マグネシウム 200 mg ・沈降炭酸カルシウム 200 mg の 3 種の制酸剤を組み合わせた場合の予測 pH 曲線（上図）と実測 pH 曲線（下図）である。炭酸水素ナトリウムにより立ち上がりが鋭く、最高 pH が 7 ~ 8 に達すると予測した。また、塩酸と反応し易い順に炭酸水素ナトリウム 200 mg は 0.1 N 塩酸消費量約 25 ml に相当するので pH 7 ~ 6 を 17 分間維持し、続いて同じ pH 域を同じ I 型の炭酸マグネシウムが 0.1 N 塩酸消費量約 40 ml に相当するので 27 分間維持する。

Table 2. 制酸剤の組み合わせモデル処方 of 予測値と実測値

I NaHCO ₃ (mg)	I MgCO ₃ (mg)	II (※) Mg·Al·Si (mg)	III CaCO ₃ (mg)	0.1N-HCl 消費量 (ml)	予 測 値		実 測 値		
					最高 pH	維持時間	立ち上り時間 (秒)	最高 pH	維持時間
200	400			106	8	59'	8.4	8.06	68'34"
200			400	104	7	63'	5.4	7.06	58'09"
200		400		108	4	42'	33.6	4.52	49'00"
200		200	200	106	6.5	73'	4.8	6.91	60'31"
200	200		200	105	7.5	75'	4.8	7.79	70'17"
200	200	200		107	7	73'	4.8	8.16	89'36"

(※) メタケイ酸アルミン酸マグネシウム

次に沈降炭酸カルシウム 200 mg は 0.1 N 塩酸消費量約 40 ml に相当するので pH6 ~ 4 を 19 分間維持し、初期の 10 分間と pH 4 ~ 3 までの下降の 2 分間を加えて維持時間が 75 分間であろうと予測した。

他の 2 組のモデル処方も加えて以上の結果を Table 2 にまとめると予測値と実測値はほぼ一致している。また、Fig. 12 ~ Fig. 15 に示す通り予測と実測の pH 曲線のパターンも近似している。

結 論

制酸剤単品の pH 曲線を知ることにより、それらを組み合せた場合の pH 推移を予測したり、配合したものの pH 曲線から配合比率を変化させたときの pH 推移をある程度予測することが出来た。

このことを利用して使用する消化酵素の至適 pH を知ることにより、それぞれの消化酵素に適した pH 曲線のパターンを制酸剤の組み合わせによって予測することが可能となり製剤設計上の目安がつけ易くなったと考えられる。

文 献

- 1) C. Fuchs : Drug and Cosmetic Ind. 64, 692 (1949)
- 2) 岡崎寛蔵, 北村允夫, 鈴木進, 中郡英次 : 薬剤学, 16(2), 12 (1956)
- 3) 幸保文治 : 薬局, 20(8), 1097 (1969)
- 4) 岡崎寛蔵, 北村允夫, 石川敏, 神田慎吾, 中郡英次 : 薬剤学, 16(3), 31 (1956)
岡崎寛蔵, 北村允夫, 石山良子, 石川敏, 16(4), 15 (1956)
岡崎寛蔵, 北村允夫, 石川潔, 中郡英次, 阿久津静江, 17(2), 110 (1957)

地黄の組織培養に関する研究^{*1}

成 川 一 郎

東亜製薬株式会社 試験研究室^{*2}

Ichiro NARIKAWA

地黄は中国原産の多年草で、中国、韓国に多く産し、日本では主として長野、奈良両県で栽培されている。薬用としては、日本薬局方によれば、アカヤジオウ又はその他の同属植物の根をそのまま又は蒸して使用している。漢方 210 処方中の 27 処方に配合されており、処方数としては多くはないが、八味地黄丸等の強壯剤に配合されるために比較的需要は多い。

今回、富山医科薬科大学薬用植物園に栽培されている中国産北京地黄の根及び葉を用いて組織培養による増殖法を試みた。なお、比較品としてはすでに報告のあるアカヤジオウの種子^{1) 2) 3)}を用いて同様に培養した。手法としては、培地に種々の生長調節物質を各濃度で添加することによる細胞塊 (Callus) 形成への影響を観察するとともに、Callusから元の地黄に還元させるまでの培養条件について検討したのでその一部について報告する。

実験の部

1. 実験材料

中国産北京地黄の根及び葉：富山医科薬科大学附属薬用植物園提供

アカヤジオウの種子：生薬資源開発 (株) 代表取締役 橋本竹二郎氏提供

2. 試料の調製

根は 1 ~ 2 cm の長さ、葉は 0.5 ~ 1 cm 四方を切り取り、種子の場合はそのままそれぞれをろ紙で包み、10% 次亜塩素酸ナトリウム溶液の中へ入れ、超音波洗浄器を用いて 5 分間洗浄した。そのまま更に 10 分間浸した後、滅菌水を用いて 5 回以上十分に洗浄し、以後は無菌的に操作を行った。次に根の場合は、径 2 ~ 3 mm のコルクボーラを用いて内芯部を打ち抜き、更にその中央部分の長さ 2 ~ 3 mm を切り取って試料とした。葉は 3 ~ 5 mm 四方を切り取り、種子はそのままを試料とした。

3. 培地の調製

Table 1 に示す Murashige-Skoog 培地 (MS 培地) を 1 N 水酸化カリウム液により pH 6.3 に調整した。これに Fig. 1 に示す生長調節物質を単独又は組み合わせてそれぞれ各濃度加え、オートクレーブ中 (120 °, 1.2 kg/cm²) で 20 分間滅菌した。生長物質の略記方法は事例として示したようにアルファベットが各生長物質を、数字 6 は「10⁻⁶モル濃度」を示している。

4. 培養条件

明の条件：1000 Lux 蛍光灯，室温

暗の条件：25 °恒温器

5. 試験方法及び結果

以下は中国産北京地黄の根及び葉を実験材料とした場合の結果についての報告であるが、同時

* 1 第 4 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表，(富山，1984 年 12 月 6 日)

* 2 〒 930 - 03 富山県中新川郡上市町若杉 55 TEL 0764 (72) 1010

Table 1. Murashige - Skoog 培地 (MS 培地) 1 ℓ 中

NH ₄ NO ₃	3.30 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025mg
KNO ₃	3.80 g	Na ₂ -EDTA	37.30mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.88 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.80mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.74 g	ミオイノシトール	100.00mg
KH ₂ PO ₄	0.34 g	グリシン	2.00mg
H ₃ BO ₃	6.20mg	HCl·B ₆	0.50mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.30mg	ニコチン酸	0.50mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60mg	HCl·B ₁	0.10mg
KI	0.83mg	ショ糖	30.00 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25mg	寒天	9.00 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025mg		

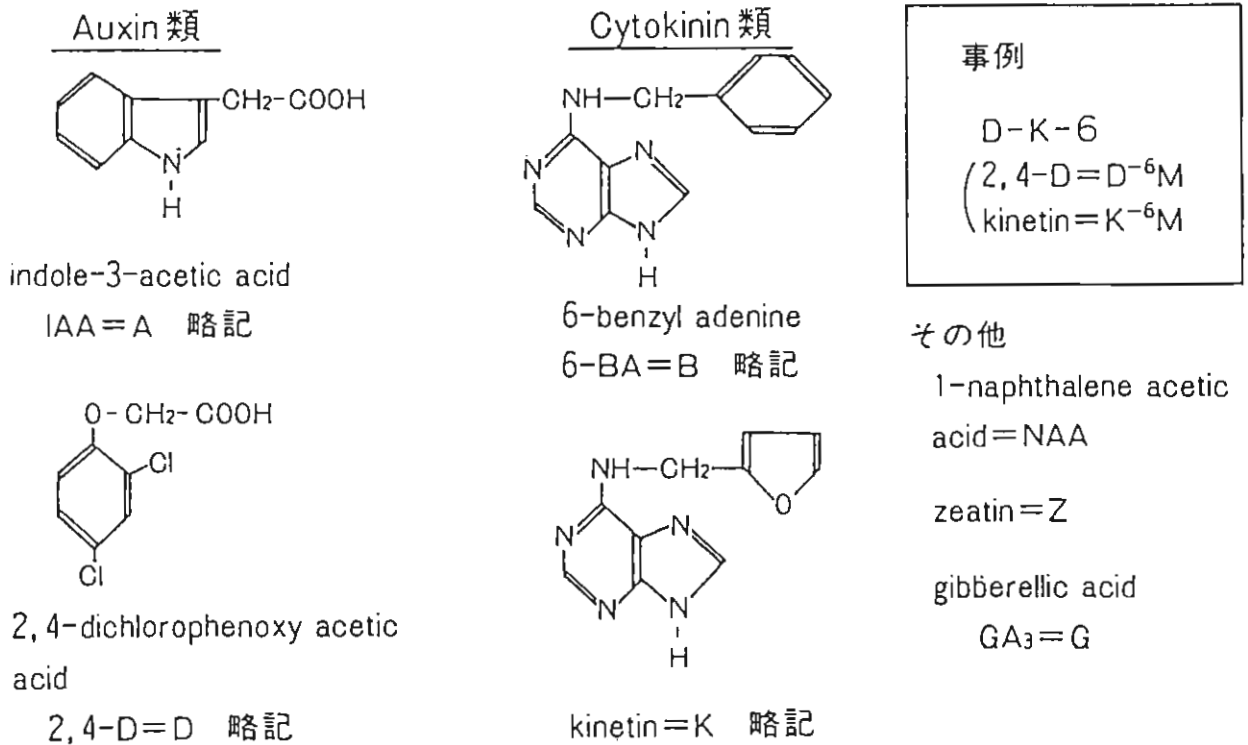


Fig.1. 生長物質と略記号

に実験したアカヤジオウの種子についても同様の結果を得ている。ただし、いずれの場合も北京地黄の増殖率はアカヤジオウに比して著しく大きかった。

1) Callusの形成

Callus形成の試みについては各種条件下で多数の実験を試みたが、この内比較的著明な結果が得られたものについてのみ報告する。いずれも培養4週間後の観察結果である。

Table 2. 地黄Callusの形成条件

実験材料：根 葉 培養条件：1000Lux 蛍光灯照射下、室温

実験No	生長物質	生長状況		
		カルス形成	不定胚	増殖度
I-1	D-0、 K-0	—	—	—
I-2	D-6、 K-0	+	+	++
I-3	D-0、 K-6	—	—	—
* I-4	D-6、 K-6	+	+	+++
I-5	D-5、 K-5	+	+	+

D : 2,4-D K : kinetin

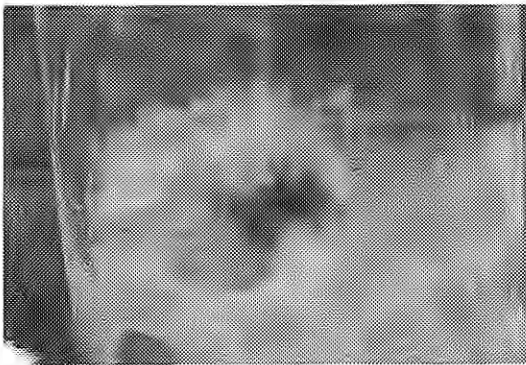


photo.1. D-K-6条件のCallus

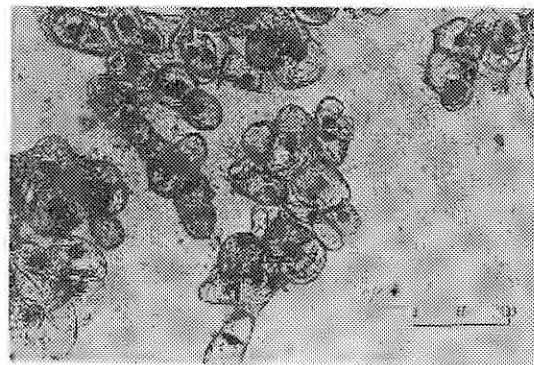


photo.2. Callusの細胞,
3%酢酸オルセイン固定



photo.3. アカヤ地黄, 種子から発芽

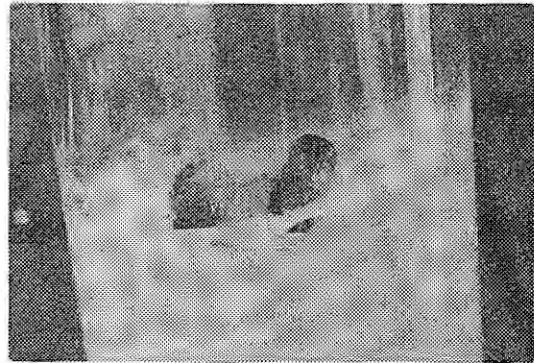


photo.4. アカヤ地黄, D-K-5条件
発芽後Callus化

北京地黄の根及び葉を用いて実施した培養実験中、Table 2に示した5種の条件下の培養において比較的良好なCallus形成が認められたが、その生長状況には格差があり、実験ⅡI-4がこれらの中で最適の培養条件と判断した。実験ⅡI-4のCallusは多数の不定胚を形成し、増殖率も最も大きかった。

2) Callusの継代培養

実験ⅡI-4のCallusを植え継ぎの材料に選び、Table 3に示したように5種の生長物質を用い、それぞれ明暗各条件下で4週間培養を行った。明条件下ではさきのCallus形成実験の場合と同様、「D-6、K-6」の生長物質を用いることによって良好な増殖状態が得られ、細かいながら多数の不定胚が生成した。暗条件下ではいずれも増殖率が低く、顕著な生長はみられなかった。

3) Shooting (幼芽の形成)

実験Ⅱ. II-4のCallusを用いてShooting (幼芽の形成)を試みた。培養条件並びに培養2週間後の結果についてはTable 4に示したとおり、これら培養条件においてはいずれもShootの生成がみられ、この内「B-6×5」のみの生長物質条件において最も顕著であった。

Table 3. 地黄 Callus の継代培養条件

実験材料：I-4 Callus

培養条件：1000Lux 蛍光灯照射下、室温 培養条件：暗、25° 恒温

実験 No.	生長物質	生長状況			実験 No.	生長物質	生長状況		
		不定胚	根	増殖度			不定胚	根	増殖度
II-1	D-0、K-0	-	-	-	III-1	D-0、K-0	+	+	-
II-2	D-6、K-0	+	-	+	III-2	D-6、K-0	-	-	+
II-3	D-0、K-6	+	+	-	III-3	D-0、K-6	+	+	-
* II-4	D-6、K-6	+	+	+++	III-4	D-6、K-6	+	-	++
II-5	D-5、K-5	+	+	+	III-5	D-5、K-5	-	-	+

D: 2, 4-D K: kinetin

Table 4. 地黄のShooting条件

実験材料：II-4 Callus 培養条件：1000Lux 蛍光灯照射下、室温

実験 No.	生長物質	Shooting 状況		
		シュート生成	色調	シュートの生長度
IV-1	A-0、 B-6	+	薄緑色	+
IV-2	A-6、 B-6	+	薄緑色	++
* IV-3	A-0、 B-6×5	+	濃緑色	+++
IV-4	A-6×5、B-6×5	+	濃緑色	++

A: IAA (indole-3-acetic acid)

B: 6-BA(6-benzyl adenine)

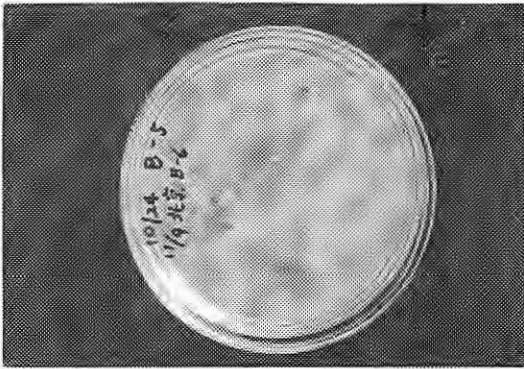


photo.5. シャレー中の幼芽

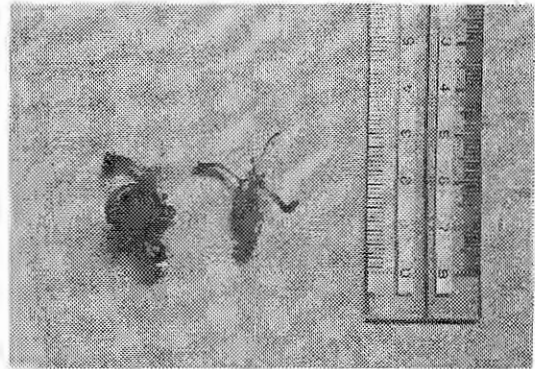


photo.6. 幼芽の大きさ, スケール入り

4) Rooting (根の形成)

実験 No. IV-3 の幼芽を用いて Rooting (根の形成) を試みた。実験 No. IV-3 の幼芽をとり、生長物質を加えず、かつシヨ糖濃度を変更した MS 培地に植え替えた。培養 2 週間後の結果については Table 5 に示したとおり、シヨ糖を含まない培地以外では、いずれも根が生成し生育した。明暗両条件ともシヨ糖濃度 2% において発根、根の生長並びに幼芽の生長が良好であり、明暗両条件の比較では、暗条件下において根の形成がより顕著であった。

Table 5. 地黃の Rooting 条件

実験材料：IV-3 の幼芽

培養条件：1000Lux 蛍光灯照射下、室温 培養条件：暗、室温

実験 No.	シヨ糖濃度 (%)	Rooting 状況		実験 No.	シヨ糖濃度 (%)	Rooting 状況	
		根の形成	根の生長度			根の形成	根の生長度
V-1	3	+	++	VI-1	3	+	++
V-2	2	+	+++	VI-2	2	+	++++
V-3	1	+	+	VI-3	1	+	+
V-4	0	-	-	VI-4	0	-	-

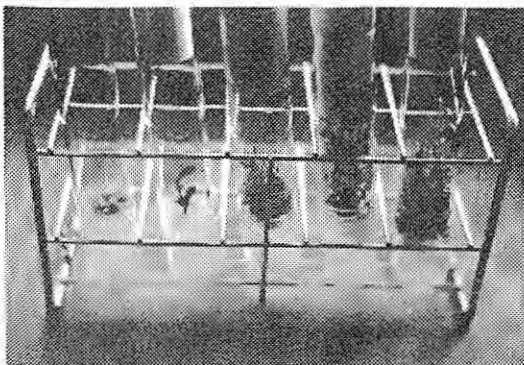


photo.7. Callus → Shoot → Root



photo.8. No Hormone
シヨ糖 1%, 2%, 3%

5) 土壌への移植

幼少苗は滅菌済のバーミキュライトに移植し、約2週間は水分の蒸散を防ぐためビニール布で覆って温室に入れた。2週間後ビニール布を取り除き、そのまま室温内で12月から翌年4月まで育苗し、4月下旬に地植えして11月初旬に収穫した結果、根は約700gで深さ約50cmに達していた。



photo.9 昭和59年4月地植，
7月5日現在の状況

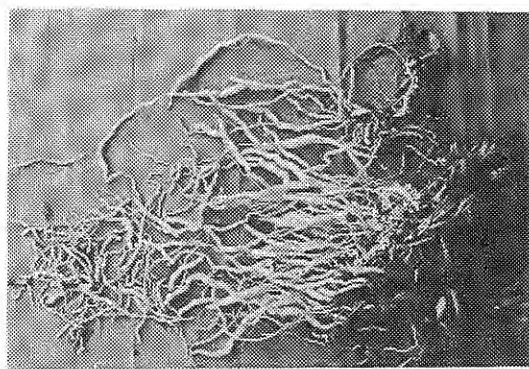


photo.10 昭和59年11月
掘り起こした根700g

考 察

植物の組織培養に関する研究は、すでに農芸関係では盛んに行われており、洋蘭などの花卉や、野菜、果樹苗の栽培で広く実用化されている。薬用植物についても昨今薬学会等で研究成果が発表されるようになってきた。永年生薬製剤や漢方製剤を手がけてきた者として、研究というよりむしろ興味本位から、地黄その他の薬用植物の組織培養を、手探り手法ながら種々試みたところ、地黄については元の植物に復元したのでその経過につき報告した。

アカヤジオウの組織培養実験についての九州大学の西岡らの報告を実験の後期になって入手し、結果的には追試ということになったが、生長物質の使い方には多少の違いはあるものの大筋においてこの報告と本実験報告は一致した。ただ本実験の材料として使用した中国産北京地黄はアカヤジオウに比べてCallusの生長力は約3倍程度著しく、これが地黄の品種差によるものか、或いは実験以前の栽培条件の違いによるものかは不明である。

本実験の内容は学術的には初歩的な段階であり、これを地黄の組織培養法として確立するには、更に多種類の生長調節物質の各濃度の組合せにより系統的に実験を行い、その結果について統計的に処理し、再現性等も考慮して最適条件を見出す必要がある上、内容成分との関連性等についても十分研究すべきであると判断している。その他、生長調節物質を用いることによる染色体の変化の有無等の観点から原植物と同定することや、幼苗のウイルス・フリーの確認等も必要である。現在私はこれらの技術についての知識は乏しいが、ウイルスは別として、組織培養によって得られた幼苗は細菌並びにかびによる汚染はないものと考えられる。また、種子内部のウイルス汚染はないとされているところから、今回の実験中アカヤジオウの種子を実験材料として組織培養した幼苗はウイルス・フリーであると判断している。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導いただいた富山医科薬科大学 吉崎正雄助教授、農博 鈴木正一氏、藤野広春氏並びに生薬資源開発(株)代表取締役 橋本竹二郎氏に深謝致します。

文 献

- 1) 西岡五夫他：アカヤジオウの栽培研究(1)組織培養による増殖法について，日本薬学会第 102 年会講演要旨集，P， 575（1982）
- 2) 西岡五夫他：アカヤジオウの栽培研究(2)組織培養による増殖について，日本薬学会 103 年会講演要旨集 P， 256（1983）
- 3) 西岡五夫他：アカヤジオウの栽培研究(4)ウイルス・フリー株，通常株，罹病株の 2 次代謝成分について，日本生薬学会第 31 回年会（東京）講演要旨集 P， 63（1984）

解熱鎮痛薬、鎮咳去痰薬及びかぜ薬の高速液体クロマトグラフィーによる定量法の検討^{*1}

藤井 則善, 山崎 洋子
株式会社広昌堂 試験室^{*2}
Noriyoshi FUJII
Youko YAMAZAKI

解熱鎮痛薬、鎮咳去痰薬、及びかぜ薬に配合される成分のHPLCによる定量法に関しては、かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法¹⁾をはじめ多数報告^{2)~17)}されているが、日々の品質管理上、特に多品目少生産に対応する際は、一定のカラムや移動相を用いるなどして試験操作の統一化をはかるのが望ましいと考え、繁用される成分について、以下定量を試みたので報告する。

実験の部

1. 標準品、内部標準物質 (I S) 及び試料

Table. 1 に示した日局、局外規等収載のもので含量 99.0% 以上含むものを用いた。また適宜標準品も I S として使用した。試料は弊社製の内服固型製剤 (散剤、顆粒剤等) を用いた。

2. 装置及び条件

装置：島津高速液体クロマトグラフ LC-5 A, 検出器：島津 SPD-2 A 紫外外部吸収検出器, カラム：Zorbax ODS (Du-Pont社製 4.6 mm × 25 cm), 移動相：A 薄めたリン酸 (1 → 4000) - アセトニトリル (75 : 25) B 全体に 0.3% のラウリル硫酸ナトリウムを含む薄めたリン酸 (1 → 4000) - アセトニトリル (50 : 45), 流速：1 ml/min, 温度：50°, 測定波長：280 nm 254 nm 210 nm, 検出感度：0.16 A U F S.

Table 1.

Mobile Phase	Components	Extraction Solvent	Internal Standard	UV (nm)
A	Acetaminophen (ACET, 1)	CH ₃ CN- CH ₃ OH (3 : 7) Soln.	Guaiacolglyceryl- ether (12) or Phenol (13) etc,	280
	Bucetin (BUCE, 2)			
	Ethenzamide (ETHE, 3)			
	Caffeine anhyd. (CAFE, 4)			
	Aspirin (ASPR, 5)			254
B	Allylisopropylacethylurea (ALLY, 6)	0.01 N H ₂ SO ₄ Soln.	Tipepidine Citrate (14) etc,	210
	Bromovalerylurea (BROM, 7)			
	Dihydrocodeine Phosphate (CODE, 8)			
	dl-Methylephedrine Hydrochloride (EFED, 9)			
Noscapine (NOSC, 10)				
Chlorpheniramine Maleate (CHLO, 11)				

* 1 第 4 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表, (富山, 1984 年 12 月 6 日)

* 2 〒939-04 富山県射水郡大門町水戸田 2841 TEL 0766 (54) 1007

3. 定量法

試料を粉末とし一定量採取し抽出溶媒, 更に内部標準溶液を正確に加えて10分間超音波抽出し移動相を加えるなどして定容した後ろ過し, ろ液の一部を0.2 μ mのメンブランフィルターに通過させ試料溶液としHPLCを行い, あらかじめ標準溶液を用いてデータ処理機に記憶させておいた検量線から各成分の含有率(%)を自動表示させた Fig. 6。

実験結果

1. HPLC条件の検討

逆相系カラムを用い, アセトニトリル-水系で分離させ解熱鎮痛作用成分(A成分)にあっては主として高波長で, 又鎮咳去痰作用成分及び抗ヒスタミン剤(B成分)ではカウンターイオンを加え溶出力の強い移動相を用い短波長で検出した。K'に対する移動相中のアセトニトリル濃度の影響はFig. 1に示すとおりで, 各成分が完全に分離しかつK'が8以下になるような移動相を選んだ。

2. 検量線及び回収率

Fig. 2に示すように各成分共ほぼ原点を通る良好な直線性を示し($r = 0.9992 - 0.9999$), また被検成分をとり去った試料に標準品を添加し回収率を求めたところ, Table 2のとおり満足すべき結果を得た。

3. 定量結果

1) 解熱鎮痛薬(鎮静成分を含まない場合) Fig. 3

a) はアセトアミノフェン, 無水カフェイン, ブセチン配合剤で, ブセチンのほかエテンザミドが配合されていても可能である。

b) はアスピリン, 無水カフェイン配合剤で, ISとしてブセチンを用いた。

2) 解熱鎮痛薬(鎮静成分を含む場合) Fig. 3

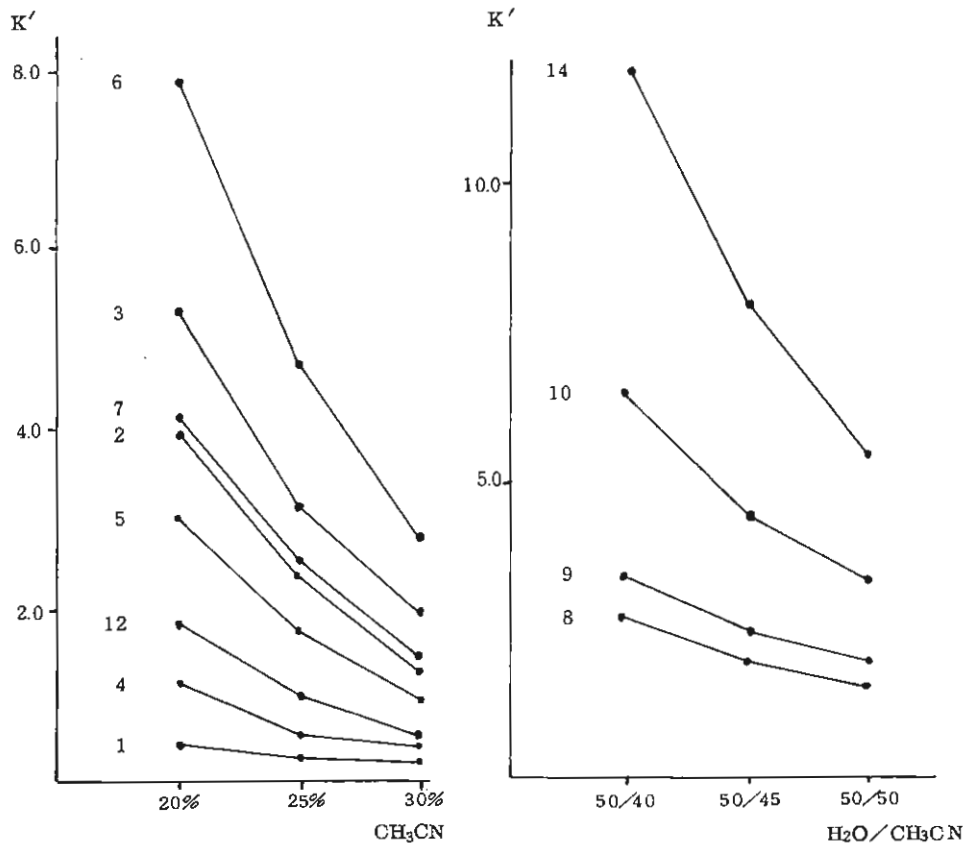


Fig.1. Effect of Acetonitrile Concentration in Mobile Phase on K' Value

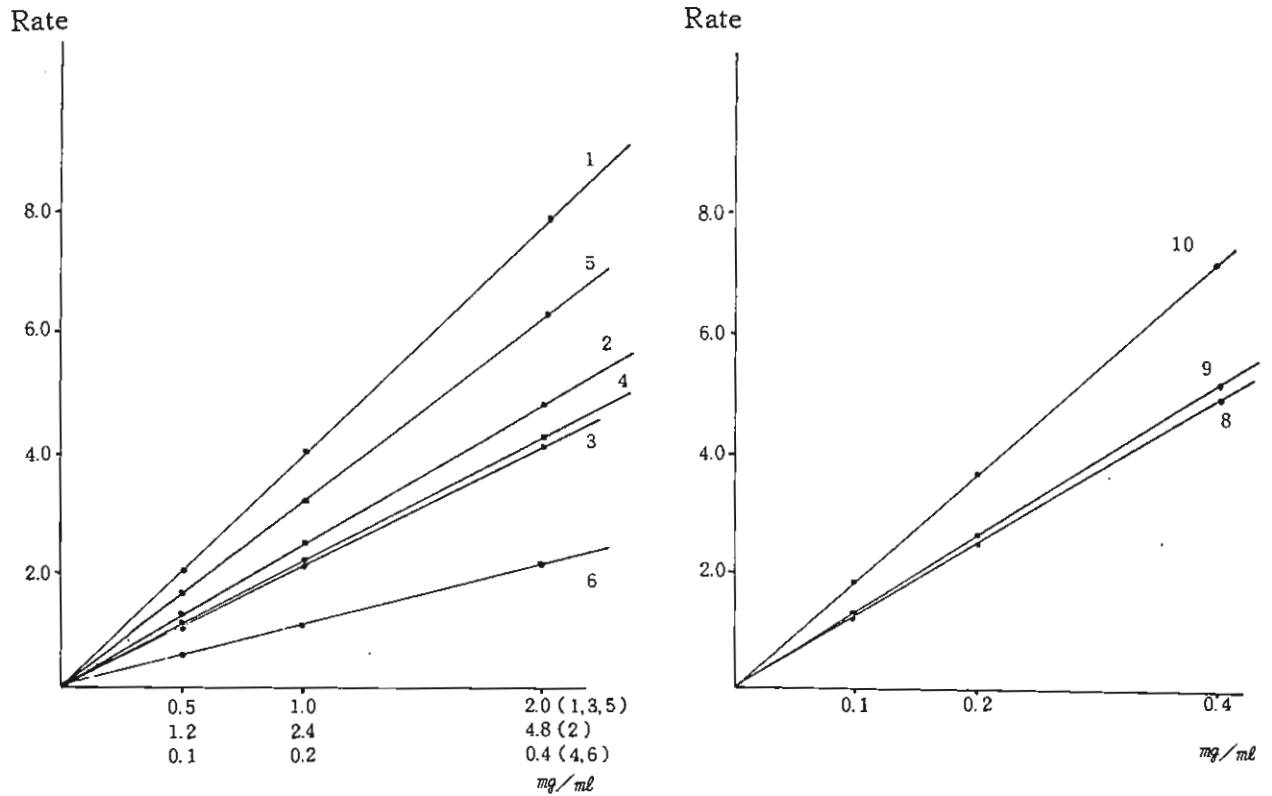


Fig.2. Calibration Curves

Table 2. Recoveries

Component	ACET	BUCE	ETHE	CAFE	ASPR	ALLY	CODE	EFED	NOSC	CHLO
Recovery (%) N = 3	100.6	98.3	99.8	99.1	99.5	99.0	99.7	99.7	97.2	99.7
C. V (%)	0.72	0.98	0.61	0.92	3.28	2.10	0.81	1.21	3.04	2.10

c) はアセトアミノフェン，無水カフェイン，エテンザミド，アリルイソプロピルアセチル尿素配合剤で，最初に 280 nm で 3 成分を定量した後，同じ抽出液を用いて 210 nm でアリルイソプロピルアセチル尿素を定量した。この時 2 番目の IS としてブセチンをあらかじめ内部標準溶液に加えた。（ただし本法ではブロムワレリル尿素とブセチンの分離が不完全であるので，これらの配合剤では移動相比率を変える等の検討が必要である）

3) 鎮咳去痰薬 Fig. 4

d) はリン酸ジヒドロコデイン，*dl*-塩酸メチルエフェドリン，ノスカピン，マレイン酸クロルフェニラミン，ジプロフィリン，グアヤコールスルホン酸カリウム配合剤で，リン酸ジヒドロコデイン，*dl*-塩酸メチルエフェドリン，ノスカピンを同時定量した。この時ジプロフィリンとグアヤコールスルホン酸カリウムは保持が弱くジヒドロコデイン以前に溶出した。e) はリン酸ジヒドロコデイン，*dl*-塩酸メチルエフェドリン，マレイン酸クロルフェニラミン配合剤で，IS としてノスカピンを用いた。また d)，e) 共マレイン酸クロルフェニラミンは K' が大きくかつ含有量も少ないために，ピークは出現するが同時定量は不可能であったので，新たに抽出操作を行い，流速を 1.3 ml/min として別個に定量した。

4) かぜ薬 Fig. 5

f) はアセトアミノフェン，無水カフェイン，エテンザミド，ヘスペリジン，*dl*-塩酸メチル

エフェドリン、ノスカピン、マレイン酸クロルフェニラミン配合剤で、1) ~ 3) を準用し3法に分け定量を行った。A成分定量の際、ISとしてフェノールを用いた。この時B成分のうち、クロルフェニラミン、ノスカピンは保持が強くピークが出現せず、一方メチルエフェドリンは高波長ではほとんど吸収がない上にA成分に比べて配合量が少ないため溶出されているものの、クロマトグラム上にピークは出現せず、妨害とならなかった。(リン酸ジヒドロコデイン配合の場合も同様である) 更にB成分定量の際、A成分はイオンペアに供することなく溶出力が強いためにメチルエフェドリン以前に出現し妨害とならなかった。またマレイン酸クロルフェニラミンは3) 同様別個に操作した。

これら製剤中の各成分の定量結果は Table 3 のとおりで、満足すべき結果を得た。

考 察

HPLCは比色定量法、GCに比べ適用範囲も広く、再現性や分離性又分析精度の面でも優れている反面、カラムのメーカーやロット間の分離性のバラツキも多く性能の経時変化が大きいという欠点もある。¹⁸⁾ 例えば、Fig. 1 に示した移動相比率においても個々のカラムにより異なる事は勿論のこと、長期間使用する場合は劣化に伴う相対的な再検討が必要となる。またカラムの入口側に空間が生じることによるためにピークがブロードとなったりショルダーピークの発生(物理的劣化)や、疎水相互作用の変化による特定成分の K' の減少(化学的劣化)といった現象を生じることもある。著者らもFig. 6に示すようにカラムの使用時間約300時間で、分離度の減少、ブセチンの保持時間の減少をみた。ただし、定量性にはほとんど影響はなく良好な定量値が得られた。^{19), 20)}

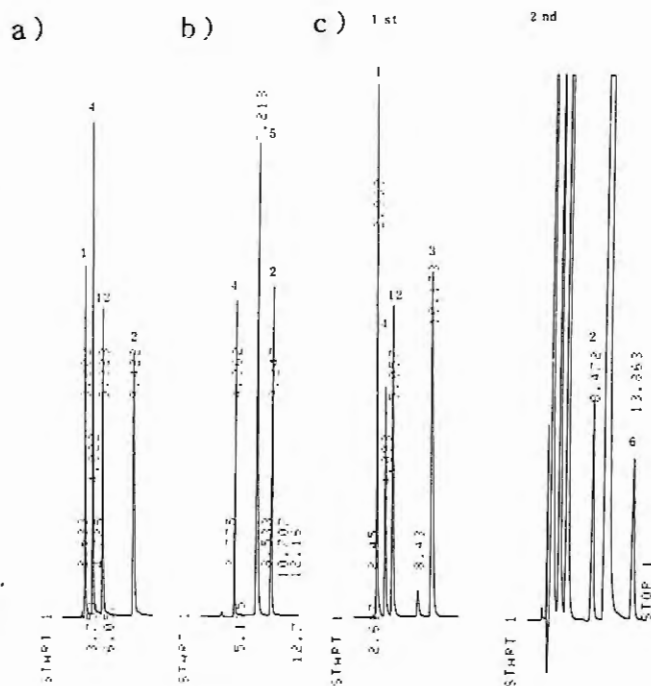


Fig.3. Chromatogram of Antipyretic Analgesics

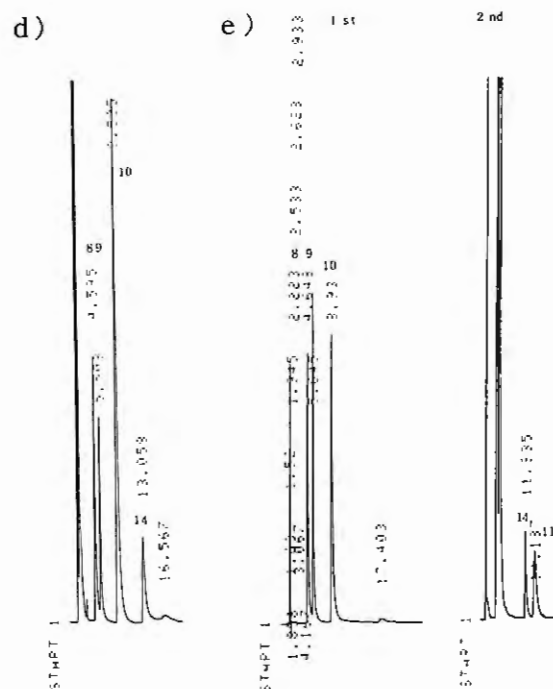


Fig.4. Chromatogram of Antitussives and Expectorants

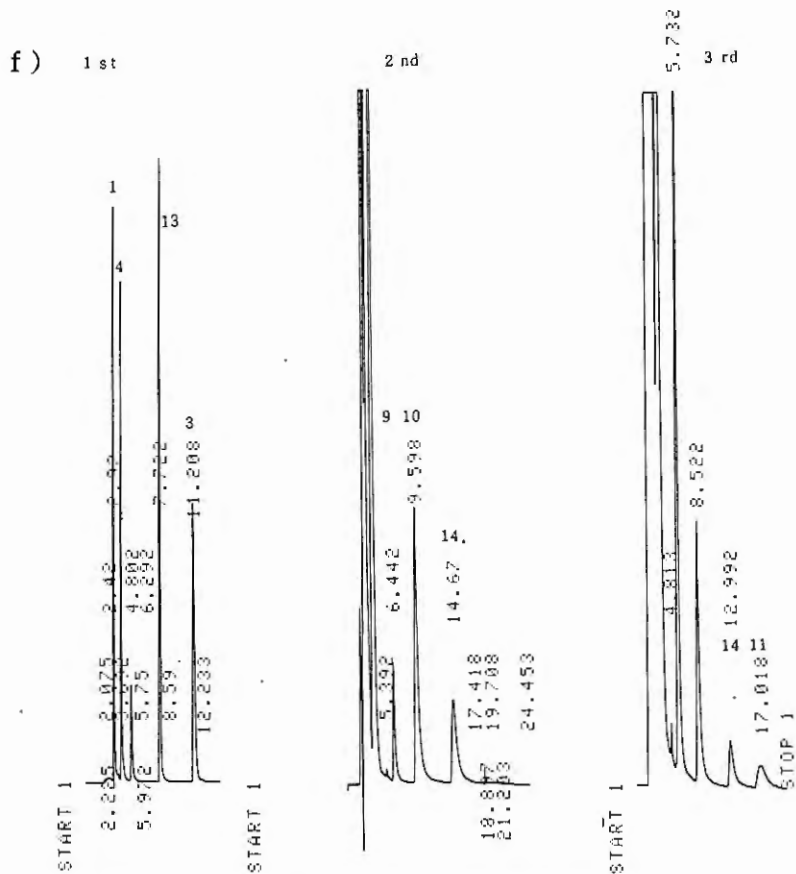


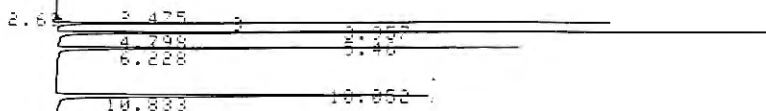
Fig.5 Chromatogram of Anti - cold drug

a), b), c) Powder form d) tablet form
 e), f) granula form
 Peak NO. is shown in Table. 1

Table.3 Determination in Phamaceutical Preparations

Component	Amount (%)									
	ACET	BUCE	ETHE	CAFE	ASPR	ALLY	CODE	EFED	NOSC	CHLO
Antipyretic- Analgesics	99.5	99.1		99.6						
	99.4		99.1	95.2		104.3				
				98.0	97.3					
Antitussives and Expectorants							97.8	94.5	94.2	
							97.4	98.3		102.5
Anti-cold drug	100.4		102.5	103.7				95.5	101.2	98.3

START 1



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	143992		2	97.6792	ACET
2	3.957	258963	V	3	100.9529	CAFE
3	5.46	179550	V	1		IS
4	10.052	234771	S	4	102.7368	BUCE
TOTAL					817277	301.3689

START 1



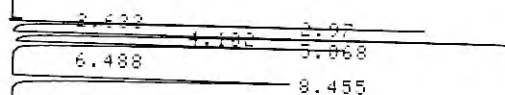
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.002	155305	S	2	101.7397	ACET
2	4.023	259729	SV	3	97.7784	CAFE
3	5.327	189928	SV	1		IS
4	9.43	235150		4	99.3728	BUCE
TOTAL					836111	298.8908

START 1



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3.058	166122		2	108.2767	ACET
2	4.147	257458	V	3	96.4338	CAFE
3	5.168	186872	V	1		IS
4	8.74	235821		4	99.1532	BUCE
TOTAL					846274	303.8637

START 1



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.97	157606		2	101.5777	ACET
2	4.102	259344	V	3	96.0546	CAFE
3	5.068	188984	SV	1		IS
4	8.455	234399		4	97.4534	BUCE
TOTAL					840333	295.0857

START 1



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.905	143028		2	94.9865	ACET
2	3.917	248965	V	3	95.0156	CAFE
3	4.723	183405	SV	1		IS
4	7.59	238713		4	102.2664	BUCE
TOTAL					814111	292.2685

Fig.6. Change of Chromatographic Performance with the Passage of Time

ま と め

解熱鎮痛薬、鎮咳去痰薬、及びかぜ薬のHPLCによる定量法を検討し、繁用される成分については2種類の移動相を用いて定量が可能であった。一方カラムの分離性や劣化に対応して適切な流路系の選択が必要とされるが、今後はさらに分離性が良くしかも安価なカラムを順次使用するなどにより、品質管理上増々利用価値の高いものとなると考えられる。

謝 辞

貴重な資料を提供していただきました昭和薬品株式会社富山営業所長 北山茂氏に深謝致します。

文 献

- 1) 日本公定書協会編, “かぜ薬・解熱鎮痛薬の試験法” P 125, 薬業時報社, 東京, (1980)
- 2) 立沢政義, 衛生化学, 25, 284 (1980)
- 3) Reemyer.J.C. et al, J. Pharm. Sci., 68, 167 (1979)
- 4) Mc Sharry W. O. et al, ibid, 69, 212 (1980)
- 5) Gupta V. D., ibid, 69, 110 (1980)
- 6) Leo L. Y. et al, J. Chromatogr., 181, 473 (1980)
- 7) Williams K. J. et al, ibid, 194, 217 (1980)
- 8) 立沢政義ら, 衛生化学, 23, 282 (1977)
- 9) 立沢政義ら, 分析化学, 27, 753 (1978)
- 10) 服部忠雄ら, 薬誌, 99, 537 (1979)
- 11) Gupta V. D. et al, J. Pharm. Sci., 68, 118 (1979)
- 12) Koziol T. R. et al, ibid, 68, 1135 (1979)
- 13) Lindberg W. et al, J. Chromatogr., 211, 201 (1981)
- 14) Curry S. H. et al, ibid, 231, 361 (1982)
- 15) Pettit B. C. et al, ibid, 242, 189 (1982)
- 16) Robert S. E. et al, ibid, 242, 364 (1982)
- 17) 中島慶子ら, 衛生化学, 28, 286 (1982) 等
- 18) 原昭二ら編, “クロマトグラフィー分離システム 考え方・選び方”, P 10, 140, 丸善, 東京, (1981)
- 19) 長島靖臣ら, 製薬工場, 4, 233 (1984)
- 20) 粟田則男ら, 薬剤学, 38, 146 (1978)

パップ剤中のベルベリンの定量法*¹

寺西昌明

テイカ製薬株式会社*²

Masaaki TERANISHI

オウバク末中の有効成分であるベルベリンの定量法に関しては、数多くの報告^{1)~9)}がなされているが、パップ剤にオウバクを配合した場合、そのベルベリンについては従来法をそのまま適用することはできなかった。

今回著者らは上述の理由によりパップ剤に配合されたオウバク末中のベルベリンの定量法について高速液体クロマトグラフ法を用いて検討し、あわせて迅速で簡便な前処理法としてセップパックC₁₈カートリッジの適用を試み、前処理法として有用と考えられたので、その結果を報告する。

実験の部

1. 試料及び試薬

試料：外用成形パップ剤にオウバク末を1%配合したもの。

標準品：日局塩化ベルベリンをエタノール溶液(1→2)で3回再結晶し、シリカゲルデシケータ中に10日間放置したもの

pH 3.0 酢酸アンモニウム緩衝液¹⁰⁾(以下緩衝液と略す)：0.05 M 酢酸アンモニウム溶液に氷酢酸を加えてpH 3.0に調製する。

緩衝液・アセトニトリル混液(74 : 26)

“ (50 : 50)

“ (90 : 10)

セップパックC₁₈カートリッジ(Waters社製)：メタノール2 ml, アセトニトリル2 ml, 水2 mlで順次洗浄し緩衝液2 mlを通しておく。

メタノール・氷酢酸混液(1 : 1)

2. HPLC条件

検出器：紫外吸光度計(検出波長254 nm)

カラム：Waters社製Z型加圧モジュール Radialpak μ -Bondapak C₁₈ (8 mm I.D. × 10 cm)

カラム温度：室温

移動相：緩衝液・アセトニトリル混液(74 : 26)

流量：2.0 ml/min

3. 内部標準溶液の調製

P-ヒドロキシ安息香酸エチル約50 mgをとり、アセトニトリルを加えて溶かし正確に100 mlとする。その5 mlを正確に量り移動相を加えて正確に50 mlとし、内部標準溶液とする。

4. 標準溶液の調製

塩化ベルベリン標準品約50 mgを精秤し、アセトニトリルを加えて溶かし正確に100 mlとする。

* 1 第4回家庭薬開発研究会シンポジウム発表、(富山、1984年12月6日)

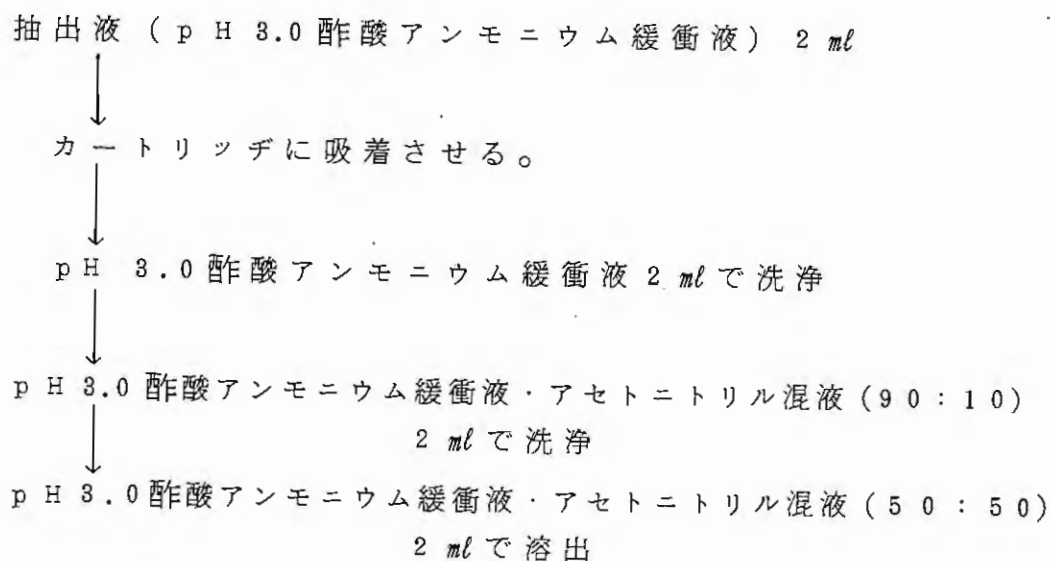
* 2 〒930 富山市荒川250 TEL 0764 (31) 8881

この液 5 ml を正確に量り移動相を加えて正確に 50 ml とする。この液 2 ml を正確に量り内部標準溶液 1 ml を正確に加え、移動相を加えて正確に 5 ml とし標準溶液とする。

5. 試料溶液の調製

試料を酢酸・メタノール混液 (1 : 1) 80 ml で 3 回 (それぞれ 2 時間, 1 時間, 1 時間) 還流抽出し、全抽出液をあわせ減圧下溶媒を留去する。残留物に緩衝液を加えて加温し溶解した後、緩衝液で正確に 50 ml とする。この液 2 ml を正確に量りセップパック処理 (Table 1) し、内部標準溶液 1 ml を正確に加え、移動相で正確に 5 ml とし試料溶液とする。

Table 1. セップパック処理



6. 定量法

標準溶液及び試料溶液の各 25 μl ずつを HPLC に注入し、得られたクロマトグラムの内部標準に対するベルベリンのピーク面積比を求め、次式により含量を算出する。

$$\text{試料 } 100 \text{ g 中のベルベリン量 (C}_{20}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N) (mg)} = \text{標準品の量 (mg)} \times 0.95 \times F \times \frac{1}{20} \times \frac{AT}{AS} \times \frac{100 \text{ (g)}}{\text{試料採取量 (g)}}$$

$$0.95 : \frac{\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_5}{\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4\text{Cl}} = \frac{353.7}{371.82} = 0.95$$

F ; 塩化ベルベリン標準品を日局第 1 部医薬品各条塩化ベルベリンの定量法に準じて定量したときの塩化ベルベリンの含有率

結果および考察

1. HPLC 条件の検討

製剤にオウバク末を配合した場合の HPLC の条件検討においては、主塩基であるベルベリンのピーク位置と副塩基であるパルマチンなどのピーク位置が一致することがあり、ベルベリン含量が実際より高くなることがあり、注意を要する。

筆者らは副塩基との分離性及び溶出時間を考慮して、移動相は緩衝液・アセトニトリル混液 (76 : 24) とした。したがって塩化ベルベリンを配合した製剤にあっては、アセトニトリル濃度をあげることができる。

2. 検量線の作成

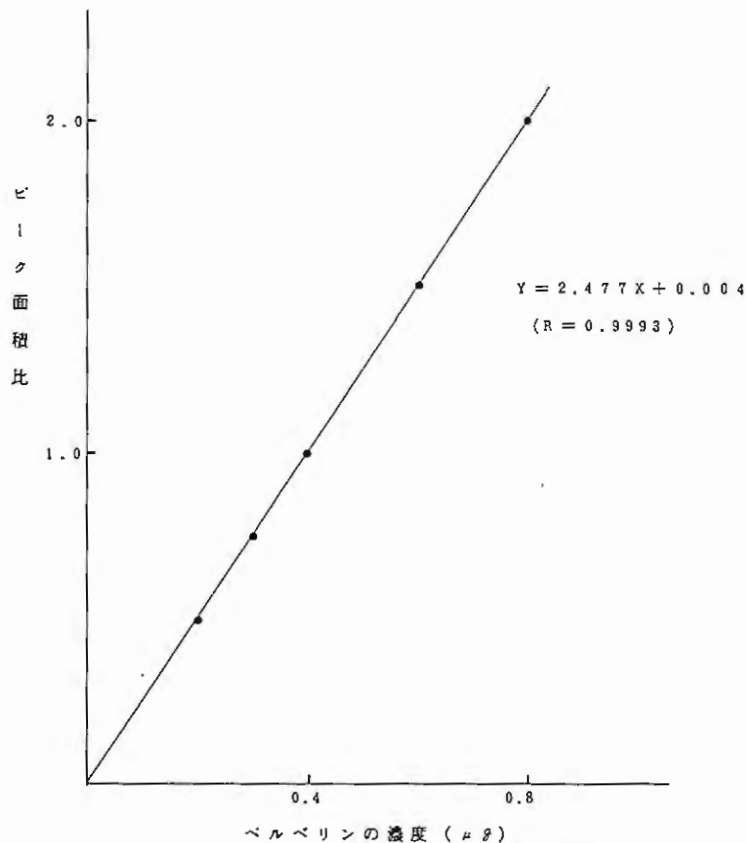


Fig.1. ベルベリンの検量線

Table 2. 抽出溶媒の検討 (還流抽出)

抽出溶媒	還流抽出2回
メタノール	74.4%
メタノール 1%クエン酸	79.4%
メタノール・酢酸混液 (3:1)	93.2%
メタノール・酢酸混液 (1:1)	101.5%

(注) 配合されたオウバク末中のベルベリン量を100%としたときの
パップ剤中のベルベリンの回収率 (n=3)

ベルベリンとして0.8 μg - 0.1 μgの範囲における検量線を作成したところ、Fig. 1 にみられるごとく相関係数0.9993で原点をとる良好な直線性を示した。

3. 抽出溶媒の検討

試料中のベルベリンの抽出に際しては、回収率などから還流抽出を選択した。

抽出溶媒については、メタノール・酢酸混液 (1:1) が最も短時間に抽出を完了することが可能であった (Table 2)。この結果はオウバク末からのベルベリンの抽出溶媒を検討した江尻²⁾らの報告とはば一致した。

4. セツパックC₁₈からのベルベリンの回収率

Table 3. Seppak 処理による標準溶液の回収率
(アセトニトリル Buffer 系)

No.	回収率	平均
1	100.1	
2	99.7	
3	100.5	100.1%

ただし測定は吸光度法 ベルベリンとして500 ng 総量

Table 4. ベルベリンの回収率及び再現性

No.	オウバク末 (含有率%)	パップ剤 (回収率%) (注)
1	2.365%	100.4%
2	2.377	98.8
3	2.306	99.7
4	2.353	102.5
5	2.341	97.9
平均値	2.348%	99.9%
CV	1.16%	1.75%

(注) 配合されたオウバク末のベルベリンを100%としたときの
パップ中のベルベリンの回収率 (%)

セップパック C₁₈ カートリッジへのベルベリンの吸着及び溶出は良好で、回収率はほぼ 100% であった (Table 3.)。

パップ抽出液の場合、水-メタノール系による溶出では溶出液が白く濁るなどの問題があり、アセトニトリル-緩衝液系を採用した。洗浄液、溶出液の溶媒の選択については、各製剤ごとに最適の条件を選択することが可能であり、その点ベルベリンは有色物質であるので操作は容易である。

5. 再現性及び回収率

本法における再現性は良好で、オウバク末、パップ剤ともに CV は 2% 以内であった。また、

配合されたオウバク末中のベルベリン量を 100 %としたときのパップ剤中のベルベリンの回収率はほぼ 100 %であった (Table 4.)。

6. セツパック処理

本法におけるセツパック処理の意義については議論のわかれるところである。

夾雑成分が多量にある抽出液の場合、セツパックのベルベリンの吸着能は相対的に低下し、吸着させる液量を増やすことができない。またカートリッジのデッドスペースの影響による誤差、内部標準物質をどこで加えるかなどの問題のため、本法では結果的にセツパック処理によりベルベリン濃度が希釈されることとなった。

Fig. 2 は本法によって得られたクロマトグラムである。本法による条件ではセツパック処理をしなくても定量可能なクロマトグラムを得ることができる。

一般に軟膏剤やパップ剤などの抽出液を HPLC 法により定量する場合、他の製剤に比べてカラムの劣化が非常に早く、大事なカラムをボツにしたときの無念さを味わった分析者はかなり多いことと思うが、カラムを消耗品としてわりきる考え方もあり、カードカラムを頻繁にとりかえる方法もある。要は分析者の選択である。

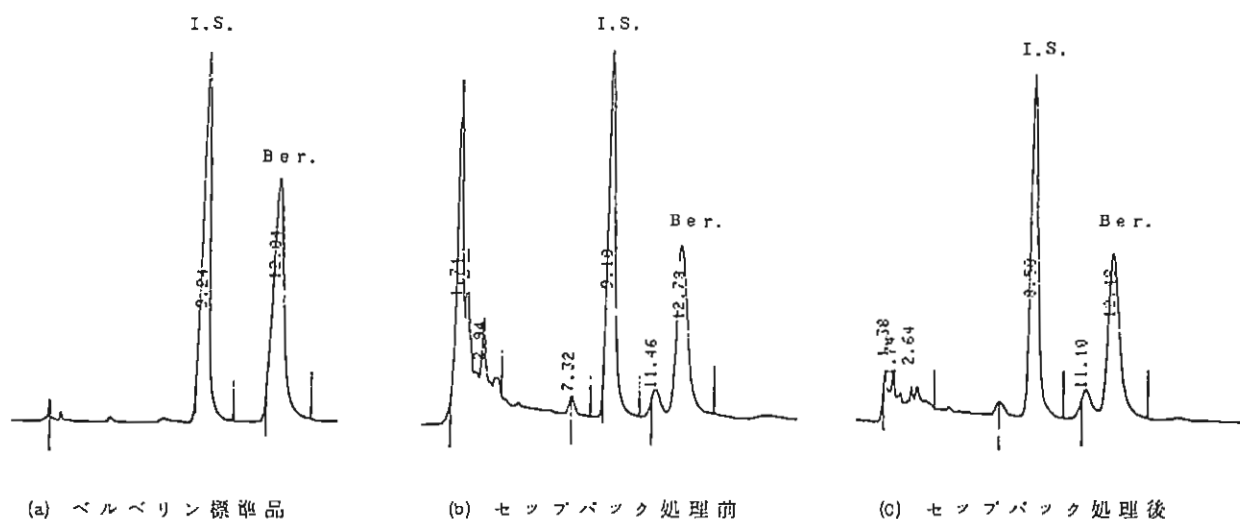


Fig. 2. 各種試料のクロマトグラム

7. セツパック処理のその他の定量法への適用

1) シリカゲルカラム法

<方法>文献に従う。

<結果>

パップ抽出液中のベルベリンはシリカゲルカラムに保持されずメタノールで溶出した。これはパップ基剤中の夾雑物の影響と考えられたが、試料をセツパック処理したものは定量が可能であった。

2) 薄層デンストメトリー法

<方法>プレート: Merck KieselGel F₂₅₄

展開溶媒: n-ブタノール・酢酸・水 (7:2:1)

スポット量: 5 μ l

測定法: ケイ光ジグザグスキャン

励起波長: 365 nm

〈結果〉

パップ抽出液中のベルベリンは標準のベルベリンと比較してRf値が上部に移動し、かつ各スポット間にテーリングが観察されデンストメトリー法には不適と考えられた。

セップパック処理後は各ベルベリンのRf値は一致し、テーリングがかなり改善された。ケイ光法の場合は測定感度の点でHPLC法より優れているが、スポットの広がり具合やテーリングなどにより再現性が大きく左右されることが知られている⁵⁾。Fig. 3にケイ光ジグザグスキャンにより得られたクロマトグラムを示した。特にセップパックをしない場合、ベルベリンの前のパルマチンを考えられるピークはテーリングが激しくスポットとして検出されない場合もあった。

このようにセップパック処理はパップ剤中のベルベリンの定量においてRf値の不一致の防止、テーリングの改善などに有効であることを認め、HPLC法に比較してさらに高感度を有するケイ光デンストメトリー法を適用することが可能となり、他の副塩基類のケイ光定量にも応用できることが期待された。

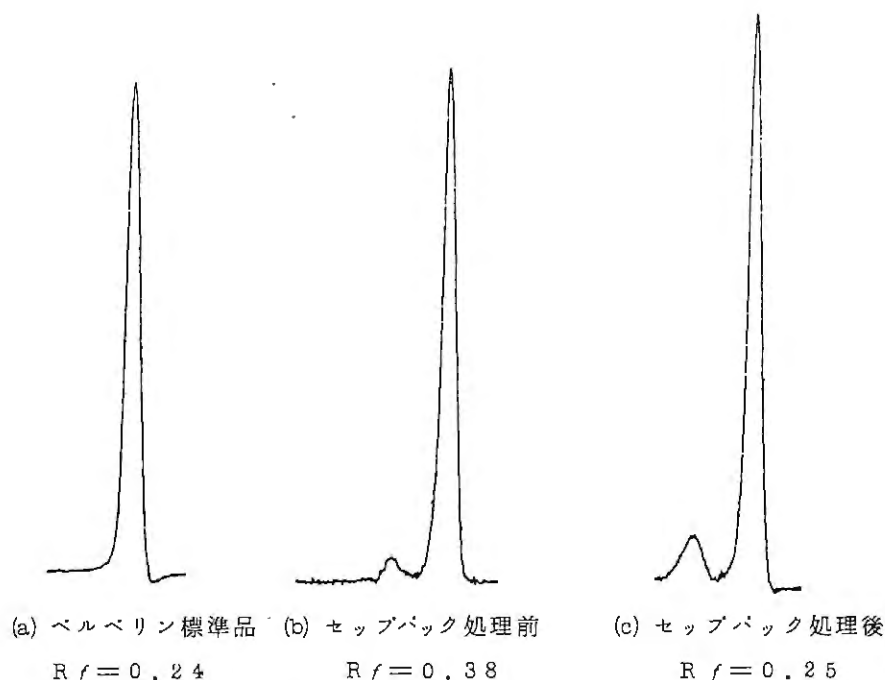


Fig.3. 各種試料のクロマトグラム
TLC-DM法 ケイ光ジグザグスキャン

結 論

1. オウバク末を配合したパップ剤中のベルベリンの定量において高速液体クロマトグラフィー法による再現性の良好な定量法を確立し、品質管理面に供することができた。
2. セップパックC₁₈カートリッジを用いた迅速で簡便な前処理法を考案し、パップ剤中のベルベリンの定量においては、HPLC及びケイ光デンストメトリー法に、特に有用であることを認めた。

文 献

- 1) 江尻千鶴子, 高島正市; 薬事研究所所報 50年・51年合併号 47~56
- 2) 江尻千鶴子, 高島正市; 薬事研究所所報 50年・51年合併号 57~61
- 3) 佐藤和男, 外岡弘道, 鹿毛有道, 尾崎昭雄, 大久保晶子; 厚生科学研究報告 昭和49年度(続報) 89~98

- 4) 服部忠雄, 井上正秀, 早川昌克; 薬学雑誌 97 (11) 1263 - 1266 (1977)
- 5) 黒田純夫, 河内敬朝; 医薬品研究 7 (2) 154 - 160 (1976)
- 6) 赤田良信, 棚瀬弥一郎; 薬学雑誌 97 (8) 940 - 943 (1977)
- 7) 石川治, 橋本勉, 中嶋暉躬, 田中治, 糸川秀治; 薬学雑誌 98 (7) 976 - 979 (1978)
- 8) 赤田良信, 河野貞子, 棚瀬弥一郎; 薬学雑誌 100 (7) 766 - 770 (1980)
- 9) 森井一仁, 窪田薄, 近藤弘之; 家庭薬研究 16 2 77 - 82 (1983)
- 10) 製剤分析講習会資料; 富山県薬事研究所 (昭和 59 年 3 月 12 日)

目薬容器のクラックについて*1

飯 倉 康 男, 針 原 悦 子
鷹 巢 美 由 起
第一薬品株式会社 研究部 *2
Yasuo IKURA
Etsuko HARIHARA
Miyuki TAKASU

目薬容器としては、現在ほとんどの点眼薬メーカーがプラスチック樹脂製のものを使用している。筆者らは透明性、加工性に優れ、商品価値も高く、しかもコストが安く、目に爽快な気分を与える ϵ -メントールの吸着の少ないポリカーボネート（以下PCと略す）樹脂の目薬容器を長年使用している。しかし点眼薬製造の段階では認めないが、経時的に目薬容器（Fig. 1）の特に口頸部にクラック（Fig. 2）が観察される。このクラックが原因でまれには液漏れや内容物の異常減少が観察される。

このクラック発生の原因とその対応策に若干の知見を得たので報告する。

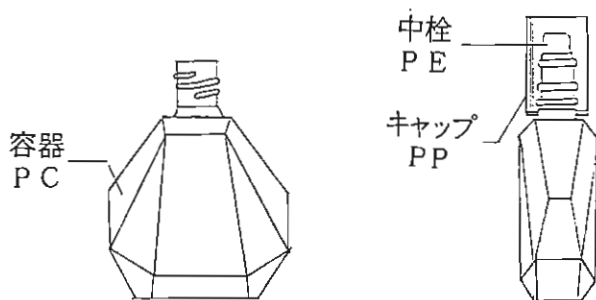


Fig. 1. 目 薬 容 器

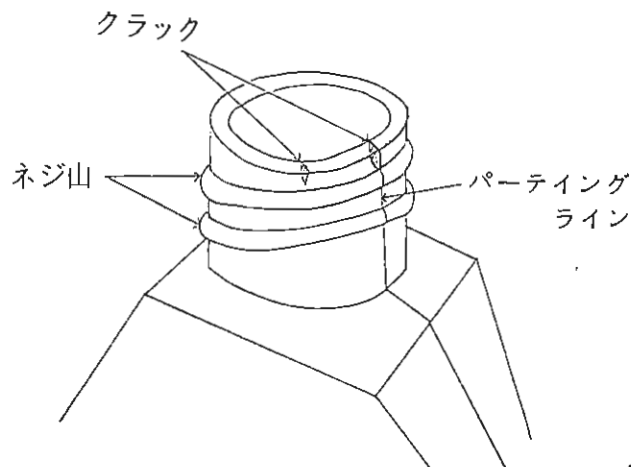


Fig. 2. 目薬容器口頸部のクラック

原 因

クラック発生の原因として、PC樹脂容器の場合は点眼液中に含まれる保存剤の塩化ベンザルコニウム等の第4級アンモニウム塩や塩素イオンにより、PCのモノマーである、ビスフェノールAを生成しクラックを発生し易い¹⁾。また点眼液のpHが中性～弱アルカリ性側では第4級アンモニウム塩の存在により、クラックの発生がより著しくなる。目薬容器の成形時、特に口頸部に歪を生じ、中栓を嵌め更にキャップを施すことにより歪、いわゆる内部応力を更に増大させストレス性のクラックを発生し易くなる²⁾。

通常は点眼液の成分やpHに由来するものと、目薬容器に由来するものとが相互に作用してクラック

* 1 第4回家庭薬開発研究会シンポジウム発表、(富山、1984年12月6日)

* 2 〒930 富山市荒川250 TEL 0764 (32) 2736

ク発生の原因となる。

目薬容器の製造方法は、今回取り上げたA社、B社共同インジェクションブロー法により作られている。この方法は、正確にはインジェクション成形したパリソンのブロー成形と呼ぶべきで、先ず射出成型によりパリソンを形成し、続いて熱パリソンをブロー用型内に移して成形する。ホッパーより乾燥したPC樹脂ペレットを投入し加熱溶融しながら右の方へ送りパリソンを形成しその後、熱パリソンをブロー成形して目薬容器を作っている。

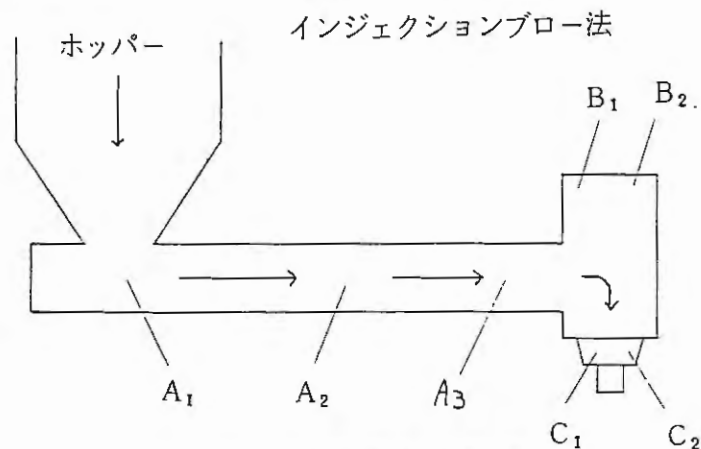


Fig.3. 目薬容器の製造方法

Table 1. 加熱溶融設定温度

	A ₁	A _{2,3}	B _{1,2}	C _{1,2}
従来	x°	y°	220°	170°
改良後	x°	y°	250°	180°

A社の場合、以前加熱溶融設定温度がB₁、B₂の個所で220°、C₁、C₂の個所が170°であった。その後改良が加えられ、B₁、B₂の個所で30°、C₁、C₂の個所で10°それぞれ設定温度を高めることにより従来品よりも耐クラック性により優れたものとなった (Table 1)。

B社に於いては、PC樹脂温度を特にコントロールする等により、従来よりも耐クラック性に優れたものを供給している。

実験の部

目薬容器の耐クラック性について、次の実験を行った。点眼液の成分については今回検討しないこととし、目薬容器でA社の従来品、A社の改良品すなわち加熱溶融温度を高めたもの及びB社のものを行った。目薬容器の前処理である滅菌条件としてオートクレーブ中121° 20分、オートクレーブ中110° 20分、温水90° 30分及び前処理なしのもの。中栓はEOガス滅菌、キャップはオートクレーブ中121° 20分滅菌処理したものを使用。中に充てんする液としては点眼液を用いたのでは目薬容器に発生するクラックの有無を短期間では知り難いので、0.01%塩化ベンザルコニウム液 (以下BC液と略す) を用いた。このBC液を用いた理由は、塩化ベンザルコニウム含有液により目薬容器にクラックが発生するとの報告が参天製薬 (株) 他多数あったのでこの方法を採用した。

BC液または水を15 ml充てんし中栓を嵌めキャップを締める。キャップの締めトルクは、4週間放置する場合は2 kg・cm。1週間毎に開栓し、中栓も取除いてクラック発生の有無を観察し4週まで繰り返して試験を行う場合は4 kg・cmとする。それぞれ40°で倒立の状態にして保存する。

実験結果

A社の従来品とその改良品の耐クラック性についての比較結果をTable 2に示す。4週放置、キャップの締めトルクは2 kg・cmとする。改良品を121° 20分で目薬容器を滅菌し水を充てんした場合4週目で容器50箇中3箇にクラックが観察されたことを示し、そのクラックの発生率は6.0%であると表わしている。よって従来品よりも改良品の方がクラックの発生率が小さい。

Table 2.

改 良 品						従 来 品	
オートクレーブ中 121° 20分		オートクレーブ中 110° 20分		無 処 理		オートクレーブ中 121° 20分	
水	BC液	水	BC液	水	BC液	水	BC液
3 / 50	45 / 50	2 / 50	26 / 50	0 / 30	13 / 30	40 / 50	50 / 50
% 6.0	% 90.0	% 4.0	% 52.0	% 0	% 43.3	% 80.0	% 100.0

A社の改良品による目薬容器の滅菌条件とクラック発生との関係をTable 3に示す。121° 20分、温水90° 30分及び前処理なしのものを1週間毎に開栓した場合の4週目の結果と4週放置後の結果でキャップの締めトルクはそれぞれ4 kg・cm、2 kg・cm。滅菌温度が低くなるとクラックの発生率が小さくなり、またキャップの締めトルクが小さい方がクラックの発生率が小さくなる。B社の場合も同様である。

Table 3.

条 件	オートクレーブ中 121° 20分		温 水 90° 30分		無 処 理	
	水	BC液	水	BC液	水	BC液
1 週毎に開栓	21 / 30	30 / 30	14 / 30	30 / 30	6 / 30	30 / 30
	% 70.0	% 100.0	% 46.7	% 100.0	% 20.0	% 100.0
4 週間 放 置	2 / 30	30 / 30	0 / 30	20 / 30	0 / 30	13 / 30
	% 6.7	% 100.0	% 0	% 66.7	% 0	% 43.3

キャップ締めトルク 1週毎：4 kg・cm 4週放置 2 kg・cm

A社の改良品とB社の目薬容器の耐クラック性について比較した結果をTable 4に示す。キャップの締めトルク4 kg・cmで1週間毎に開栓しそれを4週繰り返す。上段の数値は目薬容器50箇中でクラックの認められた目薬容器の個数を表わし、下段の数値はクラックの認められた目薬容器にはクラック、言い換えれば亀裂の数が何箇所に確認されるかを数え、その平均値で表わす。その数値が大きい程耐クラック性に優れていない。

Table 4.

	条件 保存期間	オートクレーブ中 121° 20分		オートクレーブ中 110° 20分		無 処 理	
		水	BC液	水	BC液	水	BC液
		A 社 改 良 品	1 週 目	1	50	4	41
1.00	1.82			1.00	1.37	-	-
2 週 目	18		50	5	48	0	15
	1.72		2.54	1.00	2.35	-	1.18
3 週 目	32		50	6	49	1	35
	2.16		3.46	1.67	3.39	1.00	1.49
4 週 目	40		50	26	50	4	38
	3.18		5.56	2.04	4.52	1.00	1.89
B 社	1 週 目	0	0	0	0	0	0
		-	-	-	-	-	-
	2 週 目	0	2	0	1	0	0
		-	1.50	-	1.00	-	-
	3 週 目	0	15	0	8	0	0
		-	1.07	-	1.00	-	-
	4 週 目	0	35	0	9	0	7
		-	1.17	-	1.11	-	1.00

別に、目薬容器の滅菌条件と日局一般試験法の無菌試験法の適合性についても検討した。オートクレーブ中 121° 20 分又は 110° 20 分で滅菌した目薬容器に通常の方法で点眼液を充てんし、テスト用の点眼薬を作り、無菌試験法を試みたところそれぞれの滅菌条件共無菌試験法に適合した。すなわち、オートクレーブ中 110° 20 分の滅菌条件も無菌試験法に適合することが認められた。無菌試験法に適合することが即無菌とは判断しかねるが種々の検討も必要と考えられる。

日局の製剤総則⁴⁾では「点眼剤」とは無菌に製した製剤で本剤を製するには無菌操作で行うかあるいは適当な方法で滅菌することと記されており、しかも本剤は日局の無菌試験法に適合することとなっている。

ま と め

1. A社の目薬容器は成形時加熱熔融温度を高めた改良品が耐クラック性に優れる。
2. A社の改良品とB社の目薬容器では耐クラック性に違いが認められる。
3. 目薬容器の前処理、すなわち滅菌条件 121° 20 分よりも 110° 20 分のほうがクラックの発生が少ない。
4. 滅菌条件 121° 20 分及び 110° 20 分のいずれも無菌試験法に適合する。

文 献

- 1) 林信一, 吉田昭義: 医薬品の包装設計 (各論 8) - 点眼剤 - 薬局, Vol. 34, № 8, 73 (1983)
- 2) 林直一: 医薬品の包装設計 (11) - 包装試験法(2) - 薬局, Vol. 33, № 5, 63 (1982)
- 3) 参天製薬株式会社: プラスチックと殺菌剤の相互作用について, 昭和 43 年度厚生科学研究報告, P 261 (1968)
- 4) 日本公定書協会編, “第十改正日本薬局方解説書” 廣川書店 (1981)

液剤医薬品 A の製造工程における品質設計の基礎的検討*1

田 中 良 一, 平 野 賢 治
萩 中 真由美
東亜薬品株式会社 試験開発部 **
Ryoichi TANAKA
Kenji HIRANO
Mayumi HAGINAKA

医薬品の製造において設計品質を如何に考えるか、あるいは品質管理基準をどう設定するかという事は、品質管理を行うにあたり重要なことである。

今回筆者らは、当社の新製品“液剤A”の充填工程を中心として、製造品質の予測と、その合理的な管理方法につき検討を行った。以下、その事例の一部を報告する。

実験の部

1. 目的及び方法

液剤Aの容器は中栓、キャップ付きのプラスチック容器で、容量は 24 ml である (Fig. 1)。充填工程は一貫自動ラインになっている (Table 1)。ここでは 1) 充填量, 2) キャップ締めトルク値を主な管理項目としている。

1) 充填量管理については

- (1) 消費者に対する内容量の保証 (表示は 20 ml)
- (2) 生産時における収率管理

が主目的である。

2) キャップ締めトルク値管理については

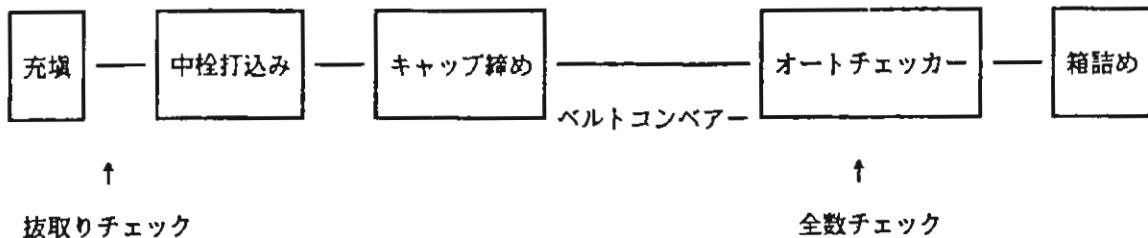
- (1) キャップゆるみによる液もれ及び蒸散の防止 (トルク値の下限)
- (2) キャップの締め過ぎによる開栓不能防止 (トルク値の上限)

が主目的であり、両者とも適正な管理幅を工程能力と見比べながら設定する



Fig. 1.

Table 1. 充填作業工程



* 1 第 4 回家庭薬開発研究会シンポジウム発表, (富山, 1984 年 12 月 6 日)

* 2 〒 939 - 05 富山市三郷 26 番地 TEL 0764 (78) 5100

必要がある。

2. 実験結果

1) 充填管理について

液剤Aの処方Table 2に示すごとく、承認内容は固形成分が重量規格で、液状成分が容量規格となっている。しかし、Fig. 2に示すごとく、本品は温度による密度変化が大きいため、温度変化が収率管理に大きく影響する。そこで基準処方全成分20°における重量規格で定めることとした（Table 2）。また、規定充填量は20 mlであるが、目標充填量は19.10 g（20.50 ml at 20°）とし、この管理は

- (1) 充填直後、一定時間毎の抜き取りチェック（充填量の管理）
- (2) キャップ締め後、オートチェッカーによる全数チェック（容器+充填量の管理）

で行うこととした。

成分	承認処方 100ml中	基準処方 20° 100ml (93.26g)中
主剤(I)	4.0ml	4.248g
主剤(II)	3.0g	3.000g
界面活性剤	2.5g	2.500g
エタノール	50 ml	40.450g
着色剤(A)	微量	4.0 mg
"(B)	"	1.0 mg
精製水	適量	43.060g

Table 2. 処方

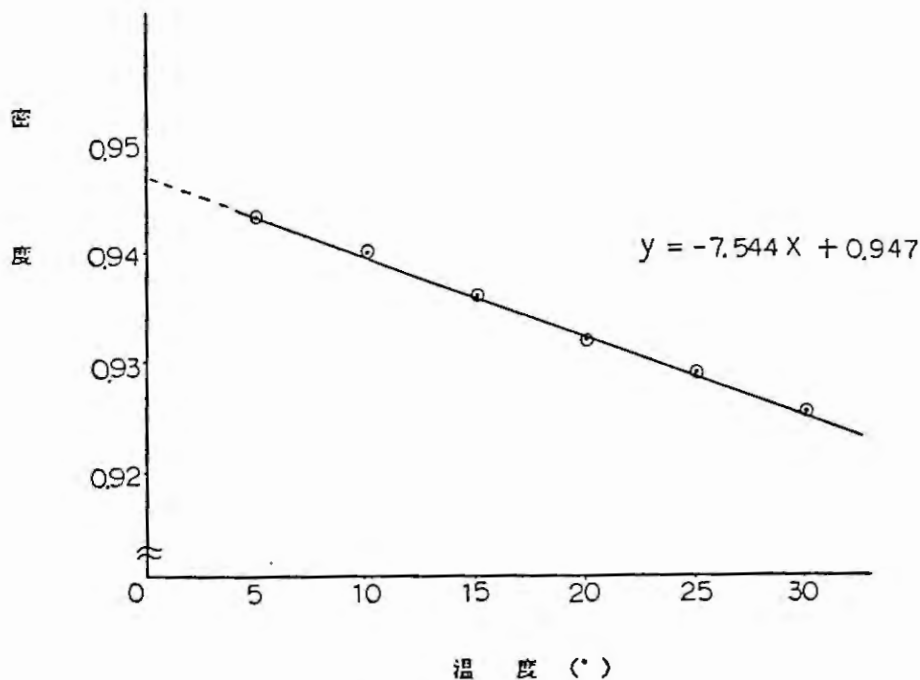


Fig. 2. 液剤Aの温度と密度の関係

① 充填量管理

充填量重量チェックは予め重量を測定した空容器に薬液を充填し、充填後の重量から充填重量を算出する方法をとった。この時の管理幅は充填機のバラツキのみを考えればよく、実験から $n = 100$ として $\sigma_1 = 33.5 \text{ mg}$ を得た。3 σ 限界とすると充填管理幅は $19.10 \pm 0.10 \text{ g}$ ($20.50 \pm 0.11 \text{ mL at } 20^\circ$) となる。

② 充填容器管理 (容器+充填量の管理)

オートチェッカーでチェックする場合は、容器重量バラツキを考慮する必要がある、また、そのバラツキ状態 (管理状態) を予め調べておく必要がある。そのため、キャップ、中栓、ボトル各々入荷ロットから \bar{x} 管理図を作成した (Fig. 3)。各パーツの工程管理指数はいずれも $CP > 1$ で管理限界中で管理されているので、統計処理の可能なことがわかった。この時に算出した各平均重量とバラツキより、容器平均重量 $\bar{x} = 7.62 \text{ g}$ 、容器重量バラツキ $\sigma_2 = 95.9 \text{ mg}$ を算出し①の充填バラツキと合わせ、全重量管理幅を 3 σ 限界として $26.70 \pm 0.30 \text{ g}$ と設定した。

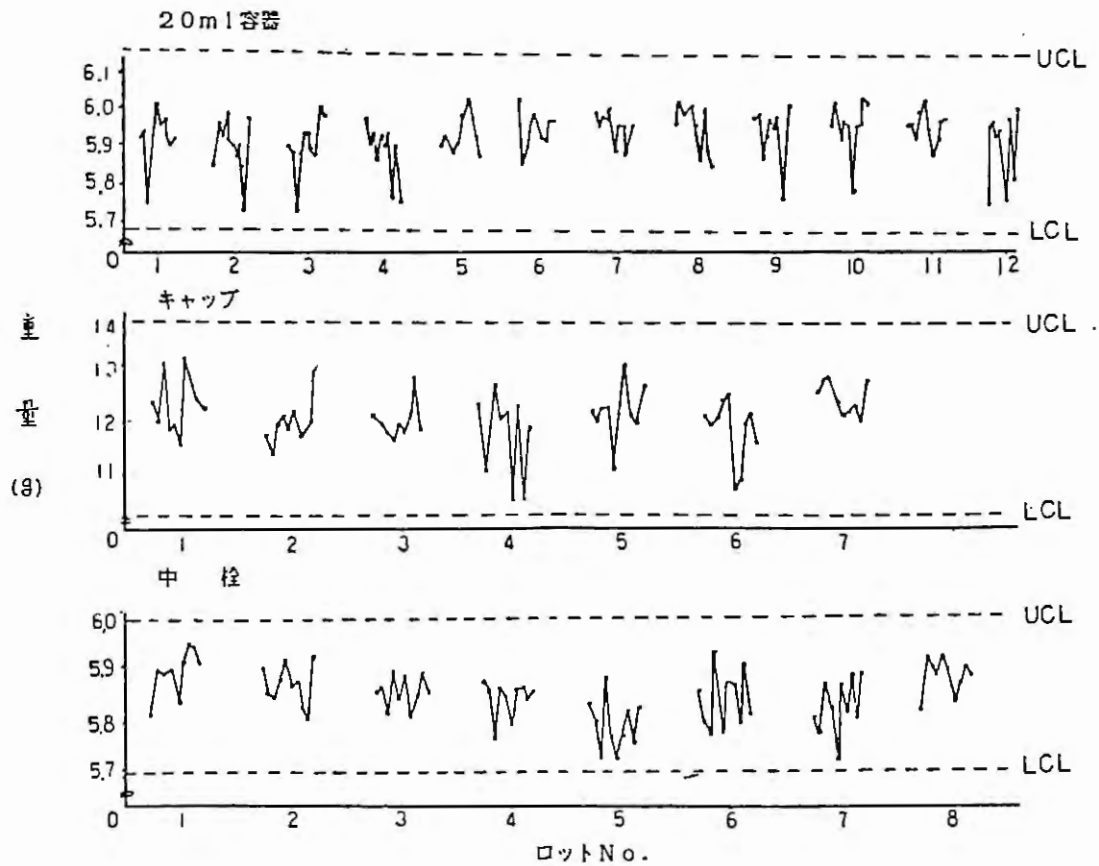


Fig.3. 容器重量 X 管理図

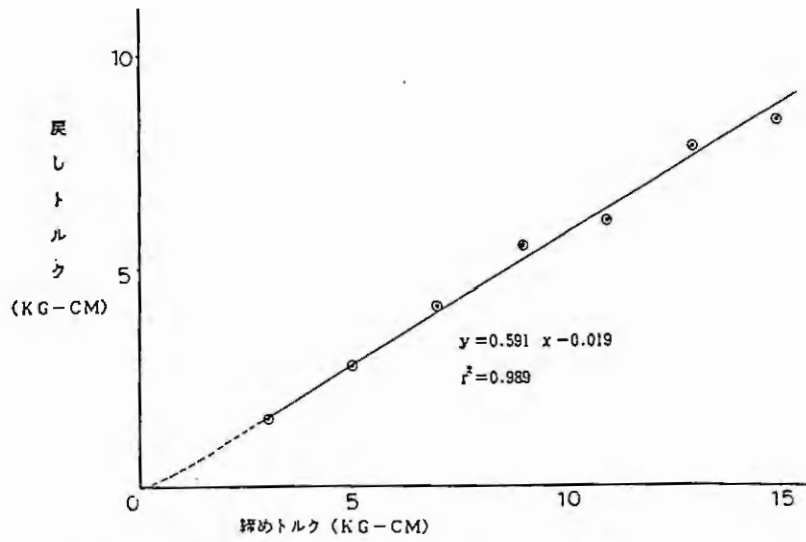


Fig. 4. 締めトルクと戻しトルクの関係

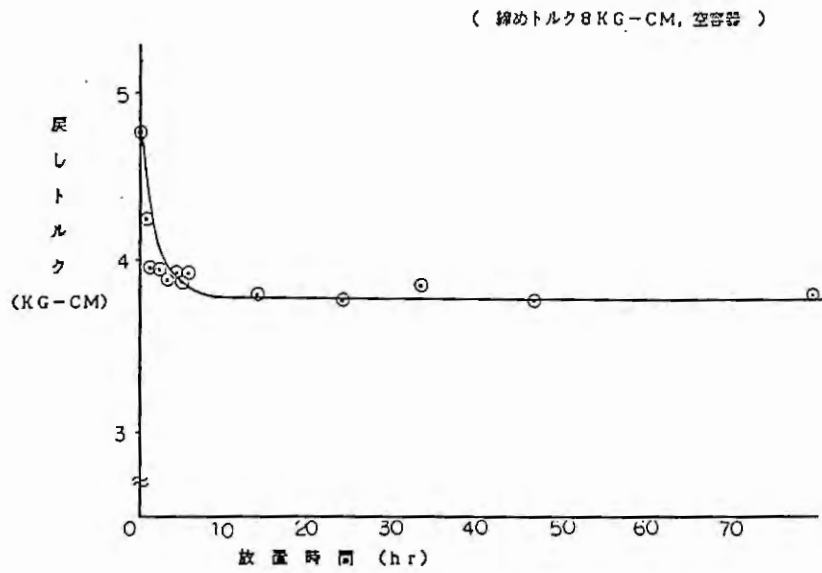


Fig. 5. 放置時間と戻しトルクの関係

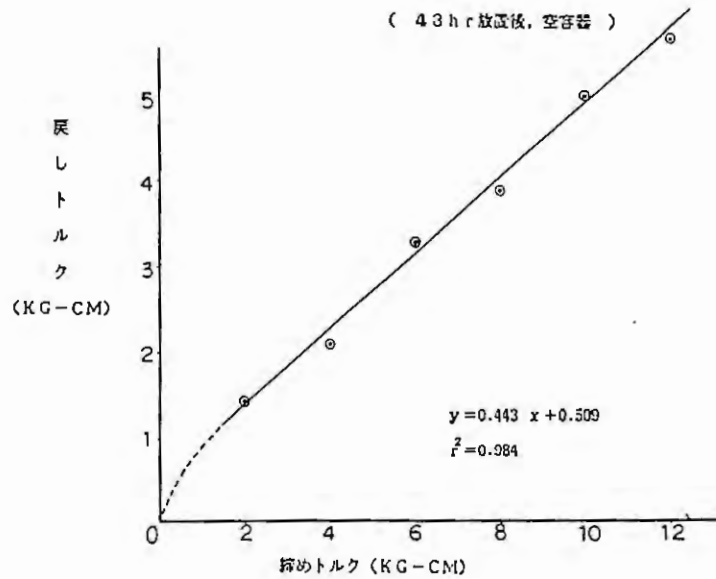


Fig. 6. 締めトルクと戻しトルクの関係

2) キャップ締めトルク値管理について

本容器のトルク値特性を調べると (Fig. 4, 5, 6) に示すような結果が得られた (東日製トルクメーター Model 2-0 T 使用)。締めトルクと戻しトルクについては Fig. 4 に示すごとく、一定範囲内で比例関係が認められた。次に一定トルク値 (8 KG-CM) で締めた場合の放置時間と戻しトルクについては Fig. 5 に示すごとく、減退後、一定値で落ち着くことがわかった。また、一定時間 (43 hr) 放置後の締めトルクと戻しトルクについては Fig. 6 に示すごとく、やはり一定範囲内で比例関係があることがわかった。

Table 3. トルク値と液もれ
(戻しトルク KG-CM)

検体 締め トルク (KG-CM)	1	2	3	4	5	6	7	8	\bar{x}	σ_{n-1}
0.5	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.16	0.08
1.0	0.3	0.4	0.3	0.6	0.4	0.4	0.3	0.6	0.41	0.12
2.0	0.8	0.9	0.8	1.3	1.2	1.2	1.3	0.9	1.05	0.22
3.0	1.4	1.3	2.2	1.3	1.3	2.2	1.7	1.8	1.65	0.39
4.0	1.6	1.6	2.3	1.9	1.6	2.2	1.3	1.1	1.70	0.41
6.0	3.7	3.1	2.1	3.5	2.7	2.3	2.8	2.3	2.81	0.58
8.0	3.9	2.8	3.2	2.6	4.2	3.6	3.7	4.2	3.53	0.61
10.0	3.3	3.4	4.6	4.8	3.7	3.3	4.4	4.1	3.95	0.61

各々液もれ 0

(14.5 hr 放置後, 減圧-730mgHg)

Table 4.

トルク値と蒸散

(40°, 1wk)

締めトルク (KG-CM)	蒸散 n=3 (w/v%)
0.5	0.15
1.0	0.10
2.0	0.09
3.0	0.11
4.0	0.09
6.0	0.09
8.0	0.10
10.0	0.09
15.0	0.09

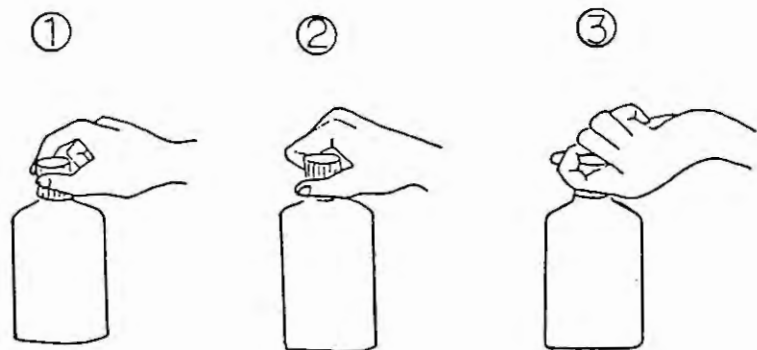


Fig. 7.

① トルク値の下限

トルク値の許容下限を調べるために、まずトルク値と液もれの関係について調べた。Table 3 に示すごとく、0.5～10.0 KG-CMの範囲の締めトルクで締めた後、倒立し、減圧（-730 mmHg）下、14.5 hr 放置したが、いずれも液もれはなく0.5 KG-CMで100本追試した結果でも液もれは全くなかった。

次にトルク値と蒸散の関係について調べた。Table 4 に示すごとく、0.5～15.0 KG-CMの範囲の締めトルクで締めた後、正立し、40°で1週間放置後、重量を測定した。この結果、締めトルク1.0 KG-CM以上ならば蒸散量にほとんど差のみられないことがわかった。

② トルク値の下限

トルク値の上限を調べるために、社内の20～50代の女性を対象として、戻しトルク値の限界を調べてみた。Fig. 7 に示す①～③の開け方でそれぞれ戻しトルク値を調べ、この中で最も一般的だった②の開け方による戻しトルク値の限界をTable 5 に示した。これによるとMax 14.8～

Table 5. 戻しトルク限界値の調査

氏名	戻しトルク限界値 (KG-CM)	氏名	戻しトルク限界値 (KG-CM)
A	6.5	M	14.8 Max
B	6.0	N	9.0
C	9.5	O	9.7
D	9.5	P	7.6
E	8.5	Q	9.5
F	9.5	R	8.8
G	10.0	S	6.5
H	7.6	T	10.5
I	7.6	U	6.0 Min
J	11.2	V	9.0
K	11.5	W	7.8
L	7.1	X	9.0

平均 : 8.8 KG-CM

Table 6. トルク値管理幅

締めトルク (KG-CM)	戻しトルク (直後) (KG-CM)	戻しトルク (放置後) (KG-CM)	備考
12.2	7	5.9	上限
8.5	5	4.5	中心値
5.4	3	2.9	下限

Min 6.0 KG-CMとなり、戻しトルク値の上限の目安を 6.0 KG-CMとした。

現実にはトルク値管理はキャップ締め直後の戻しトルクで管理を行うことになるので、キャップトルク値安定後の戻しトルクのバラツキの上限が 6.0 KG-CMとなるようにキャップ締め直後のバラツキ ($3\sigma = 2.0 \text{ KG-CM}$) とキャップ締め直後の戻しトルク値 (Fig. 4) から、管理幅 $5.0 \pm 2.0 \text{ KG-CM}$ が得られた (Table 6)。

考 察

上記のように考えた品質設計段階での品質水準が、実生産とどの程度ずれているかについては、今後の実生産の実績と比較検討していきたい。充填管理幅については、密度バラツキ (調製仕込みバラツキ) が変動要因として残っており、また戻しトルク管理幅については、キャッパーのゴムの摩耗によるバラツキ変化も変動要因となるので、今後、工程チェックシートによるデーターの蓄積が必要である。また、液もれ及び蒸散についても、室温実績のデーターは充分でなく、今後の追跡調査が必要となる。

文 献

日局 10

常用化学定数表 (広川書店 1980)

J I Sハンドブック品質管理 (日本規格協会 1979), 包装 (日本規格協会 1982)

TECHNICAL REPORT (社内報告書, 1982)

“ (社内報告書, 1984)