エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFE) の調製法、指標成分及び抗腫瘍作用

大嶋 直浩[†]Efficient Preparation of Ephedrine Alkaloids-free Ephedra Herb Extract
and Its Antitumor Effect and Putative Marker CompoundNaohiro Oshima[†]*Department of Pharmaceutical Sciences, International University of Health and
Welfare; 2600-1 Kitakanemaru, Ohtawara, Tochigi 324-8501, Japan.*

(Received September 7, 2016)

Ephedra Herb is a crude drug for the treatment of headache, bronchial asthma, nasal inflammation, and the common cold. Although it has been considered that ephedrine alkaloids (EAs) are the principal active ingredients of Ephedra Herb, EAs are known to induce palpitations, hypertension, insomnia, and dysuria as major side effects. Therefore, the administration of EAs-containing drugs to patients with cardiovascular-related diseases is strongly contraindicated. Previously, we isolated herbacetin 7-O-neohesperidoside from Ephedra Herb. In addition, we found that herbacetin, a flavonoid aglycone in Ephedra Herb, had antiproliferative and analgesic effects. Therefore, the prospect of preparing safer natural medicines without the adverse effects associated with EAs was appealing. In this symposium review, to achieve the aim of producing a clinically useful Ephedra Herb extract with none of the adverse effects associated with EAs, I present an efficient preparation method of EAs-free Ephedra Herb extract, together with its chemical composition, antiproliferative effects, and a putative marker for quality control.

Key words—ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract; chemical composition; herbacetin

はじめに

エフェドリンアルカロイド類 (ephedrine alkaloids; EAs) の歴史は、1885 年、長井が、麻黄からエフェドリン及びイソエフェドリン (後のプソイドエフェドリン) を単離、構造決定し、その内容を日本薬学会の前身である東京薬学会で演説したことから始まる。^{1,2)} その後、1887 年に三浦がエフェドリンに散瞳作用があることを見い出した。^{3,4)} 1889 年、Oelschlaegel や Ladenburg らがプソイドエフェドリンの詳細な構造を報告した。⁵⁾ Smith が *N*-メチルエフェドリン、*N*-メチルプソイドエフェドリン及びノルプソイドエフェドリンを、^{6,7)} 金尾がノルエフェドリンを、⁸⁾ それぞれ同定した。さらに、天津

及び久保田らがエフェドリンに血圧上昇作用があることを、⁹⁾ Chopra 及び Pillai がプソイドエフェドリンに心筋刺激作用があることを、¹⁰⁾ Curtis がメチルエフェドリンに交感神経刺激作用があることを、¹¹⁾ それぞれ初めて明らかにした。一方、Chen や Schmidt,^{12,13)} 並びに Nagel¹⁴⁾ がエフェドリンの反復投与により交感神経作用の漸次減弱が起こることを明らかにし、Schaumann がその現象を Tachyphylaxis と提唱した。¹⁵⁾ さらに、1926 年に MacDermot,¹⁶⁾ Kreitmair¹⁷⁾ 及び Miller¹⁸⁾ が臨床研究でエフェドリンの喘息改善作用を明らかにし、EAs のこれらの作用機序は、 α , β_1 , β_2 非選択的的刺激作用であることが明らかにされた。¹⁹⁾ また、エフェドリンは体内でプソイドエフェドリンに代謝され、中枢神経刺激作用を示すことが明らかにされた。²⁰⁾ そのほかにもプソイドエフェドリンはインフルエンザ感染による鼻粘膜充血の除去作用、²¹⁾ 抗炎症作用、²²⁾ メチルエフェドリンは鎮咳及び気管支拡張作用、²³⁾ ノルエフェドリンは末梢血管収縮による充血・膨張抑制作用²⁴⁾ が報告されており、これらの研

国際医療福祉大学薬学部薬学科 (〒324-8501 栃木県大田原市北金丸 2600-1)

現所属：[†]東京理科大学薬学部 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2666-3)

e-mail: n-oshima@rs.tus.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 136 年会シンポジウム S47 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. LC/Orbitrap MS Analyses of Ephedra Herb Extract (a) and Ephedrine Alkaloids-free Ephedra Herb Extract (b)

A: photodiode array (PDA, 254 nm); B: total ion chromatogram (TIC). EAs: ephedrine alkaloids; peak 1 6-methoxykynurenic acid; peak 2 6-hydroxykynurenic acid; peak 3 *trans*-cinnamic acid. Modified from Ref. 30).

究から、麻黄の主な有効成分は EAs と考えられていた。また、EAs は日本薬局方 (JP 17) で麻黄の定量指標成分と規定されており、²⁵⁾ EAs の含量で麻黄の品質を確保しているとも言える。一方、EAs には高血圧、動悸、頻脈、脳卒中及び発作などの深刻な有害作用があることが知られており、循環器系疾患を有する患者に、EAs を主成分とする麻黄並びに麻黄が配合された漢方処方を投与することに注意が必要である。

最近、麻黄にがん細胞の運動能を低下させる作用が認められ、²⁶⁾ 麻黄から herbacetin 7-*O*-neohesperidoside が単離され、²⁷⁾ そのアグリコンである herbacetin にがん細胞運動能抑制作用や、²⁸⁾ 鎮痛作用²⁹⁾があることが明らかにされた。これらの結果から、麻黄には EAs に依存しない薬理作用があることが示唆された。そのため、EAs を除去した麻黄

エキスの作製が、より安全な医薬品開発につながるものと考えた。本稿では、EAs 除去麻黄エキス (ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract; EFE) の効率的な調製法並びに品質管理のための指標成分の設定を中心に概説したい。

1. EFE の効率的な製造法

まず、麻黄エキスから EAs を効率的に除去するため、陽イオン交換樹脂に着目し、各樹脂による EAs の残留率を定量分析の結果から算出した。その結果、EAs 残留率の低かった樹脂のうち、安価な強陽イオン交換樹脂 SK-1B が EFE の作製に最適だった。次に、SK-1B 処理で EAs 以外に除去された成分があるかを明らかにするため、麻黄エキスと EFE の成分組成を比較することとした。成分組成を明らかにするための分析機器として、高い分解能 (60000) と安定した分析精度 (誤差 3 ppm 以内)

Fig. 2. Structures of Compounds 1, 6-Methoxykynurenic Acid; 2, 6-Hydroxykynurenic Acid; 3, *trans*-cinnamic acid; 4, herbacetin
Reprinted from Ref. 30).

を持ち、標準物質による質量校正を不要とする電場型フーリエ変換質量分析計を連結した LC/Orbitrap MS を用いた。その分析結果を Fig. 1 に示す。麻黄エキス及び EFE はどちらもよく似たクロマトグラムを示したが、EAs のほかに、ピーク 1-3 が消失若しくは減少していた。これらの成分構造を明らかにするため、各ピークの精密質量による分子式の推定並びに標品及び合成品を用いた比較分析を行い、ピーク 1-3 をそれぞれ 6-methoxykynurenic acid, 6-hydroxykynurenic acid 及び *trans*-cinnamic acid と同定した (Fig. 2)。続いて、EFE が麻黄エキスの薬理作用を保持しているかを明らかにするため、麻黄エキスと EFE の非小細胞肺癌細胞株 H1975 に対する細胞増殖抑制作用を比較した。その結果、麻黄エキス及び EFE はともに同等の抑制作用を示し、 IC_{50} 値はそれぞれ $88 \mu\text{g}/\text{mL}$, $76 \mu\text{g}/\text{mL}$ だった (Fig. 3)。これらのことから、除去された成分は抗腫瘍作用に影響しないことが明らかとなり、SK-1B 処理により、麻黄エキスの作用を減弱させることなく、EFE の効率的な作製に成功した。

2. EFE の品質確保のための候補指標成分について

第 17 改正日本薬局方 (JP 17) において、麻黄の定量指標成分は EAs と規定されており、EAs の含量で麻黄の品質を確保しているが、今回作製した EFE には EAs が含まれていないため、指標成分で EFE の品質を確保できず、期待する薬効の低下だけでなく思わぬ有害作用を引き起こす可能性がある。これを防ぐため、EFE の品質確保に資する、

Fig. 3. Ephedra Herb (EH) Extract and Ephedrine Alkaloids-free EH Extract (EFE) Prevented the Proliferation of the H1975 Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cell Line
Reprinted from Ref. 30).

新たな指標成分の設定が必要である。既に、麻黄から、herbacetin を共通のアグリコンとする herbacetin 7-*O*-neohesperidoside や herbacetin 7-*O*-glucoside が単離されていること、並びに herbacetin がん細胞増殖抑制作用や鎮痛作用が認められていることに着目し、酸加水分解後の EFE に含まれる総 herbacetin 量で品質を確保できるか検討した。その結果、6 M HCl 水溶液で EFE を酸加水分解後、総 herbacetin 量を、内標準物質 apigenin を用いた内部標準法で定量分析したところ、酸加水分解後の EFE 中に herbacetin が 0.104% 含まれていたことが明らかとなり、EFE の候補指標成分の 1 つとして herbacetin が適当と結論した。

おわりに

一般的に漢方薬の治療費は、西洋薬のそれと比べて低いことが知られており、³¹⁻³³⁾ 高額な抗がん剤を用いた治療に対して、安価な漢方薬を用いることは医療経済学の観点から重要である。そのため、漢方薬の構成生薬の 1 つである麻黄から作製された EFE の臨床使用は、安価で効果的ながん治療への貢献が期待される。しかし、麻黄エキスと EFE は、長い使用経験の有無という観点から、明確に区別されるものであり、EFE を医薬品として扱うには、品質を標準化する際に必要な指標成分の設定並びに EFE の安全性及び有効性に関する臨床試験の検討だけでなく、天然物医薬品の特性を十分に勘案

した承認申請ガイドラインの策定も必要である。しかし、麻黄エキスから新たな成分が生じることなく、EAs が除去され、そのエキスが麻黄エキスの持つ抗腫瘍作用を保持したこと並びに品質管理のための定量指標成分を設定したことは、上記の課題を考える上で重要な知見として位置づけられるものと確信している。

謝辞 本研究は、国立医薬品食品衛生研究所、常磐植物化学研究所株式会社、北里大学及び松山大学に所属する共同研究者の皆様方からのご指導の下で行われたものであり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。なお、本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）委託研究開発費創薬基盤推進研究事業「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」にて行われました。

利益相反 特許協力条約（Patent Cooperation Treaty; PCT）の規定に基づき、特許出願中である。

REFERENCES

- 1) Nagai N., *Yakugaku Zasshi*, **1892**(121), 181–221 (1892).
- 2) Funayama S., Cordell G. A., “Alkaloids: A Treasury of Poisons and Medicines,” 1st ed., Academic Press, Oxford, 2014, pp. 264–265.
- 3) Miura K., *Berliner Klinische Wochenschrift*, **38**, 707 (1887).
- 4) Takahashi J., Miura K., *The Tokyo Journal of Medical Sciences*, **2**, 944–949 (1888).
- 5) Oelschaegel C., Ladenburg A., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **22**, 1823–1827 (1889).
- 6) Smith S., *J. Chem. Soc.*, 2056–2059 (1927).
- 7) Smith S., *J. Chem. Soc.*, 51–53 (1928).
- 8) Kanao S., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, **63B**, 95–98 (1930).
- 9) Amatsu H., Kubota S., *Kyoto Igaku Zasshi*, **14**, 77–98 (1917).
- 10) Chopra R. N., Pillai K. V., *Indian J. Med. Res.*, **16**, 780–787 (1929).
- 11) Curtis F. R., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **35**, 321–332 (1929).
- 12) Chen K. K., Schmidt C. F., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **24**, 339–357 (1924).
- 13) Chen K. K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **27**, 77–86 (1926).
- 14) Nagel A., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **110**, 129–141 (1925).
- 15) Schaumann O., *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **160**, 127–176 (1931).
- 16) MacDermot H. E., *Can. Med. Assoc. J.*, **16**, 422–423 (1926).
- 17) Kreitmair H., *Klin. Wochschr.*, **5**, 2403–2404 (1926).
- 18) Miller T. G., *Ann. Clin. Med.*, **4**, 713–721 (1926).
- 19) Abourashed E. A., El-Alfy A. T., Khan I. A., Walker L., *Phytother. Res.*, **17**, 703–712 (2003).
- 20) Dollery C., “Therapeutic Drugs,” Churchill Livingstone Inc., New York, 1991.
- 21) Hoffman B. B., Lefkowitz R. J., “Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics,” McGraw-Hill, New York, 1996.
- 22) Hikino H., Konno C., Takata H., Tamada M., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2900–2904 (1980).
- 23) Yuizono T., *Yakugaku Zasshi*, **87**, 923–934 (1967).
- 24) Loux J. J., *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **183**, 28 (1970).
- 25) The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, “The Japanese Pharmacopoeia, 17th Edition,” p. 1916.
- 26) Hyuga S., Hanawa T., *J. Trad. Med.*, **30**, 19–26 (2013).
- 27) Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T., Wakana D., Hyuga M., Hyuga S., Hanawa T., Goda Y., *Molecules*, **18**, 5326–5334 (2013).
- 28) Hyuga S., Hyuga M., Yoshimura M., Amakura Y., Goda Y., Hanawa T., *Planta Med.*, **79**, 1525–1530 (2013).
- 29) Hanawa T., Hyuga S., Goda Y., Hyuga M., Amakura Y., Yoshimura M., Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP2014129341 (2014).
- 30) Oshima N., Yamashita T., Hyuga S., Hyuga M., Kamakura H., Yoshimura M., Maruyama T., Hakamatsuka T., Amakura Y., Hanawa T., Goda Y., *J. Nat. Med.*, **70**, 554–562 (2016).

-
- 31) Akase T., Akiba T., Isai H., Suzuki S., *Jpn. J. Orient. Med.*, **50**, 655–663 (2000).
- 32) Akase T., Akase T., Onodera S., Jobo T., Matsushita R., Kaneko M., Tashiro S. I., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 817–824 (2003).
- 33) Ohno K., Sekiya N., Namiki T., Kasahara Y., Chino A., Hirasaki Y., Terasawa K., *Jpn. J. Orient. Med.*, **62**, 29–33 (2011).