EFE の薬理作用と臨床応用へ向けた取り組み

日向須美子

The Pharmacological Actions of Ephedrine Alkaloids-free Ephreda Herb Extract and Preparation for Clinical Application

Sumiko Hyuga

Department of Clinical Research, Oriental Medicine Research Center, Kitasato University; 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8642, Japan.

(Received September 7, 2016)

Ephedra Herb is defined in the 17th edition of the *Japanese Pharmacopoeia* as the terrestrial stem of *Ephedra sinica* STAPF., *Ephedra intermedia* SCHRENK et C.A. MEYER, or *Ephedra equisetina* BUNGE (Ephedraceae) which contains more than 0.7% ephedrine alkaloids (ephedrine and pseudoephedrine). The primary effects and adverse effects of Ephedra Herb are traditionally believed to be mediated by ephedrine alkaloids. We recently reported that Ephedra Herb extract (EHE) exhibits antimetastatic and antitumor effects by suppressing the hepatocyte growth factor-c-Met signaling pathway through the inhibition of c-Met tyrosine kinase activity. We confirmed that the non-alkaloidal fraction of EHE had c-Met-inhibitory activity. Moreover, we discovered herbacetin glycosides in EHE and demonstrated that herbacetin, the aglycone of the glycosides, shows c-Met-inhibitory activity and analgesic action. These findings suggest that some pharmacological actions of EHE may be produced by its non-alkaloidal fraction, which does not cause the adverse effects of ephedrine alkaloids. Therefore, we prepared ephedrine alkaloids-free EHE (EFE) by removing ephedrine alkaloids from EHE using ion-exchange column chromatography. EFE had c-Met-inhibitory action, analgesic effects, and antiinfluenza activity similar to EHE but had no toxicity. Now, we are evaluating the safety of EFE in healthy volunteers and its efficacy in patients to obtain licensing approval for its therapeutic use in the future.

Key words—ephedrine alkaloids-free Ephedra Herb extract; ephedrine alkaloid; c-Met; analgesia; influenza

1. はじめに

麻黄は日本薬局方によって「*Ephedra sinica* STAPF, *Ephedra intermedia* SCHRENK et C.A. MEYER 又は *Ephedra equisetina* BUNGE (Ephedraceae) の地上茎を乾燥したものを定量するとき、総アルカロイド（エフェドリン及びプソイドエフェドリン）0.7%以上を含む」と規定されており、¹⁾ その薬理作用のほとんどはエフェドリンアルカロイドに由来すると考えられてきた。²⁾ また、エフェドリンアルカロイドによる中枢神経及び交感神経の刺激作用を介した血圧上昇、動悸、不眠などの副作用を生じることが知られており、麻黄含有漢方薬は、循環器系に障害のある患者、高血圧症の患者、あるいは高齢者

に対して使用上注意を要する。このように麻黄の主作用と副作用は、どちらもエフェドリンアルカロイドに由来すると考えられてきたため、麻黄から副作用成分を除去するという発想はこれまでほとんどなかった。

私たちは、麻黄湯ががん細胞の運動能を低下させることによってがん転移を抑制することを明らかにし、その作用は構成生薬の麻黄に由来することを見い出してきた。^{3,4)} さらに麻黄の分子メカニズムとして、麻黄エキス (Ephedra Herb extract; EHE) が肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) 受容体 c-Met のリン酸化を阻害し、HGFによって誘導されるがん細胞の運動能、細胞分散、及び細胞増殖を抑制することを明らかにした。^{5,6)} また、この c-Met 阻害作用は EHE の非アルカロイド画分に存在することを突き止めた。EHE の活性成分探索のために国立医薬品食品衛生研究所や松山大学薬学部との共同研究を開始し、EHE の非アルカロイド画分

北里大学東洋医学総合研究所臨床研究部 (〒108-8642 東京都港区白金 5-9-1)

e-mail: hyuga-s@insti.kitasato-u.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. Concept of EFE

から Herbacetin 配糖体を見い出して,⁷⁾ 非糖部分の Herbacetin に c-Met 阻害作用を含むマルチキナーゼ阻害作用があることを発見した.⁸⁾ その中でも神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) 受容体 TrkA に対する阻害作用が強く, Herbacetin は NGF-TrkA シグナル阻害を介した鎮痛作用を有することも見い出した.⁹⁾ 配糖体は腸内細菌叢で糖鎖が外れ, 非糖部分が吸収されて薬理作用を示すことが知られていることから, Herbacetin 配糖体は麻黄の活性成分の 1 つであると考えられた. しかし Herbacetin 配糖体は EHE に 0.1% 程度しか含まれておらず, 用量的にこの配糖体だけで麻黄の薬理作用を説明することは困難なことから, 非アルカロイド画分にはほかにも有効性の高い複数の活性成分が含まれていることが示唆された.

これらの研究成果から, 麻黄の薬理作用の一部はエフェドリンアルカロイドに依存せず, EHE から副作用成分を除去することは可能であることが示唆された. そこで私たちは EHE からエフェドリンアルカロイドを除去し, 副作用のないエキス製剤の作製を試みることにした. 株式会社常磐植物化学研究

所及び国立医薬品食品衛生研究所との共同研究によって, EHE からエフェドリンアルカロイドを除去した ephedrine alkaloids-free EHE (EFE) の製造に成功した (Fig. 1).¹⁰⁾ 本稿では, EFE の薬理作用と臨床応用に向けた私たちの取り組みについて紹介したい.

2. EFE による c-Met 阻害を介したがん細胞の運動能抑制作用

EFE は, EHE と同様に HGF によって誘導されるがん細胞の運動能を抑制するのかどうかを c-Met 発現ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を用いて解析した. その結果, EFE は HGF により誘導されるがん細胞の運動能を EHE や c-Met 阻害剤 SU11274 と同様に有意に抑制することが明らかになった [Fig. 2(A)]. また, HGF により誘導される運動能は EFE の濃度依存的に抑制された [Fig. 2(B)]. そこで, HGF によって誘導される c-Met のチロシンリン酸化に対する EFE の作用を解析した. EFE は, EHE や SU11274 と同様に c-Met のチロシンリン酸化を阻害し [Fig. 2(C)], この阻害作用は EFE の濃度依存的であることが明らかになった [Fig. 2

Fig. 2. Inhibitory Effects of EFE on HGF-induced Motility and Phosphorylation of c-Met in MDA-MB-231 Cells

(A) MDA-MB-231 cells (5×10^4 cells) were suspended in DMEM with or without 40 $\mu\text{g/mL}$ Ephedra Herb, 40 $\mu\text{g/mL}$ EFE, or 5 μM SU11274, and poured into the upper well of the trans-well system. The lower well of the trans-well system contained 600 μL of DMEM containing 50 ng/mL HGF. After 20 h, the cells that had migrated into the lower well were counted. Each assay was performed in triplicate. The error bars represent S.D. Statistical significance was determined by Dunnett's test. * $p = 0.01$, or ** $p < 0.001$ vs. the number of cells that migrated following HGF stimulation. (B) 5×10^4 cells were suspended in DMEM with 0, 10, 20, or 40 $\mu\text{g/mL}$ EFE and poured into the upper well of the trans-well system. The lower well of the trans-well system contained DMEM with 50 ng/mL HGF. After 20 h, the cells that had migrated to the lower well were counted. Each assay was performed in triplicate. The error bars represent S.D. Statistical significance was determined by Dunnett's test. * $p < 0.01$, or ** $p < 0.001$ vs. the number of cells that migrated without EFE exposure. (C) MDA-MB-231 cells were incubated in DMEM, DMEM containing 50 ng/mL HGF, or DMEM containing 50 ng/mL HGF with 10 $\mu\text{g/mL}$ EFE, 10 $\mu\text{g/mL}$ Ephedra Herb extract, or 5 μM SU11274 for 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Tyrosine phosphorylation of c-Met was determined by immunoprecipitation and western blot analysis. (D) MDA-MB-231 cells were incubated in DMEM containing 50 ng/mL of HGF with 0, 0.5, 1, 5, or 10 $\mu\text{g/mL}$ of EFE for 15 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. The level of tyrosine phosphorylation of c-Met in the cells was determined by immunoprecipitation and western blot analysis. (E) The kinase activity of c-Met was measured using the ProfilerPro Kit. A recombinant c-Met kinase domain was pre-incubated with and without a 2-fold serial dilution of 8 $\mu\text{g/mL}$ EFE or Ephedra Herb extract at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The fluorescence-labeled peptide substrate, 1.5 μM 5-carboxyfluorescein-EAIIYAAPFAKKK-NH₂, and 79.5 μM ATP were added, followed by incubation at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 90 min. The kinase reactions were terminated by the addition of 3 mM EDTA. Phosphorylated peptides were separated from substrate peptides and quantified using a LabChip 3000. Reproduced from Ref. 11).

(D)]. さらに c-Met のチロシンキナーゼ活性は、EHE と同様に EFE の濃度依存的に阻害された [Fig. 2(E)]. 以上の結果から、EFE は EHE と同様に HGF-c-Met シグナルを阻害し、HGF によって誘導されるがん細胞の運動能を抑制することが示唆された。さらに、麻黄の c-Met 阻害作用はエフェドリンアルカロイドに依存しないことが明らかとなった。

私たちはこれまでに、EHE が c-Met 発現がんに対して抗がん抗転移作用を有することを見い出して

きたが、エフェドリンアルカロイドによる副作用からがん治療へ応用することは難しいと考えていた。しかし EFE は副作用の心配がないことから、c-Met 発現がん患者の再発転移防止療法へ応用できる可能性が高い。現在、c-Met を標的としたがんの分子標的治療薬は開発中で医薬品化されていないことから、EFE は c-Met 分子標的治療薬の有力な候補になり得ると考えられる。また、EFE は以下に述べるように鎮痛作用を有することから、がん関連の疼痛治療に応用できる可能性も秘めている。

Fig. 3. Effect of EFE on Formalin-induced Pain

ICR mice were treated orally with water, 350 mg/kg EFE, 700 mg/kg EFE, or Ephedra Herb extract for 3 d. On the third day of treatment, formalin tests were performed 6 h after drug or placebo administration. The amount of time that each animal spent licking the injection paw was recorded for 30 min in two phases, known as the first (0–5 min) and second (15–30 min) phases. Statistical significance was determined by Dunnett's test. * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ vs. control. Reprinted from Ref. 11).

3. EFE の鎮痛作用

ホルマリン試験を用いて、EFE と EHE の鎮痛作用を解析した。EFE、EHE、あるいは水をマウスに2日間繰り返し経口投与し、3日目の投与6時間後に2.5%ホルマリン溶液20 μ Lをマウスの足底部皮下に投与し、疼痛関連行動時間を測定した。疼痛関連行動はホルマリン投与直後から5分後までに生じる第1相と、15分後から30分後までに生じる第2相を対象とし、処置した足を舐める又は噛む行動時間を計測した。第1相はホルマリンによる知覚神経終末への直接的刺激による痛みを反映し、第2相はホルマリンの組織侵害で生じた炎症による痛みを反映すると考えられている。¹²⁾ホルマリン試験の結果、両エキスともに第2相の疼痛関連行動時間を有意に抑制し (Fig. 3)、炎症性疼痛に対する鎮痛作用を有することが示唆された。また、EFEはEHEよりも高い鎮痛作用を示すことがわかった。最近、EFEは単回投与によっても鎮痛作用を示すことがわかってきた。

麻黄を含有する漢方薬〔越婢加朮湯（えっぴかじゅつとう）、葛根湯（かっこんとう）、麻黄湯（まおうとう）、麻杏よく甘湯（まきょうよくかんと）、よく苡仁湯（よくいにんと）〕は、関節痛、

筋肉痛、リウマチを効能効果に持ち、その鎮痛作用は麻黄の成分のプソイドエフェドリンの抗炎症作用によると考えられてきた。¹³⁾しかし、EFEがEHEと同様の鎮痛作用を有することから、麻黄の鎮痛作用はエフェドリンアルカロイド以外の成分に由来することが示唆された。

ところで高齢者の変形性関節症（osteoarthritis; OA）は要介護の原因となることから、その疼痛治療は急務の課題となっている。現在は非ステロイド性消炎鎮痛剤（nonsteroidal antiinflammatory drugs; NSAIDs）による治療が中心であるが、胃腸障害や腎障害のリスクが高く、より安全性の高い鎮痛薬の開発が求められている。¹⁴⁾一方、麻黄含有漢方薬は関節の痛みにも有効な治療薬で、その鎮痛効果は緩やかで患者の急激な活動増加によるOA悪化を生じ難い。しかしエフェドリンアルカロイドによる副作用のため、高齢者への投与は注意を要し、比較的体力のある高齢者に対してのみ適用されてきた。これに対してEFEは副作用の心配がないことから、EFEあるいはEFE含有漢方薬は高齢者のOAに対する優れた治療薬になる可能性がある。

4. EFE の抗インフルエンザ作用

麻黄湯はインフルエンザ初期の治療に用いられ、オセルタミビルと同等の抗インフルエンザ作用を有するとの臨床報告があり、¹⁵⁾麻黄湯の主薬である麻黄に抗インフルエンザ作用があることも報告されている。¹⁶⁾そこで、インフルエンザウイルスの感染によりMDCK細胞が溶解することを利用し、残存細胞を色素で染色することで、インフルエンザ感染阻害作用を検出した。その結果、EFEはEHEと同様に添加濃度依存的にMDCK細胞に対するインフルエンザ感染を阻害した [Fig. 4(B)]。また、本研究に用いた濃度のEFE及びEHEは、MDCK細胞の生存能に影響を与えなかった [Fig. 4(A)]。これらの結果より、EFEはインフルエンザウイルスの感染阻害作用を有することが明らかとなった。

麻黄湯の麻黄をEFEに交換したEFE含有麻黄湯去麻黄を作製すればエフェドリンアルカロイドによる副作用の心配がないことから、高齢者のインフルエンザ治療や予防的投与に応用できる可能性がある。

5. その他の薬理作用

麻黄に含まれるエフェドリンアルカロイドに由来する鎮咳作用や鼻閉に対する治療効果については、

Fig. 4. Effects of EFE on Influenza Virus Infection in MDCK Cells

MDCK cells (3×10^4 cells) were incubated in 100 μ L of 10% FCS-minimal essential medium (MEM) in a 96-well plate for 24 h, and then washed with MEM. They were incubated for 72 h at 37°C in 100 μ L of MEM or MEM containing a 2-fold serial dilution of 50 μ g/mL EFE or 50 μ g/mL Ephedra Herb extract with (B) or without (A) 100 TCID₅₀ of influenza virus A/WSN/33(H1N1). Next, living cells were stained with crystal violet and the absorbance (560 nm) of each sample was quantified using a microplate reader. Reprinted from Ref. 11).

EFE では失われていると考えられる。

6. EFE の反復投与毒性試験

EFE の安全性を確認するためにマウスに対する反復投与毒性試験を行った。5 週令の ICR マウス (1 群雄雌各 5 匹) に、1 日 1 回、EFE、EHE、あるいは水を 2 週間繰り返し経口投与した。各エキスの投与量は、麻黄含有漢方薬の中で最も高用量で用いられる麻黄の量 (6 g/日) の 50 倍量から得られるエキス量より換算した。2 週間後、体重及び外観を記録後、イソフルラン麻酔下で解剖し、腹部大動

脈より血液を回収して、生化学的検査及び血算を行った。投与期間中に死亡や衰弱した個体は出ず、外観の異常も観察されなかった。マウスの体重は 3 群間で有意差はなかった (Table 1)。臓器重量については、雄マウスの大腸重量が EFE 群及び EHE 群で水投与群よりも低下したが、その低下の程度は小さく、雌マウスの大腸重量については 3 群間で有意差がなかった (Table 1)。他の臓器重量については 3 群間で有意差はなかった。血清の生化学的検査項目については、3 群間で有意差がなかった (Table 2)。一方、血算については、雄の EHE 群が水投与群に対し血小板数が有意に増加し、白血球数が有意に低下した (Table 3)。しかし EFE 投与群の血小板数及び白血球数は、水投与群と比較して有意差は観察されなかった。以上の結果から、EFE のヒト 50 倍量の反復投与ではマウスに対する毒性は低く、EFE は EHE より安全性が高いことが示された。

7. EFE の医薬品化に向けた取り組み

EFE は日本薬局方の麻黄からエフェドリンアルカロイドを除去して製造するが、総アルカロイドが検出限界以下となるため日本薬局方の規定から外れ、医薬品ではなくなる。したがって EFE を臨床応用するためには新規医薬品として承認申請する必要がある。まず、EFE をどのような効能効果で承認申請するかについて検討した。EFE の承認申請にはヒトでの有効性評価が最も重要な課題となるが、がんに対する有効性の検証には数年以上の長期間を要し、また抗インフルエンザ作用の検証は実施時期が限られる。一方、鎮痛効果の検証は比較的短い時間 (約 2 週間程度) で可能であり、visual analogue scale (VAS) 等の評価法で数値化でき、ヒトでの有効性の評価を明確にできる可能性が高い。そこで、EFE を関節痛治療薬として承認申請することを目指した。c-Met 阻害作用や抗インフルエンザ作用については、EFE が医薬品化された後、効能効果の追加を検討する予定である。

EFE のヒトでの有効性評価の前に、ヒトに対する安全性評価を行う必要がある。EFE は局方の麻黄からアルカロイド類を除去しているため、理論的にはより安全性が高いと考えられるが、ヒトへの投与はこれまで経験がないためである。現在、医師主導型臨床研究である「健康成人を対象とした EFE の安全性を検討する臨床薬理試験 (UMIN 試験 ID:

Table 1. Body and Tissue Weight

Sex	Group		Body weight (g)	Thymus (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Liver (mg)	Adrenal gland (mg)	Kidney (right) (mg)	Kidney (left) (mg)	Spleen (mg)	Stomach (mg)
Male	Water	AVG	32.3	63.7	158.2	177.5	1939.0	7.2	262.7	244.4	97.8	256.1
		S.D.	1.5	14.6	13.9	34.0	186.6	1.9	37.7	35.0	16.9	28.3
	EFE	AVG	30.9	64.9	152.4	171.2	1777.8	7.3	237.1	239.3	90.5	231.0
		S.D.	2.9	22.2	14.7	17.7	169.4	1.6	27.0	24.5	13.6	28.1
	Ephedra Herb	AVG	30.8	43.6	151.7	195.8	1674.2	5.8	243.9	238.3	90.3	252.3
		S.D.	1.2	6.3	17.8	43.2	196.9	0.8	22.8	21.8	17.7	22.7
Female	Water	AVG	26.3	67.0	140.5	154.3	1350.3	10.0	167.3	157.2	88.1	205.7
		S.D.	2.3	46.4	14.9	10.2	162.3	1.2	12.3	14.0	13.0	18.2
	EFE	AVG	26.5	54.2	142.5	161.6	1223.6	9.8	171.8	172.1	113.9	216.8
		S.D.	2.8	13.2	24.1	13.9	215.5	2.3	29.2	35.1	42.2	26.7
	Ephedra Herb	AVG	26.1	55.6	135.9	158.8	1208.8	10.3	159.6	154.4	93.1	215.9
		S.D.	1.5	7.7	9.4	10.8	121.4	1.1	11.4	10.9	8.1	15.4

Sex	Group		Small intestine (mg)	Cecum (mg)	Colon (mg)	Testis (mg)	Vesicular gland (mg)	Vas deferens (mg)	Epididymis (mg)	Ovary (mg)	Uterus (mg)
Male	Water	AVG	1915.1	153.2	382.3	199.4	170.5	30.8	78.3	—	—
		S.D.	279.7	14.9	14.6	20.9	75.5	7.0	12.3	—	—
	EFE	AVG	1741.5	133.5	310.4**	199.7	149.3	26.1	77.0	—	—
		S.D.	318.3	16.2	35.6	24.3	37.5	2.3	6.3	—	—
	Ephedra Herb	AVG	1912.2	161.7	326.9*	198.6	126.0	25.7	74.4	—	—
		S.D.	235.0	33.1	22.5	13.0	36.8	3.9	5.8	—	—
Female	Water	AVG	1397.0	121.2	338.6	—	—	—	—	13.1	125.9
		S.D.	144.3	14.3	91.3	—	—	—	—	1.0	43.7
	EFE	AVG	1324.4	140.8	274.1	—	—	—	—	13.8	145.4
		S.D.	217.9	25.5	22.1	—	—	—	—	6.2	53.0
	Ephedra Herb	AVG	1202.8	109.8	282.1	—	—	—	—	12.4	167.1
		S.D.	92.2	13.2	45.3	—	—	—	—	2.4	66.9

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. mice administered water, by Tukey's test. Reprinted from Ref. 11).

Table 2. Serum Biochemical Values

Sex	Parameter	ALB (g/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	LDH (IU/L)	LAP (IU/L)	γ -GT (IU/L)	T-BIL (mg/dL)
	Group	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.
Male	Water	2.86 $\pm$ 0.13	51.8 $\pm$ 10.9	34.2 $\pm$ 10.8	292.6 $\pm$ 51.6	597.2 $\pm$ 447.8	58.4 $\pm$ 3.8	N.D. [†]	0.08 $\pm$ 0.014
	EFE	2.96 $\pm$ 0.17	50.2 $\pm$ 8.3	26.4 $\pm$ 2.7	280.2 $\pm$ 46.3	765.0 $\pm$ 233.2	53.8 $\pm$ 3.2	N.D.	0.10 $\pm$ 0.024
	Ephedra Herb	2.90 $\pm$ 0.10	53.4 $\pm$ 4.7	29.0 $\pm$ 4.3	384.6 $\pm$ 191.2	727.0 $\pm$ 251.9	60.6 $\pm$ 2.1	N.D.	0.08 $\pm$ 0.008
Female	Water	3.12 $\pm$ 0.08	53.4 $\pm$ 10.7	25.0 $\pm$ 3.9	332.8 $\pm$ 38.8	435.6 $\pm$ 214.0	54.2 $\pm$ 4.7	N.D.	0.08 $\pm$ 0.015
	EFE	3.06 $\pm$ 0.18	55.0 $\pm$ 9.7	21.6 $\pm$ 2.6	361.2 $\pm$ 50.6	645.8 $\pm$ 224.5	55.0 $\pm$ 3.2	N.D.	0.10 $\pm$ 0.004
	Ephedra Herb	3.24 $\pm$ 0.19	57.8 $\pm$ 6.9	21.6 $\pm$ 6.1	332.4 $\pm$ 60.1	644.2 $\pm$ 91.4	58.6 $\pm$ 7.2	N.D.	0.08 $\pm$ 0.025

[†] N.D.: Not detectable. Reprinted from Ref. 11).

Table 3. Haematological Values

Sex	Parameter	RBC (10000/ μ L)		Hb (g/dL)		Ht (%)		PLT (10000/ μ L)		WBC (1000/ μ L)		Neutro (Stab) %		Neutro (Seg) %		Lympho (%)		Mono (%)	
	Group	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.	AVG $\pm$ S.D.
Male	Water	926 $\pm$ 25	15.1 $\pm$ 0.6	50.0 $\pm$ 1.6	49.8 $\pm$ 8.4	2.27 $\pm$ 0.94	2.2 $\pm$ 0.4	33.4 $\pm$ 9.4	59.6 $\pm$ 9.0	4.8 $\pm$ 1.1									
	EFE	964 $\pm$ 21	15.6 $\pm$ 0.6	49.6 $\pm$ 1.6	48.2 $\pm$ 8.6	1.27 $\pm$ 0.63	2.6 $\pm$ 0.9	18.8 $\pm$ 12.9	74.2 $\pm$ 13.8	4.4 $\pm$ 2.1									
	Ephedra Herb	976 $\pm$ 40	15.2 $\pm$ 0.8	49.5 $\pm$ 1.8	65.2 $\pm$ 10.4*	0.90 $\pm$ 0.17*	2.4 $\pm$ 0.9	23.6 $\pm$ 12.4	70.4 $\pm$ 13.1	3.6 $\pm$ 2.2									
Female	Water	947 $\pm$ 48	15.5 $\pm$ 1.4	49.6 $\pm$ 3.5	44.2 $\pm$ 12.3	2.49 $\pm$ 1.4	2.0 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 11.0	80.0 $\pm$ 11.9	5.0 $\pm$ 1.2									
	EFE	980 $\pm$ 37	15.9 $\pm$ 0.8	49.1 $\pm$ 1.8	56.5 $\pm$ 7.4	1.6 $\pm$ 0.81	1.4 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 12.6	85.0 $\pm$ 13.8	3.8 $\pm$ 1.6									
	Ephedra Herb	965 $\pm$ 52	15.5 $\pm$ 0.8	49.1 $\pm$ 1.4	53.1 $\pm$ 8.1	1.99 $\pm$ 0.76	2.2 $\pm$ 0.8	12.4 $\pm$ 6.6	80.6 $\pm$ 7.4	4.8 $\pm$ 2.3									

* $p < 0.05$ vs. mice administered water, by Dunnett's test. Reprinted from Ref. 11).

UMIN000022061)」を北里大学病院臨床試験センターで実施している。この臨床研究により安全性が確認されれば、「関節痛患者を対象とした有効性試験」を医師主導型臨床研究として実施する予定である。

次に、EFE の関節痛治療薬としての承認申請の要件について、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PMDA) 相談を実施した。日本では天然物医薬品のための承認申請ガイドライン (GL) が整備されておらず、これまでに新規天然物医薬品が国内で医薬品化されたことはないため、PMDA においても承認審査の経験がなく、現在の GL に照らし合わせて必要な要件を整えていく必要があることがわかった。

将来の EFE の上市に向けては、製薬企業に EFE の製品化を託すことを見据え、EFE を知的財産として確立する必要がある。現在、「エフェドリン除去麻黄エキスと、その製法及び用途」について PCT 出願中 (PCT/JP2014/080605) で、EFE の特許化を目指している。

8. おわりに

日本では、西洋医学を学んだ医師・薬剤師が漢方薬をとり扱っており、西洋医学と東洋医学の橋渡しを行うことができる基盤がある。また、早くから漢方薬を医薬品として医療現場で用いており、漢方エキス製剤の品質の高さは世界で認められている。さらに漢方薬の薬理作用に関する基礎研究も精力的に進められており、新しい知見が次々と得られている。日本はこのような優れた医療基盤、製造技術、及び研究基盤を有しているにもかかわらず、天然物医薬品の承認申請 GL が整備されていないため、新規天然物医薬品を実用化することができない。EU や米国では天然物医薬品の承認申請 GL が整備されており、米国では日本の漢方薬の臨床治験が実施されている。

今後、日本で得られた新しい知見を臨床へ還元していくためには、承認申請 GL の整備が必須である。そのためには漢方薬を熟知した医師・薬剤師・研究者・製薬企業の協力が大きなアドバンテージになると考えられる。

倫理指針

1) 動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実

験委員会で承認され、動物実験等に関する規定に従って実施された。

2) 医師主導型臨床研究は北里大学相模原治験審査委員会の承認の下に実施された。

謝辞 本研究は、北里大学東洋医学総合研究所、北里大学薬学部、北里大学病院臨床試験センター、国立医薬品食品衛生研究所、株式会社常磐植物化学研究所、松山大学薬学部、及び国際医療福祉大学薬学部との共同研究により実施した。また本研究の一部は、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」及び All Kitasato Project Study（AKPS）共同研究助成金により実施した。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

利益相反 1) 北里大学東洋医学総合研究所は株式会社ツムラより寄付金を受領。2) 特許権使用料・ライセンス料の受領はないが、北里大学、国立医薬品食品衛生研究所、株式会社常磐植物化学研究所は共同出願中。

REFERENCES

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, “The Japanese Pharmacopoeia, 17th Edition,” 2016.
- 2) Harada M., *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine*, **1**, 34–39 (1980).
- 3) Hyuga S., Hyuga M., Yamagata S., Yamagata T., Hanawa T., *J. Trad. Med.*, **21**, 174–181 (2004).
- 4) Hyuga S., Hyuga M., Nakanishi H., Ito H., Watanabe K., Oikawa T., Hanawa T., *J. Trad. Med.*, **24**, 51–58 (2007).
- 5) Hanawa T., Hyuga S., Masashi M., Japan Tokkyo Koho, P 5786164 (2015).
- 6) Hyuga S., Shiraishi M., Hyuga M., Goda Y., Hanawa T., *J. Trad. Med.*, **28**, 128–138 (2011).
- 7) Amakura Y., Yoshimura M., Yamakami S., Yoshida T., Wakana D., Hyuga M., Hyuga S., Hanawa T., Goda Y., *Molecules*, **18**, 5326–5334 (2013).
- 8) Hyuga S., Hyuga M., Yoshimura M., Amakura Y., Goda Y., Hanawa T., *Planta Med.*, **79**, 1525–1530 (2013).
- 9) Hanawa T., Hyuga S., Goda Y., Hyuga M., Amakura Y., Yoshimura M., Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP2014129341 (2014).
- 10) 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).
- 11) Hyuga S., Hyuga M., Oshima N., Maruyama T., Kamakura H., Yamashita T., Yoshimura M., Amakura Y., Hakamatsuka T., Odaguchi H., Goda Y., Hanawa T., *J. Nat. Med.*, **70**, 571–583 (2016).
- 12) Tjølsen A., Berge O. G., Hunskaar S., Rosland J. H., Hole K., *Pain*, **51**, 5–17 (1992).
- 13) Hikino H., Konno C., Takata H., Tamada M., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **28**, 2900–2904 (1980).
- 14) Ishijima M., Kubota M., Ning L., Liu L., Kaneko H., Futami I., Sadatsuki R., Haneda S., Yusup A., Shimura Y., Hirasawa E., Saita Y., Takazawa Y., Ikeda H., Kurosawa H., Kaneko K., *Juntendo Medical Journal*, **59**, 138–151 (2013).
- 15) Nabeshima S., Kashiwagi K., Ajisaka K., Masui S., Takeoka H., Ikematsu H., Kashiwagi S., *J. Infect. Chemother.*, **18**, 534–543 (2012).
- 16) Mantani N., Andoh T., Kawamata H., Terasawa K., Ochiai H., *Antiviral Res.*, **44**, 193–200 (1999).