蟾酥の加工調製と品質に関する研究

氏　　名	川 原 一 仁
生 年 月 日	
本　　籍	大阪府
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	博甲第469号
学位授与の日付	平成14年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	蟾酥の加工調整と品質に関する研究
論文審査委員(主査)	御影　雅幸(薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	二階堂　修(薬学部・教授)　島田　和武(薬学部・教授) 太田　富久(薬学部・教授)　中村　浩二(薬学部・教授)

学 位 論 文 要 旨

Studies of Toad Venom　– Quality and Manufacturing Methods –

Toad Venom is a cardiac crude drug and the bufosteroids are the medical principles. Since overdose of bufosteroids results in crucial condition, strict attention must be paid for its medical use, and the content of the bufosteroids in the crude drug must be precisely evaluated. Here, I report (1) quantitative analysis of bufosteroids of 151 commercial samples, (2) improvement of manufacturing method of the crude drug, and (3) application of a practical colorimetric detection method of bufosteroids.

(1) Quantitative analysis of bufosteroids of 151 commercial samples clarified that their three bufosteroids contents widely ranged from 13.16 to113.45 mg/1000.0 mg dehydrolyzed sample, and that each lamp was chemically homogeneous.

(2) In Shang-Dong Province, China, where Toad Venom of the highest quality are produced, it takes more than two years to dry and produce the pieces of the crude drug of 100g. I found that it was possible to dry toad venom in short period by heating it at 105℃ on a tray made of brass without deterioration. Moreover, removing impurities in the fresh venom by the filtration through silk filter gave the high quality of the crude drug.

(3) The color of the concentrated sulfuric acid solution of Toad Venom measured by a colorimeter showed that all the samples with the b^* value in CIE 1976 $L^*a^*b^*$ color system of more than 37 conformed to the regulation of JP-XIII. And this is a simple way to check the quality of toad venom, and also the better method for environments.

漢薬「センソ（蟾酥）」は『神農本草経』の下品に「蝦蟆」の名称で収載された動物性生薬である．当初はヒキガエル類の体全体を乾燥させたものが同様に使用されていたが，現在では日本でも中国でも両生類（Anphibia）無尾目（Anura）ヒキガエル科（Bufonidae）の毒腺分泌物を乾燥したセンソが主に用いられている．『第十四改正日本薬局方』のセンソの項では「本品はシナヒキガエル *Bufo bufo gargarizans* Cantor または *Bufo melanostictus* Schneider (Bufonidae) の毒腺の分泌物を集めたものである」と定義され，また，2000 年版の『中華人民共和国薬典』では「本品はガマ科動物シナヒキガエル *Bufo bufo gargarizans* Cantor あるいはヘリクロヒキガエル *Bufo melanostictus* Schneider の乾燥させた分泌物である．多くは夏と秋の二回にカエルを捕まえ，洗浄し，耳後腺および皮膚腺の白色の分泌液を集めて加工し，乾燥する」と記載されている．

生薬センソには，円盤状の「餅様蟾酥」，円盤状でより小型な「棋士様蟾酥」，板状の「片酥」などといった形態の相違があるが，これらは単に市場品としての形態の違いであって，品質的な違いはないとされる．いずれも強心ステロイドである resibufogenin，cinobufagin，bufalin などを含んでいることから，強心剤として六神丸などの家伝薬に配合されている．その薬効を示す本質が毒薬であり，一日の服用量が2～5mg と微量であるため，日局収載生薬の中でも唯一毒薬指定されており，薬効面からも安全面からも安定した品質が強く要求されている生薬である．

生薬品質の安定化には，原料，採集時期，加工調製方法など，多くの要素の検討が必要であるが，センソの製造方法についてはこれまで諸説が記載されてきたが，詳細は不明のままであった．

また，センソはその原動物であるヒキガエル類が中国野生資源保護管理条例で国家重点保護野生薬材品種の第二種保護資源に指定され，資源保護政策が重視されており，今後は限りある野生資源の有効利用をはかる必要性も生じている．

そこで本研究では，市場品センソについての現状を明らかにし，品質評価を行なう目的で，産地での毒腺分泌物の採取から加工調製までの工程を現地調査し，さらに品質の安定したセンソを効率よく生産するための方法を検討した．

【成分化学的品質評価】

まず，市場品 154 検体について日局規定に準じて bufalin，cinobufagin，resibufogenin の HPLC による定量を行ない，品質のバラツキの程度を検討した．また，センソの個々内における均一性とサンプリングの妥当性を確認するために3検体について，それぞれの中心から中心角約30～60° の扇形に連続しない3箇所からサンプリングを行い，定量を行った．

その結果，センソ個々内の定量結果では3検体の C.V.値は3種類のステロイドの合計値で 0.43%，0.06%，0.08%と均一性が高かったことから，個体内の任意の一部分を代表としてサンプリングが行なえることが明らかになった（Table 1）．一方，154 検体の乾燥物 1000.0mg 中の3種類のステロイドの合計値は 13.16～113.45mg であり，その C.V.値は 40.08%という大き

Table 1 Bufosteroids Contents at Three Different Portions in One Lump.

Table 1-1 Sample B18

part	bufosteroids (mg/1000 mg dried sample)			
	bufalin	cinobufagin	resibufogenin	total
①	15.50	37.82	27.01	80.33
②	15.28	37.59	26.78	79.65
③	15.49	37.77	26.80	80.06
ave.	15.42	37.73	26.86	80.01
S.D.	0.12	0.12	0.13	0.34
C.V.	0.81	0.32	0.47	0.43

Table 1-2 Sample B19

part	bufosteroids (mg/1000 mg dried sample)			
	bufalin	cinobufagin	resibufogenin	total
①	11.53	28.21	19.84	59.58
②	11.50	28.22	19.80	59.52
③	11.51	28.19	19.82	59.52
ave.	11.51	28.21	19.82	59.54
S.D.	0.02	0.02	0.02	0.03
C.V.	0.13	0.05	0.10	0.06

Table 1-3 Sample B20

part	bufosteroids (mg/1000 mg dried sample)			
	bufalin	cinobufagin	resibufogenin	total
①	18.77	26.67	49.07	94.51
②	18.81	26.60	48.94	94.35
③	18.76	26.66	49.00	94.42
ave.	18.78	26.64	49.00	94.43
S.D.	0.03	0.04	0.07	0.08
C.V.	0.14	0.14	0.13	0.08

なバラツキを示したことから，服用量が極微量である生薬センソでは，一枚ずつを別ロットとして扱う必要があることが明らかになった (Fig.1).

【乾燥方法の改良研究】

1997 年～2001 年にかけて中国最大のセンソの生産地である山東省を中心に現地調査を行なった結果，毒腺分泌物の採取時期はヒキガエルが一箇所に集まるために捕獲が容易くなる11～12月と２～４月の年２回であり，夏と秋に捕獲するという多くの文献記載と現状とは異なることが明らかになった．また，１枚の重量が 100g 程度の一般的なセンソを生産するためには 5000～7000 匹のヒキガエルを必要とすることから，原動物の個体差や性差は品質に影響を及ぼさないであろうことが示唆された．新鮮毒腺分泌物の採取にはカスタネット状のアルミニウム製専用道具が用いられていたが，熟練者か否かによって皮膚や筋肉片といった異物混入率が大きく異なるという問題点があることや，生産農家が個別に行なっている乾燥加工には２年以上の期間を要することから，マニュアル化された生産管理を行なうことが極めて困難であるという種々の問題点が明らかになった．また，生産地では乾燥時における加熱と加工工程中にアルミニウム以外の金属と接触させることが禁止事項とされており，これらの件については科学的な評価検討を加える

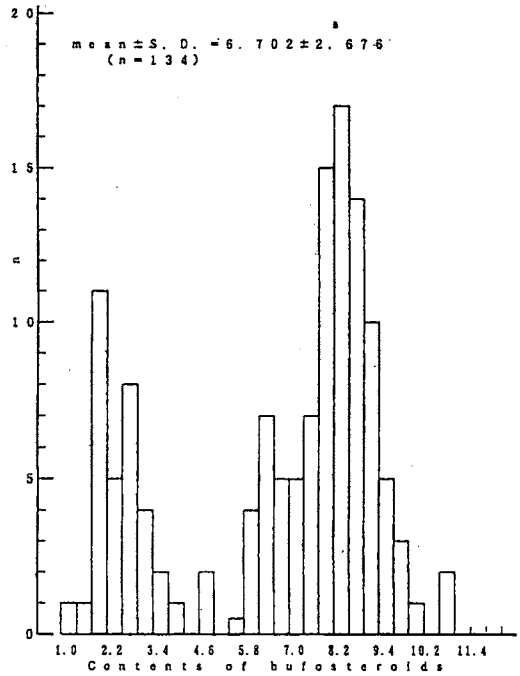

Fig. 1　1ロット内の個々のセンソに含まれるbufosteroid含量のばらつき

必要性があると考えられた.

さらには，国家重点保護野生資源動物であるヒキガエル類の養殖については，試算の結果，餌の確保に伴う不採算化が明らかになったために見送られたという経緯，また生育地周辺の田園での農薬使用によるカエルの食餌の減少や水源の汚染などにより，個体数の減少が続いているという資源を取り巻く環境の現状をも調査することができた.

これらの現地調査の結果を踏まえ，中国山東省で採取された新鮮毒腺分泌物を入手し，天日乾燥，陰干し乾燥，凍結粉砕，60℃加温乾燥，105℃加熱乾燥の条件で実験的に乾燥を行なった後，含有される bufalin, cinobufagin, resibufogenin, arenobufagin, bufotalin, cinobufotalin, desacetylbufotalin, desacetylcinobufagin, desacetylcinobufotalin, gamabufotalin, hellebrigenin および marinobufagin の 12 種類の bufadienolides について HPLC による定量を行い，理化学的な品質評価を行なった．その結果，乾燥に要した時間は 105℃加熱乾燥で4時間，凍結乾燥では前処理を含め6時間，60℃加温乾燥で 33 時間，天日干し乾燥で 133 時間，陰干し乾燥で 224 時間であり，乾燥試料 1000.0mg 中の 12 種類の bufadienolides 含量合計値は，新鮮毒腺分泌物で 235.4mg，凍結乾燥品で 184.8mg，陰干し乾燥品で 148.5mg，105℃乾燥品で 133.4mg，天日干し乾燥品で 94.4mg，60℃乾燥品で 59.2mg であった (Table 2). このことから，105℃加熱乾燥を行なうことで従来2年以上を要していた毒腺分泌物の乾燥を，さほど品質を低下させることなく，数日間に短縮できることが明らかになった.

Table 2 Bufadienolides Contents of Toad Venom Made by Various Drying Methods

	n	ARB	BL	BT	CB	CBT	DABT	DACG	DACT	GBT	HBG	MB	RB	TOTAL
fresh venom	3	17.68	32.25	trace	92.09	3.32	0.16	26.58	trace	9.52	trace	trace	53.80	235.39
dried in the sun	3	9.32	12.43	trace	36.22	1.31	0.08	9.68	trace	3.71	trace	trace	21.65	94.39
dried in the shade	3	15.11	20.58	trace	56.31	1.86	0.13	15.06	trace	5.80	N.D.	trace	33.62	148.46
dried at 60℃	3	5.97	8.12	trace	22.39	0.85	0.02	6.17	trace	2.33	trace	N.D.	13.37	59.22
dried at 105℃	3	9.12	18.85	trace	52.73	2.02	0.11	15.55	trace	5.63	trace	N.D.	29.33	133.40
frozen dried	3	16.87	26.66	trace	69.89	2.84	0.13	18.98	trace	7.69	trace	trace	41.71	184.77

Each value shows mg/1000.0 mg dried sample.

ARB: arenobufagin, BL; bufalin, BT: bufotalin, CB: cinobufagin, CBT: cinobufotalin, DABT: desacetylbufotalin, DACG: desacetylcinobufagin, DACT: desacetylcinobufotalin, GBT: gamabufotalin, HBG; hellebrigenin, MB; marinobufagin, and RB: resibufogenin

Table 3 Bufadienolides Contents of Toad Venom by Using Various Material for Drying

Material	n	GBT	ABG	HBG	DACG	DACT	DABL	BT	MB	CBT	BL	CBG	RGB	TOTAL
brass	3	27.93	20.73	trace	0.88	1.02	7.31	12.90	trace	3.87	67.85	141.84	136.39	420.72
copper	3	27.36	20.29	trace	0.83	0.88	6.78	12.56	trace	3.71	65.51	134.71	130.62	403.25
glass	3	19.00	19.31	trace	0.86	0.96	6.51	11.83	trace	3.50	62.20	127.51	122.94	374.62
acrylic resins	3	18.84	17.86	trace	0.81	1.04	6.64	11.46	trace	3.41	60.99	126.05	125.77	372.87
alminum	3	17.76	18.33	trace	0.86	0.98	7.03	11.57	trace	3.42	59.36	126.32	122.74	368.37
stainless steel	3	15.98	15.28	trace	0.57	1.37	trace	0.73	trace	3.00	52.16	109.79	104.56	303.44
fresh	3	22.80	22.46	trace	0.96	1.29	7.97	11.86	trace	4.21	74.07	154.90	149.53	450.05

Each value shows mg/1000.0mg dried sample.

【高品質で安定したセンソの生産研究】

次いで，毒腺分泌物採取の熟練度に関わりなく異物を含まず安定した品質のセンソを生産することを試みた．すなわち，毒腺分泌物を新鮮時に絹布で濾過することにより異物を除去した試料を出発原料とし，銅板，黄銅板，アルミニウム板，ステンレス板，ガラス板およびアクリル板の上に分泌物を置き，105℃定温状態で乾燥させ，乾燥物について 12 種類の bufadienolides の定量を行なった．その結果，乾燥試料 1000.0mg 中の 12 種類の bufadienolides 含量合計値は，比較対照として作成した凍結粉砕品で 450.55mg，黄銅板で 420.72mg，銅板で 403.25mg，ガラス板で 374.62mg，アクリル板で 372.87mg，アルミニウム板で 368.37mg，ステンレス板で 303.44mg であった (Table 3)．ステンレス板を用いて乾燥したセンソは黄銅板を用いたものに比べて bufadienolides 含量が 30%も減少したことから，生産地で鉄と毒腺分泌物との接

触を避けていることの正当性が確認できた．一方，黄銅板や銅板に接触させた状態で製したセンソではガラス板やアクリル板上で製したものよりも bufadienolides 含量が高いという結果が得られたことから，アルミ以外のすべての金属を排斥するという点には根拠がないことが明らかになった．本研究結果から，黄銅は効率的にセンソを生産するための素材として有用であることが明らかになった．

以上の結果から，採取直後の新鮮毒腺分泌物を絹布でろ過して異物を除去し，黄銅製の型枠に入れ，105℃で乾燥させる方法を導入することにより，従来２年以上を要していた乾燥工程が数日に短縮され，かつ高品質で安定したセンソを生産することが可能になるものと期待される．なお，実際には凍結乾燥法によって乾燥したセンソの bufadienolides 含量が新鮮毒腺分泌物にもっとも近い値を示した．科学が発達した現代社会においては凍結乾燥品の利用をも考慮する必要があろうが，凍結乾燥品は現行の日局の「センソ」の項，あるいは中華人民共和国薬典の「蟾酥」の項の性状規定に適合しない乳白色の粉末となる．今後は凍結乾燥品をも利用するために，関連法規の見直しも必要であろう．

中国で毒腺分泌物の乾燥過程において加熱や金属との接触が禁止されている理由として，センソが黒変して品質が低下するという点が挙げられていたが，これは過去において十分な検討なしに不適切な条件で加熱乾燥させたり，あるいは鉄器を用いたりした結果，センソとしての利用に耐えないような低品質なものが生産されてしまい，それ以降は十分な検討がなされないままに禁止事項として伝えられてきたものであろうと考えられる．

【色彩計による品質評価】

古来，生薬の品質評価は五感によって行なわれてきた．センソも例外ではなく，色や異物の目視と水をつけたときの白変（視覚），生臭い独特の臭気と粉を吸い込んだときのクシャミ（臭覚），舐めたときの辛味・苦味・麻痺感（味覚），水に溶かしたものによる皮膚の局所麻痺感ならびに力をこめて曲げたときの感触（触覚），２枚のセンソ同士をたたき合わせたときの音（聴覚）の五感によって良否の判定を行なってきた．しかし，センソは毒薬であるため臭覚や味覚による鑑別には限界がある．これらの五感による鑑別を客観的な数値として示すことができれば，有機溶媒を多用する分析に頼らない品質評価を行なうことができると考えた．

産地では肉色のセンソを良品とし，黒色のものは低い評価がされている．また，日本と中国で共通する鑑別法として，水をつけたときに白濁するというものがある．そこで，先の市場品について，その定量値と色彩計によって測定した粉末色および水溶液の色を比較したところ，定量値と粉末色，定量値と水溶液の色のいずれについても両者の間には相関がないことが明らかになった．現地における粉末色による品質評価は，先に述べたごとく，不適切な条件による乾燥によって黒変したセンソができた経験によるものであり，根拠がないことがこの実験からも明らかになった．また水をつけたときの白変についても，毒腺分泌物であることの確認方法としては利用で

きるが，化学的品質評価の指標とはなりえないことが分った．

一方，センソ粉末の飽和濃硫酸溶液の色彩を測定した結果，b^*値が+37 を超えるものはすべて日局規格に適合し，b^*値を利用することにより日局適不適の判断が可能であることが明らかになった (Fig. 2)．

色彩計を用いた本試験法は非常に簡便で，大きな設備も不要で，場所を問わずセンソの品質評価を行なうことができる．また，廃液は硫酸であるため，中和処理を施すだけで無害に処理することができ，環境面への影響を最小限に抑えることができる点でも評価できる．

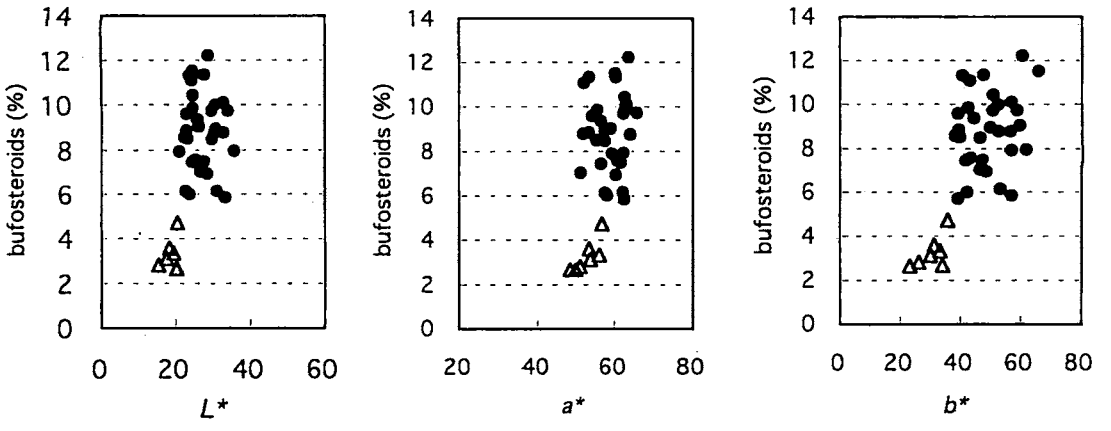

Fig. 2-1 Relation between colors of conc. sulfuric acid solution of Toad Venom and bufosteroids contents
(●: bufosteroids contents of 5.8 % or more, △: bufosteroids contents of less than 5.8 %)

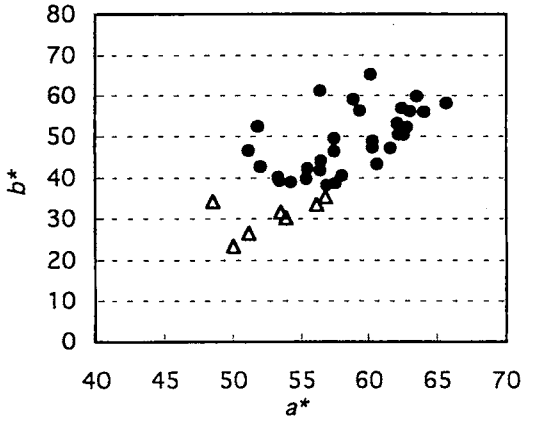

Fig. 2-2 Distribution of a^* and b^* values of conc. sulfuric acid solution of Toad Venom

学位論文審査結果の要旨

各審査委員による提出論文の審査，個別面談，ならびに平成14年2月4日の口頭発表時の質疑応答の結果を踏まえ，論文審査会を開催し協議した結果，次のとおり判定した。

本論文は，日本薬局方収載生薬の中で唯一毒薬に指定されている強心剤「センソ（蟾酥）」を研究テーマにしたものである。申請者はまず中国からの輸入蟾酥1ロット全134個について強心性ステロイド類含量について検討した結果，約100gの個々の塊の中では均質であるが，個々の塊については最大8.62倍という大きなばらつきがある実態を明らかにし，その原因を探るため中国の生産地に9回赴いて現地調査を行なった。次いで，得られた問題点を解決すべく以下の検討を行ない，結果を得た。(1)ガマ類から採取した毒腺分泌物を105℃という高温で乾燥することにより，従来約2年間を要していた乾燥を数日間に短縮できることを示唆した。(2)真鍮板の上で乾燥することにより，効率的に高品質の蟾酥を生産できることを明らかにした。(3)絹布で濾すことで，より高品質かつ安定した品質の蟾酥が生産できることを示唆した。(4)今後は凍結乾燥法によりさらに高品質な蟾酥を生産し，利用すべきであることを提案した。(5)少量のサンプルを用いた簡便な品質評価法として，リーベルマン反応を利用し，蟾酥50mgのサンプルを硫酸に溶かし色彩計で透過光を測定することにより，簡便にブフォステロイド含量の測定が行なえることを見い出した。

以上の成果はセンソの高品質で安定した生産に大きく貢献するものであり，また(5)の分析方法は有機溶媒等の環境汚染物質を出さない点でも優れ，今後の各種試験法のあり方に一石を投じる有意義なものである。

以上，本論文内容は博士（薬学）の学位に値するものと判定する。