

葛根湯エキス製剤および湯剤の同等性に関する研究 (Ⅱ)

堀井 周文^{a,*}, 小此木 明^a, 鎌倉 浩之^b, 袴塚 高志^b, 合田 幸広^b^aクラシエ製薬株式会社漢方研究所, ^b国立医薬品食品衛生研究所

Studies on Bioequivalence of Kakkonto Decoction and Its Extract Preparation (Ⅱ)

Chikafumi Horii^{a,*}, Akira Okonogi^a, Hiroyuki Kamakura^b,
Takashi Hakamatsuka^b and Yukihiro Goda^b^aKampo Research Laboratories, Kracie Pharma, Ltd., 3-1 Kanebo-machi, Takaoka, Toyama 933-0856, Japan^bNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received December 24, 2014)

In a previous report (Horii, C., *et al.*, *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (1), 9-12, 2014), a crossover study was performed in order to obtain basic information about the bio-equivalence between the Kakkonto decoction and its extract product. The result suggested that ephedrine and pseudoephedrine may be used as the marker compounds for the bio-equivalence judgment between preparations. In this study, we selected 3 components of the Kakkonto formula, Puerariae Radix, Glycyrrhizae Radix and Paeoniae Radix. The change in concentration of the five marker compounds, puerarin, daidzein, glycyrrhizic acid, liquiritin and paeoniflorin, in human blood plasma was observed after their oral administration. As a result, the dispersion of those plasma levels in the decoction and the product were observed at various sampling times. Variance analysis of the maximum plasma concentration ($C_{\max}$) and the area under the plasma concentration-time curve (AUC_{0-4}) for the five marker compounds revealed no significant differences between the decoction and the product or between the administration days. The statistical power ($1-\beta$) was determined to be insufficient (less than 80%) for both $C_{\max}$ and AUC_{0-4} on the five marker compounds. However, assuming that the standard deviation was the same as our result for puerarin and daidzein, when the number of the study participants is increased to 8 and 16 it is revealed that the statistical power become sufficient (more than 80%) for both $C_{\max}$ and AUC_{0-4} on puerarin and daidzein. Since puerarin and daidzein are known to be important biological active components in the Kakkonto formula, these results suggest that both compounds may be used as markers for a bio-equivalence judgment between preparations, although further study is needed to clarify this issue.

Keywords : bio-equivalence ; Kakkonto ; puerarin ; daidzein ; glycyrrhizic acid ; liquiritin ; paeoniflorin ; plasma level ; power

緒 言

生物学的同等性は、医薬品の有効性や安全性を確保する品質保証のための概念の一つである。漢方処方製剤に関し

ては、「医療用漢方製剤の取り扱いについて」¹⁾、「医療用漢方エキス製剤 GMP」²⁾等の通知に基づき製造管理、品質管理の充実が図られてきた。しかしながら、漢方処方製剤の生物学的同等性に関する研究は殆ど行われていない。漢

方処方製剤の主原料である生薬の基原は天然物であるため、多種多様な成分が含まれ、これらの成分についてすべてを網羅的に同等性に関する試験を行うことは不可能であると考えられる。したがって、より現実的に、どのように同等性を評価するか科学的な基準作りが望まれる。本研究では、漢方処方製剤において、指標となる成分を選択し、漢方処方製剤の同等性について基礎的検討を行うことを目的とした。

我々はこれまでに、エキスが日本薬局方収載品目である葛根湯について、煎剤及びエキス製剤を対象にヒト投与試験を行い、局方の指標成分のエフェドリン及びプソイドエフェドリンについて、漢方処方製剤において、同等性を判断する指標化合物となりうるかどうか検討を行い、良好な結果を得た³⁾。

本研究では、第十六改正日本薬局方にエキスとして収載され、最も著名な漢方処方の一つと考えられる葛根湯⁴⁾を対象に検討を行った。今回は処方構成生薬のうち、カッコンのプエラリン、ダイゼイン、カンゾウのグリチルリチン酸、リクイリチン、シャクヤクのペオニフロリンを分析対象として、葛根湯湯剤と医療用葛根湯エキス製剤について、それぞれをヒトに投与したときの血漿中濃度推移を明らかにし、両者の同等性について基礎的検討を行ったので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬・試液

プエラリン、リクイチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸は和光純薬工業株式会社製を、ダイゼインはフナコシ株式会社製を、ヒト血漿はコージンバイオ社製を、メタノールは純正化学株式会社製の高速液体クロマト用を、アセトニトリルは関東化学株式会社製の高速液体クロマト用または高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、ギ酸は和光純薬工業株式会社製の特級または高速液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー用を、水は Milli-Q (日本ミリポア社製) により精製されたものをそれぞれ用いた。フィルターはジエールサイエンス株式会社製の GL クロマトディスク水系/非水系 (直径 13mm, 孔径 0.45 μ m) を、シリンジはテルモ株式会社製の 1mL 容をそれぞれ使用した。

2. 製剤の調製

湯剤は、土瓶にカッコン 8g, マオウ 4g, タイソウ 4g, ケイヒ 3g, シャクヤク 3g, カンゾウ 2g 及びショウキョウ 1g と水 500mL (1 日量として使用する生薬の合計は 25g で、その 20 倍水量に相当) を加え、加熱抽出し、ガーゼ 4 枚を重ね、熱時ろ過を行い、半量 (250mL) に調製したものを葛根湯湯剤とした。本品中にプエラリンは 130mg, ダイゼインは 6.1mg, グリチルリチン酸は 48mg, リクイリチンは 211mg, ペオニフロリンは 62mg を含有する。

エキス製剤は湯剤と同じ構成生薬、配合割合により製し

たクラシエ葛根湯エキス細粒 7.5g (1 日量) を使用した。本品中にプエラリンは 109mg, ダイゼインは 3.9mg, グリチルリチン酸は 32mg, リクイリチンは 128mg, ペオニフロリンは 40mg を含有する。

3. 投与方法

被験者数は 6 とし、無作為に 2 グループとした。これらについて、湯剤及びエキス製剤のクロスオーバー試験を行った。各グループに湯剤またはエキス製剤を投与後、2 週間おいて湯剤を投与したグループはエキス製剤を、エキス製剤を投与したグループは湯剤を投与した。投与後、15 分、30 分、60 分、120 分及び 240 分に採血を行い、それらを分析に供した。

被験者の募集は大学病院医療情報ネットワーク研究センター臨床試験登録 (UMIN-CTR) において公募し、実施施設では口頭で募集を行った。食事は日頃の食生活を維持するようにし、試験前日の 21 時以降は絶食した。本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理方針」⁵⁾ に従い、社団法人石川県医師会の治験審査倫理委員会及び国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査委員会での審査を受けて実施した。

4. 分析方法⁶⁾

4.1 検量線の作成

プエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリン各 1mg を精密に取り、移動相組成溶媒 (0.1% 酢酸含有 50% アセトニトリル) に溶解し、精確に 100mL とした。これを標準原液とし、段階希釈し、検量線を作成した。

グリチルリチン酸 1mg を精密に取り、移動相組成溶媒 (0.1% ギ酸含有 50% アセトニトリル) に溶解し、精確に 100mL とした。これを標準原液とし、段階希釈し、検量線を作成した。

4.2 添加回収実験

標準原液を 1,000 倍希釈 (10ng/mL) したものを標準溶液とした。別にプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸各 1mg を精確に取り、薄めたメタノール (1 $\rightarrow$ 2) に溶解し、精確に 100mL とした。これを 1,000 倍希釈 (10ng/mL) したものを添加溶液とした。ブランク血漿 0.5mL に添加溶液 0.5mL を加えボルテックスミキサーで攪拌した後、試料調製に従い、試験溶液とした。

4.3 試料調製

血漿 0.5mL にメタノール 5mL を加え、攪拌した後、遠心分離し、上澄み液を採取した。残渣にメタノール 5mL を加え、同様に操作した。上澄み液をあわせ減圧下で濃縮したのち、残渣にプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリンの分析には 0.1% 酢酸含有 50% アセトニトリルを、グリチルリチン酸の分析には 0.1% ギ酸含有 50% アセトニトリルをそれぞれ 0.5mL 加え、フィルターでろ過をし、そのうちプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリンの分析には 5 μ L, グリチルリチン酸の分析には 10 μ L を LC/MS 装置に注入した。

5. 装置及び分析条件⁷⁻⁹⁾

プエラリン、ダイゼイン、リクイリチン及びペオニフロリンの分析には LC 部に SHIMADZU LC-10 ADvp システム（島津製作所社製）を配した SHIMADZU LCMS-2010 システム（島津製作所社製）を用いた。HPLC 条件は、カラムに YMC-Pack Pro C18, 5 μ m, 2.0mm $\times$ 150mm（ワイエムシー社製）を用い、カラム温度 20 $^{\circ}$ C, 流速 0.2mL/min とし、移動相に A 液（0.1% 酢酸アセトニトリル溶液）及び B 液（0.1% 酢酸溶液）を用い、A 液を 5% から 70% までリニアグラジェントで 60 分かけて分析した。MS 条件は、ESI ネガティブモードで行い、プローブ電圧 -3.5kV, CDL 電圧 0V, Q-array 電圧 (DC 1, 2, 3) 0/-15/-20 V, Q-array 電圧 (RF) 150 V, 検出器電圧 2kV, N₂ ガス流量 1.5L/min, CDL 温度 200 $^{\circ}$ C, ヒートブロック温度 200 $^{\circ}$ C とした。各成分の測定は、Selected Ion Monitoring (SIM) 法で行い、プエラリンは m/z 415, ダイゼインは m/z 253, リクイリチンは m/z 417, ペオニフロリンは m/z 539 をそれぞれモニタリングした。

グリチルリチン酸の分析には、LC 部に Waters ACQUITY UPLC システム（Waters 社製）を配した Waters Xevo TQ MS システム（Waters 社製）を用いた。HPLC 条件には、カラムに ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1mm $\times$ 100mm（Waters 社製）を用い、カラム温度 40 $^{\circ}$ C, 流速 0.4mL/min とし、移動相に A 液（0.1% ギ酸アセトニトリル溶液）及び B 液（0.1% ギ酸溶液）を用い、A 液を 30% から 80% までリニアグラジェントで 15 分かけて分析した。MS 条件は、ESI ポジティブモードで行い、キャピラリー電圧 3kV, コーン電圧 20V, コリジョン電圧 26V, 脱溶媒温度は 500 $^{\circ}$ C, 脱溶媒ガス流量は 1,000L/h とした。測定は Multiple Reaction Monitoring (MRM) 法で行い、Precursor Ion を m/z 823.63, Product Ion を m/z 453.47 とした。

結果及び考察

プエラリン、リクイリチン及びペオニフロリンは 1~1,000ng/mL の範囲で相関係数がそれぞれ $R^2 = 0.9998$, $R^2 = 1.000$ 及び $R^2 = 0.9999$ と良好な直線性を示した。グリチルリチン酸は 2~2,000ng/mL の範囲で相関係数が $R^2 = 1.000$ と良好な直線性を示した。また、ダイゼインは 0.1~1,000ng/mL の範囲で相関係数が $R^2 = 1.000$ と良好な直線性を示した。プエラリン、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸の添加回収率はそれぞれ 107%, 85%, 90%, 99% 及び 88% であり、それぞれ良好な回収率が得られた。

湯剤及びエキス製剤投与後のプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸の血漿中濃度推移をそれぞれ図 1~5 に示した。投与した湯剤とエキス製剤の各成分の含量が異なるため、それぞれの血漿中濃度は、エキス製剤中含量を湯剤中含量に等しいものとして補正をかけた。また、 C_{max} は、各採取時間におけ

る血漿中濃度の平均値の最高値とし、 T_{max} は、その最高値を示した時間とした。 AUC_{0-4} は投与後 4 時間までの血漿中濃度の平均値をもとに台形法により算出した。

各成分の血漿中濃度は、採血点によってはばらつきが認められた。プエラリンに関しては、投与後 30 分の血漿中濃度に湯剤とエキス製剤との間で t 検定にて有意な差 ($p < 0.05$) が認められたが、その他の成分についてはこれらの薬剤間で有意な差は認められなかった。

表 1 に各成分の T_{max} , C_{max} , AUC_{0-4} 及び MRT を示した。プエラリンの C_{max} はエキス製剤で 28ng/mL, 湯剤で 28ng/mL, AUC_{0-4} はエキス製剤で 79ng/mL $\cdot$ h, 湯剤で 74ng/mL $\cdot$ h であった。また、MRT はエキス製剤で 1.9h, 湯剤で 2.1h であった。ダイゼインの C_{max} はエキス製剤で 7.3ng/mL, 湯剤で 7.0ng/mL, AUC_{0-4} はエキス製剤で 14ng/mL $\cdot$ h, 湯剤で 13ng/mL $\cdot$ h であった。また、MRT はエキス製剤で 2.1h, 湯剤で 2.1h であった。リクイリチンの C_{max} はエキス製剤で 14ng/mL, 湯剤で 6.9ng/mL, AUC_{0-4} はエキス製剤で 32ng/mL $\cdot$ h, 湯剤で 15ng/mL $\cdot$ h であった。また、MRT はエキス製剤で 1.8h, 湯剤で 1.7h であった。ペオニフロリンの C_{max} はエキス製剤で 5.3ng/mL, 湯剤で 9.7ng/mL, AUC_{0-4} はエキス製剤で 10ng/mL $\cdot$ h, 湯剤で 13ng/mL $\cdot$ h であった。また、MRT はエキス製剤で 2.2h, 湯剤で 2.2h であった。グリチルリチン酸の C_{max} はエキス製剤で 26ng/mL, 湯剤で 13ng/mL, AUC_{0-4} はエキス製剤では 64ng/mL $\cdot$ h, 湯剤で 34ng/mL $\cdot$ h であった。また、MRT はエキス製剤で 2.0h, 湯剤で 2.1h であった。

今回、分析対象としたプエラリン、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸はそれぞれイソフラボン C-配糖体、イソフラボン（アグリコン）、フラバノン O-配糖体、モノテルペン配糖体及びトリテルペン配糖体である。これらの消化管からの吸収¹⁰⁾ には、グルコーストランスポーターを介する機構や、腸内細菌による代謝^{11,12)} があるなど複雑であり、特に後者に関しては、腸内細菌叢の個体差が知られている。これらの要因により、被験者間で測定値にばらつきが生じ、今回の結果になった

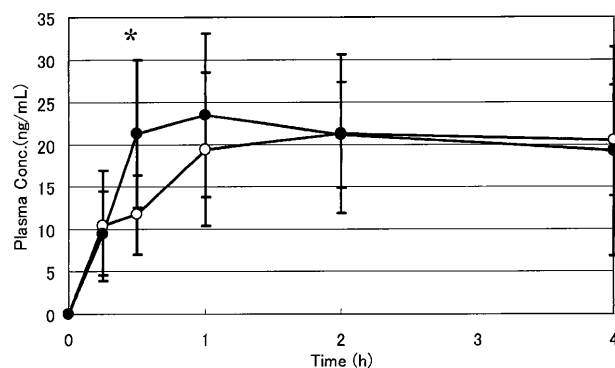


図 1 プエラリンの血漿中濃度推移 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) (●: エキス製剤, ○: 湯剤) * $p < 0.05$.

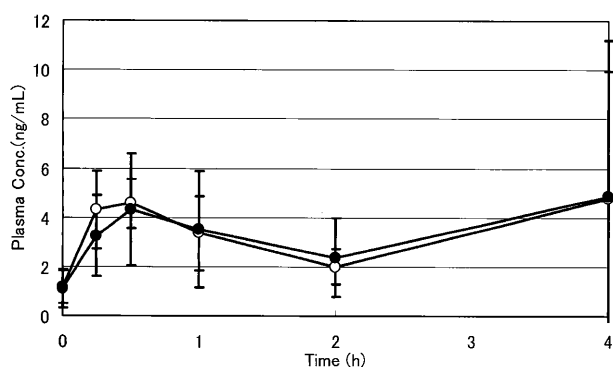


図 2 ダイゼインの血漿中濃度推移 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

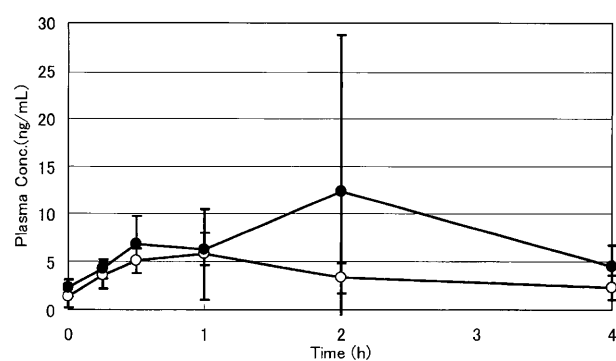


図 3 リクイリチンの血漿中濃度推移 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

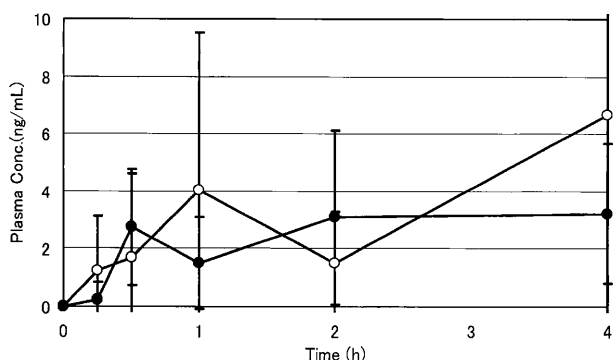


図 4 ペオニフロリンの血漿中濃度推移 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

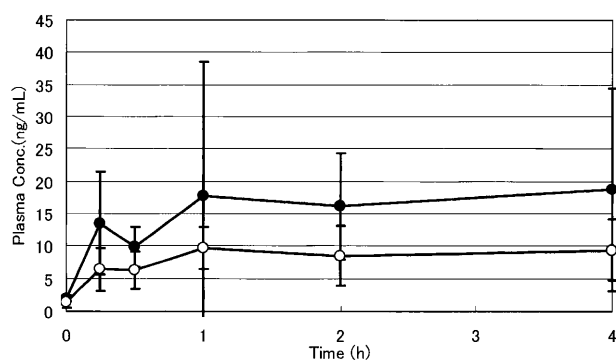


図 5 グリチルリチン酸の血漿中濃度推移 (mean $\pm$ SD, $n = 6$) (●: エキス製剤, ○: 湯剤)

表 1 湯剤, エキス製剤投与時の各成分の T_{max} , C_{max} , AUC_{0-4} 及び MRT (Values are means $\pm$ SD ($n = 6$))

		T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-4} (ng/mL $\cdot$ h)		MRT (h)	
			CV 値 (%)		CV 値 (%)			
プエラリン	湯剤	2	28 $\pm$ 4.7	17	74 $\pm$ 18	24	2.1 $\pm$ 0.2	
	製剤	1	28 $\pm$ 7.7	28	79 $\pm$ 27	34	1.9 $\pm$ 0.2	
ダイゼイン	湯剤	4	7.0 $\pm$ 3.6	51	13 $\pm$ 4.7	36	2.1 $\pm$ 0.7	
	製剤	4	7.3 $\pm$ 5.2	71	14 $\pm$ 7.3	52	2.1 $\pm$ 0.7	
リクイリチン	湯剤	1	6.9 $\pm$ 4.0	58	15 $\pm$ 4.3	29	1.7 $\pm$ 0.2	
	製剤	2	14 $\pm$ 16	112	32 $\pm$ 24	75	1.8 $\pm$ 0.2	
ペオニフロリン	湯剤	4	9.7 $\pm$ 12	119	13 $\pm$ 15	115	2.2 $\pm$ 0.7	
	製剤	4	5.3 $\pm$ 2.0	38	10 $\pm$ 4.5	45	2.2 $\pm$ 0.7	
グリチルリチン酸	湯剤	2	13 $\pm$ 2.2	17	34 $\pm$ 3.4	10	2.1 $\pm$ 0.4	
	製剤	2	26 $\pm$ 18	69	64 $\pm$ 33	52	2.0 $\pm$ 0.3	

ものと推定された。また、ダイゼインは、プエラリンやダイゼインが腸内細菌により代謝されることでも生じる¹³⁾がダイゼインの血漿中濃度の4時間値の上昇は、それによるものと推察された。プエラリン及びグリチルリチン酸に関しては、投与後1時間、2時間及び4時間における血漿中濃度に変化がないことから、観察時間の延長などの検討も必要と考えられた。

C_{max} 及び AUC_{0-4} の CV 値はプエラリンで 17~34%, ダ

イゼインで 36~71%, リクイリチンで 29~112%, ペオニフロリンで 38~119%, グリチルリチン酸で 17~69%であった。プエラリン以外は被験者間のばらつきが大きい傾向が見られた。

表 2~6 に、プエラリン、ダイゼイン、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸の C_{max} 及び AUC_{0-4} の分散分析表を示した。プエラリンの AUC_{0-4} 及びダイゼインの C_{max} に関しては、被験者の項で有意 ($p < 0.05$) で

あった。これらについては個体差が認められたものの、薬剤及び時期の項においては有意な差は認められなかった。

そこで本試験の検出力 $1-\beta^{14-18)}$ の算出を行った。その結果、プエラリンに関しては、 $C_{\max}$ で 53% 程度、 AUC_{0-4} で 33% 程度であった。ダイゼインに関しては、 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-4} ともに 20% 以下、またリクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸に関しては、 $C_{\max}$ 及び AUC_{0-4} のいずれも 10% 以下であり十分な検出力が得られていないことが判明した。そこで、得られた結果をもとに、十分な検出力を得るための被験者数を推定することとした。被験者を増やしても同様のデータが得られると仮定して被験者数の計算を行ったところ、プエラリンでは被験者数を 1 群 8 以上で十分な検出力が得られると考えられた。一方、ダイゼインでは、1 群 16 以上必要であり、リクイリチン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸では 1 群 61 でも十分な検出力が得られないことが判明した。

今回は局方で規定された指標成分であるプエラリン、ペオニフロリン及びグリチルリチン酸にダイゼイン、リクイ

リチンを加え、これらの血漿中濃度を基に、葛根湯の同等性の評価についての基礎的検討を行った。その結果、プエラリンについては、被験者数を増やすことにより、本処方の同等性に関する指標成分の一つとなる可能性が示唆された。一方、ペオニフロリンやグリチルリチン酸はシャクヤクやカンゾウの指標成分であるが、今回の結果からは同等性に関する指標成分とすることは、現時点では困難であると推察された。しかしながらシャクヤクやカンゾウは漢方処方上の重要な生薬であるため、今後も同等性の評価に関して、今回対象とした成分以外についても検討が必要と考えられる。

漢方処方製剤の主原料である生薬は天然物であり、処方製剤には多種多様な成分が含まれる。前回の報告³⁾ や今回の報告を勘案した場合、エキス剤について何らかの形で生物学的同等性を確認するには、現実的に血漿中濃度が分析可能な含有成分を対象とし、腸内細菌も含めた代謝や吸収を総合的に判断し、指標成分を適切に選択後、試験を実施していくことが重要であると考えられる。

表 2 プエラリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
AUC_{0-4}	薬剤	72.1	1	72.1	0.798	7.71
	時期	4.34	1	4.34	0.048	7.71
	被験者	4,713	5	943	10.4	6.26
	合計	5,151	11	468		
	残差	361	4	90.3		
$C_{\max}$	薬剤	4.56	1	4.56	0.187	7.71
	時期	0.05	1	0.05	0.00219	7.71
	被験者	333	5	66.6	2.73	6.26
	合計	435	11	39.6		
	残差	97.6	4	24.4		

表 3 ダイゼインの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比(分散比)	5%限界値
AUC_{0-4}	薬剤	0.46	1	0.46	0.0373	7.71
	時期	4.37	1	4.37	0.357	7.71
	被験者	321	5	64.2	5.24	6.26
	合計	375	11	34.0		
	残差	48.9	4	12.2		
$C_{\max}$	薬剤	0.27	1	0.27	0.0718	7.71
	時期	0.21	1	0.21	0.0567	7.71
	被験者	180	5	36.1	9.59	6.26
	合計	196	11	17.8		
	残差	15.1	4	3.76		

表 4 リクイリチンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比 (分散比)	5%限界値
AUC ₀₋₄	薬剤	872	1	872	2.56	7.71
	時期	473	1	473	1.39	7.71
	被験者	1,234	5	247	0.724	6.26
	合計	3,942	11	358		
	残差	1,364	4	341		
C _{max}	薬剤	156	1	156	1.08	7.71
	時期	227	1	227	1.58	7.71
	被験者	516	5	103	0.718	6.26
	合計	1,474	11	134		
	残差	575	4	144		

表 5 ペオニフロリンの分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比 (分散比)	5% 限界値
AUC ₀₋₄	薬剤	23.8	1	23.8	0.279	7.71
	時期	222	1	222	2.61	7.71
	被験者	634	5	127	1.49	6.26
	合計	1,221	11	111		
	残差	341	4	85.2		
C _{max}	薬剤	56.3	1	56.3	1.47	7.71
	時期	161	1	161	4.21	7.71
	被験者	362	5	72.4	1.89	6.26
	合計	733	11	66.6		
	残差	153	4	38.4		

表 6 グリチルリチン酸の分散分析表

	変動要因	平方和	自由度	不偏分散	F比 (分散比)	5%限界値
AUC ₀₋₄	薬剤	2,735	1	2,735	6.20	7.71
	時期	1,300	1	1,300	2.95	7.71
	被験者	2,314	5	463	1.05	6.26
	合計	8,114	11	738		
	残差	1,766	4	441		
C _{max}	薬剤	497	1	497	3.90	7.71
	時期	332	1	332	2.60	7.71
	被験者	753	5	151	1.18	6.26
	合計	2,091	11	190		
	残差	510	4	127		

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「漢方処方製剤の安全性及び同等性の評価並びに生薬の品質確保と国際調和に関する研究」及びその継続指定研究「生薬及び生薬製剤の品質確保と同等性・安全性・国際調和等に関する研究」によるものでありここに深謝する。

文 献

- Notification No. 804 (Jun. 25, 1980), "Iryouyou Kampo Seizai No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of Evaluation and Registration Division, Director of Biologics Division, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.
- Notification No.120 (May 31, 1985), "Iryoyo Kampo Ekisu No Toriatsukai Ni Tsuite", Director of the 2nd Division of Evaluation and Registration, Director of the 1st Division of Evaluation and Registration, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare.
- Horii C., Okonogi A., Okubo T., Kamakura H., Goda Y., Studies on bioequivalence of Kakkonto decoction and its extract preparation (I), *Shoyakugaku Zasshi*, **68** (1), 9-12 (2014).
- The Japanese Pharmacopoeia Sixteenth Edition (Ministerial Notification No. 65, March 24, 2011), The Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.
- Notification No. 128001 (Dec. 28, 2004), "Rinsho Kenkyu Ni Kansuru Rinri Hoshin", Director-General of Health Policy Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare.
- Ozaki Y., Noguchi M., Kamakura H., Harada M., Studies on concentration of glycyrrhizin in plasma and its absorption after oral administration of licorice extract and glycyrrhizin, *Yakugaku Zasshi*, **110**, 77-81 (1990).
- Cheng S., Qiu F., Wang S., He J., HPLC analysis and pharmacokinetic study of paeoniflorin after intravenous administration of a new frozen dry powder formulation in rats, *Chromatographia*, **64**, 661-666 (2006).
- Ma Z., Wu Q., Lee D. Y. W., Tracy M., Lukas S. E., Determination of puerarin in human plasma by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B*, **823**, 108-114 (2005).
- Yagi T., Yamauchi K., Effects of Daio-kanzo-to (Da-Huang-Gan-Cao-Tang) on colonic circular muscle motility in conscious rat: Role of glycyrrhiza in the prescription, *J. Trad. Med.*, **18**, 191-196 (2001).
- Development of polyphenol-rich functional Foods, CMC Publishing Co., Ltd., pp. 38-48 (2007).
- Hattori M., Shu Y.-Z., Shimizu M., Hayashi T., Morita N., Kobayashi K., Xu G.-J., Namba T., Metabolism of paeoniflorin and related compounds by human intestinal bacteria, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 3838-3846 (1985).
- Nakamura K., Komatsu K., Hattori M., Iwashima M., Enzymatic cleavage of the C-glucosidic bond of puerarin by three proteins, Mn²⁺, and oxidized form of nicotinamide adenine dinucleotide, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 635-640 (2013).
- Jin J.-S., Nishihata T., Kakiuchi N., Hattori M., Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in Co-culture of two human intestinal bacteria, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1621-1625 (2008).
- Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., Seibutsugakutekidotosei No Shikenho Ni Tsuite No Kaisetsu, *Iyaku hin Kenkyu*, **13**, 1106-1119 (1982).
- Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., Seibutsugakutekidotosei No Shikenho Ni Tsuite No Kaisetsu—Tokei Kaiseki Part 2—, *Iyaku hin Kenkyu*, **13**, 1267-1271 (1982).
- Ejima A., Ogata H., Kaniwa N., Aoyagi N., Shibazaki T., Watanabe Y., Motohashi K., Yamaguchi S., Suwa K., Bessho S., Aruga M., Amada I., Kitaura T., Takagishi Y., Samejima M., Shimamoto T., Imazato Y., Seibutsugakutekidotosei No Shikenho Ni Tsuite No Kaisetsu—Tokei Kaiseki Part 3—, *Iyaku hin Kenkyu*, **15**, 123-133 (1984).
- Tokei Suchihyo Henshu Iinkai, ed., "Kanyaku Tokei Suchi Hyo", Nihon Kikaku Kyokai, Tokyo (1977).
- Notification No. 0229 (Feb. 29, 2012), "Kouhatsu Iyaku hin No Seibutsugakutekidoutouseishiken Gaidorain Nadono Ichibu-kaisei Ni Tsuite", Director of Evaluation and Licensing Division, Ministry of Health, Labour and Welfare.