

マウスの回転カゴ運動に対する加味逍遙散および 加味帰脾湯の効果の投与時刻による相違

伊藤 忠信*, 村井 繁夫, 五日市 治
中村 順吉, 伊藤真理子, 金 恩暇

岩手医科大学歯学部薬理学教室

Time-dependent change in effects of Kami-syôyô-san and Kami-kihi-tô on wheel-running activity in mice

Tadanobu ITOH*, Shigeo MURAI, Osamu ITSUKAICHI
Junkichi NAKAMURA, Mariko ITO and Eun Ha KIM

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Received November 13, 1985. Accepted March 5, 1986.)

Abstract

Time-dependent changes in susceptibility of the wheel-running activity to the treatment with Kami-syôyô-san (Jia-Wei-Xiao-Yao-San) and Kami-kihi-tô (Jia-Wei-Gui-Pi-Tang) in male ddY mice were examined. 1) In the 3 hr observation experiment, Kami-syôyô-san (40, 200 and 1000 mg/kg, p.o.) and Kami-kihi-tô (40, 200 and 1000 mg/kg, p.o.) induced an increase in the activity. The highest activity was found when Kami-syôyô-san was administered at 9:00, and when Kami-kihi-tô was administered at 9:00 and/or 13:00. 2) In the 24 hr observation experiment, Kami-syôyô-san (200 mg/kg, p.o.) and Kami-kihi-tô (200 mg/kg, p.o.) induced an increase in the activity during the dark period, but did not during the light period when they were administered at 9:00. These results show that the effects of Kami-syôyô-san and Kami-kihi-tô on the wheel-running activity in mice differ with the time-of-day of the drug administration.

Key words circadian variation, wheel-running activity, Kami-syôyô-san (Jia-Wei-Xiao-Yao-San), Kami-kihi-tô (Jia-Wei-Gui-Pi-Tang)

Abbreviations CR: circadian rhythm, WRA: wheel-running activity, Kami-kihi-tô (Jia-Wei-Gui-Pi-Tang): 加味帰脾湯, Kami-syôyô-san (Jia-Wei-Xiao-Yao-San): 加味逍遙散

緒 言

薬物の効果や毒性は、生体にサーカデアンリズム (CR) が存在することから、その適用時刻によって大きく変わってくることはよく知られている。¹⁻⁴⁾

今回、著者らは漢方方剤の中で、ある種の精神・神経疾患の治療に有効性が示されている加味逍遙散および加味帰脾湯について、⁵⁻⁸⁾ マウス自発運動を指標として、投与時刻の違いによる効果について検討した。

材料と方法

1. 薬物

1) 加味逍遙散エキス原末の調整法：柴胡〔日本産, *Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae), *Bupleuri Radix*] 3.0 g, 芍薬〔中国産, *Paeonia lactiflora* PALL. (Paeoniaceae), *Paeoniae Radix*] 3.0 g, 蒼朮〔中国産, *Atractylodes lancea* DC. (Compositae), *Atractylodis lanceae Rhizoma*] 3.0 g, 当帰〔日本産, *Angelica acutiloba* KITAGAWA (Umbelliferae), *Angelicae Radix*] 3.0 g, 茯苓〔韓国産, *Poria cocos* WOLF (Polyporaceae), *Hoelen*] 3.0 g, 山梔子〔中国産, *Gardenia jasminoides* ELLIS (Rubiaceae), *Gardeniae Fructus*] 2.0 g, 牡丹皮〔中国産, *Paeonia moutan* SIMS (Paeoniaceae), *Moutan Cortex*] 2.0 g, 甘草〔中国産, *Glycyrrhiza glabra* L.var. *glandulifera* REGEL et HERDER (Leguminosae), *Glycyrrhizae Radix*] 1.5 g, 生姜〔中国産, *Zingiber officinale* ROSCOE (Zingiberaceae), *Zingiberis Rhizoma*] 1.0 g, 薄荷〔中国産, *Mentha arvensis* L.var. *piperascens* MALIN. (Labiatae), *Menthae Herba*] 1.0 g の割合で混合した生薬に約10倍量の水を加え100℃にて90分間加熱抽出したのち濾過し、減圧濃縮したのち、粉霧乾燥し、黄褐色の粉末を約10%の割合で得た。なお、加味逍遙散エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

2) 加味帰脾湯エキス原末の調整法：黄耆〔中国産, *Astragalus membranaceus* BGE. (Leguminosae), *Astragalic Radix*] 3.0 g, 柴胡〔日本産, *Bupleurum falcatum* L. (Umbelliferae), *Bupleuri Radix*] 3.0 g, 蒼朮〔中国産, *Atractylodes lancea* DC. (Compositae), *Atractylodis lanceae Rhizoma*] 3.0 g, 人參〔韓国産, *Panax ginseng* C.A. MEYER (Araliaceae), *Ginseng Radix*] 3.0 g, 茯苓〔韓国産, *Poria cocos* WOLF (Polyporaceae), *Hoelen*] 3.0 g, 遠志〔中国産, *Polygala tenuifolia* WILLD. (Polygalaceae), *Polygalae Radix*] 2.0 g, 山梔子〔中国産, *Gardenia jasminoides* ELLIS. (Rubiaceae), *Gardeniae Fructus*] 2.0 g, 大棗〔中国産, *Zizyphus jujuba* MILLER var. *inermis* REHD. (Rhamnaceae), *Zizyphi Fructus*] 2.0 g, 当帰〔日本産, *Angelica acutiloba* KITAGAWA (Umbelliferae), *Angelicae Radix*] 2.0 g, 甘草〔中国産, *Glycyrrhiza glabra* L.var. *glandulifera* REGEL et HERDER (Leguminosae), *Glycyrrhizae Radix*] 2.0

g, 生姜〔中国産, *Zingiber officinale* ROSCOE (Zingiberaceae), *Zingiberis Rhizoma*] 1.0 g, 木香〔中国産, *Aucklandia lappa* DCNE. (Compositae), *Saussureae Semen*] 1.0 g, 酸棗仁〔中国産, *Zizyphus jujuba* MILL. (Rhamnaceae), *Zizyphi Spinosi Semen*] 3.0 g, 竜眼肉〔台湾産, *Euphoria longana* LAM. (Sapindaceae), *Longanae Arillus*] 3.0 g の割合で混合した生薬に約10倍量の水を加え100℃にて90分間加熱抽出したのち濾過し、減圧濃縮したのち、粉霧乾燥し、黄褐色の粉末を約10%の割合で得た。なお、加味帰脾湯エキス原末は株式会社津村順天堂より供与された。

2. 動物

実験には ddY 系雄性マウス（静岡農場）を1群10匹ずつとして用いた。マウスは室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 50~60%, 明暗サイクル（明期; 6:00~18:00, 暗期; 18:00~6:00）の環境下でオリエンタル固型飼料と水道水で飼育し、この条件の部屋で実験を行った。なお、マウスの使用は1回限りとし、その時の体重は 25~30 g であった。

3. 方法

加味逍遙散および加味帰脾湯の投与量は、前報⁸⁾と同量（40, 200, 1000 mg/kg）として、用時純水に溶解し、体重 10 g 当り 0.1 ml の割合で胃内に投与した。対照群には生理食塩水を等量投与した。マウスの自発運動量は前報⁸⁾と同様に回転カゴ法による wheel-running activity (WRA) で示した。加味逍遙散および加味帰脾湯の投与時刻の違いによる WRA への影響の実験では 9:00 (morning), 13:00 (afternoon) あるいは、18:00 (evening) にそれぞれ別々のマウスに薬物を投与した。薬物投与後、直ちに1匹ずつ回転可能な金網カゴに入れた（この実験では箱への通路は閉鎖した）。この場合、マウスは直ちに走行し始め、金網カゴは回転した。WRA の測定は1時間ごとに3回、3時間目まで行った。次に、加味逍遙散および加味帰脾湯の24時間にわたる WRA への影響の実験では、8:30 にマウスを金網の箱に入れて30分間環境に慣らしたのち、9:00 に加味逍遙散または加味帰脾湯を 200 mg/kg 投与し、再びマウスを箱に入れた（この実験では回転金網カゴへの通路は開放し、往来できるようにした）。この場合、マウスは明期では箱内に留ることが多く、金網カゴへの移動は少なく、暗期では行動は活発となり、金網カゴの回転数は増大した。WRA の測定は10:00 から2時間ごとに翌朝8:00 まで行った。得られたデータの有意性については Student's *t*-test で検定を行った。

結 果

1. 加味逍遙散の効果

1) 9:00~12:00における実験: 加味逍遙散を9:00に投与し, 1時間ごとにWRAを測定した。Fig. 1aには加味逍遙散40, 200および1000mg/kg群のWRAの経時変化を示す。40および1000mg/kg群の2および3時間目におけるWRAは, いずれも対照群のそれら(2時間値 319.3 ± 70.9 , 3時間値 93.3 ± 34.8) よりも有意に高い値($p < 0.05$)を示した。200mg/kgによるWRAは, 対照群値よりも高い傾向を示したが, 個々の値の変動が大きいため, 統計学的に有意差は認められなかった(前報⁸⁾の加味逍遙散のWRAの値をも参照した)。なお, 3時間目までの総WRAでは, Fig. 2のmorningに示すように, 40および1000mg/kg群に对照群との間に有意差が認められたが, 200mg/kg群には認められなかった。

2) 13:00~16:00における実験: 加味逍遙散を13:00に投与し, 1時間ごとにWRAを測定した。

この時間帯での対照群のWRAは9:00~12:00の時間帯でのそれよりも一般に低かった。すなわち, 1時間値が 350.9 ± 69.2 , 2時間値が 73.0 ± 32.1 , 3時間値が 54.8 ± 29.3 であった。Fig. 1bには加味逍遙散40, 200および1000mg/kgのWRAの経時変化を示す。1000mg/kg群の2時間目のWRA (404.1 ± 101.9) が対照群のWRAより有意な高値($p < 0.01$)を示した以外は, いずれの用量も対照群と同程度の経時変化を示した。なお, 3時間目までの総WRAでは, Fig. 2のafternoonに示すように, 1000mg/kg群が有意に高い値($p < 0.05$)を示し, 40および200mg/kg群では対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 18:00~21:00における実験: 加味逍遙散を18:00に投与し, 1時間ごとにWRAを測定した。この時間帯での対照群のWRAは1時間値が 412.6 ± 90.4 , 2時間値が 301.9 ± 78.0 , 3時間値が 295.0 ± 78.7 であった。これら対照群のWRAは13:00~16:00の時間帯での対照群のWRAよりも高値であった。また, 9:00~12:00の時間帯での対照群のWRAとでは1時間目で低値の, 2時間目で

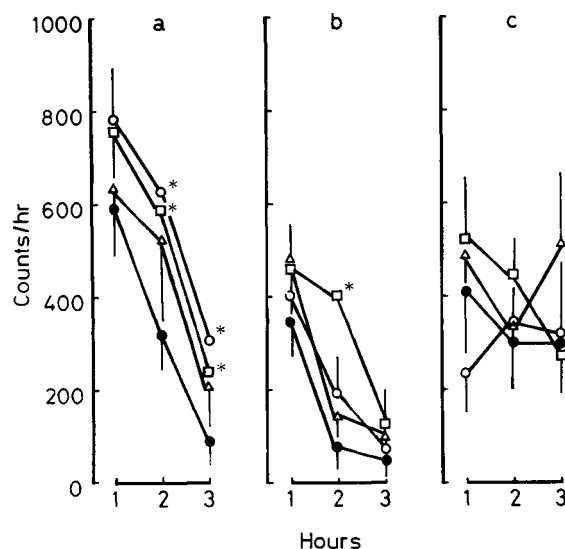


Fig. 1 Temporal changes in mean wheel-running activity counts of the mice given a saline (●—●) or Kami-syōyō-san 40 (○—○), 200 (△—△) and 1000 (□—□) mg/kg, p.o. at one of three times of day (9:00 for a, 13:00 for b and 18:00 for c).

The cumulative activity counts during 1 hr segment were measured for 3 hrs. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. *: Statistical significance from the saline treated group at $p < 0.05$.

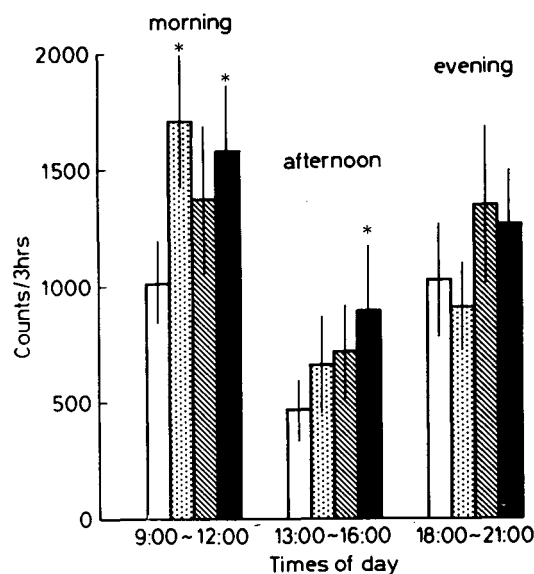


Fig. 2 Total wheel-running activity counts for 3 hrs after the administration of saline (open column) or Kami-syôyô-san (stippled column: 40 mg/kg, hatched column: 200 mg/kg and closed column: 1000 mg/kg) at 9:00 for morning, 13:00 for afternoon and 18:00 for evening. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. *: Statistical significance from the saline treated group at $p < 0.05$.

同程度の、3時間目で高値の経時変化を示した。加味逍遙散 40, 200 および 1000 mg/kg 群の WRA は Fig. 1c に示すように、個々の変動が大きいので、統計学的に有意差は認められず、対照群と同程度の経時変化を示した。なお、3時間目までの総 WRA では、Fig. 2 の evening に示すように、対照群との間に有意差は認められなかった。

2. 加味帰脾湯の効果

1) 9:00~12:00における実験：加味帰脾湯を 9:00 に投与し、1時間ごとに WRA を測定した。加味帰脾湯 40, 200 および 1000 mg/kg 群の WRA は、Fig. 3a (前報⁸⁾ の加味帰脾湯の WRA の値を参照した) に示すように用量依存的ではないが、対照群よりも高値の傾向を示した。特に、1時間目では 40 mg/kg 群が、2時間目では 40 および 1000 mg/kg 群が、3時間目では 40, 200 および 1000 mg/kg 群がいずれも対照群より有意に高値 ($p < 0.05$) を示した。なお、3時間目までの総 WRA では、Fig. 4 に示すように、いずれの用量でも対照群のそれよりも有意に高値を示した。

2) 13:00~16:00における実験：加味帰脾湯を

13:00 に投与し、1時間ごとに WRA を測定した。Fig. 3b に示すように、加味帰脾湯 40, 200 および 1000 mg/kg 群の WRA は、40 mg/kg 群の 1 時間目の値を除いて対照群のそれよりもいずれも有意に高値の経時変化を示した。また、3時間目までの総 WRA では、Fig. 4 に示すように、対照群の WRA よりも有意に高い値を示した。

3) 18:00~21:00における実験：加味帰脾湯を 18:00 に投与し、1時間ごとに WRA を測定した。Fig. 3c に示すように、200 mg/kg 群の 3 時間目の WRA (556.6 ± 71.6) の有意な高値 ($p < 0.05$) を示した以外は、対照群より低値の傾向を示したが、統計学的には有意差は認められなかった。なお、3時間目までの総 WRA では、Fig. 4 の evening に示すように、個々の変動が大きく、対照群との間に有意差は認められなかった。

3. CR 変動に及ぼす加味逍遙散および加味帰脾湯の効果

対照群は Fig. 5 に示すように、10:00~18:00 の明期には輪回し行動はほとんど観察されず、マウスは箱の中に留まっていることが多かった。20:00 以降

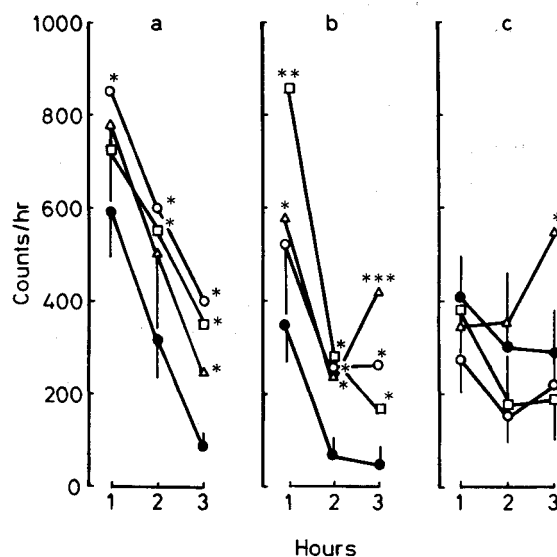


Fig. 3 Temporal changes in mean wheel-running activity counts of the mice given a saline (●—●) or Kami-kihi-tô 40 (○—○), 200 (△—△) and 1000 (□—□) mg/kg, p.o. at one of three times of day (9:00 for a, 13:00 for b and 18:00 for c).

The cumulative activity counts during 1 hr segment were measured for 3 hrs. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. *, ** and ***: Statistical significance from the saline treated group at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

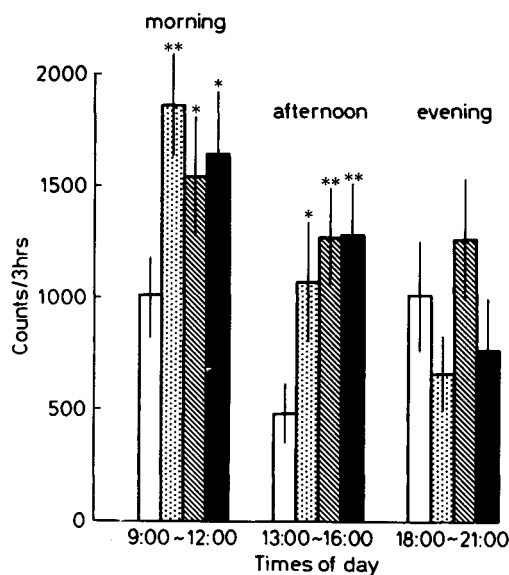


Fig. 4 Total wheel-running activity counts for 3 hrs after the administration of saline (open column) or Kami-kihi-tô (stippled column: 40 mg/kg, hatched column: 200 mg/kg and closed column: 1000 mg/kg) at 9:00 for morning, 13:00 for afternoon and 18:00 for evening.

Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. * and **: Statistical significance from the saline treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

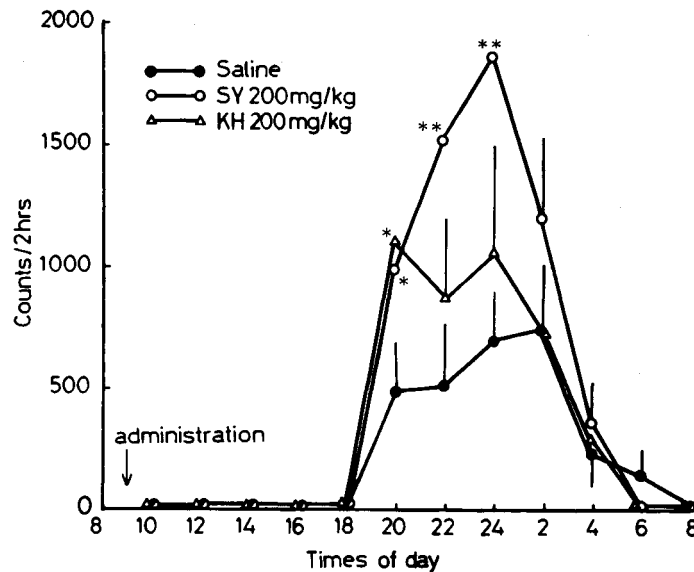


Fig. 5 Circadian variation in mean wheel-running activity counts of the mice given a saline (10 ml/kg, p.o.), Kami-syōyō-san (200 mg/kg, p.o.) or Kami-kihi-tō (200 mg/kg, p.o.) at 9 : 00, under a 12 hr light-dark cycle (light period, 6 : 00–18 : 00 ; dark period, 18 : 00–6 : 00).

The cumulative activity counts during 2 hr segments were measured for 24 hrs. Data are expressed as the mean $\pm$ S.E. *and** : Statistical significance from the saline treated group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. SY : Kami-syōyō-san. KH : Kami-kihi-tō.

の暗期には輪回し行動が出現した。すなわち、20 : 00 の WRA の値は 498.6 ± 171.3 、22 : 00 では 508.4 ± 258.0 、24 : 00 では 708.0 ± 207.4 、2 : 00 では 766.8 ± 266.4 、4 : 00 では 248.4 ± 111.1 、6 : 00 では 155.8 ± 96.7 であったが、8 : 00 では輪回し行動は観察されなかった。要するに、マウスは夜行性の動物であることから、対照群においては、Fig. 5 にみられるような CR 変動を示した。

加味逍遙散 200mg/kg 群では Fig. 5 に示すように、10 : 00–18 : 00 の明期においては、対照群と同様に輪回し行動は観察されなかったが、20 : 00 では WRA の値は 1004.4 ± 281.5 ($p < 0.05$)、22 : 00 では 1535.4 ± 397.3 ($p < 0.01$)、24 : 00 では 1878.2 ± 332.1 ($p < 0.001$) となり、対照群よりも有意に高い値を示した。2 : 00 では対照群の WRA よりも高い傾向を示したが有意差は認められなかった。なお、4 : 00 以降では対照群と同程度の経時変化を示した。

加味帰脾湯 200mg/kg 群では、Fig. 5 に示すように 10 : 00–18 : 00 の明期においては、加味逍遙散

や対照群の場合と同様に輪回し行動は観察されなかった。しかし、暗期においては、20 : 00 では WRA の値は 1096.6 ± 338.8 となり、対照群よりも有意に高い値 ($p < 0.05$) を示し、22 : 00 および 24 : 00 では対照群の WRA よりも高い傾向を示したが有意差は認められなかった。なお、2 : 00 以降では対照群と同程度の経時変化を示した。

要するに、加味逍遙散および加味帰脾湯の早期 1 回投与は明暗サイクル環境下において、明期では両者とも WRA には影響を与えなかったが、暗期では両者とも WRA を増大した。

考 察

漢方方剤の有効性並びに安全性については長い間の臨床経験を経て今日に伝えられているが、それら方剤の効果については、客観的に証明されることが必要である。

本実験で用いた加味逍遙散および加味帰脾湯は、臨床においてある種の精神・神経疾患の治療に有効

性が示されているが、⁵⁻⁸⁾これら薬物に共通した精神・神経症状の治療目標は、“イライラ,” “根気がない,” “不眠,” “心気症” などである。しかし、これら症状の基盤となっている身体的症状の治療目標はそれぞれ異なる。すなわち、加味逍遙散では、体力がなく、腹部は一般的に軟弱で、時には咽頭に異物感を訴え、肺機能が高進し、逆に肝機能が抑制されているために発現してくる精神・神経症状を目標としている。これに対して加味帰脾湯では、体力がなく、貧血ぎみで、腹部は軟弱な、いわゆる、脾・胃の機能が抑制されているために発現してくる精神・神経症状を目標としている。著者ら⁸⁾は先に、この両薬物はマウスの身体的機能状態の如何によって作用効果が異なることを報告した。

今回は、明暗サイクル環境下において加味逍遙散および加味帰脾湯の投与時刻による効果の違いについて、マウスのWRAを指標として検討した。

対照群のWRAは、morningとeveningでは大体同程度の比較的高いレベルを示したが、afternoonでは著明な低下を示し、実験時刻によりWRAに差異が認められた。一般に、マウスの自発運動活性は明暗サイクル環境下において、明期に低く、暗期に高いことはよく知られている。⁹⁻¹⁰⁾加味逍遙散はWRAを促進する傾向にあり、その効果は用量依存的ではないが、morningにおいて著明であった。一方、加味帰脾湯はmorningおよびafternoonでWRAを著明に促進したが、eveningでは対照群と差異はなかった。このようなことは、加味逍遙散および加味帰脾湯は投与時刻によってWRAに対する効果が異なることを示している。

次に加味逍遙散および加味帰脾湯を早朝の一定時刻に投与したとき、その後24時間にわたるWRAがどのように変動するかを検討した。この場合は、3時間観察の実験の場合と条件が異なり、箱と回転金網カゴをマウスが自由に往来できる装置で実験を行った。その結果対照群においては、マウスの輪回し行動は明期では観察されず、暗期で観察され、夜行性特有の行動パターンを示した。加味逍遙散および加味帰脾湯の200 mg/kgの投与においては、明期では対照群と同様に輪回し行動は観察されず、投与10時間以上経た暗期において、いずれもWRAを著明に増大した。この24時間観察の実験においては、両薬物の効果には本質的な差がみられなかった。

以上のことから、加味逍遙散や加味帰脾湯の効果は投与時刻のみならず、行動観察時刻によっても変化する可能性が示唆された。このようなことは、この両薬物は臨床において、患者の行動促進化への動

機づけが投与時刻によって異なることを示唆しているのかもしれない。

今回の3時間および24時間観察で得られた薬物効果の日内変動は一つには肝における薬物代謝酵素活性のCRの変化や、薬物に対する脳の組織感受性の変化によるものなのかもしれない。実際、肝における薬物代謝にCRが存在し、¹²⁾また、amphetamineやchlorpromazineに対する脳の組織感受性にCRが存在することが知られている。^{9,13)}さらに、薬物がCRの位相を移動させる可能性も残されている。

現在、うつ病や不眠症の発現にCRの脱同調が関与しているらしいと考えられている。¹¹⁾この脱同調したリズムが薬物によって正常化されるならば、症状が改善され、疾病の治癒に結びつくかもしれない。しかしながら、加味逍遙散や加味帰脾湯のCRに及ぼす効果については、今回の結果のみでは説明できない。さらに詳細な検討が必要である。

結 論

加味逍遙散および加味帰脾湯のマウス自発運動に及ぼす投与時刻の違いによる効果が回転カゴ法を用いて検討された。

1) 3時間観察の実験において、加味逍遙散は9:00投与時に、加味帰脾湯は9:00および13:00投与時に運動活性を著明に促進した。

2) 24時間観察の実験において、加味逍遙散および加味帰脾湯は、明期ではいずれも運動活性には影響を与えなかったが、暗期ではいずれもこれを増大した。

以上のことから、加味逍遙散および加味帰脾湯のマウス運動活性に及ぼす効果は投与時刻によって異なることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、漢方方剤などを提供して下さいました津村順天堂に深謝いたします。

文 献

- 1) 高橋清久, 高橋康郎: “サーカディアンリズム,” 中外医学社, 東京, p 3-60, 1980
- 2) 佐々木隆, 千葉喜彦: “時間生物学,” 朝倉書店, 東京, p 1-47, 1984
- 3) 古谷雅樹, 古谷妙子 (訳): “生物時計,” 学会出版センター, 東京, p 1-36, 1977
- 4) 千葉喜彦: “生物時計,” 岩波書店, 東京, p 1-16, 1977

- 5) 相見三郎：老人性ボケ（恍惚病）の治療：抑肝散の経験。日本東洋医学会誌 **25**, 227-228, 1975
- 6) 高原 明：抑うつ状態に対する漢方的治療。漢方診療 **1**, 60-79, 1982
- 7) 筒井末春：漢方と心身症。臨床精神医学 **13**, 35-40, 1984
- 8) 伊藤忠信, 金 恩瑕, 船越正夫, 西郷恵彌：マウスにおける加味逍遙散および加味帰脾湯のWheel-Running Activityに及ぼす効果。基礎と臨床 **19**, 1461-1465, 1985
- 9) Kuribara, H. and Tadokoro, S.: Circadian variation in methamphetamine- and apomorphine-induced increase in ambulatory activity in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **17**, 1251-1256, 1982
- 10) Kuribara, H. and Tadokoro, S.: Circadian variation in susceptibility to the ambulation-increasing effect to scopolamine in mice. *Japan. J. Pharmacol.* **33** 927-931, 1983
- 11) 高橋清久, 高橋康郎：薬物のサーカディアンリズムに及ぼす影響。精神薬療基金研究年報第12集, 179-188, 1980
- 12) Radzialowski, F.M. and Bausquet, W.F.: Daily rhythmic variation in hepatic drug metabolism in the rat and mouse. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **163**, 229-238, 1968
- 13) Wolfe, G.W., Bonsquet, W.F. and Schnell, R.C.: Circadian variation in response to amphetamine and chlorpromazine in the rat. *Common. Psychopharmacol.* **1**, 29-37, 1977