

四物湯及びその構成生薬, 当帰, 芍薬, 川芎及び地黄の向精神作用 に関する実験薬理学的研究

渡辺 裕司,*^{a)}佐藤 貴史,^{a)}松本 欣三,^{a)}太田 浩之,^{a)}松田 治巳,^{b)}島田多佳志^{b)}

^{a)}富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験部門, ^{b)}富山医科薬科大学附属病院和漢診療部

Psychopharmacological effects of Shimotsu-to and Shimotsu-to components, Toki, Shakuyaku, Jio and Senkyu, in the mice

Hiroshi WATANABE,*^{a)} Takashi SATOH,^{a)} Kinzo MATSUMOTO,^{a)} Hiroyuki OHTA,^{a)}
Harumi MATSUDA^{b)} and Takashi SHIMADA^{b)}

^{a)}Section of Pharmacology, Research Institute for Wakan-Yaku (Oriental Medicines),
Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{b)}Department of Japanese Oriental Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical
University Hospital

(Received June 11, 1991. Accepted September 4, 1991.)

Abstract

Psychotropic effects of Shimotsu-to and Shimotsu-to components, Toki, Senkyu, Jio and Shakuyaku were investigated in mice stressed by forced shaking (twice a day at 4°C for 4 days; 7 times in total) and isolated for 6 to 7 weeks. Shimotsu-to dose-dependently prolonged pentobarbital-induced sleep in stressed mice and decreased isolation-induced aggressive behavior (AGB) at 1-5 and 0.1-2.5 g/kg (*p.o.*), respectively. In addition, 1:1:1:1 mixtures (pseudo-Shimotsu-to) of Toki, Senkyu, Jio and Shakuyaku extracts also dose-dependently prolonged pentobarbital sleep in stressed mice and depressed isolation-induced AGB at 2.5-5 and 0.25-1 g/kg (*p.o.*), respectively. In contrast, neither Shimotsu-to nor pseudo-Shimotsu-to affected pentobarbital sleep in unstressed animals. Removal of Jio, Shakuyaku or Toki from Shimotsu-to abolished the effect on pentobarbital sleep in the stressed mice. The depressive effect of Shimotsu-to on isolation-induced AGB disappeared by removal of Senkyu, Toki or Jio. Each extract of the Shimotsu-to components dose-dependently prolonged pentobarbital sleep in the stressed mice at 0.25-1.25 g/kg, which is equivalent to 1-5 g/kg Shimotsu-to, but out of 4 components, only Jio significantly prolonged it at 0.625 g/kg. Senkyu and Toki extracts, both significantly depressed AGB in isolated mice at 1.25 g/kg, which is equivalent to 5 g/kg Shimotsu-to. Jio and Shakuyaku extracts slightly but not significantly depressed AGB. These results suggest that the effects of Shimotsu-to on pentobarbital sleep in the stressed mice and AGB in isolated mice may be due to the interaction among Shimotsu-to components rather than the specific action of one of the Shimotsu-to components.

Key words Kampo-hozai, Shimotsu-to, Toki, Senkyu, Jio, Shakuyaku, aggressive behavior, stress.

Abbreviations AGB, aggressive behavior; Shimotsu-to (Si-Wu-Tang), 四物湯.

緒 言

様々なストレスによって生じた精神不安、不眠、うつ状態、心身症などの治療において向精神薬が無効な場合あるいは副作用のために向精神薬の服用が継続できない場合に漢方療法の有効性が報告されている。¹⁻³⁾ 一方、魏と渡辺⁴⁾が臨床的に精神不安、抑うつ状態に対して有効率の高い漢方方剤、大気一転湯 (Taiki-itten-to) が動物実験でも抗うつ作用を発現することを実験薬理学的に示している。我々は基本方剤の一つで、当帰、芍薬、川芎及び地黄から成る四物湯や葛根湯など、数種の漢方方剤が低温下振盪ストレス⁵⁾を負荷したマウスにおいて短縮した pentobarbital 誘発睡眠を回復させ、また隔離飼育によって誘発されるマウス間の攻撃行動を抑制することを報告した⁶⁾。本研究では漢方方剤の向精神作用に寄与する成分の検索及び開発を行うための基礎的検討として、生薬構成の単純な四物湯についてその構成生薬の向精神作用についてさらに詳細に調べた。

材料と方法

(1) 実験動物：体重 25～45 g の ddY 系雄性マウスを使用した。

(2) 使用薬物：使用した構成生薬は下記の通りである。当帰 (Toki), *Angelica acutiloba* KITAGAWA (日本奈良県産), 芍薬 (Shakuyaku), *Paeonia lactiflora* PALLAS, 川芎 (Senkyu), *Cnidium officinale* MAKINO, 地黄 (Jio), *Rehmannia glutinosa* LIBOSCHITZ var. *purpurea* MAKINO (いずれも栃本天海堂より購入), pentobarbital-Na (東京化成)。

方剤の調製：四物湯 (当帰 30, 川芎 30, 地黄 30, 芍薬 30) (単位 g) に 900 ml の精製水を加えて 100℃ で 90 分間加熱抽出し、更に炉液を凍結乾燥して乾燥エキスを粉末とした。四物湯、四物湯去川芎、四物湯去芍薬、四物湯去当帰、四物湯去地黄の収率はそれぞれ 42.0, 42.3, 43.7, 40.3 及び 36.6 % であった。また川芎、当帰、地黄及び芍薬を各単独で抽出した場合の収率は 16.5, 33.8, 33.7 及び 34.8 % であった。

(3) 低温下振盪ストレス負荷マウスにおける pentobarbital 誘発睡眠の測定：魏と渡辺の方法⁴⁾を改変した^{5,6)}。即ちマウス 10 匹を小ケージ (24×18×13 cm) に入れて振盪器 (毎分 250 回, 1 日 2 回各 40 分間) 上に乗せ、低温室 (4℃) で振盪した。このような振盪ストレスを 4 日間で合計 7 回繰り返

し、最終振盪の 10 分後に薬液または生理食塩水を経口投与した。1 時間後に pentobarbital-Na 45 mg/kg 腹腔内投与し、マウスの正向反射が消失してから回復するまでの時間を睡眠時間として測定した。

(4) 長期隔離飼育マウスの闘争行動：マウスを 1 匹ずつ小ケージに入れて隔離飼育した。隔離飼育を開始してから 6 週間後及び 7 週間後に同じ組み合わせのマウス 2 匹を 20 分間同一小ケージに入れて、闘争発現時間を測定した。闘争行動は biting and wrestling を指標として判定した^{6,7)}。第 1 回目 (6 週間後) の測定の 1 時間前に生理食塩水のみを投与し、第 2 回目 (7 週間後) の測定の 1 時間前に薬液または生理食塩水を経口投与した。

(5) 統計処理：分散分析後 Duncan の新多重比較検定, Student's t 検定または対応のある t 検定を行った。

結 果

1. 低温下振盪ストレス負荷マウスにおける pentobarbital 睡眠に対する四物湯及び四物湯構成生薬 4 種混合物の影響

pentobarbital-Na (45 mg/kg, *i.p.*) 誘発睡眠時間はおおよそ 60 分程度であったが、低温下振盪ストレス負荷によりこの睡眠時間は約 40 % 減少した (Fig. 1)。四物湯及び四物湯構成生薬 4 種混合物 (偽四物湯) (1～5 g/kg) は短縮した pentobarbital 誘発睡眠を用量依存的に回復させたが、偽四物湯の効果は四物湯に比べて弱いものの 5 g/kg, 即ち構成生薬をそれぞれ 1.25 g/kg 投与した場合、四物湯 5 g/kg とほぼ同程度の効果を示した。

四物湯から地黄または芍薬を除いた 1 味抜き方剤にはストレス負荷で短縮した pentobarbital 誘発睡眠を回復させる効果は認められなかった。四物湯去当帰は 1.9 g/kg で短縮した睡眠時間を回復させる傾向を示したもののその効果は有意ではなかった。一方、四物湯去川芎は四物湯 5 g/kg 相当の用量において短縮した pentobarbital 誘発睡眠を回復させた (Fig. 2)。

Fig. 3 にはストレス負荷マウスにおける pentobarbital 誘発睡眠に対する四物湯の各構成生薬単独の影響を示している。芍薬、当帰及び川芎は 0.25～1.25 g/kg (それぞれ四物湯 1～5 g/kg に相当) の範囲で pentobarbital 誘発睡眠を回復させる傾向を示したが、有意ではなかった。一方、地黄は 0.625 g/kg (四物湯 2.5 g/kg に相当) で有意に睡眠時間

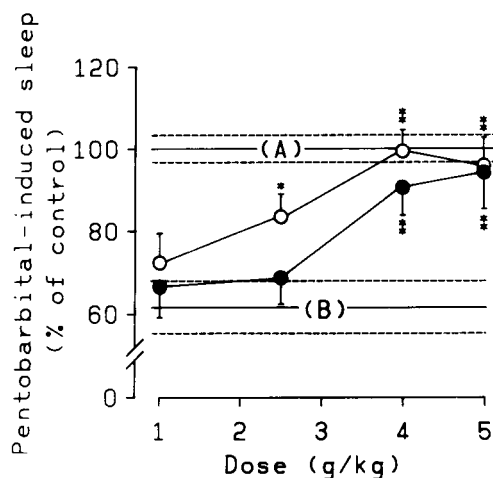


Fig. 1 Effect of Shimotsu-to and pseudo-Shimotsu-to on pentobarbital-induced sleep in stressed mice.

Mice (no more than 10 at a time) were placed in a small cage and exposed to a lower temperature (4°C) for 40 min with forced shaking (FSLT). These stress applications were carried out for 4 days (7 times in total). Ten min after the last stress application, test drugs were orally administered. Pentobarbital-Na (45 mg/kg, *i.p.*) was administered 60 min after Shimotsu-to (○) or pseudo-Shimotsu-to (●) administration. The areas indicated by (A) and (B) are the mean ($\pm$ S.E.M.) duration of pentobarbital-induced sleep in unstressed and stressed animals, respectively, which were treated with saline. Each datum represents the mean $\pm$ S.E.M. of 10 mice. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared to the saline-treated stressed mice (B).

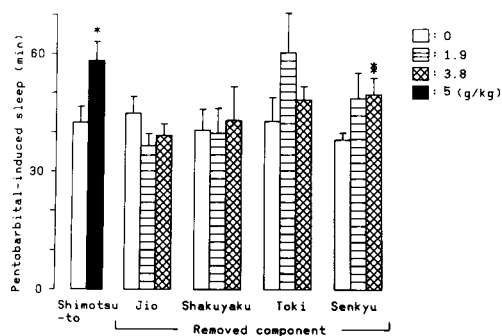


Fig. 2 Effect of removal of one component from Shimotsu-to on pentobarbital-induced sleep in FSLT stressed mice.

Mice were in total 7 times subjected to stress as described in Fig. 1. Each drug was orally administered 10 min after the last stress. After 60 min, pentobarbital-Na (45 mg/kg, *i.p.*) was injected. Each datum represents the mean $\pm$ S.E.M. of 5-15 mice. * p < 0.05 and ** p < 0.01 compared to the respective drug-untreated stressed group.

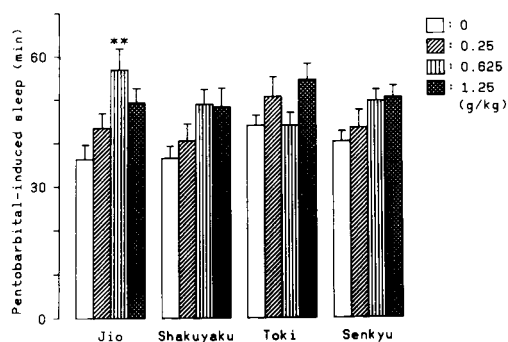


Fig. 3 Effect of Jio-, Shakuyaku-, Toki- and Senkyu-extracts on pentobarbital-induced sleep in FSLT stressed mice.

Mice were in total 7 times subjected to FSLT stress as described in Fig. 1. Each extract was orally administered 10 min after the last stress. After 60 min pentobarbital-Na (45 mg/kg, *i.p.*) was injected. Each datum represents the mean $\pm$ S.E.M. of 10 mice. ** p < 0.01 compared to the respective drug-untreated stressed group.

を回復させた。

四物湯 4 種構成生薬のうちから 2 種を組み合わせた場合のストレス負荷マウスにおける pentobarbital 誘発睡眠に及ぼす影響を Fig. 4 に示した。地黄 (1.25 g/kg) + 当帰 (1.25 g/kg), 地黄 (1.25 g/kg) + 川芎 (1.25 g/kg) 及び当帰 (1.25 g/kg) + 川芎 (1.25 g/kg) で pentobarbital 誘発睡眠を有意に回復させた。しかし他の組合せ, 即ち芍薬 + 地黄, 芍薬 + 当帰, 及び芍薬 + 川芎の場合, 若干 pentobarbital 誘発睡眠を回復させる傾向がみられたがそれらの効果は有意ではなかった。

2. 長期隔離飼育マウスの闘争行動に対する抑制作用

隔離飼育を開始して 6 週間後及び 7 週間後の 2 回の実験で観察される闘争行動に対する四物湯及び四物湯構成生薬混合物の影響を Fig. 5 に示した。四物湯 (0.1~3 g/kg) は用量依存的に隔離飼育マウス間の闘争行動を抑制した。一方偽四物湯 0.5 g/kg (四物湯 0.5 g/kg に相当) は闘争行動に影響を与えなかったが, 1 g/kg (四物湯 1 g/kg に相当) の用量で有意な抑制効果を示した。

四物湯から川芎, 当帰または地黄を除いた 1 味抜き方剤は隔離飼育マウス間の闘争行動に影響を及ぼさなかったのに対し, 芍薬を除いた方剤は四物湯と同様に有意に闘争行動を抑制した (Fig. 6)。四物湯の各構成生薬単独の効果を検討した結果, 川芎及び当帰 (1.25 g/kg) がそれぞれ単独で隔離飼育マウス間の闘争行動を有意に抑制した。これに対して地黄及び芍薬も闘争行動を抑制する傾向を示した。

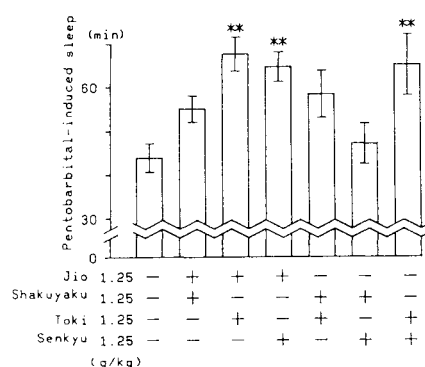


Fig. 4 Effect of the combination of two components out of Jio, Shakuyaku, Toki and Senkyu on pentobarbital-induced sleep in FSLT stressed mice.

Mice were in total 7 times subjected to FSLT stress as described in Fig. 1. Each extract combination was orally administered 10 min after the last stress. After 60 min pentobarbital-Na (45 mg/kg, *i.p.*) was injected. Each datum represents the mean $\pm$ S.E.M. of 10 mice. ** $p < 0.01$ compared to the respective drug - untreated stressed group.

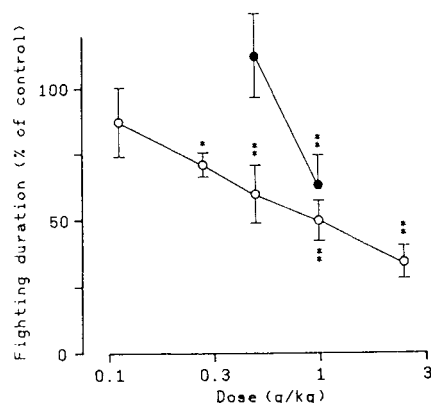


Fig. 5 Effect of Shimotsu-to and pseudo-Shimotsu-to on aggressive behavior in isolated mice.

Mice, which were individually housed for 6 weeks, were given saline (*p.o.*) 60 min before the first test. Two isolated animals, one a visitor and the other a resident, were placed in a small cage for 20 min. The duration of aggressive behavior was measured and used as a control value. After the first trial, each mouse was kept housed individually. One week after the first trial, either saline or test drugs were orally administered to the same pair of mice as the first trial. After 60 min, the aggressive behavior was measured as described above. Open and closed circles represent the effects of Shimotsu-to and pseudo-Shimotsu-to, respectively. Each datum represents the mean of 6-8 experiments with the S.E.M., indicated. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the saline-treated control group.

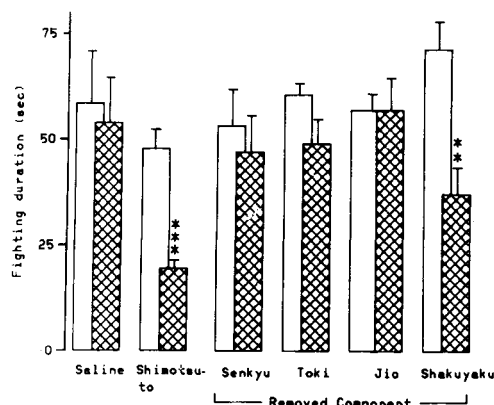


Fig. 6 Effect of Shimotsu-to and removal of one component from Shimotsu-to on aggressive behavior in isolated mice.

The aggressive behavior was measured as described in the text and Fig. 5. One week after the first trial, either saline or test drugs were orally administered to the same pair of mice as the first trial. After 60 min, the aggressive behavior was measured. Open and hatched columns are the data obtained at the first and second trial, respectively. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to the data obtained at the respective first trials.

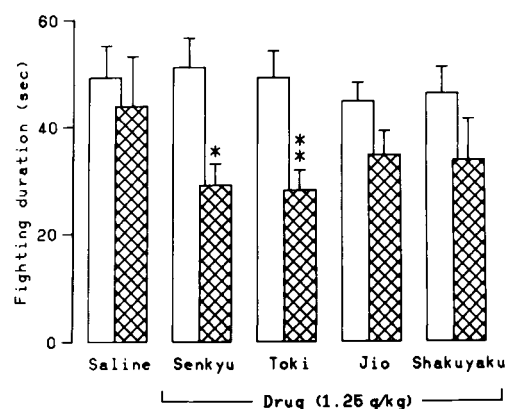


Fig. 7 Effects of Senkyu-, Toki-, Jio- and Shakuyaku-extracts on aggressive behavior in isolated mice.

The aggressive behavior was measured as described in the text and Fig. 5. One week after the first trial, either saline or test drugs were orally administered to the same pair of mice as the first trials. After 60 min, the aggressive behavior was measured. Open and hatched columns are the data obtained at the first and second trial, respectively. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to the data obtained at the respective first trials.

が、統計的な有意差は認められなかった (Fig. 7)。Fig. 8 に四物湯構成生薬のうち芍薬を除いた他の3種の生薬、即ち川芎、当帰及び地黄のうちから2種を組み合わせた場合の隔離飼育マウス間の闘争行動に対する影響を示した。当帰 (1.25 g/kg) + 地黄 (1.25 g/kg) 及び当帰 (1.25 g/kg) + 川芎 (1.25 g/kg) 投与により闘争行動は有意に抑制されたが、川芎 (1.25 g/kg) + 地黄 (1.25 g/kg) は影響を及ぼさなかった。

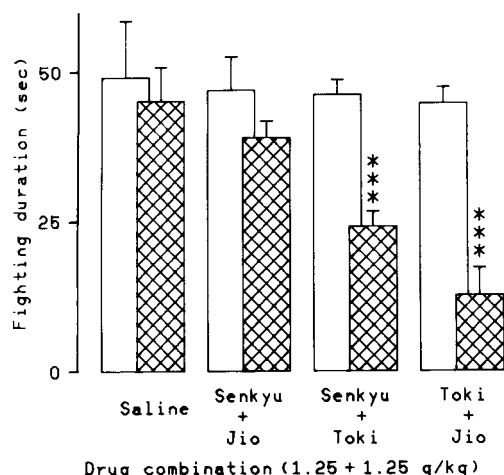


Fig. 8 Effect of the combination of two components out of Senkyu, Toki and Jio on aggressive behavior in isolated mice.

The aggressive behavior was measured as described in the text and Fig. 5. One week after the first trial, either saline or test drugs were orally administered to the same pair of mice as the first trial. After 60 min, aggressive behavior was measured. Open and hatched columns are the data obtained at the first and second trials, respectively. *** $p < 0.001$ compared to the data obtained at the respective first trials.

考 察

様々なストレス負荷により末梢及び中枢神経系機能の変化、鎮痛閾値の変化、barbital 誘発睡眠の延長などが誘発されることが知られている。⁸⁻¹¹⁾ 一方、本研究において用いた低温下振盪ストレス負荷はマウスにおける pentobarbital 誘発睡眠を短縮し⁵⁾、この睡眠時間短縮の発現には4日間に渡り、合計7回以上のストレス負荷が必要であることから、中枢機能変化が亜急性的なものである可能性が示唆されている。^{5,6)} 我々は四物湯が低温下振盪ストレス負荷によって短縮された pentobarbital 誘発睡眠を回復さ

せることを報告したが⁶⁾、今回、四物湯の4種構成生薬をそれぞれ単独で抽出し、四物湯と同じ比率で混合した薬物 (四物湯4種構成生薬混合物) が少なくとも 4 g/kg (各生薬 1 g/kg に相当) 以上の用量で四物湯と同様の効果を発現することを観察した。この結果は四物湯の作用が四物湯を構成する各生薬のいずれに由来するのか、あるいはどの生薬間の相互作用に由来するのかという問題を検討する上で重要である。

四物湯より1種ずつ構成生薬を除いた方剤のうち地黄、芍薬または当帰を除いた1味抜き方剤ではストレス負荷によって短縮した pentobarbital 誘発睡眠を回復させる効果が消失したが、川芎を除いた1味抜き方剤にはその効果が維持されていたことは地黄、芍薬及び当帰がストレス負荷動物における四物湯の作用発現に重要であることを示している。しかし Fig. 3 に示すように四物湯の各構成生薬のうち地黄のみが 0.625 g/kg 投与量でストレス負荷により短縮した pentobarbital 誘発睡眠が有意に回復したのを除き、他の用量あるいは他の生薬では、有意な効果が観察されなかった。これらの結果は地黄が作用する上で、至適用量が存在する可能性を示唆する。しかし地黄 1.25 g/kg に相当する偽四物湯 5 g/kg が、短縮した pentobarbital 誘発睡眠を有意に回復させたことを考え合わせると、四物湯のストレス負荷動物に対する作用がひとつの構成生薬に起因すると言うよりは寧ろ、複数の構成生薬間の相互作用によって発現するものと考えられる。

四物湯が低温下振盪ストレス負荷により短縮した pentobarbital 誘発睡眠を回復させる機序は不明である。Matsumoto ら⁵⁾ は低温下振盪ストレス負荷により短縮した pentobarbital 誘発睡眠を低用量の diazepam が回復させ、また benzodiazepine 拮抗薬の Ro 15-1788 によって diazepam の効果が抑制されることから中枢 GABA 系の亜急性的な機能変化が惹起される可能性を示唆している。しかし diazepam とは異なり四物湯には抗コンフリクト効果がない⁶⁾ ことから、四物湯が diazepam 様に働いて pentobarbital 誘発睡眠を回復させる可能性は少なく、GABA 系以外の神経系を介して作用しているものと推測される。

長期隔離飼育したマウス間で観察される闘争行動に対して四物湯が抑制したが、これは先に我々が報告した結果を確認したものである⁶⁾。一方、四物湯の4種構成生薬混合物の闘争行動に対する用量依存性を四物湯と比較した結果、前者の作用が後者の作用とは必ずしも一致しないものの、少なくとも 1 g/kg

以上の用量においてはほぼ四物湯と同程度の闘争抑制効果を示した。従って四物湯の4種構成生薬混合物の抗闘争効果は四物湯の闘争行動抑制効果の少なくとも一部を反映するものと考えられる。

四物湯より1種ずつ構成生薬を除いた方剤のうち芍薬を除いた1味抜き方剤のみが隔離飼育マウス間の闘争行動を抑制し、他の1味抜き方剤は何等の影響を示さなかったことは芍薬以外の構成生薬が四物湯の抗闘争効果に寄与している可能性を示唆する。一方、各構成生薬を単独投与(1.25 g/kg)した場合、地黄及び芍薬で有意ではなかったものの各生薬単独で闘争行動抑制効果が認められた。1味抜き方剤の結果を考え合わせると四物湯の抗闘争効果はおもに川芎、当帰または地黄のいずれかの単独効果に由来するのではなく寧ろ、3種生薬を混合することによって発現する効果に基づくものと考えられる。Fig. 8に示すようにこれら3種の生薬のうち川芎(1.25 g/kg)+地黄(1.25 g/kg)を除いて他の組合せ、即ち川芎+当帰及び当帰+地黄の組合せはいずれも四物湯と同様に隔離飼育マウス間の闘争行動を有意に抑制した。これらの結果は地黄が川芎及び当帰の効果発現に修飾的な影響を及ぼしている可能性を示唆している。

隔離飼育によって誘発される闘争行動の神経機構に関してはGABA-benzodiazepine系の機能変化が一部関与し、biazepamによる闘争行動の抑制がbenzodiazepine拮抗薬Ro 15-1788投与で遮断される¹²⁾。しかし先に考察したように四物湯にはdiazepamと異なり抗コンフリクト効果がないことから四物湯及びその構成生薬による闘争行動抑制が中枢のGABA系を亢進させることによるものとは考え難い。一方、隔離飼育マウス間の闘争行動発現には隔離飼育に伴った中枢noradrenaline神経系⁷⁾をはじめ中枢catecholamine神経系の機能変化の関与が示唆されており、¹³⁾四物湯及びその構成生薬がこれらの神経系に働いて闘争行動を抑制する可能性も考えられるが、今後更なる検討が必要であろう。

結 論

低温下振盪ストレス負荷によって短縮したpento-barbital誘発睡眠を四物湯が回復させる効果には構成生薬間の相互作用が寄与していることが示唆された。また長期隔離飼育マウス間の闘争行動抑制効果には当帰及び川芎が重要であり、更に地黄、当帰及び川芎間の相互作用も作用発現に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は科学技術庁の「生体情報伝達機構の解析・制御技術の開発に関する研究」の研究費及び医薬資源研究振興会の研究奨励金によった。

文 献

- 1) 杵渕 彰：不眠症・うつ状態・心身症。治療 **71**, 81-86, 1989.
- 2) 高原 明：葛根湯の精神神経科的効用について。The KAMPO, 臨時増刊 24-31, 1984.
- 3) 栗山一八：心的 Aggression に対する黄連解毒湯の効用。日本東洋医学雑誌 **34**, 100-101, 1985.
- 4) 魏 振装, 渡辺裕司：新しい漢方方剤大気一転湯の中枢作用に関する実験薬理学的研究。和漢医薬学会誌 **6**, 8-12, 1989.
- 5) Matsumoto, K., Satoh, T., Hong Bin, L., Ohta, H. and Watanabe, H. : Effects of forced shaking stress at low temperature on pentobarbital-induced sleep in mice. *Gen. Pharmac.* **33**, 100-106, 1991.
- 6) 渡辺裕司, 松本欣三, 佐藤貴史, 太田浩之, 松田治巳：四物湯、葛根湯及び黄連解毒湯の向精神作用に関する実験薬理学的検討。和漢医薬学会誌 **7**, 99-107, 1990.
- 7) Matsumoto, K., Cai, B., Satoh, T., Ohta, H. and Watanabe, H. : Desipramine enhances isolation-induced aggressive behavior in mice. *Pharmac. Biochem. Behav.* **39**, 100-106, 1991.
- 8) Hayes, R. L., Bennett, G. J., Newlon, P. G. and Mayer, D. J. : Behavioral and physiological studies of nonnarcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Res.* **155**, 69-90, 1978.
- 9) Willow, M., Carmody, J. and Carroll, P. : The effects of swimming in mice on pain perception and sleeping time in response to hypnotic drugs. *Life Sci.* **26**, 219-224, 1980.
- 10) 喜多富太郎, 秦多恵子, 米田良三, 尾陰多津子：環境温度リズムの変更によるストレス (SART ストレス) とマウス・ラットの生体機能変化。日薬理誌 **71**, 195-210, 1975.
- 11) Soubrie, P., Thiebot, M. H., Jobert, A., Montastruc, J. L., Hery, F and Hamon, M. : Decreased convulsant potency of picrotoxin and pentetrazol and enhanced [³H] flunitrazepam cortical binding following stressful manipulations in rats. *Brain Res.* **189**, 505-517, 1980.
- 12) Skolnick, P., Reed, G. F., Paul, S. M. : Benzodiazepine-receptor mediated inhibition of isolation-induced aggression in mice. *Pharmac. Biochem. Behav.* **23**, 17-20, 1985.
- 13) Bell, R., Hepper, P.G. : Catecholamine and aggression in animals. *Behav. Brain Res.* **23**, 1-21, 1987.