

ラットの加齢変化に及ぼす六味丸の影響

藤井 孝*, 福森 信隆, 多田 幸恵, 三栗谷久敏, 池田 虎雄,
矢野 範男, 高橋 博, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 佐々木美枝子

東京都立衛生研究所毒性部病理研究科

Influences of Rokumi-gan (Liu-Wei-Wan) on occurrence of
senile changes in aged rats

Takashi FUJII*, Nobutaka FUKUMORI, Yukie TADA, Hisatoshi MIKURIYA,
Torao IKEDA, Norio YANO, Hiroshi TAKAHASHI, Katsuhiko YUZAWA,
Akemichi NAGASAWA and Mieko SASAKI

Division of Pathology, The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health

(Received May 17, 1993. Accepted August 20, 1993.)

Abstract

The inhibitory or enhancing effects of Rokumi-gan (Liu-Wei-Wan), Chinese medicine, on occurrence of senile changes were investigated in aged rats. The powder of Rokumi-gan was administered in pelleted diets to rats of both sexes for 8 months. Groups of 25 rats of each sex at 18 months old were fed one of 4 diets, either the basal diet (C group) or basal diet containing 0.4, 1.2 or 3.6 % Rokumi-gan (L, M and H group). The survivals of C, L, M and H group were 88, 76, 80 and 76 %, respectively in the males and 68, 84, 64 and 84 % in the females. The mean intakes of the compound were daily doses of 156, 488 and 1410 mg/kg in the males and 180, 513 and 1482 mg/kg in the females. There were no compound-related deaths or lesions in exposed rats. No biologically significant changes in organ weights or hematologically or clinical chemistry values were found in these rats. Under the conditions of this study, there is no evidence of toxic activity of Rokumi-gan in rats of both sexes. Moreover, it is suggested that Rokumi-gan may inhibit the occurrence of spontaneous disease of the rat kidney.

Key words Rokumi-gan, aged rats, feed study, influences to senile changes.

緒 言

漢方方剤および生薬（以下、漢方薬とする）は、歴史的背景と経験とに支えられた信頼性がある。近年は、高齢化社会を目前にして、中年以降の健康保持や老人医療への関心が高まり、とくに漢方薬による療法の、これらに適しているとして期待されている。この社会状況を背景にして、東京都は昭和63年度より、「東洋医学検討会」を設置し、漢方医療を科学的に解明し、取り入れていく方向で、体系的に取り組んできた。このなかで、漢方薬を多面的に評価

すべく、同一の薬剤を用いて、臨床、薬理および品質管理研究を並行して実施することにした。共通の被検薬剤としては、都立豊島病院東洋医学科で、老人性疾患、泌尿器系疾患に頻用されている六味丸散剤（以下、六味丸と略す）を選択した。

六味丸は、小児薬として愛用されてきたが、成人の陰虚証にも有効で¹⁾、老人性疾患にも多用されている^{2,3)}。動物実験では加齢に伴う動脈硬化の発症を防止するとの報告もある⁴⁾。さらに、ヒトでは食道の異型上皮の癌化を防止し、動物実験で胃および肺の腫瘍誘発を抑制するなどの腫瘍に対する効果も認められている⁴⁾。

*〒169 東京都新宿区百人町3-24-1
3-24-1 Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan

このように六味丸は、老人性疾患にも用いられ、抗腫瘍作用が認められるなど、その有効性が明らかにされてきているが、安全性の確認を目的とした実験は少ない。そこで、著者らは安全性の評価および有効性の再確認を目的として、先ず、若年ラットによる13週間投与試験⁵⁾ならびにラット泌尿器系の毒性物質との併用投与試験⁶⁾を行った。この結果、六味丸には明らかな毒性はなく⁵⁾、ラットに膀胱癌、腎臓障害などを誘発するオルトフェニルフェノール^{7,9)}との併用では、この作用を、軽減する効果のあることが示唆された⁶⁾。

今回は、ラットを用い、とくに中年期から六味丸を連用した場合、加齢に伴って発生する種々の疾病に対し、どのような影響を与えるかを観察し、その安全性および有効性を評価する目的で実験を行い、結果を得たので報告する。

材料と方法

(1) 被検物質：六味丸は、熟地黄8、山薬4、山茱萸4、澤瀉3、茯苓3、牡丹皮3の割合で均一に混合、粉末化した13週間投与試験⁵⁾と同一ロット (Lot No.900830；ウチダ和漢薬株式会社) の薬剤を用いた。本剤は硬質ポリエチレン製容器に乾燥剤とともに充填され、ボトルインナーシールで密封された状態で搬入され、当所低温薬品庫にて4℃で保管された。

(2) 実験動物と飼育環境：F344/DuCrj ラット雌雄 (日本チャールス・リバー) 各150匹を4週齢で購入し、基礎飼料CE-2 (日本クレア) と水道水とを自由に摂取させ、18カ月齢 (77週齢) まで飼育した。ラットは、バリア飼育室の、自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式個別ケージに1匹ずつ収容された。飼育室は、室温22～24℃、湿度50～60%、換気1時間に10回 (効率99.9% HEPA フィルター経由)、照明6：00～18：00に、それぞれ制御されている。

(3) 投与方法および用量：投与は、ラットが18カ月齢と中年期であること、8カ月間の比較的長期投与であることから、強制投与に順化させるのは困難と考え、添加飼料摂取による経口投与とした。投与用量は、前回の13週間投与試験で⁵⁾ ヒトの常用量180 mg/kg/日が、ラットに明らかな障害を及ぼさなかったことから、これを低用量に、中および高投与量は、公比3で540および1620 mg/kgに設定した。

(4) 試験飼料の作製：これまでの著者らの実験結果では、F344 ラットの1日飼料摂取量は、雌雄とも

20週齢以上では、平均約50 g/kg 体重となっている。すなわち、飼料50 g中に180 mgの六味丸を添加 (濃度0.36%) して摂取させると、上述した低用量の投与に相当すると考えた。そこで、六味丸の0、0.4、1.2および3.6%添加の4種類の試験飼料を作製することにした。試験飼料の製造は日本配合飼料 (株) 知多工場に依頼し、粉末飼料CE-2 (日本クレア) に各設定濃度で添加、混合し、固形飼料化したものを購入した。試験飼料は、2カ月毎に作製し、使用するまでは4～10℃の冷蔵飼料庫に保管した。

(5) 投与群および期間の設定：ラットが77週齢 (18カ月齢) になった時点で、視診および触診によって明らかな疾病状態のものを除き、雌雄別に体重による層別化後、無作為に各試験群に割り付けた。試験群は、雌雄とも各群25匹のラットで構成し、上記の試験飼料を摂取させる4群を設定、合計200匹を用いた。

試験飼料は、ラットが78週齢 (18カ月齢) になった時点から113週齢 (26カ月齢) まで、35週間 (8カ月間) 摂取させた。投与期間中は、ラットの自己融解を防ぎ、的確な肉眼および組織所見を得る目的で、死亡解剖ではなく、可能な限り瀕死状態で発見し、エーテル麻酔下にて剖検を実施した。

(6) 一般状態検査：瀕死、死亡および異常行動の有無の検査、被毛、可視粘膜の観察は1日2回、1週間に5日行った。土、日曜日および祝祭日の観察は、午前1回とし、この際に発見した死亡例は冷蔵保存し、可及的速やかに剖検した。摂餌および摂水量 (重量) は1カ月に1回測定した。この際は、自動給水装置ではなく、給水瓶で飲料水を与えた。

(7) 血液学的検査：投与終了後の解剖時にエーテル麻酔下で大腿静脈より採血し、多項目自動血球計数装置E-4000 (東亜医用電子) により、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値および血小板数を測定した。これらの数値から、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度を算出した。また、メイ・ギムザ染色血液塗抹標本により異常血液細胞の検索および白血球の分画を行った。

(8) 血清生化学的検査：解剖時に得た血液を遠心管にとり、3000 rpmで10分間遠心、上清を分離し、自動分析装置Automatic Analyzer 7150 (日立) を用いて、アルブミン量、アルカリフォスファターゼ活性、アミラーゼ活性、総ビリルビン量、直接ビリルビン量、カルシウム量、コリンエステラーゼ活性、総コレステロール量、遊離型コレステロール量、クレアチンフォスフォキナーゼ活性、クレアチ

ニン量, γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性, グルコース量, グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ活性, グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性, リパーゼ量, 燐, ロイシンアミノペプチダーゼ活性, 乳酸デヒドロゲナーゼ活性, 燐脂質量, 中性脂肪, 総蛋白量, 尿酸量および尿素窒素量を測定した。

(9) 病理学的検査: 投与期間終了後, 生存例は前述のごとくエーテル麻酔下で放血屠殺し, 肉眼的検索を行った。途中死亡または瀕死屠殺例(以下, 死亡例とする)も, 生存例と同様に処置した。脳, 心臓, 肺, 胸腺, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 前立腺, 子宮, 卵巣は摘出し, 器官重量を測定した。この他, 顎下腺, 舌下腺, 耳下腺, 食道, 胃, 大・小腸, 脾臓, 膀胱, 包皮腺, 陰核腺, 乳腺, 大腿骨を摘出した。摘出した器官組織は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後, 定法に従ってパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン重染色後, 光学顕微鏡にて組織学的検索を行った。

(10) 統計学的分析: 体重, 摂餌・摂水量, 血液・血清生化学的検査および臓器重量等の測定値の検定は, Bartlett 検定法を用い, 分散の均一性について検定し, 分散が一樣であれば一元分散分析および Sheffe の多重比較検定を行った。また, 分散が非一樣であれば kruskal-Wallis 検定および Sheffe 型の順位と検定を行った。組織学的検査では, 変化の出現率を Fisher's exact test を用いて検定した。危険率は全て5%においた。

結 果

Table I に示すごとく, 雌雄の C 群 (0% 添加群) および投与群は投与終了時 113 週齢で, 生存率は 60% 以上であった。C 群に比べ, 雄では各投与群の生存率は低いが, 雌では M 群 (1.2% 添加群) を除き, はほぼ同じであった。雄では L 群 (0.4% 添加群) で, 雌では L 群を除く各群で早期に死亡が見られた。投与期間前半 (17 週まで) の死亡は, 雄では L 群が 4 例, 雌では C および H 群 (3.6% 添加群) が各 1 例, M 群が 2 例であった。これら生存率および生存期間の変動において, 投与濃度の増加に関連した増強または軽減は認められなかった。

死亡例では, 腫瘍が全例に発生し, 単核球性白血病, 下垂体腺腫および精巣の間細胞腫が多発した。これら腫瘍の発生率は, C 群と投与群との間で有意な差がみられず, 投与濃度に関連した変動も認められなかった。非腫瘍性変化の組織像の多くは白血病細胞の浸潤などによって修飾されていた。心臓の局所性線維化は雄の C 群に 100% (3/3), M 群に 20% (1/5) 発生したが, 他の雌雄各群では観察されなかった。肝臓の小胆管増生, 腎臓の慢性腎症 (Fig. 1), 脾臓のヘモジデリン沈着の発生率および変化程度は, C 群と投与群との間で顕著な差異を示さなかった。ここで, 白血病発症例を除いた場合の慢性腎症 (変化程度 3 以上)¹⁰⁾ の発生状況をみると, 雄では, C 群 100% (3/3), L 群 75% (3/4), M 群 100%

Table I Survival and body weight changes.

Group ¹⁾	Survival ²⁾ (%)	Survival weeks ³⁾	First death ⁴⁾	Body weight		
				Initial ⁵⁾	Final ⁶⁾	Ratio ⁷⁾
Male						
C	88 (22/25)	31.3 ± 3.2 (3)	32	424 ± 26 (25)	407 ± 26 (22)	-0.40
L	76 (19/25)	17.8 ± 7.6* (6)	5	423 ± 25 (25)	408 ± 24 (19)	-0.35
M	80 (20/25)	30.2 ± 7.1 (5)	13	423 ± 26 (25)	390 ± 34 (20)	-0.78
H	76 (19/25)	29.7 ± 4.9 (6)	22	420 ± 29 (25)	403 ± 34 (19)	-0.40
Female						
C	68 (17/25)	27.9 ± 8.9 (8)	6	267 ± 20 (25)	280 ± 13 (17)	0.49
L	84 (21/25)	32.0 ± 2.5 (4)	27	260 ± 22 (25)	283 ± 28 (21)	0.88
M	64 (16/25)	24.6 ± 8.4 (9)	7	260 ± 16 (25)	292 ± 25 (16)	1.23
H	84 (21/25)	25.0 ± 8.1 (4)	8	260 ± 24 (25)	287 ± 24 (20)	1.04

1) Group of rats given feed containing 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6% (H) Rokumi-gan. 2) Survival ratio (%) at the termination. 3) Mean survival weeks of dead rats (Mean $\pm$ S.D.); Parentheses shows number of dead rats. 4) Weeks on study in the first rats found dead or moribund. 5) Mean body weight (Mean $\pm$ S.D.) at the beginning of the administration. 6) Mean body weight (Mean $\pm$ S.D.) at the termination of the administration. 7) Final weight-initial weight/initial weight $\times$ 10.

* Significant differences to the control group ($p < 0.05$).

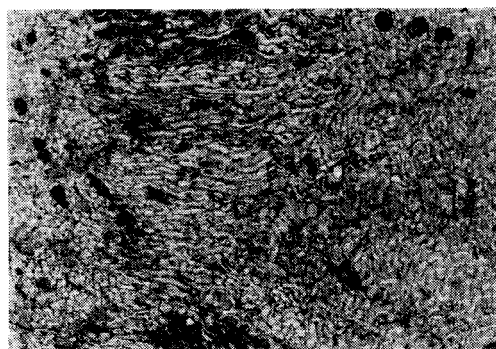


Fig. 1 Severe chronic nephropathy of male rat given feed containing 0% Rokumi-gan. $\times 55$.

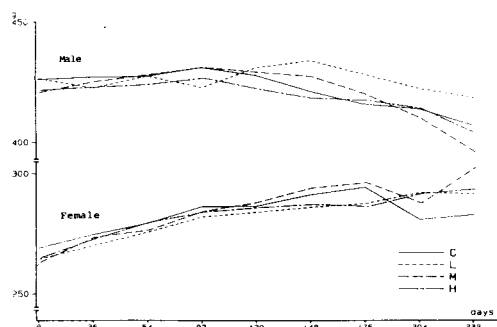


Fig. 2 Body weight changes of middle-aged rats of both sexes given feed containing Rokumi-gan for 8 months.

(4/4), H 群 66% (2/3), 雌では, C 群 80% (4/5), L 群 66% (2/3), M 群 17% (1/6), H 群 66% (2/3) の発生率で, 雌では C 群に比べ投与群は低かった。

投与開始後の体重変化は, 各群とも無作為抽出した 10 匹の平均値で代表させ, Fig. 2 に示した。雄は L 群を除き各群とも投与開始後 13 週 (91 週齢) までは僅かに増加, 以後は緩やかに減少した。L 群は他の群に遅れて, 21 週目頃 (99 週齢) がピークであった。雌では L および H 群が投与開始から終了まで漸増した。C 群と M 群とは, 17~25 週目まで緩やかな増加, 以後 29 週目までは急激に低下, その後はまた増加した。このように, 体重変化の推移には雌雄差はあるものの, 投与に関連した差異はみられなかった。投与開始時および終了時の平均体重値は Table I に示すように, 雌雄とも C 群と投与群との間に有意差は認められず, 投与濃度に比例した増減傾向もみられなかった。各群の終了時平均体重値を, それぞれの開始時と比較するため, 増減指数を示した。雄では, 各群とも指数はマイナスであったが, C 群に比べ, M 群の低下が目立った。一方, 雌では, 各群ともプラスであり, C 群に比べ, 投与群の増加が大きく, とくに M 群の上昇が明らかであった。

投与群の摂餌量は, C 群と比較して 1 カ月目の測定では, M 群雄で有意に多かったが, その他の測定月では大差なかった。各測定月とも投与各群の間では顕著な差は認められなかった。Table II に摂餌量から算定した六味丸投与量の変動を示した。投与初期は, 各群とも期待した用量を下回っているが, 中期から終了時にかけては, 設定用量に近似した値であった。摂水量は, C 群に比べ投与群では, 投与期間に比例して, 多くなる傾向を示したが, 投与濃度に関連した増加ではなかった。

血液学的検査の結果を Table III に示した。C 群に比べ, 有意ではないが, 投与群雄の赤血球数, ヘモグロビン量は少なく, ヘマトクリット値は低く, 血小板数は多かった。赤血球指数のうち, 平均赤血

Table II Intakes of Rokumi-gan.

Months ¹⁾	1	3	5	7
Male ²⁾				
L	130 $\pm$ 35 (10) ³⁾	160 $\pm$ 14 (10)	164 $\pm$ 16 (10)	170 $\pm$ 18 (9)
M	422 $\pm$ 38 (10)	480 $\pm$ 62 (10)	491 $\pm$ 35 (10)	558 $\pm$ 49 (8)
H	1235 $\pm$ 219 (10)	1397 $\pm$ 187 (10)	1451 $\pm$ 101 (10)	1555 $\pm$ 183 (9)
Female				
L	171 $\pm$ 35 (10)	183 $\pm$ 15 (10)	185 $\pm$ 20 (10)	181 $\pm$ 38 (9)
M	436 $\pm$ 64 (10)	505 $\pm$ 114 (9)	540 $\pm$ 92 (9)	571 $\pm$ 56 (7)
H	1264 $\pm$ 219 (10)	1458 $\pm$ 101 (10)	1584 $\pm$ 180 (10)	1620 $\pm$ 245 (9)

1) Months on study. 2) Rats in each group were fed 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6% (H) Rokumi-gan in diets. 3) Mean $\pm$ S.D. (mg/kg/day), the numbers of rats weighed Rokumi-gan intake were shown in parentheses.

Table III Summary of hematological examination.

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾		C 20	L 19	M 17	H 16
Male					
RBC ⁴⁾	(10 ⁶ /mm ³)	9.57±1.64 ³⁾	8.86±1.65	9.19±1.27	8.96±1.45
WBC ⁵⁾	(10 ³ /mm ³)	6.2±2.9	8.4±7.6	6.8±2.6	6.9±3.0
Hemoglobin	(g/dl)	16.4±3.2	15.4±2.6	16.0±2.2	15.6±2.2
Hematocrit	(%)	51.5±8.8	48.9±7.1	50.1±6.5	49.3±6.7
Platelet	(10 ³ /mm ³)	781±171	893±184	873±199	883±185
MCV ⁶⁾	(μ ³)	54.4±3.5	55.8±3.9	54.6±1.4	55.2±3.1
MCH ⁷⁾	(μμg)	17.2±1.4	17.5±0.9	17.4±0.6	17.5±1.0
MCHC ⁸⁾	(%)	31.6±1.4	31.4±1.5	31.9±0.6	31.7±0.8
Differential of leukocytes(%)					
Neutrophils		41.7±10.8	43.3±8.8	45.7±11.4	49.6±11.5
Lymphocytes		55.4±11.6	54.2±8.9	51.2±11.6	48.0±10.1
Monocytes		1.5±1.5	1.2±0.8	1.8±1.5	1.6±1.1
Eosinophils		1.5±0.9	1.2±1.1	1.2±1.1	1.4±0.9
No. of rats		16	21	14	20
Female					
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	8.34±0.68	8.34±0.86	8.51±0.33	8.42±0.36
WBC	(10 ³ /mm ³)	3.3±0.7	3.8±2.2	4.1±1.8	3.0±0.5
Hemoglobin	(g/dl)	15.6±0.9	15.7±1.5	15.9±0.5	15.7±0.5
Hematocrit	(%)	47.4±2.4	47.0±4.3	48.3±1.2	47.6±1.6
Platelet	(10 ³ /mm ³)	653±136	603±177	589±133	634±93
MCV	(μ ³)	57.0±2.4	56.6±1.5	56.8±1.4	56.5±1.4
MCH	(μμg)	18.8±0.7	18.8±0.4	18.7±0.6	18.7±0.4
MCHC	(%)	33.0±0.5	33.3±0.5	32.9±0.4	33.1±0.3
Differential of leukocytes (%)					
Neutrophils		35.0±11.6	35.2±10.3	35.8±8.8	35.7±9.6
Lymphocytes		61.4±11.6	62.1±10.2	61.4±9.5	61.7±9.8
Monocytes		1.8±0.8	1.8±1.1	1.5±1.6	1.4±1.1
Eosinophils		1.8±1.3	0.8±0.9	1.3±1.2	1.3±1.2

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6 % (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats without leukemia from survived rats examined in each group. 3) Mean±S.D. 4) Red blood cell count. 5) White blood cell count. 6) Mean corpuscular volume. 7) Mean corpuscular hemoglobin. 8) Mean corpuscular hemoglobin concentration.

球容積および平均赤血球血色素量は、若干増加していた。さらに、投与群雄では白血球数が増加し、白血球の分画では、C群に比べ、好中球の比率が高く、リンパ球の比率が低下していた。これら投与群雄での血液学的変化には、投与濃度に比例した一定の増減傾向は認められなかった。また、雄で見られた種々の変化は雌の投与群では認められず、その他の変化も現れなかった。

血清生化学検査の結果を Table IV に示した。C群に比べ、投与群雄では総コレステロール量(CHO)、磷脂質量、中性脂肪が増加しており、M群のCHOは有意であった。一方、クレアチンフォス

フェキナーゼ、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ活性(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ活性(GPT)、GOTとGPTの比(O/P)はいずれも低下し、L群のGOTの低下は有意であった。C群に比べ、M群雌のGOT、O/P、乳酸デヒドロゲナーゼ活性、尿素窒素量が有意に増加したが、他の投与群雌では増加、減少まちまちであった。これらの数値の変動には、雌雄とも投与濃度に比例した増減傾向は認められなかった。

臓器重量測定の結果を Table V に示した。雄では、C群に比べMおよびH群の肝臓、全群の腎臓の絶対および相対重量が増加し、M群の腎臓およびH

Table IV Summary of biochemical examination of serum.

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	C 22	L 19	M 20	H 19
Male				
Total cholesterol (mg/dl)	153±35 ³⁾	186±60	209±64*	176±50
F-cholesterol ⁴⁾ (mg/dl)	44±12	54±21	65±24*	54±17
E-cholesterol ⁵⁾ (mg/dl)	109±24	133±39	144±42*	122±34
CPK ⁶⁾ (IU/l)	1697±832	1232±510	1273±595	1317±471
GOT ⁷⁾ (IU/l)	96±39	71±32*	112±155	73±23
GPT ⁸⁾ (IU/l)	26±8	22±5	27±16	21±6
GOT/GPT ratio	3.67±0.65	3.15±0.59	3.38±1.46	3.50±0.90
LDH ⁹⁾ (IU/l)	1188±368	990±405	1321±1130	999±331
Phospholipid (mg/dl)	257±49	307±106	357±116*	318±76
Triglyceride (mg/dl)	154±51	178±170	225±186	179±86
Urinary nitrogen (mg/dl)	23.4±4.7	22.6±6.7	26.2±10.2	28.8±18.9
No. of rats	17	21	16	20
Female				
Total cholesterol (mg/dl)	168±69	164±55	153±49	155±69
F-cholesterol (mg/dl)	50±25	47±22	50±38	48±32
E-cholesterol (mg/dl)	118±44	117±33	104±32	107±42
CPK (IU/l)	1398±632	1540±887	1985±949	1083±286
GOT (IU/l)	116±145	101±58	164±118*	98±106
GPT (IU/l)	41±38	33±17	47±37	32±16
GOT/GPT ratio	2.58±0.48	3.02±0.60	3.82±2.45*	2.73±0.80
LDH (IU/l)	725±169	879±327	1166±739*	659±271
Phospholipid (mg/dl)	326±130	328±114	311±120	308±150
Triglyceride (mg/dl)	219±249	233±241	212±290	227±315
Urinary nitrogen (mg/dl)	18.3±2.6	18.9±2.8	22.1±3.4*	18.3±3.3

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6 % (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats examined. 3) Mean ± S.D. 4) Free cholesterol. 5) Esterified cholesterol. 6) Creatine phosphokinase. 7) Glutamic oxaloacetic transaminase. 8) Glutamic pyruvi transaminase. 9) Lactic dehydrogenase.

*Significant differences to the control group ($p < 0.05$).

群の肝臓は有意であった。精果は、腫瘍が多発したため、重量による各群間の比較を行わなかった。雌の臓器重量では、各群間に明らかな差異は認められなかった。

組織学的検査のうち、腫瘍性変化は発症の週齢に拘らず、死亡例も含めた全例をまとめて表に掲載した。非腫瘍性変化は、同一週齢で比較するために、投与終了時生存例の主な変化についてのみ掲載した。腫瘍は、Table VIに示すように多くの臓器組織に発生し、腫瘍を認めなかったラットは、雄では全体で1例、雌では各群6~9例であった。腫瘍を持たないラットの出現数は、対照群と投与群との間で差はなかった。悪性腫瘍を持つラットの数および悪性腫瘍の総数をみると、雄では投与濃度に伴い多くなっていたが、雌では一定傾向は示さなかった。悪性

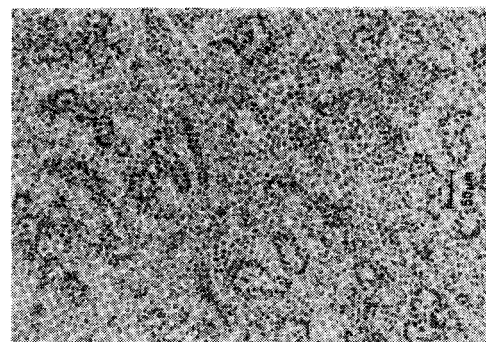


Fig. 3 Transitional cell carcinoma of the urinary bladder of male rat given feed containing 3.6 % Rokumi-gan. ×110.

Table V Summary of organ weight changes.

Group ¹⁾ No. of rats ²⁾	C 22	L 19	M 20	H 19
Male				
Brain (mg)	2180±42 ³⁾ (537±29) ⁴⁾	2184±43 (537±31)	2167±51 (19) ⁵⁾ (560±51)	2183±31 (545±45)
Heart (mg)	1143±101 (281±104)	1126±76 (276±17)	1106±86 (285±27)	1186±170 (295±40)
Lung (mg)	1352±178 (20) (334±49)	1335±96 (328±24)	1338±114 (18) (340±34)	1334±70 (16) (334±28)
Spleen (mg)	1071±358 (20) (265±92)	1096±169 (269±38)	1171±336 (18) (297±81)	1111±234 (16) (278±59)
Liver (g)	14.89±2.16 (21) (3.65±0.44)	14.25±1.73 (17) (3.51±0.48)	15.72±2.56 (19) (4.07±0.81)	16.40±2.52* (4.09±0.66)*
R. kidney (mg)	1482±149 (364±31)	1535±151 (378±45)	1611±223* (417±77)*	1562±160 (18) (383±43)
R. adrenal (mg)	30.0±4.7 (19) (7.3±1.3)	30.7±3.1 (18) (7.5±0.8)	32.4±4.6 (18) (8.4±1.6)	33.4±7.3 (16) (8.4±2.1)
No. of rats	17	21	16	20
Female				
Brain (mg)	1959±41 ²⁾ (702±39) ³⁾	1971±37 (703±76)	1971±41 (679±66)	1980±21 (695±51)
Heart (mg)	844±68 (302±28)	830±52 (20) ⁴⁾ (294±33)	869±64 (300±46)	835±84 (293±40)
Lung (mg)	935±95 (16) (333±38)	922±56 (328±38)	921±70 (14) (312±37)	898±36 (19) (313±24)
Spleen (mg)	674±225 (16) (239±77)	606±155 (215±50)	708±305 (14) (242±117)	567±114 (19) (197±40)
Liver (g)	9.40±1.59 (3.65±0.44)	9.31±1.44 (3.51±0.48)	9.76±1.55 (4.07±0.81)	9.08±1.49 (4.09±0.66)
R. kidney (mg)	1037±111 (371±43)	1025±121 (366±63)	996±78 (344±46)	981±99 (344±44)
R. adrenal (mg)	29.6±2.7 (16) (10.6±1.1)	31.2±4.5 (19) (11.2±2.2)	30.8±2.7 (10.6±1.2)	28.9±3.3 (10.2±1.6)

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6 % (H) Rokumi-gan in diets. 2) No. of rats weighed organs weight. 3) Absolute weights (Mean±S.D.). 4) Relative weights (mg or g/100 g body weight; Mean±S.D.). 5) Parentheses shows number of organs weighed in each group. *Significant differences to the control group ($p<0.05$).

腫瘍のうち、有意ではないが、雄で投与濃度の増加に伴い単核球性白血病が多発した。この他、頻発した腫瘍は、雌雄の下垂体腺腫、雄の精巣間細胞腫、甲状腺のC-細胞腺腫、脾臓の島細胞腫、雌の乳腺腫、乳腺線維腺腫、子宮内膜ポリープであった。このなかで、下垂体腺腫の発生は、C群に比べ有意ではないが、H群雄では少なく、L群雌では多かった。しかし、投与濃度に依存した発生ではなかった。雄の脾臓島細胞腫は、C群よりも投与群で低頻度の発生であり、濃度に伴い低下した。この他の多発腫瘍では、

投与群とC群との間で発生率に有意差はなく、投与濃度との関連も認められなかった。投与群のみに発生した悪性腫瘍は、H群雄でみられた腎盂および膀胱の移行上皮癌 (Fig. 3)、合計3例であった。また、膀胱の良性腫瘍である移行上皮乳頭腫が、雌のLおよびH群で各1例認められた。腎盂または膀胱腫瘍に関連した変化として、これら部位の移行上皮を精査したが、H群雄で1例の過形成を認めたのみであった。この他、Tableに掲載しなかった少数発生例としては、皮膚の乳頭腫がC群雄、毛嚢上皮腫がM

Table VI Summary of occurrence of neoplasms in all rats examined microscopically.

Groups ¹⁾ No. of rats ²⁾	Male				Female			
	C 25	L 25	M 25	H 25	C 25	L 25	M 25	H 25
No. of rats with tumors	25	24	25	25	18	19	16	16
No. of rats with malignant tumor (s)	3	3	6	9	5	1	6	3
Subcutis								
Fibroma	1	1	0	0	0	0	0	0
Fibrosarcoma	1	1	0	1	0	0	0	0
Mammary gland								
Adenoma	1	0	0	1	5	2	6	5
Fibroadenoma	1	0	0	0	0	2	0	0
Fibroma	0	1	1	2	0	0	2	0
Hematopoietic organs								
Mononuclear cell leukemia	2	2	4	5	4	1	4	3
Lymphatic leukemia	0	0	0	1	0	0	1	0
Lung								
Adenoma	0	0	2	3	1	0	1	2
Liver								
Neoplastic nodule	1	2	1	0	0	0	0	0
Renal pelvis								
Transitional cell carcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0
Urinary bladder								
Transitional cell papilloma	0	0	0	0	0	1	0	1
Transitional cell carcinoma	0	0	0	2	0	0	0	0
Testes								
Interstitial cell tumor	23	21	20	24	-	-	-	-
Preputial/clitoral gland								
Adenoma	1	1	3	0	2	0	2	0
Uterus								
Endometrial stromal polyp	-	-	-	-	3	7	4	4
Leiomyosarcoma	-	-	-	-	0	0	1	0
Pituitary gland								
Adenoma	9	10	10	3	4	11	2	5
Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0
Thyroid gland								
C-cell adenoma	4	6	4	3	2	1	0	1
Pancreatic islets								
Islet cell adenoma	12	9	8	7	2	0	0	0
Adrenal gland								
Pheochromocytoma	3	1	3	4	2	2	0	0

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6 % (H) Rokumi-gan in diets.

2) No. of rats examined microscopically. 3) No. of rats with lesions at the site.

群雌で各1例、耳道の乳頭腫および扁平上皮癌がM群雄で各1例、胸腺腫がM群雄、卵巣の顆粒膜細胞腫がL群雌、上皮小体の腺腫がC群雄、脳の星状膠細胞腫がM群雄、腹腔または陰嚢腔の中皮腫が雄のLおよびM群で、それぞれ1例づつ認められた。

非腫瘍性変化は、多彩で多くの臓器組織に観察さ

れたが、主な変化を Table VII に示した。多発したのは、肝臓の肝細胞増殖巣、小胆管増殖、門脈周囲線維化、微小肉芽、腎臓の慢性腎症、心臓の局所性線維化、脾臓のヘモジデリン沈着、膵臓の局所性外分泌腺萎縮であった。これらの変化の発生率は、C群と投与群との間に有意差はなかった。発生率に大差

Table VII Summary of the observations of nonneoplastic lesions in rats lived at the termination.

Groups ¹⁾ No. of rats ²⁾		Male				Female			
		C 22	L 19	M 20	H 19	C 17	L 21	M 16	H 21
Liver		3)							
Bile duct proliferation	+	0 ⁴⁾	0	1	0	6	2	4	8
	++	7	2	6	14	2	2	1	1
	+++	12	17	13	5	0	0	0	0
Periportal fibrosis	+	10	12	18	15	2	2	1	2
	++	4	5	2	2	0	0	0	0
Microgranuloma	+	13	11	5	7	14	15	11	14
	++	1	0	0	1	0	3	1	0
Altered cell foci	+	9	9	9	11	9	8	10	14
	++	0	0	0	2	0	3	0	0
Kidney									
Chronic nephropathy	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	2	1	0	0	2	6	9	9	12
	3	1	1	4	3	8	6	5	2
	4	19	17	12	13	2	5	1	2
	E	1	1	4	1	1	0	0	0
Heart									
Focal fibrosis	+	4	8	8	6	1	4	1	2
	++	3	0	1	1	0	0	0	0
Spleen									
Hemosiderosis	+	13	14	12	14	6	1	7	5
	++	3	0	0	0	8	18	7	12
Pancreas									
Focal atrophy of exocrine glands	+	14	9	11	12	4	10	10	17
	++	6	8	8	6	2	1	0	1
Mammary glands									
Hyperplasia	+	6	2	2	1	4	4	1	4
	++	2	4	1	1	2	3	0	0

1) Rats in each group were fed 0 (C), 0.4 (L), 1.2 (M) or 3.6 % (H) Rokumi-gan in diets.

2) No. of rats examined microscopically. 3) Grade in chronic nephropathy; 1 (grade 1~4 (grade 4) and E (end stage); grade in the other lesions; + slight, ++ moderate, +++ severe.

4) No. of rats with lesions at the site.

はないが、投与群雄の心臓の線維化は、C群に比べ変化程度がやや軽減されていた。非腫瘍性変化の発生率、変化程度には、何れも投与濃度に関連した増強または軽減は認められなかった。ここで、白血球発症例を除いた場合の中等度以上の慢性腎症（雄では変化程度4以上、雌では3以上）¹⁰⁾の発生状況をみると、その発生率は、雄では、C群90% (18/20)、L群95% (18/19)、M群82% (14/17)、H群72% (13/18)、雌では、C群67% (11/16)、L群57% (12/21)、M群40% (6/15)、H群19% (4/21)であった。このように、雌では用量-反応関係をもって発

生率が低下しており、H群はC群に比べ有意に低かった。雄でも軽度ながら、同様の傾向が窺える。

考 察

本試験で用いた六味丸散剤の各種理化学試験を行った結果、充分満足できる品質で、均一に混和されていると確認された。¹¹⁾すなわち、本剤は漢方薬としての有効性を検討する目的に合致する薬剤と認められる。本剤に含まれる有害物質の検索で、農薬では総BHCが0.017 ppm検出されたが、その他の農薬

およびカビ毒は検出限界以下であった。¹²⁾ 現在、総BHCの食品での残留農薬基準は、牛乳、野菜、果実が0.2 ppmであり、¹²⁾ 今回検出された濃度で、直ちに生体に害作用が発現するとは考えられない。残留放射能では¹³⁴Csおよび¹³⁷Csの検出合計値が2 Bq/kg以下と、食品での暫定限度値の370 Bq/kgを大きく下回っていることから、¹²⁾ 健康に害を及ぼさないと推定される。これらのことから、本剤に含有されている上記の有害物質が、六味丸の安全性検索に影響し、評価を混乱させる危険性は極めて低いと考えられる。

本試験で用いたラットは、投与終了時には113週齢であり、C群雌雄の生存率はそれぞれ60%以上であった。すなわち、ラットは自然発生疾病の好発週齢に達しているとともに、疾病発生と投与との関連を検討するに十分な生存数を維持していた。薬剤投与量は、設定した量に比べ、投与前期ではやや少ないが、中期以後、増加したことにより、投与期間を通しては、やや低い程度に留まった。また、投与量は各群間で添加濃度と同じく、ほぼ公比3で増加しており、投与は設定のごとく行われたと考えられる。これらのことから、本試験は、長期間投与試験として成立しており、国際的規範¹³⁾を満足させるものと評価できる。

投与群の生存率は、C群に比べ雄では有意ではないが低く、死亡時期はL群で有意に早かった。著者らの蓄積データによれば、同一系統のF344/DuCrjラットの109週齢時における無処置対照群雄の平均生存率は、74% (63~86%)である。¹⁴⁻¹⁶⁾これに比べ、今回は113週齢と高齢であるにも拘らず、C群の生存率は88%とやや高い。また、投与群のそれは76~80%で蓄積データのC群の範囲内にあり、異常値とは言えない。すなわち、本試験のC群と投与群との生存率の差異は、C群の生存率が高かったことに原因を求めるべきであろう。さらに、生存率および死亡時期は用量に関連した変動を示していない。これらのことから、投与群雄の生存率の低下は、六味丸の致死作用を示唆するものではないと考えられる。一方、雌では、用量に依存した上昇ではないが、LおよびH群の生存率は、C群に比べ高かった。前述の蓄積データによれば、109週齢時の対照群雌ラットの平均生存率は、79% (73~84%)である。¹⁴⁻¹⁶⁾すなわち、投与群の高い生存率は、今回のC群が68%と低かったことによって生じた現象と考えるべきであろう。さらに、雄と同様に生存率および生存期間の変動には、用量-反応関係が認められない。従って、本実験結果から、直ちに六味丸が雌に対し

て延命効果を現したと解釈すべきではないと判断する。

ラットでは100週齢を過ぎると、とくに雄では体重増加が鈍り、横ばいから減少に転じ、^{16,17)}この頃から自然発生疾病も頻発する。すなわち、体重変化からも老化の進行が概ね類推できる。今回、体重変化では、雌雄とも投与に関連した増減傾向はなく、その推移もC群と投与群との間に差異はない。従って、六味丸は、体重に影響を与えず、換言すれば、老化速度を変化させなかったと言えよう。雌では、C群と投与群との摂餌量に差が無いにも拘らず、投与群の体重増加が目立って見える。しかし、これも生存率と同じく、用量-相関をもった変動ではなく、六味丸投与の効果に直結させることはできないと考える。

投与群雄での貧血傾向は、軽度であり用量に依存した増悪もみられないことから、投与との関連は明らかではない。実験動物は加齢に伴い貧血傾向が増すとされており、¹⁸⁾老化現象の現れと思えるが、投与との関連が明らかではないことから、六味丸が老化を促進したとは考え難い。

血清生化学検査では、C群に比べ、投与群雄のコレステロールなど血清脂質が増加しており、前述の貧血傾向との関連を疑えるが、疾病を特定できるような著明な増加ではない。さらに、用量-相関がみられないことから、貧血と同様に、六味丸が関与した変化とは思われない。

臓器重量の変化で、投与群雄の肝臓が用量に伴って増加したことは、前記の血清脂質の増加との関連が考えられる。しかし、重量増加に対応する肝細胞の増生、肥大、脂質の蓄積などの組織変化は顕著ではなかった。従って、肝重量の増加は特異的な障害作用の表現ではなく、臓器レベルでの適応現象であると推定される。

腫瘍の発生状況を見ると、多発した腫瘍は、いずれも、F344ラットでは、加齢に伴い無処置対照群に出現する「自然発生腫瘍」として報告されている。^{10,16,19-21)}これら多発腫瘍の発生率および発生時期は、C群と投与群との間で有意な差はない。そこで、さらに詳細に差異をみてみると、悪性腫瘍である単核球性白血病が投与群雄に、やや多く発生しており、H群では20% (5/25)の発生率であった。この腫瘍は、前述のF344ラット雄では23~25%の発生と報告されており、^{10,16,19)}H群の発生率も、この範囲に含まれている。従って、H群の発生が突出して見えるのは、C群の発生が8% (2/25)と低いためであると理解できる。良性腫瘍である脾臓の島細胞腫が、有

意ではないが雄の各投与群でC群よりも低い発生率を示した。しかし、この腫瘍は雄のF344ラットで、3.1~7.8%の自然発生であるとされており、^{10, 16, 19-21)} 今回の雄での発生率は、C群の48%を始め投与群の28~36%も、原因不明ながら異常に高いと考えられる。このことから、六味丸投与によって本腫瘍の発生が抑制されたとは即断できない。腎盂または膀胱の移行上皮癌がH群雄のみに3例発生し、過形成も1例認められている。また、LおよびH群雌でも膀胱の移行上皮の乳頭腫が各1例発生し、投与との関連を疑わせる。しかし、本腫瘍のF344ラットでの自然発生は、雌雄とも低頻度とされているものの、^{10, 19-21)} 皆無ではないこと、本実験において、腫瘍と過形成の発生とを合計しても雄ではH群とC群との間で発生率に有意差はなく、用量-反応関係が成立しないことから、現時点では六味丸投与に関連した膀胱腫瘍の発現であるとは言い難い。

非腫瘍性変化は、多くの臓器組織に認められたが、いずれもF344ラットでは、加齢に伴い、発現する「自然発生疾病」として記載されており、^{10, 20, 21)} 投与群のみに発生した変化もみられない。さらに、頻発した肝臓、腎臓の組織変化も、C群と投与群との間で発生率に有意な差は認められなかった。従って、六味丸は特異的に疾病を誘発せず、自然発生疾病の発現も促進しなかったと考えられる。

以上のごとく、六味丸を中年以降に連続投与した場合、生体に特異的障害を惹起せず、非特異的障害の発症を促進しなかった。すなわち、その安全性は高いと評価できる。

六味丸の有効性については、前回の尿路系の障害誘発物質との併用実験で、腎臓の組織変化程度を減弱する傾向がみられたことで言及した。⁶⁾ 今回、白血病発症例を除いた場合の慢性腎症の発生が、その作用機序は明らかではないが、とくに雌で用量-反応関係をもって抑制されていることから、六味丸の腎障害に対する有効性が示唆されたと思えるが、今後、さらに検討を加えるべきと考えている。

結 論

本実験条件下において、ラットの中年から老年期にかけて投与した場合、漢方方剤六味丸は、老化促進および致死作用を顕現せず、腫瘍を含む疾病の誘発、発生促進など明らかな障害を惹起しないことから、安全性は高いと考えられる。一方、自然発生腫瘍などの疾病発症を抑制する、寿命を延長するなどの作用は顕著には認められなかったが、腎障害に対

する有効性を窺わせる結果を得た。

謝 辞

本研究にあたり、被検薬物の理化学的品質評価では、当所医薬品研究科の安田一郎氏、浜野朋子氏、有害物質の検討では、細菌第一研究科の諸角 聖氏、和宇慶朝昭氏、食品研究科の田村行弘氏、上村 尚氏、真木俊夫氏、観 公子氏、永山敏廣氏、動物実験および病理検索の実施に際しては、病理研究科の皆様それぞれ、多大なるご協力を頂きました。深く感謝致します。

文 献

- 1) 張 瓏英, 臨床中医学概論. 自然社, 東京, pp.298-301, 1988.
- 2) 李 長生: 六味地黄湯応用拳隅. 山東中医雑誌 3, 25, 1987.
- 3) 原敬二郎: 老化による多臓器障害の漢方治療概論. 現代東洋医学, 9(4), 11-14, 1988.
- 4) Jiang Tingliang, Yan Shuchang, Zhao Liangfu, et al: Preventing effect of "Liuwei Dihuang Decoction" of esophageal carcinoma, 癌と化学療法, 16(4), 1511-1518, 1989.
- 5) Fujii, T., Mikuriya, H., Yano, N., Yuzawa, K., Nagasawa, A., Tada, Y., Fukumori, N., Sumi, C. & Sasaki, M.: Oral toxicity test of Rokumi-gan by gavage to rats for 13 weeks. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* 42, 235-242, 1991.
- 6) Fujii, T., Mikuriya, H., Yano, N., Yuzawa, K., Nagasawa, A., Tada, Y., Fukumori, N., Sumi, C. & Sasaki, M.: Inhibitory effects of Rokumi-gan on the lesions in urinary system induced by 13 weeks exposure to o-phenylphenol. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H.* 42, 235-242, 1991.
- 7) Hiraga, K. and Fujii, T.: Induction of tumors of the urinary bladder in F344 rats by dietary administration of o-phenylphenol. *Fd Chem. Toxic.* 22, 865-870, 1984.
- 8) Hiraga, K. and Fujii, T.: Induction of tumors of the urinary system in F344 rats by dietary administration of sodium o-phenylphenate. *Fd Cosmet. Toxicol.* 19, 303-310, 1981.
- 9) Fujii, T., Nakamura, K. & Hiraga, K.: Effects of pH on the carcinogenicity of o-phenylphenol and sodium o-phenylphenate in the rat urinary bladder. *Fd Chem. Toxic.* 25, 359-362, 1987.
- 10) Goodman D.G., Ward J.M., Squire R.A. Chu K.C. and Linhart M.S.: Neoplastic and non-neoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxic. Appli. Pharmacol.* 48, 237-248, 1979.
- 11) Yasuda, I., Hamano, T., Takano, I., Takahashi, N., Watanabe, Y., Akiyama, K., Suzuki, T. & Yamakawa, Y.: Preparation of Chinese medicine "Rokumigan

- powder" and its physical and chemical evaluation. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* **42**, 27-32, 1991.
- 12) 藤井 孝, 佐々木美枝子, 角 千代, 長井二三子, 佐藤かな子, 藤田 博, 小縣昭夫, 吉田誠二, 安田一郎, 浜野朋子, 田村行弘, 上村 尚, 真木俊夫, 観 公子, 永山敏広, 諸角 聖, 和字慶朝昭: 漢方方剤六味丸の安全性, 有効性に関する研究. 東京都衛生局学会誌 **86**, 64-65, 1991.
 - 13) Siontag J.M., Norbert P.P. & Umbert S. (Eds.): Guidelines for Carcinogen Bioassay in Small Rodents. National Cancer Institute, Maryland, 1976.
 - 14) Fujii, T., Mikuriya, H. & Hiraga, K.: Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of thiabendazole in rats. *Fd Chem. Toxic.* **29**, 771-775, 1991.
 - 15) Fujii T. & Hiraga K.: Carcinogenicity testing of sodium orthophenylphenate in F344 rats. *J. Saitama Medical School* **12**, 277-287, 1985.
 - 16) Hiraga K. & Fujii T.: Carcinogenicity testing of acetaminophen in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **76**, 79-85, 1985.
 - 17) 山本利男, 各務 進, 額田久雄, 井上博之: F344 系ラットを用いた長期動物実験における生存率, 体重変化, 摂餌量および一般状態, "フィッシャーラット", Fischer ラット研究会, pp33-41, 1990.
 - 18) 谷本義文: 実験動物の生物学的特性データ. 田嶋嘉雄監修, ソフトサイエンス社, 東京, pp.95-149, 1989.
 - 19) Maekawa A., Kurokawa Y., Takahashi M., Ogiu T., Onodera H., Tanigawa H., Ohno Y., Furukawa F. and Hayashi Y.: Spontaneous tumors in F344/DuCrj rats. *Gann* **74**, 365-372, 1983.
 - 20) Coleman G., Barthold S.W., Osbaldiston G.W., Foster S.J. and Jonas A. M.: Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats. *J. Gerontology* **32**, 258-278, 1977.
 - 21) Sollveld H.A., Haseman J.K. & McConnell E.E.: Natural history of body weight gain, survival and neoplasia in the F344 rat. *JNCI* **72**(4), 929-940, 1984.