

補益作用の研究 (第1報)

—貧血ラットによる心血虚証モデルの試作—

小島 暁*, 江崎 宣久, 井上 昌輝, 柳沢久美子, 菅原ゆかり, 木下 剛

養命酒製造(株)中央研究所

Studies of tonification in traditional Chinese medicine I : Anemic rats as a model of “deficiency of heart-blood syndrome”

Satoru KOJIMA*, Nobuhisa EZAKI, Masaki INOUE,
Kumiko YANAGISAWA, Yukari SUGAWARA, Go KINOSHITA

Central Research Laboratories, Yomeishu Seizo Co., Ltd.

(Received March 23, 1994. Accepted October 12, 1994.)

Abstract

The present study was undertaken in an attempt to elucidate “tonification” (補益) in traditional Chinese medicine. The anemic rats were prepared, using bloodletting twice a week and iron-free feeding for 3 weeks, to estimate as a model of “deficiency of heart-blood syndrome” (心血虚証). The anemic rat showed that (1) RBC, Hb and Ht decreased in all, and the body weight slowly decreased; (2) L^* value increased and a^* value decreased in the ear color; (3) the blood pressure declined and the heart rate increased and (4) the QRS-interval of ECG was prolonged. On the contrary the P-interval of ECG was reduced; (5) after mecholyl treatment, the blood pressure decreased and its recovery was delayed compared with normal rats; (6) the latency of grooming behavior was prolonged in the open field test. These findings nearly correspond to clinical symptoms of deficiency of heart-blood syndrome, and we regard the anemic rat as an animal model of deficiency of heart-blood syndrome.

Key words tonification, deficiency syndrome, deficiency of heart-blood syndrome, traditional Chinese medicine, anemic rat, animal model.

Abbreviations ECG, electrocardiogram; RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit.

緒 言

“補益”は、“虚証”に対する東洋医学独特の治療法であり、補益方剤はこの治療理論に基づく薬剤である。補益方剤は、生体に必要不可欠な“気、血、陰、陽”の不足を補い、症状を改善する効果を有している。その有用性は、長い使用経験により実証されており、現代医学においても各種不定愁訴の改善¹⁾や手術後の回復期²⁾あるいは老人病の治療³⁾に用いられ、すぐれた効果を示すことが報告されている。その作用機序に関しては内分泌

系⁴⁾や免疫系⁵⁾への関連も推察されているが、いまだ科学的な解明は十分になされていない。補益方剤の科学的な解明を困難にしている大きな理由として東洋医学と現代医学とでは、まったく異なった体系(理論、診断、治療)を有しており、ことに現代医学においては、虚証に類似した病態の認識がなく、したがって補益という治療概念が存在しないことがあげられる。

著者らは補益作用を科学的に解明するには、以下の条件を備えた適切な虚証モデル動物が必須であると考えている。①証の病因、病機(病理)および症状を具備していること。②証の症状を客観的かつ定量的に測定できる

*〒399-46 長野県上伊那郡箕輪町中箕輪2132-37
2132-37 Nakaminowa, Minowa-machi, Kamiina-gun,
Nagano 399-46, Japan

こと。③証に対する基本方剤により症状の改善が認められること。

ところで、虚証は「気虚、血虚、陽虚、陰虚」の4種に大別されるが、臨床上では“臟腑弁証”等も勘案され、さまざまな虚証が存在する。これらの中から、まず「心血虚証」について証の客観的な測定方法を検討した。

心血虚証は“心血不足、心失濡養”の病態を指し、古典では《景岳全書・怔忡驚恐》「心虚血少、神志不寧而驚悸者、養心湯或寧志丸」⁶⁾および《丹溪心法・驚悸怔忡》「人之所主者心、心之所養者血、心血一虚、神氣不守、此驚悸之所肇端」、《本草經疏・心虚八証》「不得眠属心血虚」、「怔忡、属心血不足；心淡動動、盗汗、属心血虚」と述べられ、⁷⁾「面色淡白無華、心悸、眩暈、健忘、失眠、驚悸不安、舌淡、脈細或結代」等の症状を呈するとされている。この直接的な原因として“陰血来源匱乏損失過度、思慮過度陰血暗耗、失血過度心血減少、水谷失養血源不足、熱病日久傷陰血耗、心氣先傷氣及血”がある。

著者らは、証モデルの作出にあたり、これらの原因の中で“失血過度心血減少”および“水谷失養血源不足”に着目し、ラットに放血処理および鉄欠乏飼料を施すことにより貧血ラットを作成した。この貧血ラットについて心血虚証モデルとしての可能性を心血虚証の症状「面色淡白無華、心悸、眩暈、健忘、失眠、驚悸不安、舌淡、脈細或結代」との適合性から検討した。

材料と方法

(1) 実験動物：7週齢のWistar系雄性ラットを日本エスエルシー(株)より購入し、1週間の予備飼育の後実験に供した。飼育はステンレス製のプランケットケージによる個飼いとし、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、6:00点灯18:00消灯下で行った。

(2) 薬物：mecholyl(塩化メタコリン、半井化学薬品)は用時生理食塩水に溶解した。

(3) 貧血作成方法：予備飼育後、正常対照群には粉末飼料(MF粉末、オリエンタル)および水道水を、貧血処理群には鉄欠乏粉末飼料(オリエンタル、鉄含量は $5.5\mu\text{g/g}$ 以下)および蒸留水を与えた。放血は、松本ら⁸⁾の方法に従い、無麻酔下にラットを背位に固定し、除毛後に頸静脈より注射筒を用いて採血した。1回の放血量は体重の 0.64% とし、放血は鉄欠乏飼料による飼育開始の日から10:00に3、4日間隔で週2回、3週間行った。

(4) 血液検査：週2回、放血前に体重を測定し、放血した血液を用いて赤血球数(RBC)およびヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)を自動血球計測装置(MEK-515動物用、日本光電)により測定した。

(5) 「証」の症状測定：心血虚証の診断には「面色淡白無華、心悸、眩暈、健忘、失眠、驚悸不安、脈細或結代、舌淡」等の症状を呈していることが必要であり、ヒトにおけるこれらの症状をモデルで客観的に診断するため以下のように測定した。

1) 「面色淡白無華、舌淡」：顔色が白く、赤みがなくて冴えず、舌の色も淡い状態を指すもので、ラットでは皮膚の露出している耳介の色調を計測した。すなわち、ラットを手で軽く保定し、耳介の内側にファイバー製のプローブを当て色差計(TC8600A、東京電色)により色の明るさを示す L^* 値、赤みを示す a^* 値を測定した。

2) 「心悸、脈細或結代」：頻脈や脈の異常を指すものでラットの血圧、心拍数、心電図のパラメータの変動を計測した。予熱(38°C 、10分間)後のラットを約 28°C の保温箱の中で保定装置(RH-100一部改良、フクダME工業)に保定後、尾動脈を用いて非観血式自動血圧計(UR-5000、ウエダ製作所)により最大血圧(血圧)および心拍数を測定した。心電図は、血圧測定と同時に、保定後コイルスプリング状の電極を四肢に装着し、第II誘導により生体アンプ(AB620、日本光電)を介してペン書きで記録した。

3) 「眩暈」：めまいを指すもので、直接測定することは不可能であるが、めまいの一部は循環調節の障害⁹⁾によるものと考えられることから、mecholyl刺激による血圧の変動を計測した。血圧の測定と同様にラットを予熱後保温箱内で保定し、血圧を1分毎に測定し5分後にmecholyl $100\mu\text{g/kg}$ を肩甲骨付近の皮下に投与し、15分後まで血圧を測定した。

4) 「驚悸不安」：びくびくして驚きやすい状態を指すものでopen field testにおける行動観察を行った。直径60cmの塩ビ製円筒型open field装置を使用し、ラットを中心に静かに置き、5分間の移動区画数および立ち上がり回数、洗顔・身繕い行動の出現時間と回数を観察した。

5) 「健忘」：学習記憶の障害¹⁰⁾を指すものと考えられることから、学習記憶試験法の中から受動的回避試験を行った。 $30\times 25\times 20\text{ cm}$ の明室と $19\times 14\times 20\text{ cm}$ の暗室からなる受動的回避装置(PAR型、小原医科産業)を用い、ラットを明室に静かに入れ暗室に入るまでの時間を測定した。暗室に入った後床のグリッドを通して75Vの電撃を明室に出るまで負荷し、明室に戻って20秒後に明室から取出した。24時間後に再び明室にラットを入れ、暗室に首を入れるまでの時間および頭から入って尾のつけねを暗室に入れるまでの時間を最長5分間測定した。

6) 「失眠」：不眠を直接測定することは困難なため、ラットの日内自発行動リズムを計測した。9:00にラットを飼料と飲水を備えた $25\times 42\times 16\text{ cm}$ のプラスチックケ

ージに入れて animex (MK 110, 室町科学) にのせ, 50 分後より 1 時間毎に 23 時間の自発活動量を計測した。
7) 測定手順: 上記 1) ~ 6) の測定は, 放血処理の当日を避け, 行動リズム以外の測定では群間に時間的および日間の偏りが生じないように 13:30 以降に行った。正常および貧血処理群をそれぞれ 2 群用意し, 1 群では色差, 血圧, 心拍数, 心電図の測定, 受動的回避試験を行い, 他の群では, open field test および mecholyl 刺激試験を行った。行動リズムの測定は貧血処理開始 13~16 日に, open field test は 16 日に, 受動的回避試験は 17 日に, mecholyl 刺激試験は 18 日に, 耳介の色差および血圧, 心電図の測定は 20 日に行なった。

(6) 統計学的処理: 2 群間の平均値の有意差検定には, Student の *t* 検定を用いた。

結 果

1. 貧血ラットの作成

8 週齢の雄ラットを用い, 体重の 0.64 % (全血液量の 8 % に相当) に相当する血液を週 2 回放血するとともに鉄欠乏飼料により飼育を行うと, 血液像は徐々に変化し, 処理開始 19 日では, 単位容積あたりの RBC および Hb, Ht とも正常ラットの約 50 % となり, 明らかな貧血を示した (Fig. 1)。この貧血処理の条件下では, 貧血の進行にともない体重の低下, 体毛の粗毛化, 自発行動の減少, 体幹の緊張性の低下等がみられるようになったが, 4 週間以上にわたって死亡例はみられず, 貧血ラットを作成することができた。

この貧血ラットは, 全身症状から「虚」の状態にあると判断されたので, 心血虚証モデルとしての可能性について心血虚証の症状である「面色淡白無華, 心悸, 眩暈, 健忘, 失眠, 驚悸不安, 脈細或結代, 舌淡」との適合性から検討した。

2. 「面色淡白無華, 舌淡」(耳介色差) の検討

貧血の進行にともなう, ラットの体色は赤みが減少して白っぽくなった。この変化は「面色淡白無華, 舌淡」に相当するものと考えられ, 体毛の少ない耳介における色調の変化を検討した。その結果, 色の明るさを表わす L^* 値は増加し, 赤味を表わす a^* 値は減少した (Fig. 2)。

3. 「心悸, 脈細或結代」(血圧, 心拍数, 心電図) の検討

貧血ラットでは血圧は著しく低下し, 逆に心拍数は増加した (Fig. 3)。また, 心電図においては, P 幅の短縮および QRS 幅の延長傾向が認められた (Fig. 4)。これらは, 貧血による生体の代償性反応の結果によるものと考え

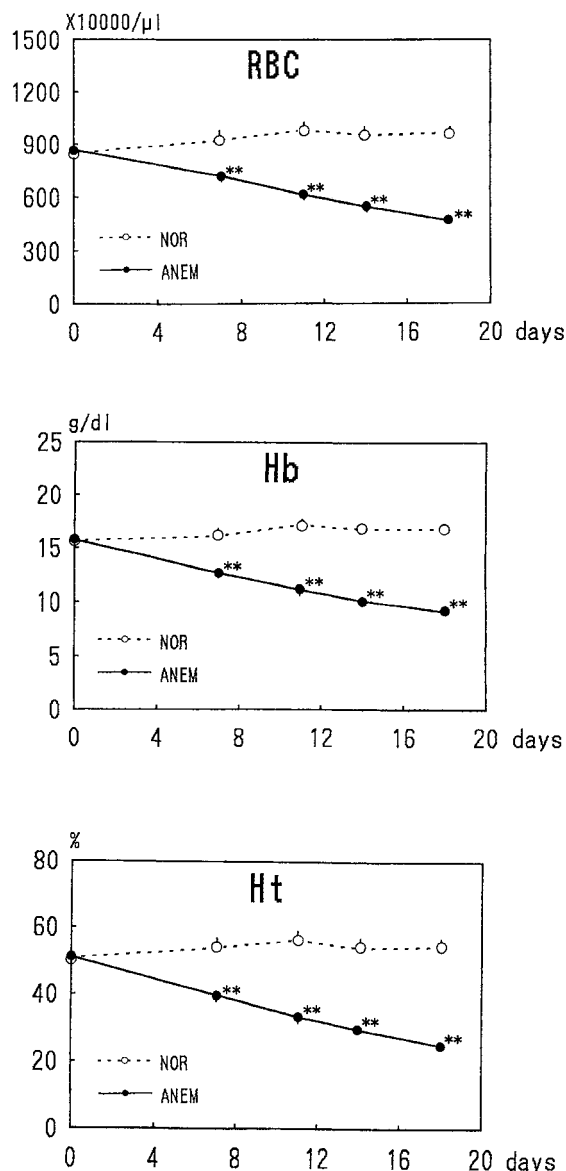


Fig. 1 Changes of RBC, Hb and Ht after bloodletting and iron-free feeding in rats.
--○-- NOR; normal rats (n=8), —●— ANEM; anemic rats (n=8). Each point expressed the mean $\pm$ S.D..
**; Significant difference from normal group by Student's *t*-test, $p < 0.01$.

えられ, また, 「心悸, 脈細或結代」を示すものと考えられる。

4. 「眩暈」(Mecholyl 刺激試験) の検討

めまいを直接測定することはできないが, 血圧調節機構と深く関係しているとされていることから, mecholyl 刺激による血圧反応から検討した。mecholyl の皮下投与により正常ラットでは 1~2 分後に血圧は最低となり, そ

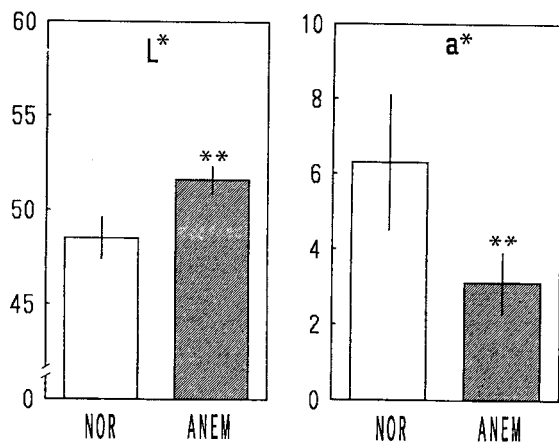


Fig. 2 Influence of bloodletting and iron-free feeding on the ear color in rats at 20th day of experiment. L^* value represents degree of lightness and a^* value represents degree of red. □ NOR; normal rats (n=8), ■ ANEM; anemic rats (n=8). Each value expressed the mean $\pm$ S.D. **; Significant difference from normal group by Student's t -test, $p < 0.01$.

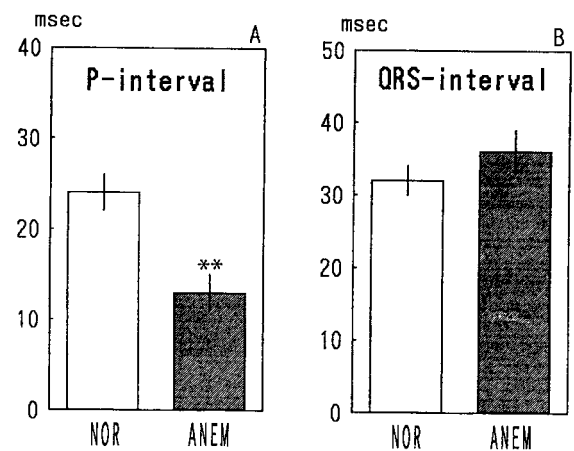


Fig. 4 Influence of bloodletting and iron-free feeding on the P-interval and the QRS-interval of ECG in rats at 20th day of experiment. □ NOR; normal rats (n=8), ■ ANEM; anemic rats (n=8). Each value expressed the mean $\pm$ S.D. **; Significant difference from normal group by Student's t -test, $p < 0.01$.

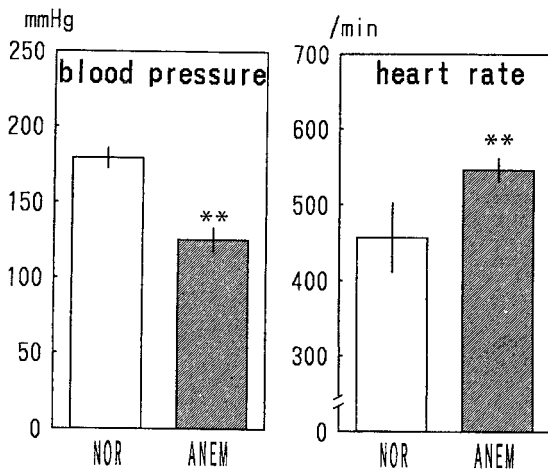


Fig. 3 Influence of bloodletting and iron-free feeding on the blood pressure and the heart rate in rats at 20th day of experiment. □ NOR; normal rats (n=8), ■ ANEM; anemic rats (n=8). Each value expressed the mean $\pm$ S.D. **; Significant difference from normal group by Student's t -test, $p < 0.01$.

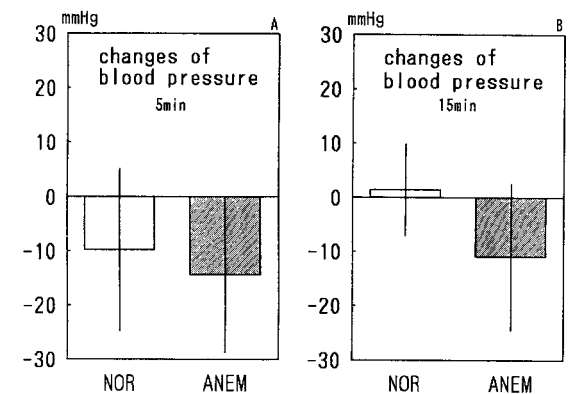


Fig. 5 Changes of the blood pressure after mecholyl treatment in rats at 18th day of experiment. A showed changes of the blood pressure at 5 min after mecholyl treatment (s.c.), and B showed at 15 min. □ NOR; normal rats (n=5), ■ ANEM; anemic rats (n=7). Each value expressed the mean $\pm$ S.D.

の後徐々に上昇して約 10 分以降、投与前の値に回復した。これに対し貧血ラットでは、mecholyll による血圧降下が著しく、中には 90 mmHg 以下となり今回の方法では測定不能例がみられ、15 分後においても十分な回復はみられなかった (Fig. 5)。このことは、貧血ラットでは昇圧反応が十分でなく血圧調節機能が低下していることを示しており「眩暈」を間接的に表わしていると考え

られる。

5. 「驚惕不安」 (Open field test) の検討

Open field test において正常ラットは、まず、field 内をグルグル移動する探索行動を、やや遅れて立ち上がり行動を現し、やがて探索行動が減少して洗顔・身繕い行動を現した。これに対し貧血ラットでは、探索行動、立ち上がり行動とも低下傾向がみられ、情動の安定を表わ

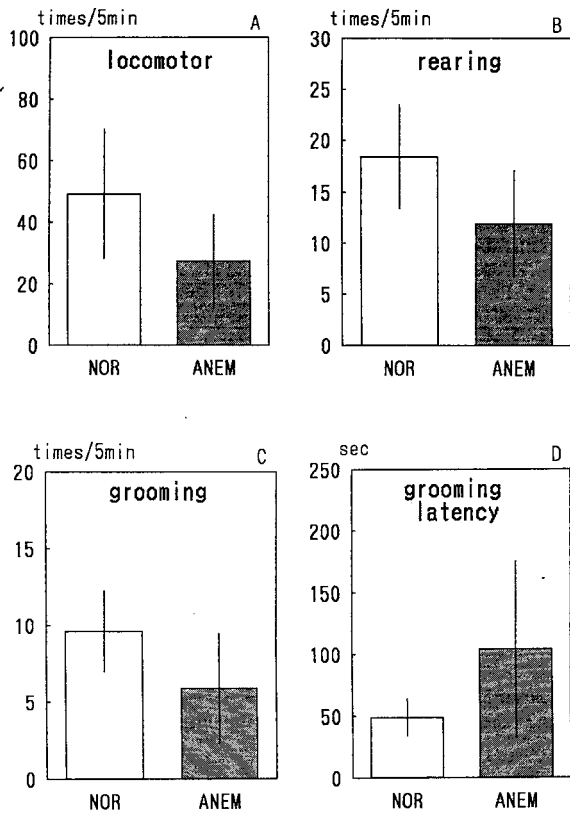


Fig. 6 Influence of bloodletting and iron-free feeding on behavior by the open field test in rats at 16th day of experiment.

A showed locomotor activity, B showed times of rearing, C showed times of grooming, D showed latency of grooming, □ NOR ; normal rats (n=5), ■ ANEM ; anemic rats (n=7). Each value expressed the mean $\pm$ S.D..

すとされる身繕い・洗顔行動では、出現潜時の延長傾向および回数の減少傾向がみられた (Fig. 6)。このことは、貧血ラットの情動の不安すなわち「驚惕不安」を示しているものと考えられる。

6. 「健忘」(受動的回避試験)の検討

貧血ラットでは、受動的回避試験において第1日に暗室に入るまでの時間は、正常ラットに比べ延長した。しかし、翌日の暗室へ最初に首を入れるまでの時間および全身を入れるまでの時間では、ともに正常ラットとの差異はみられず、貧血ラットの「健忘」ととらえることはできなかった。

7. 「失眠」(Animexにおける行動リズム)の検討

貧血ラットでは1日の総行動量は、正常ラットに比べ低下したが、昼夜の行動リズムでは、正常ラットと同様に夜間の活動期に2~3峰性のピークがみられ、昼間の行動においても「不眠」を示唆する行動リズムの変化はみられなかった (Fig. 7)。

考 察

東洋医学でいう「血」は、直接に血液をさすものではないが、共通する点が多いとされており、「血とは体をめぐる赤い液体」と記載されている¹¹⁾。

臨床上也重度の貧血患者は、「血虚証」と弁証される。この心血虚証の原因として「失血過度心血減少、水谷失養養源不足」がある。そこで、放血および鉄欠乏飼料処理により作成した貧血ラットが、心血虚証モデルとして使用できないかと考えその可能性について検討した。

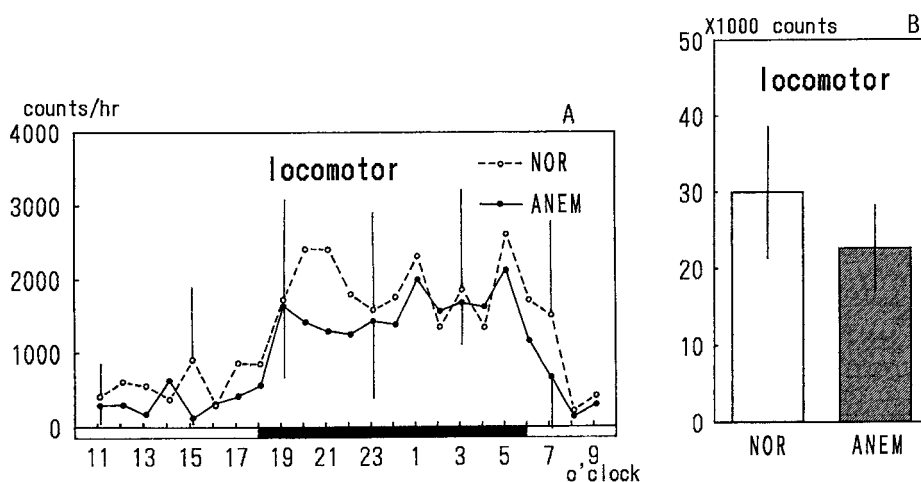


Fig. 7 Influence of bloodletting and iron-free feeding on the circadian rhythm of locomotor activity in rats at 13~16th day of experiment.

A showed circadian rhythm, --○-- NOR ; normal rats (n=8), —●— ANEM ; anemic rats (n=8). Each points expressed the mean $\pm$ S.D., partially. B showed total locomotor activity, □ NOR ; normal rats (n=8), ■ ANEM ; anemic rats (n=8). Each value expressed the mean $\pm$ S.D..

貧血ラットの作成にあたっては、松本ら⁸⁾の報告を参考にして、ラットの週齢、放血方法（1回の放血量、放血間隔、放血部位）、鉄欠乏飼料との組合せ等について検討し、ラットの外観、体重変化、血液像の変化、死亡例の出現、処理解除後の回復状況等を総合的に考慮して貧血処理条件を設定した。すなわち8週齢の雄性ラットを用い、頸静脈から1回の放血量を体重の0.64%（全血液量の8%に相当）として週2回放血し、同時に鉄欠乏飼料により飼育する方法である。

この貧血処理によりラットの血液像は、徐々に変化し、1週間後にはRBC、Hb、Htとも有意に低下した。また、体重の低下、粗毛化、活動性の鈍化等がみられるようになり、東洋医学の特徴である“全体観”からみて“虚”の状態にあるものと判断された。このラットが、心血虚証の症状である「面色淡白無華、心悸、眩暈、健忘、失眠、驚悸不安、脈細或結代、舌淡」を備えているか、客観的な評価を試みた。

その結果、「面色淡白無華、舌淡」は耳介の色調を色差計で測定することにより、「心悸、脈細或結代」は非観血的に血圧、心拍数の測定および心電図の測定から検出できることが示唆された。また、間接的ではあるが「眩暈」についてはmecholyol刺激後の血圧測定により、「驚悸不安」はopen field testにおける行動観察から検出できるものと考えられた。

一方、「健忘」については、位置移動のみを指標とする受動的回避試験のほか、Y字迷路試験および水迷路試験、レバー押し型能動的回避試験も検討したが、いずれも「健忘」を示唆する結果は得られなかった。また、「不眠」についても、行動リズムの変動からとらえることはできなかった。

このように、放血および鉄欠乏飼料で処理したラットは、全身的にみて「虚」の状態にあり、「健忘」および「不眠」の症状はみられないものの心血虚証の主症状である「面色淡白無華、舌淡」のほか、「心悸、脈細或結代」、「眩暈」、「驚悸不安」の症状を示していることから心血虚証モデルとして使用できるものと考えられる。

結 論

放血および鉄欠乏飼料により貧血ラットを作成し、心血虚証モデルとしての可能性を検討した。

(1) 体重の低下およびRBC、Hb、Htの明らかな低下が

認められた。

(2) 貧血ラットにおける耳介の明るさ（ L^* 値）の増加および赤み（ a^* 値）の低下は「面色淡白無華、舌淡」を表わし、血圧の低下および心拍数の上昇、同時に心電図のP幅の短縮およびQRS幅の延長傾向は「心悸、脈細或結代」を表わし、mecholyol刺激による血圧低下および血圧の回復遅延傾向は「眩暈」を表わし、open field testにおける洗顔・身繕い行動の出現の遅延傾向は「驚悸不安」の一部を表わしているものと考えられた。この貧血ラットは、心血虚証の一つの証モデルである可能性が示唆された。

謝 辞

本研究にあたり、御指導を頂きました静岡県立大学赤堀幸男教授、王元武講師に深甚な謝意を表わします。

References

- 1) Murata, T.: The treatment of Oriental traditional medicine for menopausal symptoms. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* 6(3), 20-29, 1985.
- 2) Nabeya, K.: Overview of surgery and kampo-medicine from the standpoint of traditional medicine. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* 14(1), 1-10, 1990.
- 3) Orimo, H.: Harmonization between Western medicine and Oriental medicine in the treatment for geriatric diseases. *Japanese Journal of Oriental Medicine* 41(1), 1-10, 1990.
- 4) Usuki, S.: Effects of hachimijiougan, tokishakuyakusan and keishibukuryougan on progesterone and 17α -hydroxyprogesterone secretion by rat corpora lutea *in vivo*. *Japanese Journal of Fertility and Sterility* 33(1), 60-66, 1988.
- 5) Cyong, Jong-Chol: Effects of herbal medicine on immune complexes and complement. *METABOLISM AND DISEASE* 29 (臨時増刊号), 364-369, 1992.
- 6) Zhang, J.: "Jingyue-quanshu (景岳全書)", Shanghai-kejichuban (上海科技出版), Shanghai, p.326, 1987.
- 7) Deng, T. ed.: "Zhongyi-zhenghouguifan (中医証候規範)", Guangdong-keji chubun (広東科技出版), Guangzhou, p.75, 1990.
- 8) Matsumoto, K., Shirai, T.: Basic study on drug-induced myelotoxicity. *Juntendo Medical Journal* 33(1), 74-85, 1987.
- 9) Yoshitoshi, Y.: "MEDICAL DIAGNOSIS", Kinpodo, Kyoto, p.159, 1988.
- 10) Tadokoro, S., Kuribara, H., Ohara, K.: "Practice of Behavioral Pharmacology", Seiwa Shoten, Tokyo, p.127, 1991.
- 11) Zhang, E. ed.: "Basic theory of Traditional Chinese Medicine (1)", Publishing House of Shanghai College of Traditional Medicine, Shanghai, p.101, 1989.