

補益作用の研究 (第2報)

—貧血ラットに対する四物湯および帰脾湯の影響—

小島 暁*, 江崎 宣久, 井上 昌輝, 柳沢久美子, 菅原ゆかり

養命酒製造(株)中央研究所

Studies of tonification in traditional Chinese medicine II: Effects of Shimotsu-to and Kihi-to on the anemic rats

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

Central Research Laboratories, Yomeishu Seizo Co., Ltd.

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

Abstract

We showed previously that the anemic rat caused by bloodletting and iron-free feeding might be useful as a model of "deficiency of heart-blood syndrome" (心血虚証). This work was undertaken in an attempt to elucidate the effects of Shimotsu-to and Kihi-to, which are the primitive prescriptions of blood-tonics (補血方剂), on anemic rats, compared with those of erythropoietin (EPO). In normal rats, Shimotsu-to extract (0.9~3.4 g/kg) and Kihi-to extract (0.9~3.5 g/kg), administered orally and daily for one week, had no effects. EPO (30~750 IU/kg), administered subcutaneously every other day for one week, increased red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht). On the contrary, in anemic rats, Shimotsu-to and Kihi-to, administered orally and daily for 3 weeks; (1) increased a^* value in ear color; (2) recovered the fallen blood pressure; (3) shortened the delay of QRS-interval of ECG. These results supported that theory the anemic rat is one of the models of the deficiency of heart-blood syndrome.

Shimotsu-to dose-dependently increased RBC, Hb, Ht, food intakes and body weights, and recovered weight of thymus and liver, and also suppressed the hypertrophy of heart. Kihi-to similarly increased food intakes, RBC, Hb and Ht, and suppressed the hypertrophy of heart. These results supported that Shimotsu-to and Kihi-to improved the deficiency of hematopoietic system or circulating system. Any effect of EPO was not observed in anemic rats.

Key words tonification, deficiency syndrome, deficiency of heart-blood syndrome, traditional Chinese medicine, anemic rat, Shimotsu-to, Kihi-to, EPO.

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

緒 言

医薬品の中に生薬を主体とした滋養強壯剤と称される製剤が多数存在するが、この“滋養強壯”の医学的な定

義は定まっていない。赤堀ら¹⁾は、東洋医学的な考察から滋養強壯を「陰陽を同時に補うこと」として、おおむね補益と同義に定義している。従って、補益作用を解明することは、ひいては滋養強壯剤の科学的な解明にもつながるものと考えられる。

*〒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

そこで、補益作用を解明するには適切な虚証モデルが必要と考え、まず、虚証の一つである心血虚証の証モデルの作成を試み、前報²⁾において、放血および鉄欠乏飼料処理による貧血ラットが、心血虚証モデルとして使用できる可能性を示した。今回は、この貧血ラットを用い、代表的な補血方剤である四物湯および帰脾湯の作用について、造血促進因子である erythropoietin (EPO) と比較しながら検討した。

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使用した。飼育はステンレス製のブラ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) 貧血作成方法：予備飼育後、貧血処理群には鉄欠乏粉末飼料(オリエンタル製、鉄含量は $5.5\mu\text{g/g}$ 以下)および蒸留水を与えた。鉄欠乏粉末飼料では、通常の粉末飼料に比べラットの摂取量がわずかではあるが抑えられることから、前報²⁾では通常の粉末飼料および水道水を与えた群を正常対照としたが、今回は、藤田ら³⁾の方法に従って、鉄欠乏粉末飼料および蒸留水に硫酸第一鉄($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg/l , 和光純薬)を溶解し飲用水として与えた群を正常対照とした。放血は松本ら⁴⁾の方法に従って、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回行った。

(3) 薬物：四物湯は、市販の刻み生薬(松浦薬業)を用いて当帰(北海道産)4, 川芎(北海道産)4, 地黄(河南産)4, 芍薬(四川産)4gの割合とし、帰脾湯は人參(黒竜江産)2.5, 黄耆(内蒙古産)2.5, 白朮(吉林産)2.5, 甘草(陝西産)1.2, 当帰(北海道産)2.5, 茯苓(湖北産)2.5, 酸棗仁(河北産)2.5, 竜眼肉(広東産)2.5, 遠志(河北産)2.5, 木香(雲南産)1.2gの割合としてそれぞれの生薬を合わせたもの100gにイオン交換水600mlを加えて30分間浸漬した後、自動煎じ器(マイコンとろ火; 栃本天海堂)により30分間加熱抽出した。煎じ液を濾過し、凍結真空乾燥機(DF-03G, 日本真空技術)を用いて褐色の粉末エキスを得て用時蒸留水に溶解した。

四物湯の収率は32.2%, 帰脾湯は23.2%であり、四物湯の用量は $0.9\sim 3.4\text{ g/kg}$ 、帰脾湯は $0.9\sim 3.5\text{ g/kg}$ とした。EPO(エポジン1500, 中外製薬)は、0.05%ヒト血清アルブミン(ミドリ十字)を含む5%マンニトール液に溶解し、用量は $30\sim 750\text{ IU/kg}$ とした。mecholy(塩

化メタコリン, 半井化学薬品)は、投与時に生理食塩水に溶解した。四物湯および帰脾湯は、貧血処理開始1週間前より1日1回16:00に経口投与を行った。対照には蒸留水を経口投与し、EPOは、補血方剤投与開始と同時に初めの2週間は2日に1回、その後は3日に1回の皮下投与を行った。

(4) 測定方法

1) 血液検査：頸静脈より放血させた血液を用いて赤血球数(RBC), 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。

2) 「証」に関する測定：前報²⁾に従って、心血虚証の計測可能な症状に対する影響を検討した。すなわち「面色淡白無華, 舌淡」は耳介の色差により、「心悸, 脈細或結代」は血圧, 心拍数および心電図により、「眩暈」はmecholy(メチル)刺激後の血圧により、「驚悸不安」はopen field testにより測定した。各測定は、放血処理の当日を避け、同一個体について群間に時間的な偏りがないように行った。今回は、被験薬の影響を確認するため各測定を前報²⁾のおおよそ1週間後に行った。すなわち色差, 血圧, 心拍数, 心電図の測定およびopen field testは、貧血処理開始後17~21日に、mecholy(メチル)刺激試験は21~28日に行った。なお、測定日に幅を設けたのは、同一日に全例を測定できないためであるが、群間に偏りが生じないように測定した。

3) 体重および摂食量, 摂水量：週2回測定した。

4) 臓器重量：貧血処理開始28日後に剖検を行い、各臓器を摘出して重量を測定した。

(5) 統計学的処理：群間における平均値の差の検定には、Sheffeの方法(Yukms統計ソフト)を用いて多重比較を行った。

結 果

1. RBCおよびHb, Htに対する影響

貧血処理の進行にともなう、単位容積あたりのRBCおよびHb, Htは著しく低下した。これに対し四物湯群では、この低下の抑制がみられ、用量依存的な改善が認められた(Fig. 1)。帰脾湯 3.5 g/kg 群でも、同様な改善がみられたが、四物湯の作用にはおおよばなかった。

EPO群では、貧血処理開始前の正常状態においてはRBCおよびHb, Htの明らかな増加が認められたが、貧血処理開始1週以降、貧血処理の進行につれて対照群との差異はみられなくなった。このことは、EPOの貧血改善作用は、体内の鉄が減少した状態ではみられないことを示唆している。

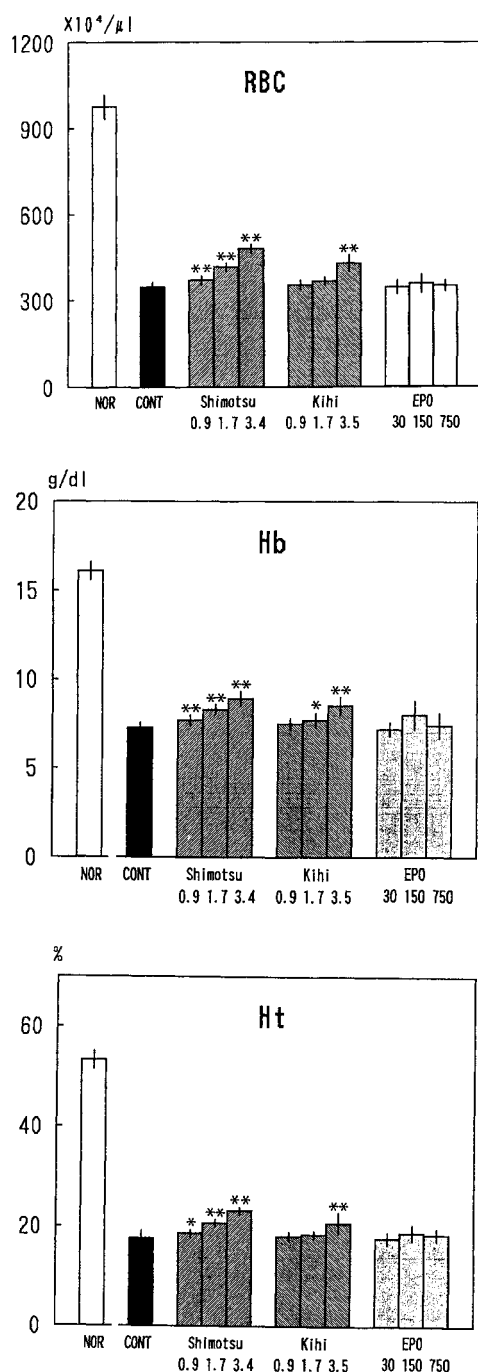


Fig. 1 Effects of Shimotsu-to, Kihi-to and EPO on RBC, Hb and Ht in anemic rats.

□ NOR ; normal rats (n=14),

■ CONT ; control in anemic rats (n=15),

▨ Shimotsu ; Shimotsu-to (extract 0.9, 1.7, 3.4 g/kg/day, p.o., n=14, 14, 14),

▩ Kihi ; Kihi-to (extract 0.9, 1.7, 3.5 g/kg/day, p.o., n=12, 12, 13),

▤ EPO ; erythropoietin (30, 150, 750 IU/kg/2, 3 days, s.c., n = 10, 10, 10). Each value expressed the mean ± S.D., **, **; Significant difference from control group by Sheffe multiple-comparison test, $p < 0.05, 0.01$.

2. 「証」の症状に対する影響

1) 耳介色差

貧血処理により耳介の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。これに対し、四物湯 3.4 g/kg 群および帰脾湯 3.5 g/kg 群では、有意ではないが a^* 値の回復傾向が認められた (Table I)。

2) 血圧および心拍数、心電図

貧血処理により血圧は大幅な低下がみられたが、四物湯 1.7 g/kg 群では有意な回復が、四物湯 3.4 g/kg 群および帰脾湯 3.5 g/kg 群では回復傾向がみられた (Table I)。EPO 群では、明らかな影響は認められなかった。心拍数に対して被験薬群では、いずれも明らかな影響はみられなかった。

心電図の各パラメータの比較では、貧血処理により QRS 幅の延長が認められたが、四物湯 3.4 g/kg 群では、延長抑制が認められた。帰脾湯および EPO 群では明らかな影響はみられなかった (Table I)。

3) Mecholyl 刺激試験

貧血ラットでは、mecholyl の皮下投与により血圧は大幅に低下し、90 mmHg 以下となり今回の非観血的な方法では測定不能な例が多数みられた。四物湯群では、測定可能な例が対照を上回ったものの、他の薬物群と同様にその後の血圧回復に対して明らかな促進は認められなかった。

4) Open field test

貧血処理により移動区画数、立ち上がり回数の低下および情動の安定を表わすとされる身繕い・洗顔行動の出現するまでの時間の延長がみられたが、これに対し四物湯 0.9, 1.7 g/kg 群で移動区画数の回復傾向が、帰脾湯 1.7, 3.5 g/kg 群では逆に移動区画数の低下がみられた。身繕い・洗顔行動の出現するまでの時間に対しては、いずれの被験薬群も影響はみられなかった。

3. 体重および摂食量、摂水量に対する影響

貧血処理開始前 1 週間の被験薬の投与による体重および摂食量、摂水量に対する影響はみられなかった。

貧血処理開始から体重および摂食量は徐々に低下したが、四物湯 3.4 g/kg 群では貧血処理開始 21 日後、有意ではないものの摂食量および体重の増加傾向が認められた。帰脾湯 1.7, 3.5 g/kg 群では、摂食量の増加傾向がみられた。EPO 群では、貧血処理開始から体重および摂食量とも対照を下まわり、全身状態の悪化が観察された。

摂水量では、貧血処理開始とともに徐々に増加がみられたが、各被験薬群とも明らかな影響はみられなかった。

4. 臓器重量に対する影響

貧血処理開始 28 日後の剖検では、十二指腸以下の消化管が細くなり盲腸の縮小もみられたが、明らかな病変は

Table I Effects of Shimotsu-to, Kihi-to and EPO on the α^* value, blood pressure and QRS-interval in the anemic rat.

	n	α^*	Blood pressure (mmHg)	QRS-interval (msec)
Normal	14	6.5±1.1	169±13	34.4±2.8
Control	15	2.5±0.4	126±14	37.3±4.0
Shimotsu-to				
0.9 g/kg	14	2.5±0.6	127±12	35.7±6.1
1.7	14	2.4±0.6	143±19*	32.8±4.1
3.4	14	2.9±0.3	138±15	32.4±3.8*
Kihi-to				
0.9 g/kg	12	2.4±0.4	135±13	35.6±7.8
1.7	13	2.6±0.3	131±14	36.9±4.5
3.5	13	2.8±0.5	140±15	38.2±8.1
EPO				
30 IU/kg	10	2.3±0.8	122±8	35.9±4.1
150	10	2.6±0.3	132±10	34.9±5.4
750	10	2.5±0.9	128±19	36.5±4.1

Each value expressed the mean±S.D., The α^* value represents degree of red.*; Significant difference from control by Scheffe multiple-comarison test, $p<0.05$.

Table II Effects of Shimotsu-to, Kihi-to and EPO on the organ weights in the anemic rats.

	n	Body weight (g)	Adrenal (mg)	Thymus (mg)	Spleen (mg)	Heart (mg)	Lung (mg)	Kidney (g)	Liver (g)
Normal	14	264±14	39.3±3.9	232±53	483±60	709±55	857±58	1.88±0.14	9.43±0.84
Control	15	216±15	38.0±4.5	168±23	544±83	839±75	838±57	1.60±0.12	5.59±0.58
Shimotsu-to									
0.9 g/kg	14	223±16	37.2±3.5	189±26	624±58*	820±89	858±72	1.69±0.17	6.41±0.86**
1.7	14	219±13	36.1±3.4	202±18**	597±52	771±69	828±24	1.61±0.08	6.26±0.37*
3.4	14	229±14	39.2±3.7	199±24**	597±55	761±83	850±52	1.67±0.12	6.73±0.58**
Kihi-to									
0.9 g/kg	12	229±9	38.7±5.3	195±28	633±86	833±68	827±41	1.61±0.10	6.02±0.87
1.7	13	223±15	40.5±5.2	179±27	644±95*	822±67	830±48	1.69±0.11	6.18±0.69
3.5	13	218±11	42.6±5.6	177±25	623±51	767±41*	823±38	1.71±0.22	6.65±0.61**
EPO									
30 IU/kg	10	212±16	36.6±2.4	148±13	549±97	826±68	852±61	1.53±0.12	5.35±0.52
150	10	204±18	36.3±6.1	132±23**	460±41	752±69*	790±57	1.40±0.14*	5.14±0.74
750	10	208±6	38.4±4.1	152±15	576±74	816±57	811±56	1.53±0.10	5.19±0.55

Each value expressed the mean±S.D..

*, **; Significant difference from control by Scheffe multiple-comparison test, $p<0.05$, $p<0.01$.

認められなかった。対照群では胸腺および腎、肝重量の低下、また、脾および心重量の増加が認められた (Table II)。これに対し四物湯 1.7, 3.4 g/kg 群では、低下した胸腺および肝重量の増加および心肥大の抑制傾向がみられ、他方、脾重量では対照をさらに上まわる増加が認められた。帰脾湯 3.5 g/kg 群では、肝重量の有意な回復および心肥大の抑制が認められた。EPO 群では、胸腺および腎、肝重量は低下した対照群をさらに下まわり、他の臓器重量の回復もみられなかった。

考 察

四物湯は《太平惠民和剂局方》に「調益榮衛，滋養氣血，治衝任虛損・・・」⁵⁾と記載されて“補血調血”を目標に使用され、また、帰脾湯は《濟生方》に「治思慮過制，勞傷心脾，健忘怔忡」⁶⁾と記載されて“益氣補血，健脾養心”を目標に使用されてきた。ともに補血作用を有する代表的な方剤で、臨床において各種の貧血に対する治療

薬としてその有効性⁷⁾が知られているが、その作用機序に関しては不明な点が多い。

四物湯および帰脾湯は、貧血ラットのRBCおよびHb, Htに対して用量依存的な改善作用を示し、補血方剤は造血系に作用することが示唆された。このことは、太田ら⁸⁾が四物湯の放射線障害防御作用から造血系への関与を推察している報告を支持している。この補血方剤の血液像に対する作用は、正常状態における1週間の投与ではみられなかった。一方、骨髓において造血前駆細胞、特に赤芽球系に働きその分化を促進して赤血球の産生を増加させるEPOは、正常ラットに対して荒井ら⁹⁾、升永ら¹⁰⁾の報告と同様にRBCおよびHb, Htを増加させた。しかし、このEPOの作用は貧血の進行とともにみられなくなり、摂食量の低下や粗毛の増加等全身症状を悪化させた。このようにEPOは、正常状態でしか造血促進作用を示さないこと、一方、四物湯および帰脾湯では、貧血が進行した状態でも繰り返し投与により貧血改善作用を示すことから、EPOと補血方剤では造血系に対する作用機序は、それぞれ異なっているものと推察された。

また、貧血ラットでは胸腺および肝、腎重量の低下、逆に心、脾重量の増加がみられた。これに対し、補血方剤は心肥大を抑制し、胸腺重量の低下を回復させたことから、循環器系や免疫系への関与も推察される。

ところで、今回は各被験薬の作用を確認するため、各測定を前報²⁾より約1週間後に行った。この間にラットは貧血および体重減少がやや進行したが、外観、症状等に明らかな変化はみられず、前報²⁾と同様のモデルと考えられた。この貧血ラットに対し四物湯および帰脾湯では、心血虚証の症状である「面色淡白無華、舌淡」や「心悸、脈細或結代」に対して改善作用が窺えた。また、体重や摂食量、全身の観察においても改善傾向がみられた。このように代表的な補血方剤によりこれら心血虚証の症状が一部改善されたことは、この貧血ラットが心血虚証のモデルとしての適性を備えていること、すなわち補血方剤の解明に使用可能なモデルであることを示唆しているものと考えられる。

四物湯と帰脾湯とでは、共通して貧血ラットの血液像の改善、耳介色差の改善、血圧低下の改善、心肥大の抑制、胸腺重量低下の回復等の作用がみられた。しかしながら、帰脾湯の作用は、多くの測定項目において四物湯より弱く、四物湯で観察された心電図QRS幅の延長抑制や体重の回復はみられず、またopen field testにおいては異なる作用がみられた。このことは、同じ補血方剤であっても臨床上の使用目標が異なるように、方剤により作用が異なることを示している。しかし、補血方剤としては、共通する造血系もしくは循環器系への作用が主

要なものと推察された。

結 論

放血および鉄欠乏試料による貧血ラットに対し、四物湯（エキス0.9～3.4 g/kg/day）および帰脾湯（エキス0.9～3.5 g/kg/day）の影響を検討した。

- (1) 四物湯および帰脾湯は、ともに明らかなRBC, Hb, Htの改善および心肥大の抑制を示し、補血方剤は造血系または循環器系に作用することが推察された。
- (2) 造血促進因子のEPOは、正常状態のラットに対してRBC, Hb, Htの明らかな増加作用を示したが、貧血ラットに対しては改善作用は認められず、四物湯および帰脾湯の作用とは異なることが示唆された。
- (3) 四物湯および帰脾湯は、貧血ラットにおける耳介の a^* 値(赤み)の低下、血圧の低下および心電図QRS幅の延長に対し改善傾向を示した。これらの成績は、心血虚証の「面色淡白無華、舌淡、心悸、脈細或結代」の改善を示唆するものであり、この貧血ラットは心血虚証モデルとして有用であることが示された。

References

- 1) Wang, Y., Akahori, Y. : Discussions on YAO-JIU (medicinal liquor) prescriptions by the theory of traditional Chinese medicine (III). *Japanese Journal of Oriental Medicine* **41** (4), 241-262, 1991.
- 2) Kojima, S., Ezaki, N., Inoue, M., Yanagisawa, K., Sugawara, Y. : Studies of tonification in traditional Chinese medicine I. *Journal of Traditional Medicines* **11**, 225-230, 1994.
- 3) Fujita, T., Ohgoh, T., Kinoshita K., Miyao, K. : Effect of methylcobalamin on iron treatment of iron deficiency anemia in rats. *Ôyô Yakuri* **5** (1), 141-148, 1971.
- 4) Matsumoto, K., Shirai, T. : Basic study on drug-induced myelotoxicity. *Juntendo Medical Journal* **33** (1), 74-85, 1987.
- 5) Chen, S. select : "Zengguan Taipinghuimin hejijufang" (増広太平惠民和劑局方). Enterprise Co. Ltd., Tokyo, p.150, 1988.
- 6) Yan, Y. select : "Yanshi jishengfang" (嚴氏濟生方). Enterprise Co. Ltd., Tokyo, p.37, 1988.
- 7) Tsuruta, M. : Kampo medicines for childhood bloody disease. *The Journal of Traditional Sino-Japanese Medicine* **12** (4), 18-22, 1991.
- 8) Ohta, S., Sakurai, N., Inoue, T., Takahashi, K., Shinoda, M. : Studies on chemical protector against radiation. XXIV. *YAKUGAKU ZASSHI* **105** (9), 874-877, 1985.
- 9) Arai, H., Uratani, K., Nagano, N., Kawagishi, M., Kusaka, O. : Effects of KRN 5702 on erythropoiesis in normal rats and anemic model rats with renal failure. *The Clinical Report* **22** (15), 5531-5546, 1988.
- 10) Masunaga, H., Takahira, R., Sawai, T. : Effects of recombinant human erythropoietin (SNB-5001) on renal anemic rats induced by drugs. *Folia Pharmacol. Japon* **98**, 151-160, 1991.