

補益作用の研究 (第3報)

—四物湯の貧血ラットにおける骨髓造血促進作用—

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 III :
Effects of Shimotsu-to on the hematopoietic system in the anemic rat

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

Central Research Laboratories, Yomeishu Seizo Co., Ltd.

(Received November 11, 1994. Accepted August 9, 1995.)

Abstract

We previously reported that Shimotsu-to improved anemia induced by bloodletting and iron-free feeding in rats. This study was undertaken to elucidate the effects of Shimotsu-to on the bone marrow in the anemic rat. Shimotsu-to was daily administered at the dose of 3.4 g/kg/day for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation. Shimotsu-to increased RBC, Hb and Ht. It also increased the ratio of polychromatic erythroblasts and orthochromatic erythroblasts in the femoral bone marrow of anemic rats at the 10 th and 20 th day after the first anemic operation, respectively. On the other hand, when iron was administered daily at the dose of 0.19 mg/kg/day, the same amount as that contained in Shimotsu-to, for the same period as Shimotsu-to, it increased RBC, Hb and Ht. Iron also increased the ratio of orthochromatic erythroblasts in the femoral bone marrow at the 20 th day after the first operation, without affecting the ratio of polychromatic erythroblasts. These effects of iron were less potent than those of Shimotsu-to. These findings suggested that Shimotsu-to stimulates the synthesis of Hb in the femoral bone marrow and improves the hematopoietic system and that iron partly contributes to the actions of Shimotsu-to on the hematopoietic system.

Key words traditional Chinese medicine, tonification, Shimotsu-to, anemic rat, hematopoietic effect.

Abbreviations RBC, red blood cell; Hb, hemoglobin; Ht, hematocrit; Shimotsu-to (Si-Wu-Tang), 四物湯.

緒 言

著者らは、補益作用の科学的な解明を図るため心血虚証モデルの作出を試み、¹⁾ ついで四物湯および婦脾湯の証モデルの症状に対する改善作用を検討してきた。²⁾ 放血および鉄欠乏飼料処理による心血虚証モデルに対し四物湯および婦脾湯は、証モデルの症状を一部改善し、また、

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) を用量依存的に有意に回復させることをみだしている。また、骨髓造血前駆細胞の分化促進因子である erythropoietin は、正常状態においてのみ RBC 等の増加を示し、四物湯の作用とは明らかに異なることも観察している。²⁾ 今回は、このような四物湯の貧血改善作用の機序を明らかにするため、貧血ラットの骨髓細胞に対する影響を検討した。

*〒 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

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プランケットケージにより個飼いと、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、6:00点灯および18:00消灯下で行った。

(2) **薬物**：四物湯エキスの作成には、市販の刻み生薬(松浦薬業)を用い、当帰(北海道産)25、川芎(北海道産)25、地黄(河南産)25、芍薬(四川産)25gを合し、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。次いで、煎じ液をこした後、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た(エキスの収率は32.2%)。このエキスを投与時に蒸留水に溶解した。四物湯の用量は、前報²⁾において明らかに貧血改善作用が認められた 3.4 g/kg/day (エキス重量)とした。鉄剤としては、硫酸第一鉄($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬)を蒸留水に溶解し、用量は予め原子吸光法により四物湯エキス中の鉄含有量を測定し、投与された四物湯エキスに含有されている鉄に相当する 0.19 mg/kg/day とした。

(3) **貧血作成方法および実験操作**：予備飼育後、貧血処理群には鉄欠乏粉末飼料³⁾(オリエンタル、鉄含量は $5.5\text{ }\mu\text{g/g}$ 以下)および蒸留水を与えた。正常対照群には、前報²⁾と同様に藤田ら⁴⁾の方法に従い、鉄欠乏粉末飼料および硫酸第一鉄($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、和光純薬)を蒸留水に 200 mg/l となるよう溶解し飲水ビンを用いて自由摂取させた。放血は、前報^{1,2)}と同様に松本ら⁵⁾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、計6回行った。被験薬群には放血処理開始1週間前より7日間、続いて貧血処理開始から20日間、1日1回16:00に被験薬を経口投与し、正常対照および貧血対照群には蒸留水を経口投与した。貧血処理開始10日および20日後に大腿骨を摘出し、骨髓有核細胞数の計測および骨髓細胞を分類し組成を比較した。

(4) 測定方法

1) 血液検査：放血した血液を用いてRBCおよびHb, Htを自動血球計測装置(MEK-5158動物用、日本光電)により測定した。

2) 骨髓有核細胞数および骨髓細胞の分類：大腿骨を摘出してその長軸にそって断面を作り、血球計ピペット

(A237、菅垣医理科)の0.5日盛りまで骨髓液を吸引し、アイソトナック(血球数計測用希釈液、日本光電)により200倍に希釈した。このピペットを血球計ピペット振盪器(KB-3、菅垣医理科)により20分間振盪し、希釈液を用いて自動血球計測装置(セルタックMEK-5158動物用、日本光電)により有核細胞数を測定した。また、骨髓液を供試動物の血漿に移して細胞浮遊液とし、載せガラス法により塗抹標本を作成し、May-Giemsa染色を行った後、顕微鏡下に標本1枚あたり500個の細胞を赤芽球および顆粒球、リンパ球、単球に分類しそれぞれの出現率として表した。

3) 血清鉄および不飽和鉄結合能：放血した血液を用いて血漿を分離し、血清鉄および不飽和鉄結合能(Fe-CテストワコーおよびUIBCテスト、和光純薬)を測定した。

4) 体重および臓器重量：体重は週2回測定し、貧血処理開始20日後に剖検し、各臓器を摘出して重量を測定した。

(5) **統計学的処理**：平均値の差の検定は、すべての群を含めて一元配置分散分析を行い、その後各群の比較をLSD法(最小有意差法；Yukms統計ソフト)により行った。

結 果

1. RBCおよびHb, Ht

前報¹⁾と同様に貧血処理の進行にともなって単位容積あたりのRBCおよびHb, Htは大幅に低下した。この低下に対し四物湯群では、RBCおよびHb, Htとも徐々に回復がみられ、貧血処理開始20日後には有意な増加が認められた(Fig. 1)。四物湯エキス中に含まれる鉄と同量を投与した鉄剤群においても、同様にRBCおよびHb, Htの有意な増加が認められたが、その改善作用は四物湯群には及ばなかった。

2. 骨髓有核細胞数

骨髓の有核細胞数を計測したところ、貧血処理にともない骨髓有核細胞数は、有意ではないが減少傾向がみられた(Table I)。これに対し四物湯群は、貧血処理開始10日後には、対照群に比べ有意ではないが増加傾向がみられたものの、20日後には影響はみられなかった。鉄剤群においては、骨髓有核細胞数に対して影響はみられなかった。

3. 骨髓細胞の組成

骨髓造血細胞の組成を知るため塗抹標本における細胞を分類し比較した。

(1) 赤芽球

貧血処理にともない多染性赤芽球は増加し、正染性赤

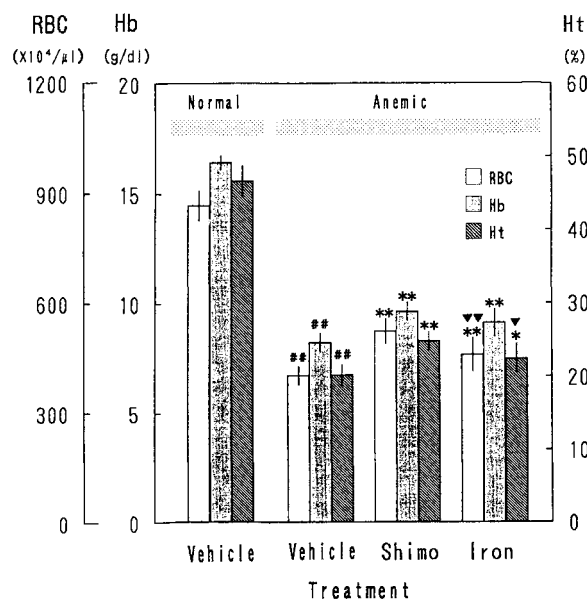


Fig. 1 Effects of Shimotsu-to and iron on RBC, Hb and Ht in the anemic rat.

Normal Vehicle; distilled water (n=10), Anemic Vehicle; distilled water (n=10), Shimo; Shimotsu-to (extract 3.4 g/kg/day, n=10), Iron; FeSO₄ (Fe 0.19 mg/kg/day, n=10). Each column represents the mean±S.D. Test drug was administered orally for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation.

##; Significant difference from normal vehicle group by LSD test at $p < 0.01$.

*, **: Significant difference from anemic vehicle group by LSD test at $p < 0.05$, 0.01 . ▼▼; Significant difference from Shimotsu to group by LSD test at $p < 0.05$, 0.01 .

Table I Effects of Shimotsu to and iron on nucleated cell counts at femoral bone marrow in the anemic rat.

Group	Drug	After the first anemic operation			
		Nucleated cell counts ($\times 10^3/\mu\text{l}$)			
		(n)	10 th day	(n)	20 th day
Normal	vehicle	9	157±40.8	10	155±17.4
Anemic	vehicle	10	148±27.7	9	132±31.9
	Shimotsu-to				
	3.4 g/kg/day	9	195±50.2	9	142±54.2
	Iron				
	0.19 mg/kg/day	10	148±19.9	10	138±16.5

Each value represents the mean±S.D. Test drug was administered orally for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation. Normal vehicle and anemic vehicle groups were administered distilled water.

芽球は減少した (Fig. 2A, B)。これに対し四物湯群では、貧血処理開始 10 日後に多染性赤芽球の有意な増加が認められ、20 日後には正染性赤芽球の有意な増加が認められた。このことから、四物湯は赤芽球の成熟を促進する

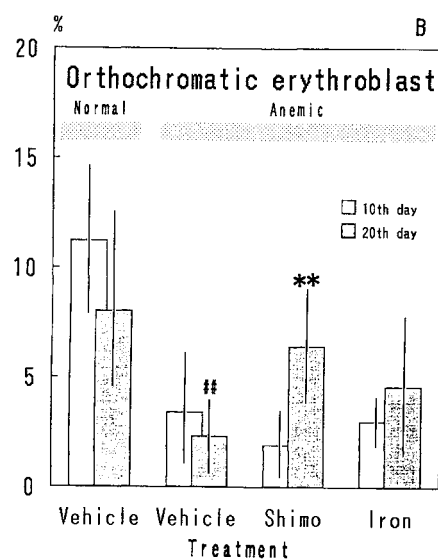
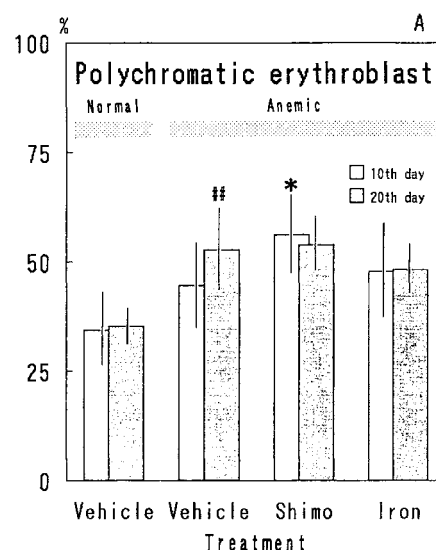


Fig. 2 Effects of Shimotsu to and iron on the differential cell counts of polychromatic erythroblast (A) and orthochromatic erythroblast (B) at femoral bone marrow in the anemic rat.

Normal Vehicle; distilled water (n=10), Anemic Vehicle; distilled water (n=10), Shimo; Shimotsu-to (extract 3.4 g/kg/day, n=10), Iron; FeSO₄ (Fe 0.19 mg/kg/day, n=10). Each column represents the mean±S.D. Test drug was administered orally for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation.

##; Significant difference from normal vehicle group by LSD test at $p < 0.01$.

*, **: Significant difference from anemic vehicle group by LSD test at $p < 0.05$, 0.01 .

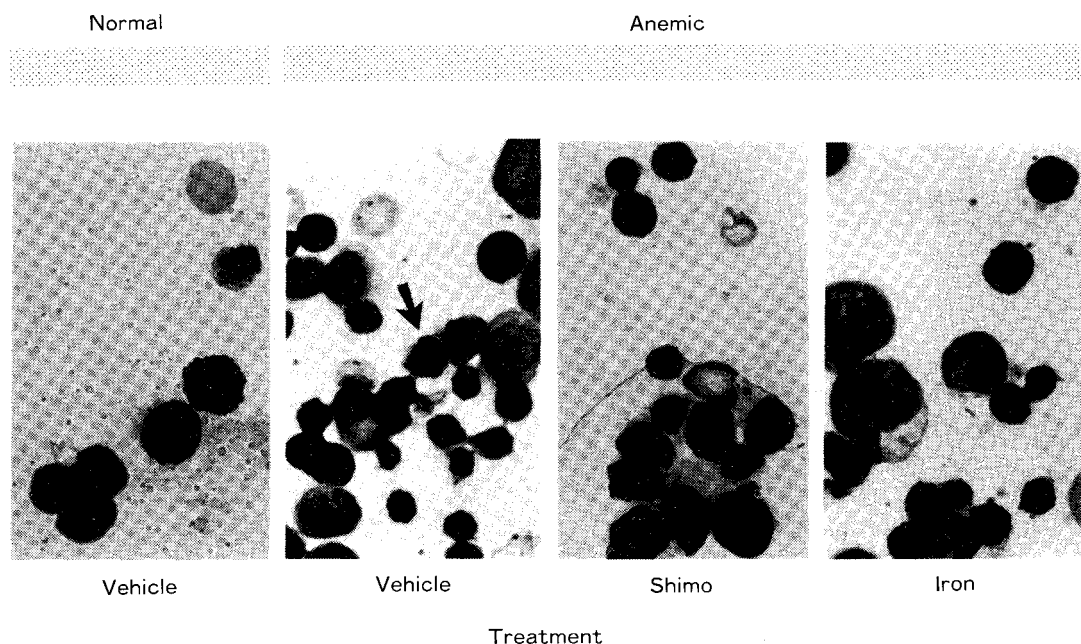


Fig. 3 Micrograph of the femoral bone marrow in the anemic rats treated with Shimotsu-to and iron (at $\times 1000$).

Arrow sign indicates erythroblast, stained by May Giemsa method. Normal Vehicle; distilled water. Anemic Vehicle; distilled water. Shimo; Shimotsu-to (extract 3.4 g/kg/day). Iron; FeSO_4 (Fe 0.19 mg/kg/day). Test drug was administered orally for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation.

ことが示唆された。鉄剤群では、貧血処理開始 20 日後に正染色赤芽球の有意ではないが増加傾向がみられた。

顕微鏡下において、貧血対照群では赤芽球の過形成がみられ、細胞は May-Giemsa 染色により濃青に染まり、狭小でその輪郭は不整（ギザギザ状）であった (Fig. 3)。四物湯群では、細胞質が豊富で輪郭の不整が改善された赤芽球の増加が認められた。鉄剤群では、一部に細胞質の豊富な赤芽球も散見されたが四物湯群には及ばなかつ

た。

(2) 顆粒球およびリンパ球、単球

貧血処理 20 日後では正常対照群に比べ顆粒球の有意な低下がみられ、リンパ球、単球はいずれも有意ではないが低下傾向がみられた (Table II)。これに対し四物湯群では、貧血処理開始 10 日後に有意ではないが顆粒球および単球の低下傾向が、20 日後でも単球の低下傾向がみられた。これは、顕微鏡下の塗抹標本全体の観察から、

Table II Effects of Shimotsu-to and iron on the differential cell counts of granulocyte, lymphocyte and monocyte at femoral bone marrow in the anemic rat.

Group	Drug	After the first anemic operation											
		<u>Granulocyte (%)</u>				<u>Lymphocyte (%)</u>				<u>Monocyte (%)</u>			
		(n)	10 th day	(n)	20 th day	(n)	10 th day	(n)	20 th day	(n)	10 th day	(n)	20 th day
Normal	vehicle	9	25.3±5.1	10	25.0±2.9	9	16.5±3.4	10	17.5±3.8	9	7.3±1.8	10	8.9±2.3
Anemic	vehicle	10	22.1±3.7	9	16.9±3.3##	9	16.5±5.7	10	13.9±4.4	9	6.5±2.3	10	6.4±2.2
	Shimotsu-to												
	3.4 g/kg/day	9	18.1±3.2	9	18.0±5.2	9	14.5±4.0	10	12.1±2.6	9	5.1±1.4	10	5.0±1.1
	Iron												
	0.19 mg/kg/day	10	22.6±4.1	10	18.6±1.7	9	16.7±6.8	10	12.1±2.5	9	7.2±1.7	10	7.1±2.5

Each value represents the mean $\pm$ S.D. Test drug was administered orally for 7 days before and for 20 days after the first anemic operation. Normal vehicle and anemic vehicle groups were administered distilled water. ##; Significant difference from normal vehicle group by LSD test at $p < 0.01$.

四物湯群で顆粒球およびリンパ球、単球が減少したためではなく、赤芽球が増加した結果、相対的に顆粒球、リンパ球の割合が低下したものと考えられた。一方、鉄剤群では、顆粒球およびリンパ球、単球いずれに対しても明らかな影響はみられなかった。

4. 血清鉄および不飽和鉄結合能

生体鉄の輸送型を表す血清鉄は、正常状態で $243 \pm 72.6 \mu\text{g/dl}$ ($n=10$) であったが、貧血処理により低下し、貧血処理開始 20 日後には $83.5 \pm 21.1 \mu\text{g/dl}$ に達した。一方、不飽和鉄結合能は、正常状態では $399 \pm 47.4 \mu\text{g/dl}$ ($n=9$) であったが、貧血処理開始 20 日後には $877 \pm 94.5 \mu\text{g/dl}$ に上昇した。四物湯および鉄剤群とも血清鉄およ

び不飽和鉄結合能に対して影響はみられず、四物湯は生体鉄の輸送系に対して影響を与えないものと推察された。

5. 体重および臓器重量

貧血処理にともない体重は徐々に減少した。剖検時の臓器重量において貧血対照群では体重減少に平行して副腎、胸腺、肝重量の有意な減少が、有意ではないが脾および心重量の減少傾向がみられた (Table III)。四物湯群では副腎重量の減少に対し有意な回復が、有意ではないが脾および肝重量の回復傾向がみられた。鉄剤群では有意ではないが脾および肝重量の回復傾向がみられたものの、副腎重量の回復はみられなかった。

Table III Effects of Shimotsu-to and iron on body and organ weights in the anemic rat at 20 days after the first anemic operation.

Group	Drug	(n)	Body weight (g)	Adrenal (mg)	Thymus (mg)	Spleen (mg)	Heart (mg)	Liver (g)
Normal	vehicle	10	276 ± 9	43.4 ± 4.7	296 ± 42	566 ± 57	690 ± 43	11.1 ± 1.2
Anemic	vehicle	10	$222 \pm 18^{##}$	$37.1 \pm 4.6^{\#}$	$194 \pm 58^{##}$	507 ± 48	646 ± 44	$7.6 \pm 0.6^{##}$
	Shimotsu-to							
	3.4 g/kg/day	10	229 ± 15	$44.1 \pm 4.0^{**}$	197 ± 46	538 ± 64	655 ± 51	8.7 ± 1.0
	Iron							
	0.19 mg/kg/day	10	226 ± 21	39.8 ± 3.8	210 ± 47	525 ± 67	636 ± 65	8.5 ± 0.8

Each value represents the mean $\pm$ S.D. Test drug was administered orally for 7 days before and 20 days after the first anemic operation. Normal vehicle and anemic vehicle groups were administered distilled water. #, ##; Significant difference from normal vehicle group by LSD test at $p < 0.05$, 0.01, **; Significant difference from anemic vehicle group by LSD test at $p < 0.01$.

考 察

四物湯は、臨床上、各種貧血の治療に使用されている。^{6,7)} 太田ら⁸⁾ は、四物湯の前投与による放射線障害防御効果を検討し、その延命効果が造血機能障害に対する防御作用によるものと推測しているが、四物湯の貧血改善作用の機序を検討した報告はみあたらない。著者らは、前報²⁾ において四物湯が鉄欠乏飼料および放血処理による貧血ラットの RBC および Hb, Ht 等を用量依存的に回復させることをみいだしており、その作用機序を明らかにするため骨髓に対する影響を検討した。

一般に、骨髓の有核細胞は貧血によりいったん増加し、⁹⁾ 貧血が進行すると低下する¹⁰⁾ ことが知られている。今回の条件では、貧血処理により有核細胞数の低下傾向がみられ、これに対し貧血処理開始 10 日後には四物湯により対照群に比べ有核細胞数の増加傾向がみられた。骨髓細胞の組成においては、対照群では多染性赤芽球の増

加、正染性赤芽球の減少が認められ、また、細胞自体も May-Giemsa 染色により濃青に染まることから、Hb 合成が低下していることが示唆された。赤芽球の分化成熟においては、前赤芽球から塩基好性赤芽球、多染性赤芽球へと成熟する過程で核のクロマチン構造が粗剛化し、細胞質での Hb 合成が最大となり、May-Giemsa 染色による濃青味も薄れ、正染性赤芽球以降の過程で Hb 含量が増大することが知られている。¹¹⁾ 四物湯は貧血処理開始 10 日後に多染性赤芽球の有意な増加を、20 日後に正染性赤芽球の有意な増加を示した。一方、四物湯は顆粒球およびリンパ球、単球には影響しなかった。また、四物湯は鉄の輸送系に対しても影響を示さなかった。これらのことから四物湯の貧血改善作用は、骨髓における Hb 合成を促進して赤芽球の分化成熟を促進することによるものと推察された。

今回用いた貧血ラットは、放血および鉄欠乏飼料処理により作成した鉄欠乏性貧血であり、四物湯の貧血改善作用には、Hb 合成の材料としての鉄、すなわち四物湯に

含まれる鉄の関与が予測された。そこで、四物湯エキス中の鉄に相当する鉄剤を投与したところ RBC および Hb, Ht の増加が観察された。しかし、この鉄剤による改善作用は、四物湯に比べ弱く、さらに、骨髓細胞の組成においては、貧血処理開始 20 日後に正染色赤芽球の増加傾向がみられたのみで、四物湯の作用とは異なることが示された。このことから四物湯の貧血改善作用には、鉄が一部関与していることが推定された。

なお、四物湯は血清鉄および不飽和鉄結合能に対して影響はみられず、鉄の輸送系には作用しないものと考えられる。

また、四物湯により副腎重量の有意な回復および脾、肝重量の回復傾向が認められたことから、四物湯は骨髓造血の促進作用のみならず、全身状態の改善にも働くものと推察される。

結 論

放血および鉄欠乏飼料による貧血ラットに対し、四物湯および鉄剤の繰り返し投与による血液および骨髓に対する作用を検討した。

四物湯 (エキス 3.4 g/kg/day) は、RBC および Hb, Ht を有意に増加させ、大腿骨骨髓において貧血処理開始 10 日後に多染色赤芽球、20 日後には正染色赤芽球の有意な増加を示した。鉄剤 (0.19 mg/kg/day) は RBC および Hb, Ht を有意に改善したが、その作用は四物湯より弱く、また、骨髓においては貧血処理開始 20 日後に正染色赤芽球の増加傾向のみがみられた。これらのことから、四物湯は、骨髓における Hb の合成促進による赤芽球

の分化成熟を促進し貧血改善作用を示すものと推察された。また、この作用に四物湯中の鉄が一部関与していることが推察された。

References

- 1) Kojima, S., Ezaki, N., Inoue, M., Yanagisawa, K., Sugawara, Y. and Kinoshita, G.: Studies of tonification in traditional Chinese medicine I. *Journal of Traditional Medicines* **11** (3), 225-230, 1994.
- 2) Kojima, S., Ezaki, N., Inoue, M., Yanagisawa, K. and Sugawara, Y.: Studies of tonification in traditional Chinese medicine II. *Journal of Traditional Medicines* **11** (3), 231-235, 1994.
- 3) Suzuki, K., Kanke, Y. and Goto, S.: The nitrogen balance of rats fed an iron deficient Diet. *J. Japan Soc. Nutr. Food Sci.* **35**, 397-400, 1982.
- 4) Fujita, T., Ohgoh, T., Kinoshita, K., Miyao, K.: Effect of methylcobalamin on iron treatment of iron deficiency anemia in rats. *Ōyō Yakuri* **5** (1), 141-148, 1971.
- 5) Matsumoto, K., Shirai, T.: Basic study on drug-induced myelotoxicity. *Juntendo Medical Journal* **33** (1), 74-85, 1987.
- 6) Kashiwabuchi, S.: Tetuketubouseihinketu ni taisuru kamporyouhou (鉄欠乏性貧血に対する漢方療法) *Kamposhinryou* (漢方診療) **6** (6), 40-43, 1992.
- 7) Tsuruta, M.: Kampo Medicine 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. and Shinoda, M.: Studies on chemical protectors against radiation XXIV. *YAKUGAKU ZASSHI* **105** (9), 874-877, 1985.
- 9) Miwa, S. and Watanabe, Y.: Atlas of Blood cells. Bunkodo (文光堂), Tokyo, p.143, 1992.
- 10) Mizoguchi, H., Hirai, H. and Sakata, Y.: Bessatsu Igaku no Ayumi, Ketsuekishikkan (別冊医学の歩み/血液疾患). Ishiyaku Publishers, Inc. (医歯薬出版), Tokyo, p.169, 1993.
- 11) Hino, S.: Rinshoketsueigaku (臨床血液学). Ishiyaku Publishers, Inc. (医歯薬出版), Tokyo, p.14, 1988.