

小柴胡湯エキスの妊娠ラットおよび その胎児の発育に及ぼす影響

小西 啓悦,*^{a),b)} 安田 佳子,^{b)} 阿部 博子^{a)}
有地 滋,^{a)} 谷村 孝^{b)}

^{a)}近畿大学東洋医学研究所, ^{b)} 近畿大学医学部 第一解剖教室

Effects of Syô-saiko-tô on pregnant rats and development of their fetuses

Hiro Yoshi KONISHI,*^{a),b)} Yoshiko YASUDA,^{b)} Hiroko ABE,^{a)}
Shigeru ARICHI^{a)} and Takashi TANIMURA^{b)}

^{a)}The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University

^{b)}Department of Anatomy, Kinki University School of Medicine

(Received May 9, 1986. Accepted July 7, 1986.)

Abstract

Pregnant rats of Wistar strain were given orally a water suspension of Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang) during mid-gestation and/or mid-and late-gestation, and the effects on physical conditions of dams and the development of the fetuses were examined. Once a day pregnant rats were given a dosage of 0, 418, 835 or 1670 mg of Syô-saiko-tô per kg of body weight from day 6 to 15 of gestation and/or from day 5 through day 19. They were sacrificed on day 20 of gestation and their fetuses were examined for external, internal and skeletal abnormalities.

No significant differences in the maternal physical conditions, body weight gain throughout pregnancy, serum transaminases and proteins and histological findings of the liver at term, were detected in the experimental rats when compared with the controls. Any harmful effects on reproductive performance were not seen in the experimental groups. The fetuses exposed to Syô-saiko-tô showed significantly accelerated ossification of phalanges in the dose-dependent relation. The other developmental anomalies and/or variations were not discernible in the treated groups.

In conclusion, prenatal administration of Syô-saiko-tô did not induce any harmful effects on the development of the fetuses and maternal conditions.

Key words Syô-saiko-tô, pregnancy, fetal development, rat

Abbreviation Syô-saiko-tô (Xiao-Chai-Hu-Tang), 小柴胡湯

緒 言

小柴胡湯は食欲不振, 全身倦怠感, 胸脇苦満など

の「証」を示す患者に従来より用いられてきたが, 近年になって肝炎, 腎炎などの炎症性疾患にも広く用いられるようになった。しかし, 妊娠婦人が本剤を適用する機会があるにもかかわらず, 妊娠婦人お

*〒589 大阪府南河内郡狭山町西山 380
Sayama-cho, Osaka 589, Japan

よびその胎児に対する本剤の安全性についての報告はほとんどなされていない。成ラットを用いての慢性毒性試験では、血液中の α -ヒドロキシブチリックデヒドロゲナーゼ値の上昇、中性脂肪値の増加およびアルカリフォスファターゼ値の低下などが報告されている¹⁾。本実験では、小柴胡湯エキスを妊娠ラットにその妊娠中期から後期にかけての投与と、妊娠中期のみの投与を行い、母体およびその胎児に対する影響をみた。

材料と方法

小柴胡湯は生薬24.0 gを100℃で煎出し、2.0 gの乾燥粉末としたエキス原末（ツムラ順天堂、東京）を用いた。その構成生薬をTable Iに示した。原末は黄褐色の樹脂臭を有する水に難溶性の粉末であるので、乳鉢中で均質な水性懸濁液として投与し、動物はウィスター系ラット（静岡実験動物農業共同組合、浜松）を用いた。飼育室は温度23±1℃、湿度50±5%および照明は12時間（7:00～19:00）に調整した。飼料は固形飼料（OA-2：日本クレア、東京）を蒸留水とともに自由に摂取させた。

実験Ⅰ：膣栓確認日を妊娠0日とした11週齢ラットを妊娠1日齢で購入し、妊娠4日まで予備飼育を行った。投与は妊娠5日から19日まで1日1回小柴胡湯エキスを胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

投与量は、最大懸濁濃度（1670 mg/kg 母体体重）を求め、それを大量投与量とし、以下公比 $\frac{1}{2}$ で中および少量投与量を決定した。少量投与量の418 mg/kg 母体体重はヒト常用量の約10倍量に相当する。1回に与える量は10 ml/kgとした。使用動物数は大、中および少量投与群にそれぞれ5、6および5匹を用いた。対照群には蒸留水を同様の方法で

4母獣に与えた。投与期間中は母獣の一般状態を毎日観察し、体重は定時に1日1回測定した。妊娠20日にエーテル麻酔下で母獣を屠殺し、子宮と卵巣を摘出した。得られた胎児は外表検査と内臓観察に供した。また屠殺時に母獣より5 mlの心臓採血を行い、血清学的検査（GOT値、GPT値、総タンパク量値、アルブミン値、グロブリン値、A/G比）に供した。検査法は、GOT、GPTについてはUV法、総タンパク量はビュレット法、アルブミンはBCG法を、それぞれ用いた。

実験Ⅱ：雌雄8週齢で購入し、4週間の予備飼育後12週齢で交配を開始した。交配時間は16時間（午後4時～午前8時）とし、膣塗抹標本にて精子を確認した日を妊娠0日とした。妊娠ラットは個別ケージで飼育した。投与は、実験Ⅰと同じ3用量（1670、835、418 mg/kg 母体体重）を用い、妊娠6日から15日までの間、1日1回胃ゾンデによる強制経口投与を行った。使用動物数は大、中、少量投与群にそれぞれ13、12、12匹を用い、対照群には11匹に蒸留水を実験群と同様の方法で与えた。

母獣は実験Ⅰと同様に、一般状態、体重の測定を行うと同時に、摂餌量の測定も行った。妊娠20日に子宮を摘出する際、各投与群から無作為に5母獣を選び、その肝臓の一部を切り出しブアン液にて固定し、組織検索に供した。さらに実験Ⅰに加えて、トリグリセライド値と総コレステロール値を含む血清学的検査に供した。トリグリセライド値、総コレステロール値共に酵素法で測定を行った。

摘出した子宮については、総着床数、死亡あるいは吸収胚数を調べた後、生存児については性別、体重測定、口腔を含む外表奇形の有無の観察を行った。生存児の $\frac{1}{3}$ はブアン液にて固定し、Barrowらの方法²⁾に基づいて内臓観察に供した。さらに各投与群から無作為に5胎児を選びその肝臓を組織学的

Table I Components* of Syō-saiko-tō (Xiao-Chai-Hu-Tang) extract.**

Bupleuri Radix (Saiko)	7.0 g
Pinelliae Tuber (Hange)	5.0 g
Scutellariae Radix (Ôgon)	3.0 g
Zizyphi Fructus (Taisô)	3.0 g
Ginseng Radix (Ninjin)	3.0 g
Glycyrrhizae Radix (Kanzô)	2.0 g
Zingiberis Rhizoma (Syôkyô)	1.0 g

*JP. X; ** Tsumura juntendo CO., LTD.

に検索した。残余の%の生存児については、99%エタノールにて固定し、Dawson法³⁾による骨染色を行い骨格観察に供した。摘出した卵巣については、黄体数を調べ着床率を求めた。

母動物の体重、摂餌量、血清中の諸検査値、黄体数、着床総数、着床率および生存胎児数、胎児体重、胎児の指骨骨化数、腰椎後椎骨数については同腹児を単位としてStudentのt検定を行い、胎児の死亡あるいは吸収胚数、性比、恥骨欠損や胸骨分節の骨化の遅れおよび腰肋を示した胎児数についてはMann-WhitneyのU検定を行った。

結 果

1. 母動物に及ぼす影響

実験Ⅰ：投与群、対照群ともに妊娠期間中の死亡および流産はなく、一般状態についても特記すべき所見は認められなかった。母体の体重推移をFig. 1に示した。血清の肝機能検査値をTable IIに示した。これらについては投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった。

実験Ⅱ：投与群、対照群ともに妊娠期間中の死亡

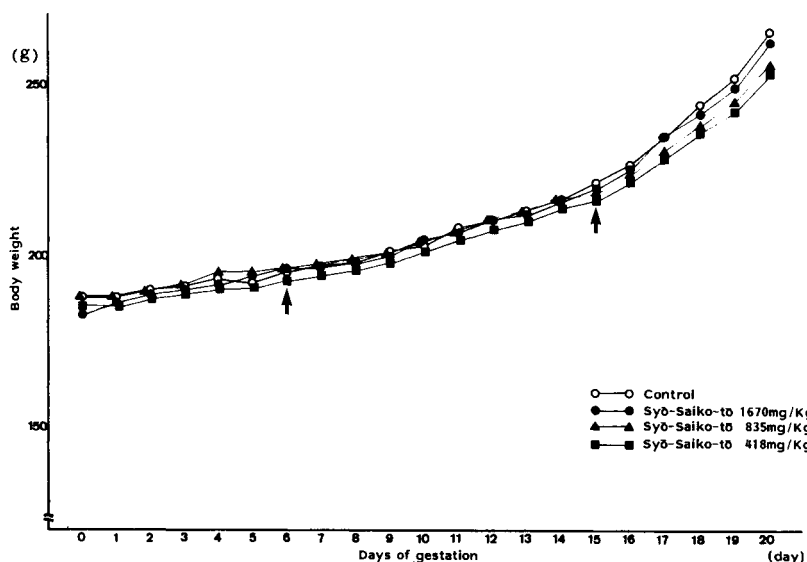


Fig. 1 Daily body weight of pregnant rats treated with Syδ-saiko-tō during day 5 to day 19 of pregnancy.

Table II Effect of Syδ-Saiko-tō on liver function in pregnant rats administered on days 5–19 of gestation (Exp. I).

Dose (mg/kg)	No. of animals examined	Glutamic oxaloacetic transaminase (U)	Glutamic pyruvic transaminase (U)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Globulin (g/dl)	A/G ratio
0	4	86.2±14.5 ^a	19.7±4.8	6.39±0.70	4.19±0.49	2.21±0.22	1.90±0.08
418	5	85.7±7.1	17.6±1.1	6.37±0.06	3.95±0.29	2.42±0.85	1.74±0.39
835	6	81.6±8.6	15.5±6.6	6.35±0.94	4.11±0.55	2.23±0.44	1.88±0.23
1670	5	79.4±11.2	22.1±4.8	6.54±0.71	4.07±0.28	2.48±0.51	1.68±0.25

a : mean ± SD

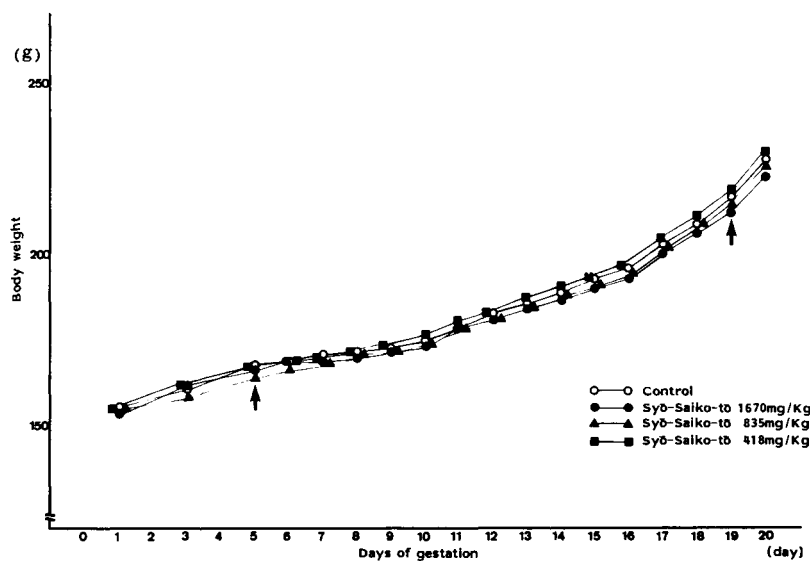


Fig. 2 Daily body weight of pregnant rats treated with Syδ-saiko-tδ during day 6 to day 15 of pregnancy.

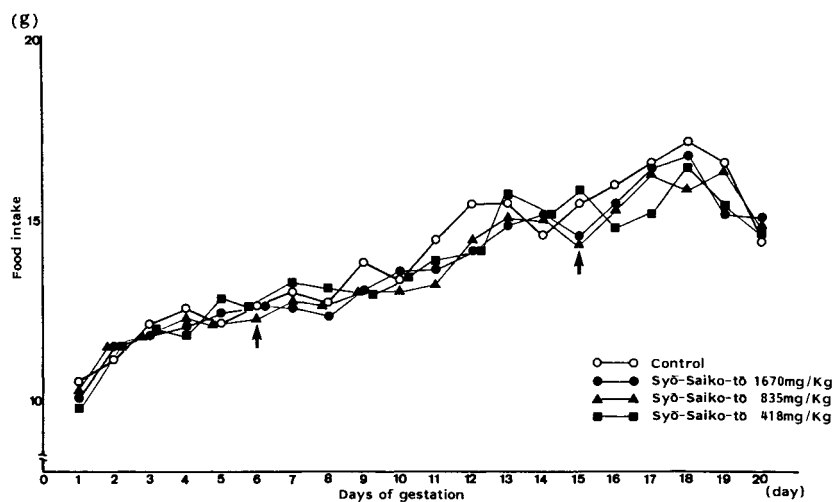


Fig. 3 Food consumption of pregnant rats treated with Syδ-saiko-tδ during day 6 to day 15 of pregnancy.

及び流産は認められなかった。一般状態についても特記すべき所見は認められなかった。妊娠中の体重の推移については Fig. 2 に示すように小量投与群において、妊娠末期に至るまで体重の増加の抑制が

認められたが、対照群との間に有意な差は示さなかった。摂餌量については、Fig. 3 に示すように対照群との間に顕著な差異は認められなかった。また Table III に一腹平均着床数および着床率について

Table III Effect Syô-saiko-tô on reproductive performance in pregnant rats administered on days 6-15 of gestation (Exp. II).

Dose mg/kg	No. of dams	No. of Corpa Lutea (mean±SD)	No. of implantation sites (mean±SD)	implantation rate (% , mean±SD)
0	11	12.3±1.7	11.2±2.4	90.8±13.3
418	12	12.8±1.4	9.6±3.4	77.4±29.3
835	12	11.4±2.6	8.8±3.6	75.6±29.2
1670	13	12.5±1.3	10.4±3.2	83.2±23.1

Table IV Effect of Syô-saiko-tô on liver function in pregnant rats administered on days 6-15 of gestation (Exp. II).

Dose mg/kg	No. of animals examined	Glutamic oxaloacetic transaminase (U)	Glutamic pyruvic transaminase (U)	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	Globulin (g/dl)	A/G ratio
0	11	139±26.1 ^a	33±2.6	281±55.9	88±4.3	6.6±0.41	3.4±0.25	3.2±0.20	1.08±0.060
418	12	141±13.7	37±3.9	261±86.8	90±8.8	7.1±0.49	3.7±0.37	3.4±0.22	1.10±0.109
835	12	139±21.3	37±5.3	272±117.0	98±7.0	7.2±0.52	3.8±0.39	3.4±0.24	1.11±0.113
1670	13	135±17.7	33±4.6	270±60.3	92±8.8	6.7±0.52	3.5±0.32	3.2±0.24	1.10±0.064

a : mean ± SD

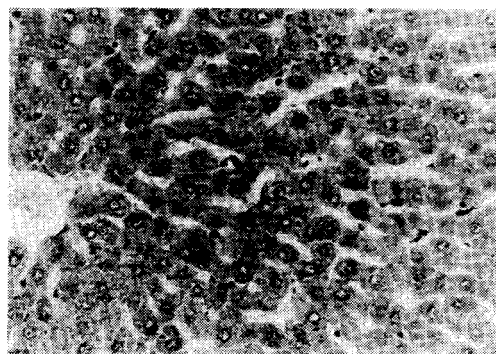


Fig. 4 Liver of pregnant rat on day 20 of gestation administered vehicle alone during day 6 to day 15 of pregnancy.

Hematoxylin-eosin stain (×190)

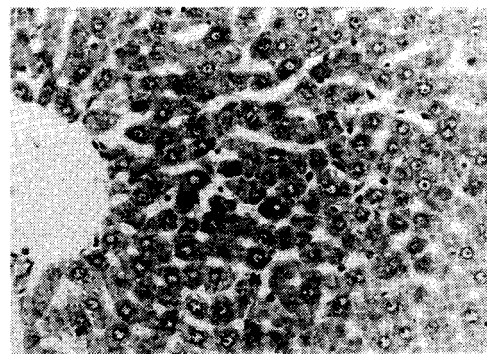


Fig. 5 Liver of pregnant rat on day 20 of gestation administered Syô-saiko-tô during day 6 to day 15 of pregnancy.

Hematoxylin-eosin stain (×190)

示したが、投与群と対照群との間に差異は認められなかった。母動物の肝機能検査については、妊娠20日における血清中のそれぞれの値を Table IV に示した。投与群、対照群との間に特記すべき差異を認めなかった。屠殺時の肝臓の病理組織学的検索では、大量投与群 (Fig. 5) は対照群 (Fig. 4) と比べて病的な変性像など異常は認められなかった。

2. 胎児に及ぼす影響

胎生20日における生存胎児数、死亡胎児数、総着床数、外表奇形数、性比および胎児体重について、Table V, VI にまとめた。実験 I の総着床数、死亡あるいは吸収胚数においては、投与群と対照群との間に有意な差は示さなかった (Table V)。また、投与群および対照群ともに外表あるいは内臓に奇形を有する胎児は1例も認められなかった (Table V)。胎児平均体重では、小量投与群において対照

Table V Effect of Syō-saiko-tō on development of rat fetuses exposed during days 5–19 of gestation (Exp. I).

Dose mg/kg	No. litters	Total number of implantation 〔Litter size〕 mean±SD	No. of resorption and/or dead fetuses(%)	No. of malformed fetuses (%)	Sex ratio ♂/♀ ×100	Fetal body weight (g) mean±SD
0	4	34 (6.8±2.99)	1 (2.9)	0	120	3.42±0.08
418	5	40 (10.0±0.71)	0	0	100	3.25±0.03*
835	6	39 (6.5±2.99)	0	0	75	3.56±0.46
1670	5	41 (8.2±2.23)	3 (7.3)	0	100	3.15±0.22

*Significant difference from control by Student's *t*-test ($p < 0.01$).

Table VI Effect of Syō-saiko-tō on development of rat fetuses exposed during days 6–15 of gestation (Exp. II).

Dose mg/kg	No. of litters examined	Total No. of implantation 〔Litter size〕 mean±SD	Total No. of resorptions and/or dead fetuses (%)	No. of malformed fetuses(%)	Live fetuses			
					No. of fetuses (mean±SD)	Sex ratio ♂/♀×100	Body weight (g) mean±SD	
							♂	♀
0	11	124 (11.3±2.3)	3 (2.4)	0	121 (11.0±2.5)	112	3.05±0.15	2.87±0.10
418	12	116 (9.7±3.4)	14 (12.1)	0	102 (8.5±3.4)	113	3.17±0.14	2.91±0.19
835	12	106 (8.8±3.6)	5 (4.7)	0	101 (8.4±3.6)	91	3.29±0.48	3.04±0.41
1670	13	135 (10.4±3.2)	3 (2.2)	0	132 (10.2±3.0)	164	3.32±0.41	3.07±0.51

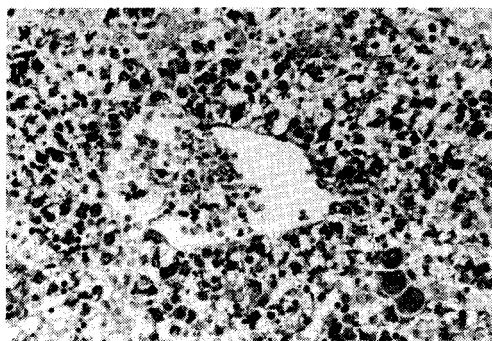


Fig. 6 Liver of 20-day-old rat fetus exposed to vehicle alone during day 6 to day 15 of pregnancy.

Hematoxylin-eosin stain (×190)

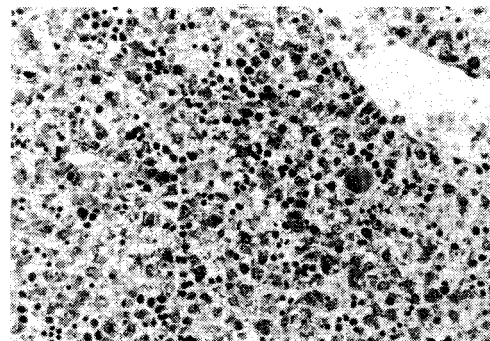


Fig. 7 Liver of 20-day-old rat fetus exposed to Syō-saiko-tō during day 6 to day 15 of pregnancy.

Hematoxylin-eosin stain (×190)

群との間に有意な減少を示したが、他の投与群と比較して減少は認められず、また用量効果関係も示さなかった (Table V)。

実験IIでは Table VI に示すように、小量投与群において総着床数の減少と死亡胚数あるいは吸収胚

数の増加傾向を認めたが、対照群との間に有意差は認められなかった。全投与群において外表異常の発生は認められなかった。また、胎児体重については用量相関的に増加の傾向が見られたが有意差はなかった。

Table VII Effect of Syô-saiko-tô on skeletal development of rat fetuses exposed days 6-15 of gestation (Exp. II).

Dose mg/kg	No. of fetuses examined	Anomaly defect of pubic bone No. of cases (%)	Variation		No. of retarded ossification of sternebrae (%)	Ossification				
			cervical rib	lumbar rib(%)		forelimb R mean±SD	phalanges L mean±SD	hindlimb R mean±SD	phalanges L mean±SD	No. of postlumbar vertebrae mean±SD
0	79	4 (5.1)	0	2 (2.5)	46 (58.2)	5.6±0.1	5.5±0.1	4.8±0.1	4.8±0.1	8.2±0.1
418	66	2 (3.0)	0	0	43 (65.2)	5.3±0.2***	5.1±0.2***	4.7±0.2	4.8±0.1	8.3±0.1*
835	62	3 (4.8)	0	2 (3.2)	36 (58.1)	5.9±0.3**	5.8±0.3**	5.1±0.2***	5.2±0.2***	8.6±0.3***
1670	89	3 (3.4)	0	3 (3.4)	47 (52.8)	6.1±0.3***	6.1±0.3***	5.1±0.1***	5.1±0.2***	8.7±0.3***

Significant difference from control by Student's *t*-test : **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

L : left, R : right

胎児の肝臓組織像では対照群で、Fig. 6 に示したように肝細胞索の分化、中心静脈、類洞がよく発達して認められ、この時期の肝はまだ若干の赤芽球、血芽細胞、巨大細胞などの造血細胞が認められた。大量投与では、対照群の像と比較して、顕著な差はなかった (Fig. 7)。

実験IIの骨格標本検査結果を Table VII にまとめた。恥骨欠損などの小異常や腰肋などの変異の散発が観察されたが、それらの頻度は対照群にも同様に見られ、有意な差はなかった。指骨骨化数と腰椎後椎骨数が投与群において統計的に有意に増加し、かつ用量効果関係を示した。その他は投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

胎児の内臓観察所見では、肝臓の分葉異常が大量、中量にそれぞれ 1, 2 例認めたが、対照群でも 3 例を認め、さらに肺では大量と小量が 2, 1 例それぞれ認めたが、対照群でも同様の所見を 1 例認めた。

考 察

妊娠初期、特に胎児においてはその器官形成期に相当する時期に、妊娠を自覚せずに本方剤を処方する機会が存在する可能性を鑑み、小柴胡湯の妊娠ラットおよびその胎児に対する影響をみる目的で、妊娠中、後期および中期のみの投与を行ったところ、母体に対しては、実験IIにおいて妊娠期間中の体重増加が妊娠末期においてやや抑制されることを認めたが、対照群との間に有意差を示さなかった。血清中のトランスアミナーゼや血清蛋白などの数値およ

び肝臓の組織所見をあわせて考えると、本実験の条件下では小柴胡湯は妊娠母獣に対して特記すべき異常を誘発しないものと考えられる。

一方胎児に対する影響については、最も顕著に認められた所見は投与群における骨格の発達において実験II (Table VII) で骨化の進行度が有意に高められたことで、これは指骨数と腰椎後椎骨数の増加が認められたことである。その他の所見では、生存率、死亡率、奇形発生率、末期体重、内臓諸器官の発生状態については、対照群との間に差異を認めなかった。骨化の進行度の促進は、小柴胡湯投与で胎児体重の増加傾向が認められたことと関連しているように考えられる。また、肺や肝の分葉異常については、この系の自然発生奇形の範疇に入れるべきものと考えられる⁶⁾。

当帰芍薬散^{4,5)}、小半夏加茯苓湯⁵⁾、葛根湯⁵⁾ および小青竜湯⁵⁾ で器官形成期投与試験が行われたが、いずれもラット胎児に対して致死性、発育抑制および催奇形性が認められないことを報告している。本方剤中に含まれる生薬中、半夏、生姜、大棗、甘草については、当帰芍薬散を除く方剤のいずれかにふくまれており共通のものであるが、柴胡、黄芩、人参については全く含まれていないものであり、しかも常用生薬である。

以上のことから、小柴胡湯エキス原末の本実験の条件下では、妊娠中および後期に渉る連続投与あるいは妊娠中期のみの連続投与では、妊娠期間中のラット母体、動物の一般状態や肝機能に障害とならないこと、および胎児の発生においては、器官形成期およびその後の胎生期の小柴胡湯の経胎盤投与では、胎児毒性を生ぜしめないことが結論される。

文 献

- 1) 伊藤忠信, 村井繁夫, 吉田 熙, 増田義勝, 齊藤弘子, 畠山起夫, 米倉秀夫: 小柴胡湯のラットにおける慢性毒性試験. 応用薬理 **23**, 279-285, 1982
- 2) Barrow, M. V. and Taylor, W. J.: A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.* **127**, 291, 306, 1968
- 3) Dawson, A. B.: Note on the staining of the skeleton of cleaned specimens with alizalin red S. *Stain Tech.* **1**, 123-124, 1926
- 4) 油田正樹, 秋山喜彦, 市尾義昌, 中村 厚, 市川信雄: 当帰芍薬散のラットにおける催奇形性試験. 応用薬理 **23**, 981-997, 1982
- 5) 福西克弘, 横井義之, 寺崎まゆみ, 能瀬尚志, 高瀬英樹: 漢方薬の催奇形性試験. 基礎と臨床 **17**, 2117-2126, 1983
- 6) 亀山義郎, 谷村 孝, 安田肇生: 実験動物における自然発生奇形. 先天異常 **20**, 25-106, 1980