

老化促進モデルマウス (SAM) に対する漢方薬の作用 (第1報)

織田真智子, 片田 圭子, 阿部 博子*

近畿大学東洋医学研究所第一研究部門

Effects of traditional Chinese medicine on senescence accelerated mouse (SAM) (I)

Machiko ORITA, Keiko KATADA and Hiroko ABE*

First Department, The Research Institute of Oriental Medicine, Kinki University

(Received January 30, 1989. Accepted May 24, 1989.)

Abstract

The effects of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) on age related changes in the characteristics of erythrocyte membrane were examined using senescence accelerated mice (SAM-P₁) and control mice in normal aging characteristics (SAM-R₁). A significant decrease in number of erythrocytes and significant increases in MCV and ATP level in erythrocytes were observed in 7-month-old SAM-P₁ as compared with 7-month-old SAM-R₁. The contents of cholesterol and phospholipid in erythrocyte membranes increased significantly in aged SAM-P₁ as compared with SAM-R₁ but the molar ratio of cholesterol/phospholipid in SAM-R₁ was inversely lower than SAM-P₁. The plasma cholesterol level was significantly decreased in 7-month-old SAM-P₁ as compared with SAM-R₁. Hachimi-jio-gan did not cause any change in the number of erythrocytes, Ht and MCV in both SAM-P₁ and R₁ but inhibited the remarkable decrease in serum lipids in SAM-P₁. The molar ratio of cholesterol/phospholipid in erythrocyte membranes was significantly increased in SAM-P₁ treated with Hachimi-jio-gan since the content of phospholipid of erythrocyte membranes was remarkably decreased but the content of cholesterol was not changed by Hachimi-jio-gan.

Key words senescence accelerated mouse, aging, erythrocyte membrane, Hachimi-jio-gan (Hachimi-jiō-gan).

Abbreviations SAM, senescence accelerated mouse; Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan), 八味地黄丸.

緒 言

加齢に伴う生体膜の変化は、個体の老化の基本的な現象として注目され、ことに赤血球は細胞膜の加齢に伴う変化を検討するためには極めて便利な試料として、老化との関連性が多方面から研究されている¹⁻³⁾。一方、老化促進モデルである SAM-P₁ 系マウス⁴⁾ は正常な成長の後に活動性の低下、脱毛、被毛粗雑、眼周囲病変、脊椎前後湾増強、白内障、骨粗鬆症、老化アミロイド症などを伴い急速な老化を来すモデル動物として老化の基本的現象の解明に使用

されている。私共は既にこの SAM-P₁ 系マウスが加齢に伴って赤血球数の減少、平均赤血球容積の増加、ATP 含量の増加、赤血球膜組成の変化を示すことを見出しており⁵⁾、更に血清脂質においてはコレステロール、トリグリセライド値なども有意に低下すること⁶⁾ などから、これらの変化と老化促進との関連性を追求している。

漢方では老化に伴うさまざまな臓器機能の低下などに対して八味地黄丸が用いられることが多い。最近の基礎的研究ではこの八味地黄丸が糖脂質代謝改善作用^{7,8)} 抗動脈硬化作用⁹⁾ など加齢に伴うさまざまな現象に対して有効であることが報告されている

*〒589 大阪府大阪狭山市大野東377-2

が、老化の基本的現象に対する作用機作については全く知られていない。

本研究では SAM 系マウスの加齢に伴う赤血球膜組成の変化に対する八味地黄丸の作用を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物と飼料：生後 4 カ月齢の SAM-P₁ 系及び SAM-R₁ 系マウスを各々 2 群に分け、1 群には通常飼料（日本クレア CE-2）、2 群には八味地黄丸粉末を通常飼料に 5W/W% の割合で混和したものを与えて 3 カ月間飼育して実験に供した。

八味地黄丸は地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂枝、附子からえられたエキス末（特許製）を、粉末飼料中に 5% の割合で添加した。

(2) 赤血球数と平均赤血球容積の測定：東亜医用電子製、Sysmex Microcell Counter CC-150 を用いて、血球数、ヘマトクリット値、平均赤血球容積（MCV）を測定した。

(3) 赤血球 ATP 含量の測定：採血後、すみやかに氷冷下で洗浄した赤血球の ATP 含量を、ベーリンガー・マンハイム社製測定用キットを用いて測定した。

(4) 血清脂質の測定：軽エーテル麻酔下で、頸静脈より採血した血液から血清を分離し、酵素法（和光純薬工業製、測定用キット使用）により、血清中の総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質

を測定した。

(5) 赤血球膜脂質：柴田らの方法¹⁰⁾に従い、イソプロパノール、クロロホルムで赤血球膜脂質を抽出し、酵素法（和光純薬製測定用キット使用）でコレステロール、リン脂質を定量した。

結 果

1. 飼料および水の摂取量

SAM-P₁ 系マウスおよび SAM-R₁ 系マウスの通常飼料投与群（対照群）の飼料摂取量はそれぞれ 5.03 ± 0.31 g/日、 5.16 ± 0.23 g/日で差は認められず、またそれぞれの八味地黄丸投与群の飼料摂取量は 5.25 ± 0.64 g/日、 4.93 ± 0.15 g/日でありいずれも特に変化は認められなかった。SAM-P₁ 系対照群の水摂取量は 13.6 ± 1.02 g/日、八味地黄丸投与群では 12.7 ± 0.61 ml/日であり、SAM-R₁ 系対照群では 16.5 ± 0.83 ml/日、八味地黄丸投与群は 15.4 ± 0.92 ml/日と SAM-P₁ 系でやや水摂取量の減少傾向が見られた。

2. 血液学的所見の変化 (Table I)

SAM-P₁ 系の対照マウスの赤血球数は SAM-R₁ 系の対照マウスに比べて有意の減少を示したが、平均赤血球容積は逆に著しく増加した。ヘマトクリット値、ヘモグロビン値については SAM-P₁、SAM-R₁ 系マウスの間に差は認められなかった。

八味地黄丸の投与は SAM-P₁、SAM-R₁ 系マウ

Table I Effects of Hachimi-jio-gan on hematological data.

SAM		RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	Ht (%)	MCV (μ^3)	WBC ($10^2/\text{mm}^3$)	Hb (g/dl)
P	Control	$772 \pm 42^{**}$	37.8 ± 1.8	$49.1 \pm 1.1^{**}$	37.2 ± 1.6	12.45 ± 0.54
	Hachimi-jio-gan	735 ± 30	34.5 ± 1.2	47.1 ± 0.5	28.1 ± 2.3	11.70 ± 0.40
R	Control	879 ± 15	38.6 ± 0.7	43.9 ± 0.2	30.4 ± 4.1	13.44 ± 0.25
	Hachimi-jio-gan	876 ± 8	38.5 ± 0.3	44.0 ± 0.4	34.5 ± 4.4	13.50 ± 0.12

** $p < 0.005$; Significant difference from control in SAM-R.

Table II Effects of Hachimi-jio-gan on serum lipids.

SAM		TCL (mg/dl)	F-CL (mg/dl)	P-Lip (mg/dl)	Trig (mg/dl)
P	Control	$57.68 \pm 5.7^{**}$	$20.35 \pm 1.99^*$	$135.20 \pm 11.9^{**}$	119.1 ± 22.2
	Hachimi-jio-gan	68.75 ± 5.5	$27.15 \pm 2.78^{\#}$	$181.43 \pm 14.9^{\#}$	$185.5 \pm 20.3^{\#}$
R	Control	110.30 ± 2.0	34.68 ± 0.45	235.80 ± 8.0	150.8 ± 11.3
	Hachimi-jio-gan	106.00 ± 5.3	32.17 ± 1.44	209.50 ± 8.2	116.9 ± 8.2

TCL: total cholesterol, P-Lip: phospholipid, Trig: triglyceride. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; Significant difference from control in SAM-R. $^{\#}p < 0.1$; Significant difference from control in SAM-P.

Table III Effects of Hachimi-jio-gan on ATP content in erythrocytes and lipid components of erythrocyte membrane.

SAM		ATP (10^{-3} mg/ 10^{10} RBC)	CL (mg/ 10^{10} RBC)	P-Lip (ml/ 10^{10} RBC)
P	Control	581 $\pm$ 46*	0.739 $\pm$ 0.032**	3.9 $\pm$ 0.6**
	Hachimi-jio-gan	504 $\pm$ 24	0.696 $\pm$ 0.018	2.8 $\pm$ 0.1 [#]
R	Control	470 $\pm$ 13	0.632 $\pm$ 0.010	2.5 $\pm$ 0.1
	Hachimi-jio-gan	475 $\pm$ 19	0.636 $\pm$ 0.007	2.8 $\pm$ 0.1

CL : cholesterol, P-Lip : phospholipid. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$: Significant difference from control in SAM-R. [#] $p < 0.05$: Significant difference from control in SAM-P.

スいずれにおいてもこれらの血液学的所見に特に有意の差をもたらさなかった。

3. 血清脂質成分に対する作用 (Table II)

SMA-P₁ 系マウスでは血清総コレステロール値, フリーコレステロール値およびリン脂質値はいずれも SAM-R₁ 系マウスに比べて著しい低下を示した。トリグリセリド値も低下傾向を示したが, 有意の差は認められなかった。

SAM-P₁ 系マウスに八味地黄丸を投与すると血清総コレステロール値に差は見られなかったが, フリーコレステロール値, リン脂質, トリグリセリド値はいずれも増加の傾向を示した。しかし, SAM-R₁ 系マウスに八味地黄丸を投与しても, これらの血清所見に変化は見られなかった。

4. 赤血球膜組成に対する作用 (Table III)

SAM-P₁ 系マウスの赤血球では SAM-R₁ 系マウスに比べて赤血球 1×10^{10} 個当たりの ATP 含量, コレステロール量, リン脂質量がいずれも有意の増加を示した。しかし赤血球膜のコレステロール/リン脂質比 (モル比) は SAM-P₁ 系で 0.364 ± 0.023 , SAM-R₁ 系では 0.458 ± 0.015 と SAM-P₁ 系マウスで明らかな減少 ($p < 0.001$) が認められた。

SAM-P₁ 系マウスに八味地黄丸を投与したマウスでは ATP 量, コレステロール量に有意の変化は見られなかったが, リン脂質量では有意の減少が認められた。したがって, 八味地黄丸を投与した SAM-P₁ 系マウスでは赤血球膜コレステロール/リン脂質比は 0.486 ± 0.017 と対照の SAM-P₁ 系マウスに比べて有意に増加 ($p < 0.001$) した。しかし SAM-R₁ 系マウスでは八味地黄丸投与による変化は全く見られず, 赤血球膜コレステロール/リン脂質比も 0.458 ± 0.017 で対照マウスとの間に差は認められなかった。

考 察

各種臓器の細胞膜は外部からの情報を細胞内に伝えるための極めて重要な役割を果たしており, 細胞膜の細胞生物学的性質や膜結合性の酵素活性などが膜の物理化学的性質と対応して変化することなどはよく知られている。したがって, 老化に伴って起こる各種臓器の機能変化も細胞膜あるいは細胞内小器官の膜の加齢に伴う変化によってもたらされる可能性が指摘されており, ラット肝細胞膜のコレステロール/リン脂質比, microviscosity, 飽和脂肪酸比などの加齢による変化^{11,12)} が注目されている。また赤血球の加齢に伴う変化についての報告は極めて多く, 赤血球表層荷電,¹³⁾ 浸透圧に対する脆弱性,¹⁴⁾ θ 毒素感受性¹⁾ などが加齢に伴って変化することが見出されている。しかし赤血球膜のコレステロール含量には老化に伴う変化が認められておらず, θ 毒素による溶血にはコレステロール量よりコレステロールの膜における存在状態が極めて重要であると推測されている¹⁾。また一方 Grinna らは,¹⁵⁾ ラットの加齢に伴って, 肝臓のミクロソームやミトコンドリアの膜のコレステロール/リン脂質比が上昇することを見出し, この膜組成の変化が膜酵素活性の低下をもたらすと推測している。しかし, これらの加齢に伴う細胞膜系の膜組成の変化については反対の結果も報告¹²⁾ されているなど現在まだ必ずしも一定の見解には到っていない。

一方, 私共は SAM-P₁ 系マウスの赤血球数, MCV, ATP 量および赤血球膜脂質組成は生後100日齢まで SAM-R₁ 系マウスとの間に有意の差を示さないが, 100日齢以後加齢に伴って明らかに赤血球数は減少し, MCV, ATP 量, 赤血球膜コレステロール, リン脂質なども増加することを見出している⁵⁾。したがって本研究で使用した SAM-P₁ 系の対照マウスに見られる赤血球の諸性質の変化も

老化に伴う現象であると考えられる。八味地黄丸はこの SAM-P₁ 系マウスの老化に伴う赤血球数や MCV, ATP 量の変化に対して特に作用しなかったが、赤血球膜のリン脂質は対照マウスで $3.9 \pm 0.6 \text{ mg}/10^{10} \text{ RBC}$ であったのに対して八味地黄丸投与マウスでは $2.8 \pm 0.1 \text{ mg}/10^{10} \text{ RBC}$ と明らかな低下をもたらした。コレステロール/リン脂質比を増加させた。SAM-P₁ 系マウスにおける赤血球膜組成の変化が一般老化における普遍的変化であるか否かについては問題もあるが、この変化に対して八味地黄丸が抑制効果を示すことは八味地黄丸には細胞膜系の脂質組成を変化させる作用のあることを示唆する極めて興味ある結果であると思われる。

一般にヒトの老化では、血清コレステロール、HDL コレステロール、トリグリセリド値の上昇による二次的病変が老化において重要な意味を持つことから、老化と脂質代謝との関連性が注目されている。しかし本研究で用いた SAM-P₁ 系マウスでは Table II に見られるように血清総コレステロールは $57.68 \pm 5.7 \text{ mg/dl}$ で SAM-R₁ 系マウスの $110.30 \pm 2.0 \text{ mg/dl}$ に比べて明らかな低下を示し、フリーコレステロール、リン脂質も SAM-R₁ 系ではそれぞれ $34.68 \pm 0.45 \text{ mg/dl}$, $235.80 \pm 8.0 \text{ mg/dl}$ であるのに対して SAM-P₁ 系では $20.35 \pm 1.99 \text{ mg/dl}$, $135.20 \pm 11.9 \text{ mg/dl}$ と著しい低下を示している。八味地黄丸は SAM-P₁ 系マウスにおけるフリーコレステロールおよびリン脂質を $27.15 \pm 2.78 \text{ mg/dl}$, $181.43 \pm 14.9 \text{ mg/dl}$ とそれぞれ増加させたが、SAM-R₁ 系マウスの血清脂質には赤血球膜に対する作用と同様に全く変化をもたらさなかった。八味地黄丸のこのような作用の特徴は漢方薬が異常状態には作用するが正常状態に対しては特に作用しないという、いわゆる漢方処方の病的状態の“正常化作用”を示唆する興味深い結果であると思われる。また八味地黄丸の血清脂質改善作用と赤血球膜脂質組成に対する作用との関連性は極めて興味ある問題ではあるが、現在のところまだ SAM-P₁ 系マウスにおける血清脂質の変化と赤血球膜組成の変化との関連性についても全く検討されておらず、これらの点については今後更に一般の老化現象の解明も含めて詳細な検討を行う必要があると思われる。

結 論

老化促進マウス (SAM-P₁) および対照マウス (SAM-R₁) の加齢に伴う赤血球膜組成の変化に対

する八味地黄丸の作用を検討した結果、八味地黄丸は SAM-P₁ 系マウスの加齢に伴う赤血球数の減少、MCV の増加、ATP 含量の増加などに対して特に有意の変化をもたらさなかったが、赤血球膜のコレステロール/リン脂質の著明な減少に対して抑制効果を示すことが見出された。しかし対照の SAM-R₁ 系マウスに対しては全く変化をもたらさなかった。

謝 辞

本研究で使用した SAM マウスを御恵与頂いた京都大学結核胸部疾患研究所病理部門・教授・竹田俊男先生に心から感謝致します。

文 献

- 1) Saito, M., Ando, S., Tanaka, Y., Nagai, Y., Mitui, K. and Hase, J.: Age-dependent changes in susceptibility of erythrocytes to perferingolysin O. *Mech. Aging Mech.* 20, 53-63, 1982.
- 2) Lutz, H.U. and Kay, M.B.: An age-specific antigen is present on senescent human red blood cell membranes. *Mech. Aging Dev.* 15, 65-75, 1981.
- 3) Abe, H., Orita, M. and Arichi, S.: Erythrocyte deformability in aging. *Mech. Aging Dev.* 27, 383-390, 1984.
- 4) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T.: A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Aging Dev.* 17, 183-194, 1981.
- 5) Abe, H., Orita, M. and Takeda, T.: Age-dependent changes in erythrocyte membranes in Senescence Accelerated Mouse (SAM). *Mech. Aging Dev.*, in press.
- 6) Higuchi, K., Matsumura, A., Honma, A., Toda, K., Takeshita, S., Matsushita, M., Yonezu, T., Hosokawa, M. and Takeda, T.: Age-related changes of serum apoprotein SAS (SAM), apoprotein A-I and low-density lipoprotein levels in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech. Aging Dev.* 26, 311-326, 1984.
- 7) Yoshida, M., Kasukawa, R., Watanabe, N., Ohtsuki, G., Sakamoto, T. and Haranaka, R.: The effects of Bawei-Wan (Hachimijiogan) on plasma levels of high density lipoprotein-cholesterol and lipoperoxide in aged individuals. *Am. J. Chinese Med.* 13, 71-76, 1985.
- 8) 渡辺宜佳, 星野昌伯, 大槻剛智, 阪場貞夫, 阪木次夫, 中井正彦, 吉田 浩, 粕川礼司: 八味地黄丸の薬理効果に関する研究. 新薬と臨床 31, 1366-1371, 1982.
- 9) 原中瑠璃子, 長谷川律子, 小曾戸洋, 大和田滋, 平馬直樹, 花輪寿彦, 飯村二三男, 中川滋木: 八味地黄丸, 柴胡加竜骨牡蛎湯, 大柴胡湯, 黄連解毒湯エキスの動脈硬化に及ぼす影響に関する実験研究. 和漢医薬学会誌 3, 51-

- 57, 1986.
- 10) 柴田 進, 武元良整, 柴田和子 : Iatroscan の赤血球膜脂質分析への応用. *Clinical Laboratory* **21**, 837-844, 1980.
- 11) Grinna, L.S. and Baber, A.A. : Age related changes in membrane lipid content and enzyme activities. *Biochim. Biophys. Acta* **288**, 347-353, 1972.
- 12) 小泉恵子, 小島清秀, 小泉欣也, 佐藤秩子, 石原広男 : ラット肝の細胞膜脂質層の加齢による変化. *脂質生化学* **21**, 304-307, 1979.
- 13) Hegner, D., Platt, D., Hecker, H., Schloeder, U. and Breuninger, V. : Age-dependent physiochemical and biochemical studies of human red cell membranes. *Mech. Aging Dev.* **10**, 117-130, 1979.
- 14) Detraglia, M., Cook, F.B., Stasiw, D.M. and Cerny, L. C. : Erythrocyte fragility in aging. *Biochim. Biophys. Acta* **345**, 213-219, 1974.
- 15) Grinna, L.S. : Age related changes in the lipids of the microsmal and mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech. Aging Dev.* **6**, 197-205, 1977.