

六神丸のラット血圧反応におけるセンソ中のアドレナリンの関与

松原 利行*, 横田 洋一, 上野 美穂, 川筋 透, 斎藤 晴夫

富山県薬事研究所

Contribution of adrenaline in Bufonis to blood pressure response after intravenous administration of Rokushingan in anesthetized rats

Toshiyuki MATSUBARA*, Youichi YOKOTA, Miho UENO, Toru KAWASUJI and Haruo SAITO

Toyama Prefectural Institute for Pharmaceutical Research

(Received March 3, 1989. Accepted June 2, 1989.)

Abstract

We studied the effects of Rokushingan and the six constituent crude drugs on blood pressure and heart rate in anesthetized rats, as a series of studies of Rokushingan on a cardiovascular system. The drugs were suspended in 0.1% CMC or dissolved in saline, and intravenously administered. Rokushingan induced a hypotension at the low dosages (0.003, 0.01 and 0.03 grains/kg). A temporary hypertension, which was followed by the hypotension, was induced at the high dosages of Rokushingan (0.1 and 0.3 grains/kg). Bufonis showed the same blood pressure response as Rokushingan, although the other five constituent crude drugs, *i.e.*, Fel Ursi, Aquilariae, Ginseng, Bezoar and sheep testis extract, did not affect blood pressure and heart rate. Three bufosteroids (bufalin, cinobufagin and resibufogenin) induced a continuous rise of blood pressure, which was very different to the response of Rokushingan. The hypotension induced by Rokushingan was blocked by propranolol. The hypertension induced by Rokushingan was depressed by phentolamine. These results suggest a contribution of α - and β -sympathomimetic actions to the blood pressure response of Rokushingan. Therefore, we determined adrenaline content in Bufonis by a HPLC method. Adrenaline was included in Bufonis as much as showing the blood pressure response (1.52%). These results reveal that blood pressure response of Rokushingan is due to adrenaline in Bufonis.

Key words Rokushingan, Bufonis Venenum (toad-cake), blood pressure, anesthetized rat, sympathomimetic action, adrenaline content, HPLC.

Abbreviations Bufonis Venenum (Ch'an Su), センソ; CMC, carboxymethyl cellulose sodium; HPLC, high performance liquid chromatography; Rokushingan (Lu-Shen-Wan), 六神丸.

緒 言

六神丸は富山の代表的な配置家庭薬であり、その効能は、動悸、息切れ、気付けである。近年、種々の医薬品の薬効再評価が進むなかで、我々は和漢薬の薬効薬理試験成績の充実を計りたいと考えており、今回、六神丸を取り上げた。六神丸およびセン

ソ含有製剤の強心作用についてはいくつかの報告があるが¹⁻³⁾循環器系に対する影響を広く検討する目標を掲げ、まず今回、反応が顕著にみられる静脈内投与後のラット血圧変化を調べるとともに、その血圧反応の解析を試みた。

*〒939-03 富山県射水郡小杉町中太閤山 17-1
17-1, Nakataikouyama, Kosugi-machi, Imizu-gun,
Toyama 930-03, Japan

材料と方法

1. 被験試料

(1) 六神丸の組成：実験に用いた六神丸およびその構成生薬は、広貫堂(株)より供与された。六神丸の通常成人1日量である4粒中の各構成生薬組成をTable Iに示す。

Table I Crude drug composition of Rokushingan preparation.

Crude drug	Contents in 4 grains (daily dose) of Rokushingan
Bufonis Venenum (センソ)	5.0 mg
Fel Ursi (ユウタン)	3.0 mg
Bezoar Bovis (ゴオウ)	2.0 mg
Ginseng Radix (ニンジン)	3.0 mg
Aquilariae Lignum (ジンコウ)	2.0 mg
Sheep testis extract (羊精巣エキス)	2.5 mg
Vehicle (賦形剤)	8.1 mg

The weight of one grain of Rokushingan is 6.4 mg.

(2) 六神丸懸濁液の調製：生理食塩液（以下「生食」と略）にカルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬、以下CMCと略）を溶解し、0.5% CMC生食液を調製した。この溶液に乳鉢で微粉碎した六神丸を1粒/mlの濃度で懸濁し、20秒間の超音波処理（日本精機製作所、US-150を使用）をして六神丸原液を調製した。この原液をさらに生食で5倍に希釈し、CMC濃度を0.1%とした。さらに希釈を行うときには、すべて0.1% CMC生食液を用い、CMC濃度を0.1%に統一した。六神丸懸濁液は用時調製するとともに、調製後2時間以内に実験に使用した。

2. 実験動物

Wistar系雄性ラット（体重：300～350 g）を三協ラボサービス(株)より購入し1週間以上予備飼育し

たのち試験に供した。

3. 血圧および心拍数の測定

ラットをウレタン（1.7 g/kg, sc, 和光純薬）により麻酔したのち、右頸静脈に薬物投与のためのカニューレを挿入し、左頸動脈圧を圧トランスジューサー（Gould Statham, P231D, Puerto Rico）および歪み圧力用アンプ（日本光電, AP-601G）を介して熱書き記録器（日本光電, WT-685G）上に描記した。また、心拍数は脈波より瞬時心拍計（日本光電, AT-601G）を介して測定し、血圧と同時記録した。

4. アドレナリンの定量

正確に秤量したセンソ（約10 mg）を蒸留水に懸濁し、10分間の超音波処理（ヤマト, Bransonic 321を使用）をしたのち全量50 mlとした。この懸濁液を遠心分離したのち、上清を0.5 μ のメンブレンフィルターで濾過し試料溶液とした。また、アドレナリンを蒸留水に溶解し標準溶液とした。標準溶液および試料溶液について、Table IIに示すHPLC条件でそれぞれのピーク面積を測定し、センソのアドレナリン含量を求めた。

5. 使用薬物

実験には上記の被験生薬のほかに以下に示す試薬を用いた。酒石酸水素L-アドレナリン（東京化成）、(L)-イソプロテレノール塩酸塩（シグマ）、(D, L)-プロプラノロール塩酸塩（シグマ）、メシル酸フェントラミン（チバガイギー、レギチン注射液）、重酒石酸L-ノルアドレナリン（和光純薬）、ブファリン（シグマ）、シノブファギン（シグマ）、レジブフォゲニン（和光純薬）、ヘパリンナトリウム（和光純薬）、EDTA・2Na（和光純薬）、塩化ナトリウム（和光純薬）、リン酸二水素ナトリウム（和光純薬）、リン酸（和光純薬）。

Table II HPLC condition for determination of adrenaline.

Column	AQ-312, ϕ 6×150mm (Yamamura Chemical Laboratories Co., Ltd.)
Eluent	Phosphate buffer, pH 3.0 0.1 M sodium dihydrogenphosphate 0.1 mM EDTA-2Na phosphoric acid (used for adjusting pH)
Flow rate	1 ml/min
Column temperature	40°C
Detection	FL (Ex 285 nm, Em 305 nm)
Sample volume	20 μ l

結 果

1. 六神丸の血圧および心拍数に対する影響

六神丸の静脈内投与による血圧および心拍数への影響を調べた。0.003粒/kg, 0.01粒/kg, 0.03粒/kgの投与により用量依存的な降圧反応が認められた。また, 0.1粒/kgおよび0.3粒/kgの投与により, 初期に一過性の昇圧反応, それに続く降圧反応が認められた。一方, 心拍数は0.003粒/kg~0.1粒/kgの投与により用量依存的な増加が認められた。さらに, 一部に死亡例もみられる0.3粒/kgでは昇圧反応の前に瞬間的な心臓停止が起こり, それにともなう血圧の急激な下降が認められた。これらの瞬間的な変化は迷走神経の切断により消失した。血圧反応の一例を Fig. 1 に示すとともに, 各用量の血圧および心拍数に対する影響を Table III

に6例の平均値で示す。

2. 六神丸を構成する各生薬の血圧に対する影響

顕著な血圧反応が認められる六神丸の0.1粒/kgと0.3粒/kgの両用量に対応するユウタン, ジンコウ, ニンジン, ゴオウ, 羊精巢エキスを六神丸と同様に静脈内投与したが, いずれの生薬も血圧および心拍数に対して影響を与えなかった。結果を Fig. 2 に示す。

これに対し, センソは六神丸と同様に低用量で用量依存的な降圧反応を示し, 六神丸の0.1粒/kgおよび0.3粒/kgに対応する用量においては, 昇圧とそれに続く降圧反応が認められ, 六神丸の血圧反応はセンソに由来することが明らかとなった。上述のセンソによる血圧変化を Fig. 3 に示す。

3. プフォステロイドの血圧反応

センソ中に約10%含有されている⁴⁾ プフォステロイドのうち含量が多いシノブファギン (約5%),

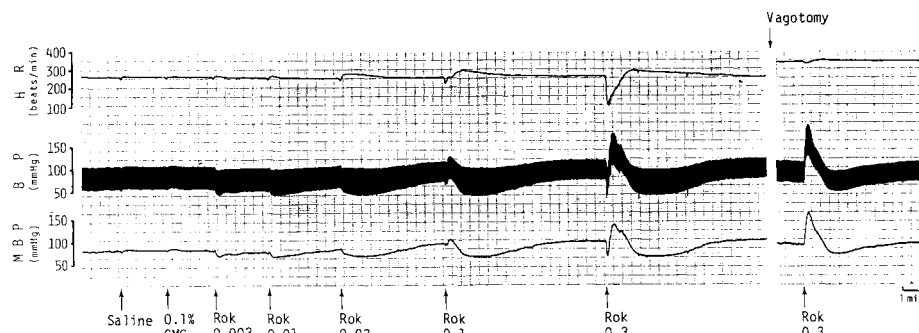


Fig. 1 Effects of Rokushingan (Rok) on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.

CMC, carboxymethyl cellulose sodium (vehicle); MBP, mean blood pressure. Dosage of Rokushingan is expressed as grains/kg.

Table III Effects of Rokushingan on blood pressure and heart rate in anesthetized rats.

Dose (grains/kg, i.v.)	No. of rats	Change of blood pressure (mmHg) ^{a)}		Change of heart rate (beats/min) ^{a)}	
		Hypotension	Hypertension ^{b)}	Increase	Transient fall ^{c)}
0.003	6	-7.3±1.9	—	+9.2±3.0	—
0.01	6	-11.5±1.6	—	+19.8±5.0	—
0.03	6	-16.8±0.7	+1.8±1.3	+36.3±9.8	-13.5±8.0
0.1	6	-21.0±2.9	+18.3±3.6	+52.0±10.0	-23.0±7.7
0.3	6	-27.5±2.1	+41.2±8.8	+54.8±15.1	-154.5±30.3

a) Each value is expressed as mean±S.E.

Blood pressure and heart rate obtained before administration of Rokushingan were 77.2±1.9 mmHg and 280±7 beats/min, respectively. (n=6, mean±S.E.)

b) Hypertension developed immediately after administration. This response was followed by hypotension.

c) Transient fall of heart rate developed immediately after administration. This response was followed by the increase of heart rate.

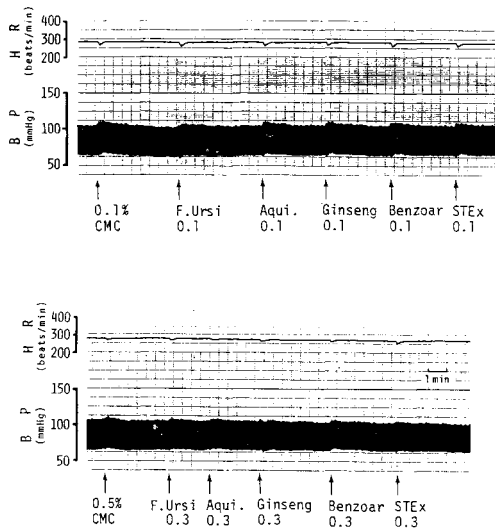


Fig. 2 Effects of individual crude drugs contained in Rokushingan on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.

CMC, carboxymethyl cellulose sodium (vehicle); F. Ursi, Fel Ursi; Aquil., Aquilariae; STEx, sheep testis extract. Dosages of crude drugs are expressed by the corresponding dosages of Rokushingan (grains/kg).

レジブフォゲニン (約5%) およびブファリン (約2%) についてその血圧反応を調べた。Fig. 4-6に示すように、ブファリン、シノブファギンおよびレジブフォゲニンは、100 $\mu\text{g/kg}$ または 300 $\mu\text{g/kg}$ で反応の程度に差があるものの持続的な昇圧反応および心拍数の増加が認められた。これらの反応はセンソの反応と異なるとともに、センソが著明な血圧反応を示す用量に含有されるブフォステロイドの量は計算上数 $\mu\text{g/kg}$ という血圧に全く影響がない量であることから、六神丸の血圧反応にブフォステロイドは関与していないものと考えられる。

4. 六神丸の血圧反応の解析

六神丸の降圧反応に β 交感神経刺激作用の関与について調べた。Fig. 7に示すように、六神丸の降圧反応は、 β 遮断剤であるプロプラノロールにより著明に抑制された。また、昇圧反応に α 交感神経刺激作用の関与についても調べた。Fig. 8に示すように、六神丸の昇圧反応は、 α 遮断剤のフェントラミンにより著明に抑制された。

これらのことから、六神丸の血圧反応に交感神経系の α および β 作用の関与が示唆されたので、アドレナリンの血圧反応について調べたところ、Fig. 9に示すように、低用量で降圧反応、高用量で昇圧ののち降圧反応を示し、六神丸の血圧変化と類似していた。

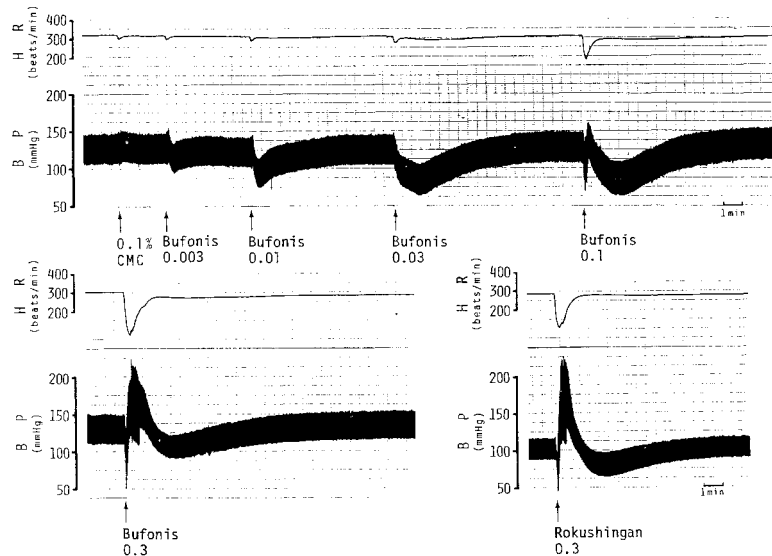


Fig. 3 Effects of Bufonis Venenum (Bufonis) and Rokushingan (Rok) on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.

CMC, carboxymethyl cellulose sodium (vehicle). Dosages of Bufonis are expressed by the corresponding dosages of Rokushingan (grains/kg). Dosage of Rokushingan is expressed by grains/kg.

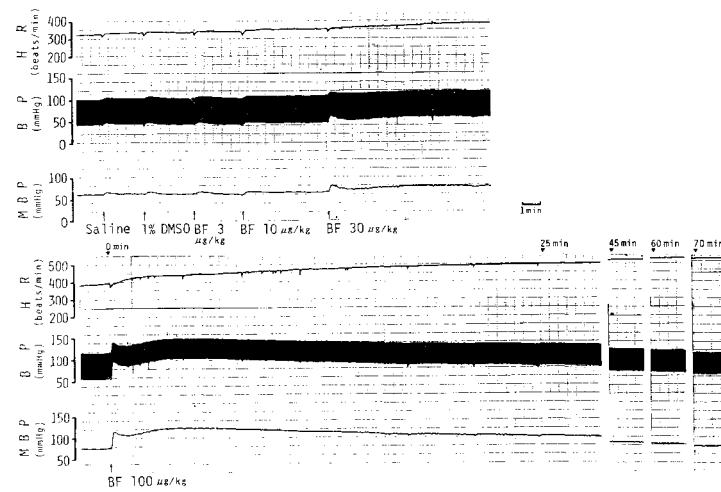


Fig. 4 Effects of bufalin (BF) on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.
DMSO, dimethyl sulfoxide ; MBP, mean blood pressure.

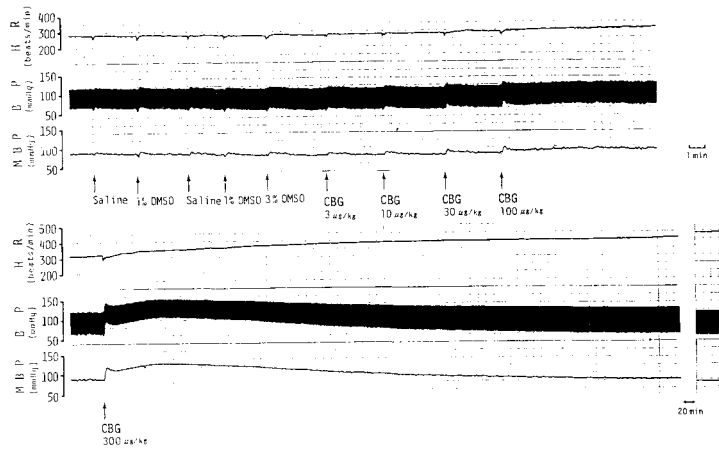


Fig. 5 Effects of cinobufagin (CBG) on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.
DMSO, dimethyl sulfoxide ; MBP, mean blood pressure.

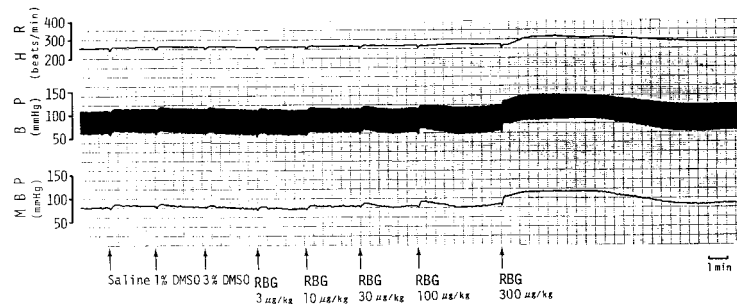


Fig. 6 Effects of resibufogenin (RBG) on blood pressure (BP) and heart rate (HR) in anesthetized rats.
DMSO, dimethyl sulfoxide ; MBP, mean blood pressure.

六神丸のラット血圧反応の解析

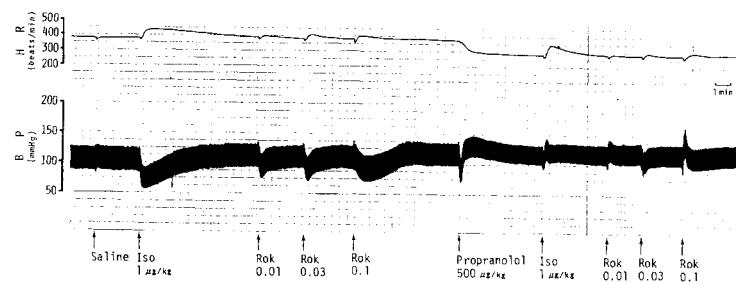


Fig. 7 Effects of propranolol on hypotension induced by Rokushingan (Rok) in anesthetized rats.
Iso, *l*-isoproterenol; BP, blood pressure; HR, heart rate. Dosage of Rokushingan is expressed as grains/kg. Rokushingan was suspended in saline.

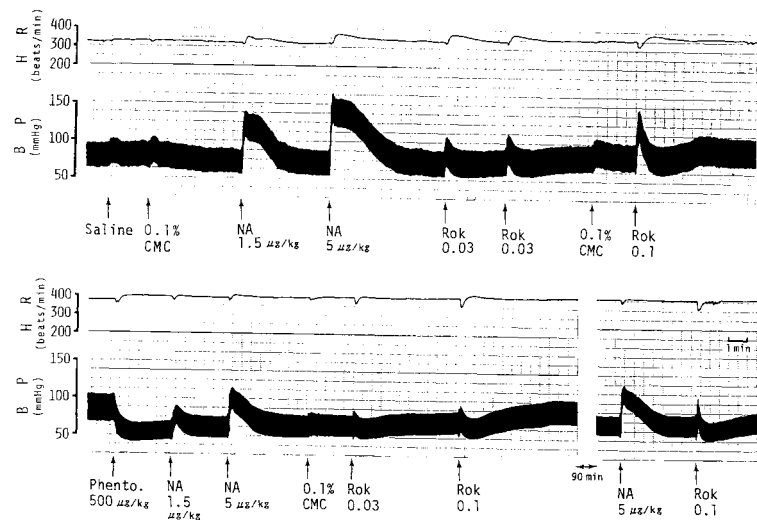


Fig. 8 Effects of phentolamine (Phento.) on hypertension induced by Rokushingan (Rok) in anesthetized rats.
CMC, carboxymethyl cellulose sodium (vehicle); NA, *l*-noradrenaline; BP, blood pressure; HR, heart rate. Dosage of Rokushingan is expressed as grains/kg.

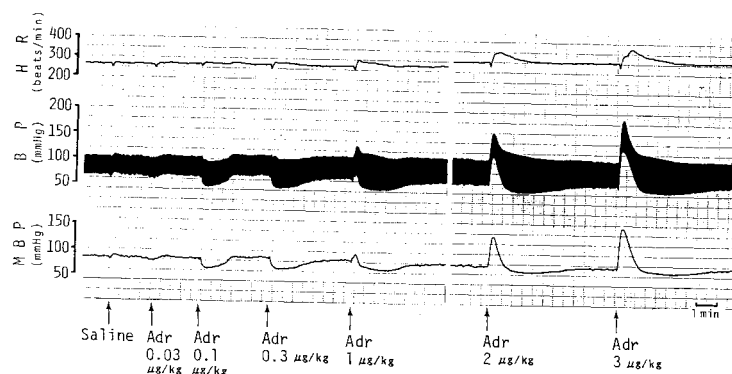


Fig. 9 Typical responses of blood pressure (BP) and heart rate (HR) after intravenous administration of adrenaline (Adr) in anesthetized rats.
MBP, mean blood pressure.

Table IV Effect of membrane filtration of Bufonis suspension on blood pressure and heart rate in anesthetized rats.

Treatment of Bufonis suspension ^{a)}	No. of animals	Blood pressure (mmHg) ^{b)}		Heart rate (beats/min)	
		before ^{c)}	after ^{d)}	before ^{c)}	after ^{d)}
No filtration	3	86±9	120±11	337±22	409±32
Filtration treatment	3	89±5	119±14	332±15	415±22

a) Bufonis was suspended in 0.1% CMC and administered at 0.125 mg/0.5 ml/kg.

b) Mean blood pressure.

c) Mean value±S.D. before intravenous administration of Bufonis.

d) Mean value±S.D. after intravenous administration of Bufonis.

Table V Contents of adrenaline and noradrenaline in Bufonis.

Crude drug	Catecholamine	Content ^{a)}	%
Bufonis	Adrenaline	15.2 µg/mg	1.52
	Noradrenaline	1.7 µg/mg	0.17

a) Contents of catecholamines were determined by HPLC method.

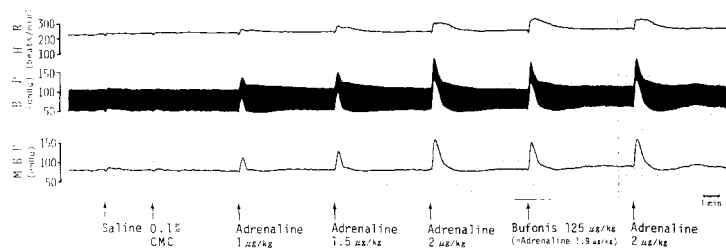


Fig. 10 Determination of adrenaline content in Bufonis by bioassay of blood pressure in anesthetized rats.

CMC, carboxymethyl cellulose sodium (vehicle); Adr, adrenaline; BP, blood pressure; MBP, mean blood pressure; HR, heart rate. The calculated content of adrenaline in 125 µg of Bufonis is 1.9 µg.

5. センソ中のアドレナリンの定量

HPLCによるセンソ中のアドレナリン含量の測定のため、センソの懸濁液をフィルター処理したが、その処理前後における血圧反応の差異について調べた。Table IVに示すようにフィルター処理後も血圧反応に差はなく、フィルター処理が血圧変化を惹起する成分の含量に対し影響がないことが確認されたので、フィルター処理したセンソ懸濁液についてアドレナリン含量をノルアドレナリン含量とともに調べた。Table Vに示すように、センソ1 mg中にアドレナリンが15.2 µg (1.52%)、ノルアドレナリンが1.7 µg (0.17%) 確認された。

6. 血圧反応を用いたセンソ中のアドレナリン量のバイオアッセイ

アドレナリンの昇圧反応を指標にして、センソ中

に含有されるアドレナリン量を調べた。Fig. 10に示すように、アドレナリンの1 µg/kg, 1.5 µg/kg および2 µg/kgを静注することにより、用量依存的な昇圧反応がみられるとともに、センソ125 µg/kgの投与によりアドレナリンの2 µg/kgの反応より若干小さい反応がみられた。センソ中にはアドレナリンが1.52%含まれていることをHPLCで確認してあり、センソ125 µgには計算上1.90 µgが含有されていることとなる。上記のバイオアッセイを3例行い平均値を求めたところ、Table VIに示すように、1.87±0.20 (SE) µgという値が得られ計算上の1.90 µgとかなり近い値となり、センソの血圧反応にアドレナリンが大きく関与していることが確かめられた。

Table VI Determination of adrenaline content in Bufonis by using blood pressure response in anesthetized rats.

Item	Value
Composition of Bufonis in 0.1 grain of Rokushingan preparation	125 μ g
Percent of adrenaline content in Bufonis from determination by HPLC	1.52%
Calculated content of adrenaline in 125 μ g of Bufonis	1.90 μ g
Content of adrenaline in 125 μ g of Bufonis obtained from determination by blood pressure response	1.87 $\pm$ 0.20 μ g ^{a)}

a) Mean value $\pm$ S.E. (n=3).

考 察

生薬強心剤として知られる六神丸の循環器系に対する作用を検討するにあたり、今回、ラットの血圧に対する影響を調べ、その作用機序も併せて検討した。

今回実験に用いた六神丸の構成生薬はセンソ、ユウタン、ゴオウ、ジンコウ、ニンジン、そしてワシントン条約により近い将来輸入が難しくなるジャコウの代替品として有望視されている⁵⁾ 羊精巢エキスである。このうちセンソについては循環器系に対する作用、特に強心作用についていくつかの報告がある^{6,7)}。センソの強心作用は、ガマ毒すなわちブフォステロイドによるといわれている^{8,9)}。今回の実験で六神丸のラット血圧反応の惹起物質は、センソに含まれるアドレナリンであることが明らかとなり、強心作用を示す物質の1つとして十分考慮しなければならないと思われる。著者らは前報¹⁰⁾において、マグヌス管に懸垂したモルモット心房筋標本に六神丸を適用したところ、六神丸の0.001粒/mlの濃度で顕著な陽性変力作用および陽性変時作用がみられたと報告したが、この作用がブフォステロイドに起因するものか、またはアドレナリンによるものかについては今後詳細な検討を要すると考えられる。ただし、ブフォステロイドの強心作用については山原ら⁹⁾が検討しており、それによれば、強心作用が認められる最少有効濃度は 10^{-8} ~ 10^{-7} Mの濃度であり、センソには通常約10%程度ブフォステロイドが含まれる⁴⁾ことから考えると、著者らの得たモルモットでの六神丸の強心作用にはアドレナリンとブフォステロイドの双方が関与しているものと推測される。また、センソについての一般薬理試験結果が最近森下ら¹¹⁾により報告されたが、そのなかにもアドレナリン様作用を示す物質が含有されていると述べられている。著者らも、*in vitro*での薬理試験に

おいては、常にアドレナリンの薬理活性を念頭において実験を進めているところである。

一方、センソ以外の生薬に関しては、今回の実験結果に示されるように、六神丸に含まれる程度の量では循環器系にほとんど影響しないものと考えられるが、今回の実験では、ジャコウのかわりに羊精巢エキスをを用いているので、その点について若干考察を加える。ジャコウには、抗炎症作用¹²⁾、心収縮亢進作用⁶⁾、カテコラミン増強作用¹³⁾などがあると報告されている。しかし、これらの作用はいずれも比較的高用量で認められるものであり、六神丸に含まれる量ではほとんど影響はないと思われる。さらに、佐藤ら⁷⁾はジャコウについて、豊口ら¹⁴⁾はジャコウの成分のムスコンについて麻酔ラット、麻酔開胸犬、モルモット Langendorff 標本および心房筋標本を用いて循環器系に対する影響を調べたが、顕著な作用は認められなかったと報告している。さらに松原らは¹⁰⁾羊精巢エキスを含まない新六神丸製剤と従来のジャコウを含む旧六神丸製剤の血圧反応にほとんど差異が認められないことを報告しており、今回の血圧反応の解析に新製剤を用いてもほとんど問題はないと考えられる。

以上述べたように、今回麻酔ラットを用いての六神丸の血圧に対する影響については、その構成生薬中のセンソに含まれるアドレナリンが大きく関与していることが明らかとなったが、六神丸は本来経口投与されるものであることから、アドレナリンがどの程度血中にはいり生理活性を示し薬効とどのように関連するかという点に関しては、今後検討していきたいと考えている。

謝 辞

本実験を実施するにあたり、被験薬の六神丸およびその構成生薬を提供していただいた広貫堂(株)の久保喜一氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 中島光好, 大口貞雄, 橋本久邦, 小黑捷義, 滝口祥令: MAPIN T5 の臨床第一相試験 (第2報) - 一週間連続服薬試験, 臨床薬理 **13**, 539-546, 1982.
- 2) 御手洗玄洋, 森 滋夫, 高林 彰, 榊原 学, 高木貞治: 実験的高々所環境下の人々の心拍出量変化に対するセンソ含有製剤の効果, 臨床薬理 **13**, 515-527, 1982.
- 3) 重井達朗, 石川直久, 滝 和美, 北条泰男, 萩野泰道: センソおよびセンソ含有製剤の水溶性浸出液ならびにシノブファジンのイヌ心臓標本に対する作用について, 応用薬理 **15**, 437-445, 1978.
- 4) 横田洋一: HPLC 法による六神丸のプロステロイドの定量法について, 富山県薬事研究所報一昭和58・59年度合併号, 41-46, 1986.
- 5) Kubo, K., Matsuda, H. and Ogita, Z.: Developmental research on moschus-analogue crude drugs, *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **3**, 1-9, 1986.
- 6) 木村正康, 長田永三郎, 脇 功巳: 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究 (第7報) 民間薬方剤“六神丸”構成生薬の心臓機能における複合作用について, 薬誌 **88**, 125-129, 1968.
- 7) 佐藤 博, 大鳥居健, 豊口義夫, 菅原和信: 蟾酥, 麝香および牛黄の循環系に対する作用, 応用薬理 **33**, 817-824, 1987.
- 8) 森下信一, 斉藤 隆, 三島泰宏, 水谷 睦, 平井康晴, 川上万里: Cinobufagin の一般薬理作用, 日薬理誌 **86**, 269-292, 1985.
- 9) 山原條二, 田中慎二, 松田久司, 澤田徳之助, 藤村一: センソ強心ステロイドの灌流心臓に対する強心作用特性と実験的虚血性心不全に対する Cinobufagin の作用, 日薬理誌 **88**, 413-423, 1986.
- 10) 松原利行, 三村泰彦, 足立博一, 堀越 勇: 新・旧六神丸のラット血圧およびモルモット摘出心房筋に対する影響の比較, 応用薬理 **34**, 17-22, 1987.
- 11) 森下信一, 斉藤 隆, 三島泰宏, 水谷 睦, 平井康晴, 川上万里: センソ含有製剤 KY-1, KY-2 の一般薬理作用, 日薬理誌 **87**, 361-378, 1986.
- 12) 木村正康, 長田永三郎, 松井竹史, 小林千代子: 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究 (第9報) 民間薬方剤“六神丸”構成生薬の抗炎症効果における複合作用について, 薬誌 **88**, 135-139, 1968.
- 13) 木村正康, 脇 功巳, 池田浩子: 和漢薬作用に関する薬学的基礎研究 (第8報) 漢薬麝香の Catecholamine 増強作用について, 薬誌 **88**, 130-134, 1968.
- 14) 豊口義夫, 佐藤 博, 大鳥居健, 菅原和信: 循環動態に及ぼす Muscone の薬理作用, 応用薬理 **33**, 701-706, 1987.