

当帰芍薬散の安胎効果に関する基礎的研究

野田 洋一*, 井田 憲司, 成木 勝彦, 岸 淳二, 都倉 隆, 後藤 康夫,
野々垣多加史, 夏山 知, 塩谷 雅英, 森 崇英

京都大学医学部婦人科学産科学教室

Nursing effect of Toki-shakuyaku-san on mouse embryo

Yoichi NODA*, Kenji IDA, Katsuhiko NARIMOTO, Junji KISHI, Takashi TOKURA, Yasuo GOTO,
Takashi NONOGAKI, Satoshi NATSUYAMA, Masahide SHIOTANI and Takahide MORI

Obstetrics and Gynecology Department, Kyoto University School of Medicine

(Received May 17, 1990. Accepted August 1, 1990.)

Abstract

Dissolved Toki-shakuyaku-san (2.5-3.5 g/day) was orally administered to 3 week old ICR female mice for 14 days before mating. The first groups of mice were laparotomied on the day following mating (Day 1) and oocytes were collected by the tubal flushing method. Second groups of mice were laparotomied on the 12th day and the uterus was opened to count the number of implanted sites and developing embryo. The number of average ovulated ova and the fertilized ova in the experimental group (28 mice) was 13.3 and 12.6 per mouse, respectively, and 13.3 and 12.5 per mouse in the control group (32 mice). The number of implanted sites and developing embryos in the experimental group (27 mice) was 12.4 and 12.2 per mouse, respectively, and 12.3 and 11.9 per mouse in the control group (34 mice). The fertilization rate and the abortion rate of the experimental group (95.2%, 1.8%) were better in quality than the control group (93.9%, 3.1%). Although the nursing effect of Toki-shakuyaku-san on mouse embryo was not confirmed statistically in this experiment, the result reconfirmed the high quality pregnancy of experimental mice in that 93-95% of ovulated ova fertilized, 98.4% of fertilized ova implanted, and in all, 89.7% of ovulated ova were delivered.

Key words Toki-shakuyaku-san (Tôki-syakuyaku-san), nursing effect, ICR mouse, embryo, fertilization rate, implantation rate, abortion rate.

Abbreviations PBS, phosphate buffer saline; BSA, bovine serum albumin; BWB, Bigger Whitten Whittingham; Toki-shakuyaku-san (Dang-Gui-Shao-Yao-San), 当帰芍薬散.

緒 言

ヒトを含む哺乳類では排卵された卵はたとえ *in vivo* の環境内であっても、必ずしも全て産仔となるわけではなく、受精、着床および子宮内での発育のそれぞれの過程で失われてゆく卵或は胚が存在すること¹⁾が知られている。ヒトでは成立した全ての妊娠の内およそ15%が流産に終ることが知られてお

り、²⁾これが *in vitro* の環境を利用した体外受精法等による妊娠の場合は、もっと高率 (25~40%) に流産の生ずることが知られている。³⁻⁵⁾ 流産の生ずる原因については染色体異常^{6,7)} など、種々の要因が知られているものの原因不明のものも少なくない。そこで本研究では妊娠現象全体の効率を高くすることができかどうかという観点から、すでにラットにおける安胎効果の報告がみられる⁸⁻¹⁰⁾ 当帰芍薬散がマウス妊娠現象の内どのように安胎効果を発現す

*〒606 京都市左京区聖護院川原町54
54 Shogoin Kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606,
Japan

るかの検討を行った。

材料と方法

(1) **実験動物**：ICR 系マウス（雌，3 週齢）を 24℃，8 時～20 時の照明で飼育した。実験群は 14 日間以上当帰芍薬散エキス原末の可溶性成分を含む飲料水にて飼育したのち雄と同居せしめた。このように自然排卵周期で雄と交配せしめ，翌朝腔栓の認められた雌を Day 1，および Day 12 に開腹し，排卵卵数，受精卵数，着床胚数および流産胚数の算定を行った。なお雄マウスは同系成熟個体を用い，実験群，対照群共になんらの処置を行わず，水道水を与えた基本飼育条件で飼育した。交配時には随時雄個体を両群の間に配分し，雄の性能による成績の偏りを防止した。

(2) **当帰芍薬散可溶性成分の調製と投与方法**：当帰芍薬散エキス（株式会社ツムラ）50 g を水道水 2 l に溶解した。まず，37℃～40℃にて約 2 時間保温し十分に振とうして可及的に溶解せしめたのち不溶性沈澱を除去した（4500 rpm×20 min）。上清を回収したのちコーヒーフィルターを通した液を給水瓶に入れ，飲料水として投与した（実験群）。給水瓶は毎日取り替え新しい飲料水を与えた。対照群としては無処置の水道水のみを与えた。なお，雌マウス 20 匹を用いた飲水量の予備実験では，1 匹 1 日平均

4.25 ml の水を摂取しており，1 匹 1 日あたり約 100 mg の当帰芍薬散エキス原末由来の可溶画分を摂取したことが推定された。

(3) **安胎効果の判定法と操作**：Day 1 および Day 12 に開腹し子宮および卵管を切除回収した。Day 1 の午後 2 時に回収した卵管を Dulbecco's PBS (phosphate buffer saline) にて灌流し回収された卵のすべてを実体顕微鏡で観察記録した。算定項目は排卵卵数，受精卵数（前核期）および変性卵数である。回収された卵を形態学的に判定し，変性の明らかなもの，前核の認められないものおよび翌 H 2 細胞期に達しないものは，いずれも未受精卵として分類した。回収時前核の明らかに認められたものあるいは翌 H 2 細胞期に達していたものは，いずれも受精卵と判定した。なお，Dulbecco's PBS で回収した卵はすべて 0.3 % BSA 加 BWB (Bigger Whitten Whittingham)¹¹⁾ 中 37℃，5 % CO₂ in air で培養を続けた。Day 12 に回収した子宮は生存胎仔数を計数し，同時に着床率をも算定し着床後の流産胚数を計数した。これら 2 つを合計して着床胚数とした。

結 果

実験群および対照群とも飼育状態は良好と考えられ特に当帰芍薬散によると思われる食欲不振，興奮

Table I Fertilizing rate of ICR mice.

	Experimental group	Control group
No. of mice used	28	32
No. of ova ovulated	372 (13.3) ^a	427 (13.3) ^a
No. of ova fertilized	354 (12.6) ^a	401 (12.5) ^a
Fertilization rate	95.2 %	93.9 %

a : Average ova per mouse

Table II Implantation rate and abortion rate of ICR mice.

	Experimental group	Control group
No. of mice used	27	34
No. of embryo implanted	336 (12.4) ^a	419 (12.3) ^a
No. of developing embryo	330 (12.2) ^a	406 (11.9) ^a
Rate of developing embryo	98.2 %	96.9 %
No. of embryo aborted	6 (0.22) ^a	13 (0.38) ^a
Abortion rate	1.8 %	3.1 %

a : Average embryo per mouse.

状態など病的状態は認められなかった。対照群32匹の雌を用いて算定した結果、排卵卵数は平均13.3個で受精卵数は平均12.5個であり受精率は93.9%であった。一方28匹を用いて行った実験群では平均13.3個の排卵をみ、受精卵数は平均12.6個で受精率は95.2%であった (Table I)。また対照群における平均着床胚数は12.3個で平均生存胎仔数は11.9個、平均生存胎仔率は96.9%であった。一方、実験群では平均着床胚数は12.4個、平均生存胎仔数は12.2個で生存胎仔率は98.2%と対照群より高い値を示し、安胎効果の発現をうかがわせる傾向があった。しかし対照群に比して χ^2 検定による統計的有意差は認められなかった (Table II)。

考 察

当帰芍薬散はラットを用いた生物効果の解析がすでに詳細に行われており、投与群において妊娠経過、分娩、哺育状態等に異常が認められないこと⁸⁾、さらに高血圧合併妊娠ラットに投与した場合は母親の血液の粘性が低下し子宮一胎盤系の循環動態が改善されたとの報告もある⁹⁾。さらに妊娠ラットの子宮収縮が抑制され、心拍減少効果があることや¹⁰⁾、子宮内胎仔の発育を促進し SFD の予防に有効であるとの報告もある¹²⁾。本研究ではマウス自然排卵周期における排卵卵数、受精率、着床率、生存胎仔率等のパラメーターでその効果を解析したが、胎仔生存率が実験群においてやや高い値を示したにとどまった。本研究では薬剤の投与方法としてまず最初に水道水に薬剤を溶解し、胃内へ強制投与する方法を試みたが、適切な投与量の設定が難しく動物の健康状態が悪化し、活動性の低下や毛並の劣下などがみられたため、可溶画分の自由摂取方式をとることとした。この為十分な薬剤の投与量が与えられていなかった可能性がある。これは今後の課題として残されている。

つぎに本研究においてはからずとも明らかにされたことは、実験動物マウスのきわめて高い妊娠効率である。Table I および Table II の結果からは排卵卵子の93~95%が受精し、受精卵の98.4%が着床し、排卵卵子の89.7%が出生し、受精卵の95.3%が出生することになる。この驚くべき効率の良さを確認する一方、我々が設定しているヒト体外受精をはじめ哺乳類等における低い胚培養効率¹³⁾を考えると、培養液組成、pH、気相条件、温度等 *in vitro* 胚培養条件の設定が充分になされていないと考えざるを得ない。今後当帰芍薬散の持つ安胎効果の本質に

ついて更に検討を加えてゆきたいと考えている。

謝 辞

稿を終えるに当り本研究を助成していただいた株式会社ツムラに深く謝意を表します。また本研究における動物実験遂行のため努力していただいた下野奈美嬢に感謝を捧げます。

文 献

- 1) Hertig, A.T., Rock, J., Adams, E.C. and Menkin, M. C. : 34 Fertilized ova, good, bad and indifferent, recovered from 210 women of known fertility. *Pediatrics* **23**, 202, 1959.
- 2) Warburton, D. and Fraser, F.C. : Spontaneous abortion risks in man : Data from Reproductive Histories Collected in a Medical Genetics Unit. *Am. J. Hum. Genet.* **16**, 1, 1964.
- 3) Fishel, S.B., Edwards, R.G., Purdy, J.M., Steptoe, P.C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J., Fehilly, C., Hewitt, J. and Rowland, G. : Implantation, abortion and birth after in vitro fertilization using the natural menstrual cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotrophin. *J. In Vitro Fert. Embryo Trans.* **2**, 123, 1985.
- 4) Jansen, R.P.S. : Spontaneous abortion incidence in the treatment of infertility : Addendum on in vitro fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **138**, 738, 1982.
- 5) Staessen, C., Camus, M., Khan, I., Smits, J., Van Waesberghe, L., Wisanto, A., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. : An 18-month survey of infertility treatment by in vitro fertilization, Gamete and Zygote intrafallopian transfer, and replacement of frozen thawed embryo. *J. In Vitro Fert. Embryo Trans.* **6**, 22, 1989.
- 6) Boue, J., Boue, A. and Lazar, P. : Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* **12**, 11, 1975.
- 7) Hook, E.B. : Prevalence of chromosome abnormalities during human gestation and implications for studies of environmental mutagens. *Lancet* **II**, 169, 1981.
- 8) 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, 1982.
- 9) 貝原 学, 丸本百合子 : 高血圧合併妊娠ラットの胎仔発育に及ぼす当帰芍薬散の影響. 日産婦誌 **38**, 2026, 1986.
- 10) 千村哲朗 : 当帰芍薬散のラット妊娠子宮収縮および β_2 刺激剤誘導頻脈に対する影響の基礎的研究. 産婦世界 **40**, 743, 1988.
- 11) Bigger, J.D., Whitten, W.K., Whittingham, D.G. : The culture of mouse embryos in vitro. In "Methods in mammalian embryology (Ed. by Daniel, J.C. Jr.), Free-

- man Co., San Francisco, p. 86, 1971.
- 12) 渡辺賢一, 柴田 昭, 丸山晋司 : SFDと当帰芍薬散. 産婦人科漢方研究のあゆみ **6**, 73, 1989.
 - 13) Claman, P., Armant, D.R., Seibel, M.M., Wang, T., Oskowitz, S.P. and Taymor, M.L. : The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies. *J. In Vitro Fert. Embryo Trans.* **4**, 218, 1987.