

地黄の研究（第4報） 熟地黄50%エタノール抽出エキスの血行動態に及ぼす影響（その2）

久保 道徳,^{a,c)} 月岡 康行,^{b)} 森山 健三,^{b,c)} 新谷 卓弘,^{c)}
塩本 秀己,^{d)} 浅野 年紀,^{d)} 松田 秀秋^{a)}

^{a)}近畿大学薬学部薬用資源学研究室, ^{b)}近畿大学医学部附属病院薬剤部, ^{c)}近畿大学東洋医学研究所,
^{d)}大正製薬株式会社セルフメディケーション開発研究所

Studies on Rehmanniae Radix IV. Effects of 50% ethanolic extract from steamed Rehmanniae Radix on hemodynamics (Part 2)

Michinori KUBO,^{a,c)} Yasuyuki TSUKIOKA,^{b)} Kenzo MORIYAMA,^{b,c)} Takahiro SHINTANI,^{c)}
Hidemi SHIOMOTO,^{d)} Toshiki ASANO,^{d)} and Hideaki MATSUDA^{a)}

^{a)} Natural Drug Resources, School of Pharmaceutical Sciences, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka, Osaka, 577-8502, Japan.

^{b)} Department of Pharmacy, Kinki University Hospital, 377-2, Onohigashi, Osakasayama, Osaka, 589-8511, Japan.

^{c)} The Institute of Oriental Medicine, Kinki University, 377-2, Onohigashi, Osakasayama, Osaka, 589-8511, Japan.

^{d)} Self Medication Laboratories, Taisho Pharmaceutical Co. Ltd., 1-403 Yoshino, Kita-ku, Saitama, 331-9530, Japan.

(Received August 26, 2003. Accepted October 20, 2003.)

Abstract

The effects of 50% ethanolic extract (JR-ext) prepared from Steamed Rehmanniae Radix (the steamed root of *Rehmannia glutinosa* LIBOSH, "Juku-Jio" in Japanese) on hemodynamics were investigated in rats. JR-ext activated pyruvate kinase activity, rate-limiting enzyme in erythrocyte glycolytic pathway that closely relates to erythrocyte ATP content and its rheological properties, and increased the ratio of young erythrocytes in whole blood. JR-ext increased erythrocyte count, and locomotor activity after forced running (3 m/min × 8 hr), in iron-deficient anemic rats. Also, JR-ext had an inhibitory effect on decrease of hypodermic temperature in back of rats under 4°C, and promotional effect on recovery of hypodermic temperature after water-immersion.

These results suggest that JR-ext enhanced the erythrocyte properties in quantity and quality, would promote the exchanges of oxygen and carbon dioxide in peripheral tissue, and consequently activate vital life activity.

Key words *Rehmannia glutinosa*, hemodynamic, erythrocyte aging, anemia, hypodermic temperature, locomotor activity.

Abbreviations JR-ext, 50% ethanolic extracts prepared from steamed Rehmanniae Radix; ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; NAD, nicotinamide adenine dinucleotide; PK, pyruvate kinase; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; EGTA, ethyglycol bis(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid; BSA, bovine serum albumin.

緒 言

地黄は修治の違いにより、生地黄（生の根を地中空間に

貯えたもの）、乾地黄（根を陽乾したもの）、熟地黄（酒に浸し蒸して乾燥したもの）と称される。生地黄はおもに生理不順、緒出血性疾患などの駆瘀血薬として、乾地黄は外傷性の炎症、うっ血、虚血などの血行障害の改善

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: kubo@phar.kindai.ac.jp

薬として用いられてきた。熟地黄は補虚養血薬として虚勞、老化現象の改善を目的に用いられてきた。

著者ら¹⁻³⁾はその修治と薬能の關係に着目し、末梢循環に及ぼす影響を指標に地黄の薬能解明を試み、生地黄が動脈系の血行障害を、熟地黄が静脈系および微小循環系の血行障害を改善することを明らかにしてきた。さらに、熟地黄に赤血球変形能亢進、赤血球内 ATP 含量増加、赤血球凝集抑制および線溶系活性化作用を明らかにし、熟地黄の補虚養血作用の一部はこれら血液レオロジー学的な薬理作用を介した末梢循環障害改善作用が担っていると推察してきた。

“補虚養血”とは漢方医学特有の用語であるが、薬理学的には血行動態の改善や造血系機能の活性化などによって、末梢組織への酸素や栄養素の供給、末梢組織からの二酸化炭素や老廃物の除去およびホルモンの運搬などが促され、組織が活性化することと考えられる。

そこで、今回、熟地黄の“補虚養血”効果を血行動態、皮下温、自発行動量を指標に検討した。

材料と方法

1. 実験材料と被検体の調製

中国・北京市郊外で栽培収穫されたカイケイジオウ *Rehmannia glutinosa* の生の肥大根（最大部直径 5 cm 以上）を乾燥させたものを乾地黄として実験材料に用いた。さらに、乾地黄を水で軟化させた後、その重量の約半量に相当する黄酒と称される中国酒に 2 時間漬けた後、ほぼ密閉された容器で 20 時間蒸して調製した熟地黄を実験材料に用いた。それらをそれぞれ細切後、10 倍量の 50 % ethanol で約 80℃、2 時間 2 回加熱抽出し、ろ過後、減圧下で ethanol を留去、凍結乾燥した乾地黄および熟地黄の 50 % エタノール抽出エキス（それぞれの収率は 22.0、60.1 % で、以下、KR-ext、JR-ext と略記）を得、被検体に供した。

試薬には α -cellulose, microcrystalline cellulose, pentoxifylline (Sigma), ADP, leupeptin hemisulfate (ICN), lactate dehydrogenase, NADH (オリエンタル酵母工業(株)), pepstatin, phenylmethylsulfonyl fluoride, phosphoenolpyruvate (和光純薬工業(株)), percoll (ファルマシア)を用いた。

2. 実験動物

実験動物には Crj:Wistar 系雄性ラット（3 週齢あるいは 8 週齢：日本チャールスリバー(株)）を用いた。飼育環境は恒温恒湿、明暗サイクル 12 時間の実験動物飼育室で、市販の固形試料（MF、オリエンタル酵母）および水を自由に摂取させ、1 週間予備飼育後、健常動物を実験に

供した。

3. 赤血球内 Pyruvate Kinase (PK) 酵素活性

Salvo ら⁴⁾の方法に準じて赤血球浮遊液を調製し、赤血球内 PK 酵素活性を測定した。8 週齢の Wistar 系雄性ラットに被検体を 1 日 1 回 7 日間連日経口投与し、最終投与 1 時間後に pentobarbital 麻酔下で後大静脈から採血した。採取した血液に 1/10 量の 1.0 % EDTA・2K 生理食塩液溶液を添加後、700×g、10 分間遠心分離した。血漿および buffy coat を除いた血球画分をヘマトクリット値 50 % に調整後、 α -cellulose および microcrystalline cellulose (1:1) を HEPES 生理緩衝液 (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.4) に懸濁して調製したカラム（約 4 ml）にその血球画分 1 ml を通し、白血球および血小板を完全に除去した。赤血球を含むカラム流出液は 1000×g、5 分間遠心分離後、HEPES 生理緩衝液にて 2 回洗浄した後、洗浄赤血球浮遊液 1 ml に調整した。その洗浄赤血球浮遊液は 9 倍量の EGTA 緩衝液 [137 mM NaCl, 4.6 mM KCl, 1.1 mM KH₂PO₄, 0.6 mM MgSO₄, 1.1 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.4, 緩衝液 1 ml 中 leupeptin 0.5 μ g, pepstatin 0.7 μ g, phenylmethyl-sulfonyl fluoride 40 μ g 含有] に分散後、acetone-dryice にて凍結融解を 2 回繰り返して、溶血せしめた。得られた溶血液を 4℃、5,000×g にて 10 分間遠心分離し、その上清部を酵素活性測定用試料とした。PK 酵素活性測定⁵⁾は酵素反応液 [酵素活性測定用試料 0.1 ml を 1.0 unit/ml lactate dehydrogenase, 0.1 mM NADH, 2.0 mM ADP, 4.0 mM MgCl₂, 75.0 mM KCl を含有する 10 mM HEPES-HCl 緩衝液 (pH 7.8) に添加した溶液] 2.9 ml を 25℃ にて 10 分間保温した後、3.0 mM phosphoenolpyruvate 0.1 ml を添加して反応を開始した。反応開始前および反応 3 分後における 340 nm の吸光度を測定し、その吸光度の減少量と NADH のモル吸光係数より PK 酵素活性 (U/g Hb) を算出した。なお、ヘモグロビン量はヘモグロビン-テストワコー（シアンメトヘモグロビン法、和光純薬工業(株)）にて測定した。

4. 赤血球の細胞齢

Salvo ら⁴⁾の方法に準じて密度勾配によって赤血球を分離、測定することにより、細胞加齢の変化を観察した。上述に示した方法にて得られた洗浄赤血球浮遊液 1.0 ml をあらかじめ調製した不連続 Percoll 密度勾配（下記に示す BSA-HEPES 緩衝液と BSA-Percoll-HEPES 緩衝液を混合・調製した Percoll 濃度 63, 66, 69 および 72 % の溶液をペリスターポンプにより 4 ml ずつ重層したもの）に付し、1,000×g で 10 分間遠心分離した。密度勾配に従って赤血球は 3 層に分かれるが、上層と中間層部（若赤血球画分）と下層部（老赤血球画分）を分取し、それぞれ

を $700 \times g$ で 5 分間遠心分離し、2 回洗浄後、液量を 1.0 ml に調整し、赤血球数を測定した (Technicon H-1E; 株式会社日立製作所製)。なお、Percoll の濃度は BSA-HEPES 緩衝液 (HEPES 緩衝保存液 (2.66 M NaCl, 0.09 M KCl, 0.2 M HEPES, pH 7.4) 1 容に BSA 溶液 19 容を混合し、最終 BSA 濃度 3.5% の溶液 (pH 7.4, π 265 mOsm/kg H_2O)) と BSA-Percoll-HEPES 緩衝液 (HEPES 緩衝保存液 1 容に BSA/Percoll 溶液 19 容を混合し、最終 BSA 濃度 3.5% の溶液 (pH 7.4, π 330 mOsm/kg H_2O)) を混合することにより調整した。また、その密度勾配を Density Marker Beads Kit (ファルマシア株式会社) にて測定したところ、実用範囲は 1.08~1.12 であった。

5. 貧血モデル

a) 瀉血性貧血: Ether 麻酔下で 8 週齢の Wistar 系雄性ラットの頸静脈から 1 日 1 回 3 日間、血液を 1.0 ml ずつ採取し、瀉血ラットとした。被検体は瀉血初日から 1 日 1 回 14 日間連日経口投与した。投与開始 7 および 14 日目に ether 麻酔下で頸静脈から 0.3 ml の血液を採取し、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量を測定した (Technicon H-1E)。

b) 鉄欠乏性貧血: 3 週齢の Wistar 系雄性ラットを Table I-a および I-b に示した鉄欠乏性飼料 (オリエンタル酵母株式会社製) で 3 週間飼育した。被検体は鉄欠乏食摂取開始日から 1 日 1 回連日経口投与した。投与開始 21 日目に ether 麻酔下でラットの頸静脈から採血し、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量を測定した。

6. 貧血動物の行動量

5. b) の採血 3 日後、強制歩行装置 (長沢理科学機器製) を用いて、ラットを 3.0 m/min の速度で 8 時間強制歩行 (10:00~18:00) させた。歩行終了 1 時間後から 12 時間の自発行動量 (スーパーメックス; 室町機械株式会社製) を測定した。

7. 低温暴露ラットの皮下温、血糖値、中性脂肪量、遊離脂肪酸量および肝グリコーゲン量

a) 低温暴露ラットの皮下温: 8 週齢の Wistar 系雄性ラットの背部皮下に ether 麻酔下で体温測定用チップ (IPTT, 動物埋め込み用マイクロチップ, BMDS 製) を埋め込み、その 3 日後、チップ温度を ELAMS システム (DAS-5004, BMDS 製) にて測定し、その温度を皮下温として群構成した。被検体を 1 回あるいは 7 日間連日経口投与したラットを、最終投与 30 分後、温度 $4 \pm 1^\circ C$ 、湿度 $45 \pm 3\%$ の環境下に、個別に放置し、皮下温の経時的変化を低温暴露 8 時間後まで測定した。

b) 低温暴露ラットの血糖値、中性脂肪量、遊離脂肪酸量および肝グリコーゲン量: 低温暴露による血糖値、中性脂肪量、遊離脂肪酸量および肝グリコーゲン量の推移

Table I-a Composition of diet.

Component	Amount (%)	
	Normal	Iron deficient diet
α -Corn starch ¹	42.57	42.57
Sucrose ¹	21.28	21.28
Casein ¹	20.0	20.0
Corn oil ²	5.0	5.0
Vitamin mix. ³	1.0	1.0
Mineral mix. ³	5.0	-
Mineral mix.(-Fe) ³	-	5.0
Cellulose ¹	5.0	5.0
Choline-Cl ⁴	0.15	0.15
Total	100	100

1: Purchased from Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan.

2: Purchased from Honen Co., Tokyo, Japan.

3: Vitamin (AIN-93), mineral (AIN-93) and mineral (-Fe) (AIN-93) mixtures were purchased from Nihon Nosan K.K., Yokohama, Japan.

4: Purchased from Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan.

Table I-b Composition of the Mineral Mix. and Mineral Mix.(-Fe) used for the normal or iron deficient diets.

Component	Amount (mg/1000000mg)	
	Normal	Iron deficient diet
CaCO ₃	357000	357000
KH ₂ PO ₄	196000	196000
K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · H ₂ O	70780	70780
NaCl	74000	74000
K ₂ SO ₄	46600	46600
MgO	24000	24000
FeC ₆ H ₅ O ₇ · nH ₂ O	6060	-
ZnCO ₃	1650	1650
MnCO ₃	630	630
CuCO ₃ · Cu(OH) ₂ · H ₂ O	300	300
KIO ₃	10	10
Na ₂ SeO ₄	10.25	10.25
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	7.95	7.95
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	1450	1450
CrK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	275	275
LiCl	17.40	17.40
H ₃ BO ₄	81.50	81.50
NaF	63.50	63.50
NiCO ₃ · 2Ni(OH) ₂ · 4H ₂ O	30.53	30.53
NH ₄ VO ₃	6.60	6.60
Sucrose	up to 1000000	up to 1000000

を観察するため、低温暴露前および低温暴露 1, 2, 6 時間後に、pentobarbital 麻酔下、ラットの後大静脈から採血し、脱血後、肝臓を摘出した。血液を $1,500 \times g$, $24^\circ C$ にて 20 分間遠心分離後、得られた血清を用いて、血糖値 (ムタローターゼ・GOD 法, グルコース CII-テストワ

コー, 和光純薬工業(株)), 中性脂肪量 (GPO・*p*-クロロフェノール法, トリグリセライド G-テストワコー, 和光純薬工業(株)) および遊離脂肪酸量 (ACS-ACOD 法, NEFA C-テストワコー, 和光純薬工業(株)) を測定した。また, 肝臓は 5% トリクロロ酢酸溶液中にて 1% 肝臓ホモジネートを調製後, 遠心分離 (900×g, 10 分間) し, その上清を 10 N NaOH 溶液で 1 時間加水分解した。加水分解液を AcOH にて中和後, 肝グリコーゲン量をグルコース量としてアンスロン・硫酸法により比色定量した。

8. 水浸負荷ラットの皮下温 (cooling-rewarming test)

7. a) に記した方法で体温測定用チップを埋め込んだラットを 20±1°C の水に 10 分間水浸負荷した。水浸負荷終了後, 直ちに皮下温を測定し, 被検体を経口投与した後, 水分を速やかに拭き取り, ラットを個別に放置した (24±1°C)。皮下温を 20 分間隔で負荷 60 分後まで経時的に測定した。なお, 水浸負荷前および負荷直後の体温差を 100 とした時の回復率で被検体の有効性を検討した。

9. 統計学解析

それぞれの測定結果は平均値±標準誤差で示した。2 群間の検定の場合には, F-test を行い, 等分散の場合には Student's *t*-test を, 不等分散の場合には Welch's *t*-test を行った。多群間の検定の場合には, Bartlett test を行い, 等分散の場合には Dunnett test を, 不等分散の場合には non-parametric Dunnett-type test を行った。それぞれ, $p<0.05$ をもって有意差ありと判定した。なお, 統計処理は SAS 前臨床パッケージ Ver. 5.0 (株) SAS インスティテュートジャパン) を用いて行った。

実験結果

1. 赤血球内 PK 酵素活性に及ぼす影響

Fig. 1 に示したごとく, 対照群ラットの赤血球内 PK 活性は 4.6±0.1 unit/g Hb であった。JR-ext 200 mg/kg をラットに 7 日間連日経口投与すると, 赤血球内 PK 活性は有意に増加した。

2. 赤血球の細胞齢に及ぼす影響

Intact ラットの赤血球数を測定したところ, 5.9±0.2 ×10⁶ cells/μl であった (Fig. 2)。この血液を不連続 Percoll 密度勾配にて赤血球を上層部と中間層部の低密度画分 (若赤血球画分) と下層部の高密度画分 (老赤血球画分) に分離, 分取したところ, 高密度画分の赤血球数に対する低密度画分の赤血球数の比率は 0.78 であった。JR-ext を 50, 200 mg/kg の用量で 7 日間連日経口投与すると, 低密度画分の赤血球数が有意に増加し, 高密度の赤血球数が減少した。その結果, 高密度画分の赤血球数に対する低密度画分の赤血球数の比率は, JR-ext 50,

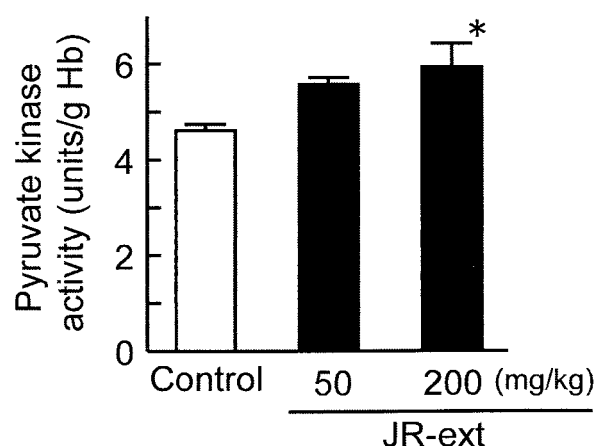


Fig. 1 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed Rehmanniae Radix on erythrocyte pyruvate kinase activity in intact rats.

Test substance in 0.5% CMC·Na was orally administered once a day for 7 d. Blood samples were collected from the abdominal vein 1 h after the final administration. The pyruvate kinase activity in erythrocytes was measured by the quantitative enzymatic determination at 25°C, as the rate of disappearance of NADH. Each value represents the mean ± S.E. (n=8). Significantly different from control value, * $p<0.05$.

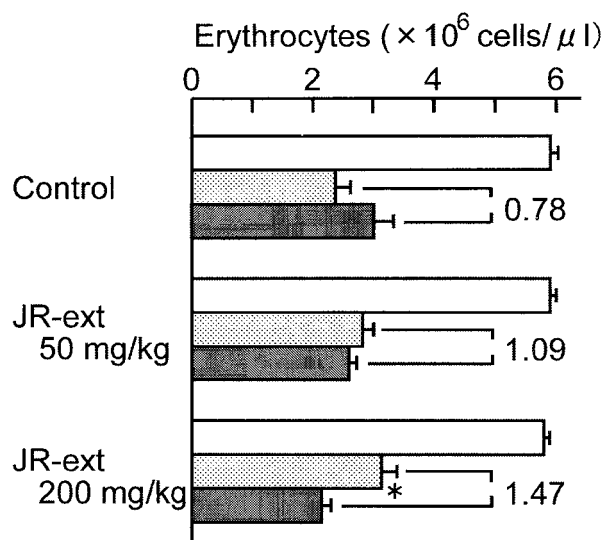


Fig. 2 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed Rehmanniae Radix on cell age of erythrocytes in intact rats

Test substance in 0.5% CMC·Na was orally administered once a day for 7 d. Blood samples were collected from the abdominal vein 1 h after the final administration. The erythrocytes were separated by the discontinuous Percoll density gradient. The erythrocyte counts in high-density and low-density fractions were measured. Each value represents the mean ± S.E. (n=8). Significantly different from high-density erythrocyte counts in control rats, * $p<0.05$. □; whole erythrocyte count, ▨; low-density erythrocyte count (young cell), ■; high-density erythrocyte count (old cell).

200 mg/kg 投与によりそれぞれ 1.09, 1.47 に上昇した。なお, 低密度画分は高密度画分に比較し, 赤血球内 PK 酵素活性は高かった (データは示さず)。

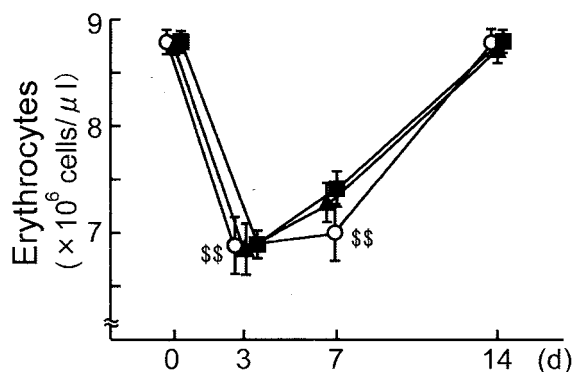


Fig. 3 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed *Rehmanniae Radix* on erythrocyte counts in phlebotomized anemic rats

Anemia was caused by drawing blood 1.0 ml from the cervical vein once a day for 3 d. The rats were orally administered test substances in 0.5% CMC·Na once a day for 14 d immediately after the first phlebotomy. Blood samples were repeatedly collected from the cervical vein at 3, 7 and 14 d, and the erythrocyte counts were measured. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=9-10). Significantly different from value before first phlebotomy, ^{\$\$} $p < 0.01$. ○; control, ▲; JR-ext 50 mg/kg, ■; JR-ext 200 mg/kg.

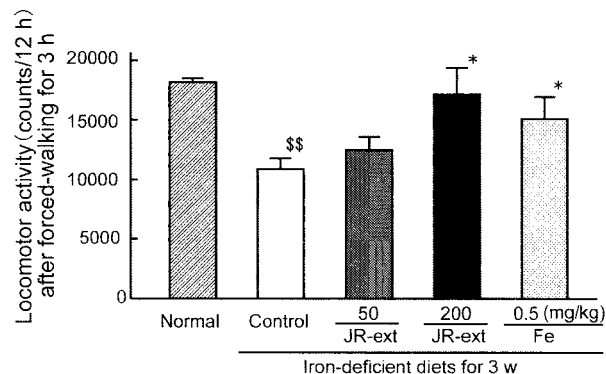


Fig. 4 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed *Rehmanniae Radix* and ferric ammonium citrate (Fe) on locomotor activity after forced-walking in iron-deficient anemic rats

Rats fed a normal diet or an iron-deficient diet, and was orally administered test substance in 0.5% CMC·Na once a day for 25 d from first day in the experimental period. The locomotor activity (19:00 ~ 7:00) after forced walking (3 m/min $\times$ 8 h) in iron-deficient anemic rats was measured. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from normal value, ^{\$\$} $p < 0.01$. Significantly different from control value, * $p < 0.05$.

Table II Effects of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed *Rehmanniae Radix* and Ferric ammonium citrate on body weight, erythrocyte counts, hemoglobin content and hematocrit value in iron-deficient anemic rats.

Treatment	Body weight (g)	Erythrocytes ($\times 10^6$ cells/ μ l)	Hemoglobin content (g/dl)	Hematocrit value (%)
Normal	165.7 $\pm$ 1.2	7.83 $\pm$ 0.27	13.7 $\pm$ 0.5	40.9 $\pm$ 1.3
Iron-deficient diet				
Control	147.3 $\pm$ 2.6 ^{\$\$}	4.52 $\pm$ 0.18 ^{\$\$}	7.8 $\pm$ 0.2 ^{\$\$}	18.8 $\pm$ 0.5 ^{\$\$}
JR-ext 50 mg/kg	152.0 $\pm$ 3.7	5.05 $\pm$ 0.22	8.1 $\pm$ 0.2	20.4 $\pm$ 1.0
JR-ext 200 mg/kg	151.6 $\pm$ 5.6	5.13 $\pm$ 0.21*	8.3 $\pm$ 0.2*	21.0 $\pm$ 0.9
Fe 0.5 mg/kg	156.3 $\pm$ 4.4	7.45 $\pm$ 0.29**	10.1 $\pm$ 0.3**	32.1 $\pm$ 1.4**

The rats were fed a normal diet or an iron-deficient diet, and were orally administered test substances in 0.5% CMC·Na once a day for 21 d from first day in the experimental period. Blood samples were collected from the cervical vein. Erythrocyte counts, hemoglobin content and hematocrit value were measured. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from the normal value, ^{\$\$} $p < 0.01$. Significantly different from the control value, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3. 造血機能に及ぼす影響

1) 瀉血ラット

Fig. 3 に示したごとく、ラットの頸静脈から1日1回3日間1.0 mlの血液を採取(瀉血)すると、赤血球数は瀉血前に比較して有意に減少した。減少した赤血球数は暫時回復し、瀉血後11日には瀉血前のレベルまで回復した。JR-ext 200 mg/kg 投与群には瀉血によって減少した赤血球数をその投与開始7日目(瀉血後4日目)において回復傾向を示したが有意な作用ではなかった。ヘマトクリット値およびヘモグロビン量の増減も赤血球数と同様に推移した(データは示さず)。

2) 鉄欠乏性貧血ラット

血液像: Table II に示したごとく、鉄欠乏食を3週間ラットに摂食させると、赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値が有意に低下した。Ferric ammonium

citrate (Fe として 0.5 mg/kg) 投与は赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値の減少を有意に抑制した。JR-ext 200 mg/kg 投与は鉄欠乏性食餌摂取による赤血球数およびヘモグロビン量の低下を有意に抑制し、ヘマトクリット値の低下を抑制する傾向を示した。

自発行動量: 鉄欠乏性食餌を3週間摂取させたラットと正常食を摂取させたラットの自発行動量を比較したところ、活動期および休息期を通じて自発行動量に差は認められなかった(データは示さず)。そこで、それらラットを3.0 m/minの速度で8時間強制歩行(10:00~18:00)させ、歩行終了後12時間(19:00~翌7:00)の自発行動量を測定した。その結果、正常食を摂取したラットの行動量に比較して、鉄欠乏性食餌ラットの自発行動量は有意に低下した(Fig. 4)。JR-ext 200 mg/kg 投与およびFerric ammonium citrate (Fe として 0.5 mg/kg) 投与

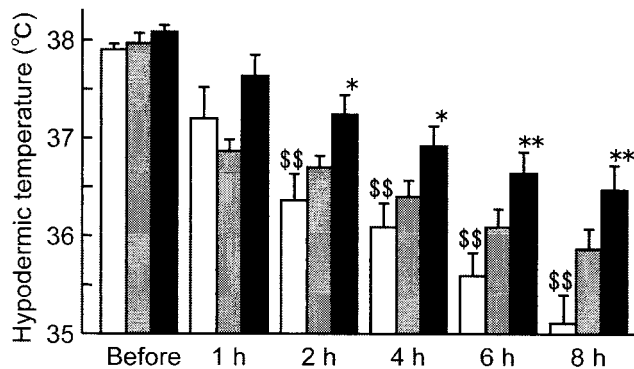


Fig. 5 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed Rehmanniae Radix on body temperature in cold (4°C)-stressed rats

Test substance in 0.5% CMC·Na was orally administered one time or once a day for 7 d. The rats were left under 4°C from 30 min after the final administration. The change of hypodermic temperature in back of rats was measured in 4°C. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from value before cold-stress, $^{**}p<0.01$. Significantly different from control value, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$. □; control, ■; JR-ext 200 mg/kg $\times$ one time, ■; JR-ext 200 mg/kg $\times$ 7 times.

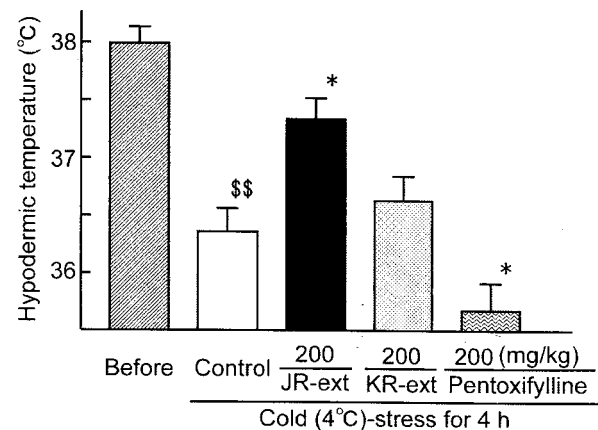


Fig. 6 Effects of 50% ethanolic extracts from various Rehmanniae Radix (KR-ext, JR-ext) and pentoxifylline on body temperature in cold (4°C)-stressed rats

Test substances in 0.5% CMC·Na were orally administered once a day for 7 d. The rats were left under 4°C from 30 min after the final administration. The change of hypodermic temperature in back of rats was measured in 4°C. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from hypodermic temperature before cold-stress, $^{**}p<0.01$. Significantly different from control value, $^{*}p<0.05$.

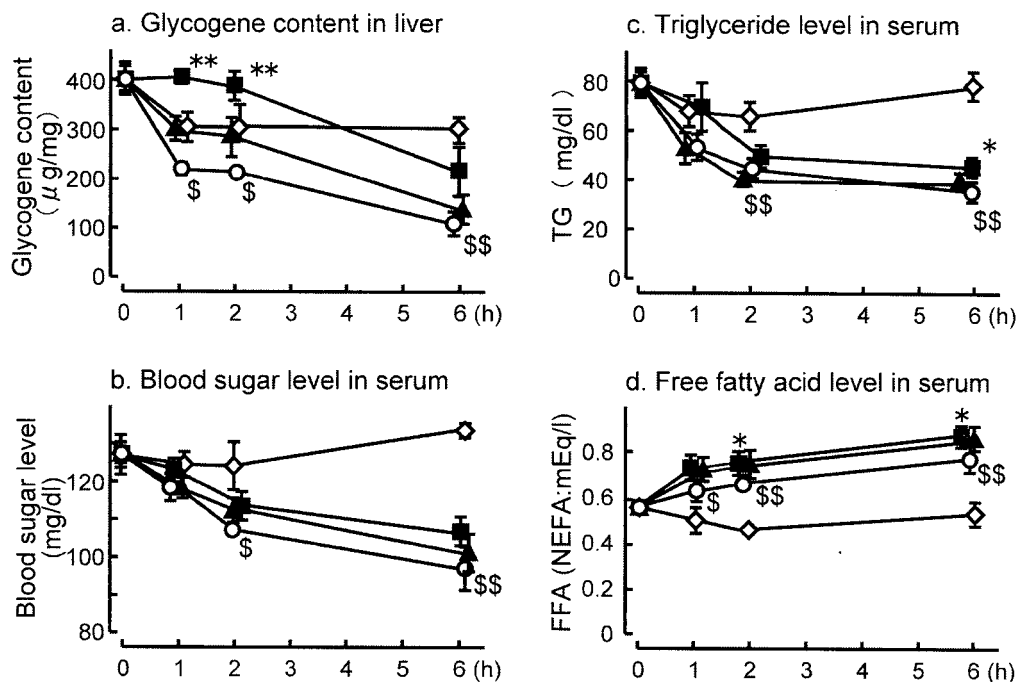


Fig. 7 Effect of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed Rehmanniae Radix on glycogen content in liver, blood sugar level, triglyceride level and free fatty acid level in serum in cold (4°C)-stressed rats

Test substance in 0.5% CMC·Na was orally administered once a day for 7 d. The rats were left under 4°C from 30 min after the final administration. Blood samples were collected from the caudal vena cava, and livers were extracted at 1, 2 and 6 h. The glycogen content in liver (a), the blood sugar level (b), the triglyceride level (c) and the free fatty acid level (d) in serum were determined. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from the value before cold-stress, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$. Significantly different from the control value, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$. ◇; normal, ○; control, ▲; JR-ext 50 mg/kg, ■; JR-ext 200 mg/kg.

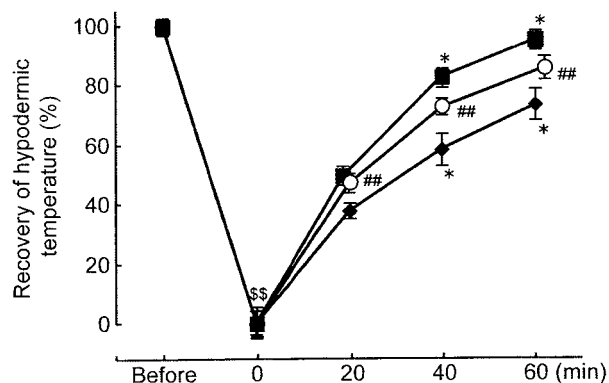


Fig. 8 Effects of 50% ethanolic extract (JR-ext) from steamed *Rehmanniae Radix* and pentoxifylline on body temperature in water (20°C) -immersion-treated rats

Rats were immersed in water (20°C) for 10 min. Test substances in 0.5% CMC·Na were orally administered immediately after water-immersion. The change of hypodermic temperature in back of rats was measured in 24°C. Each value represents the mean $\pm$ S.E. (n=8). Significantly different from value before water-immersion, $^{**}p<0.01$. Significantly different from value immediately after water-immersion, $^{##}p<0.01$. Significantly different from the control value, $^{*}p<0.05$.

○; control, ■; JR-ext 200 mg/kg, ◆; pentoxifylline 200 mg/kg.

は行動量の低下を有意に抑制した。

4. 低温暴露ラットの皮下温、肝グリコーゲン量、血糖値、中性脂肪量および遊離脂肪酸量に及ぼす影響

皮下温: Fig. 5 に示したごとく、ラットを低温に曝露すると、皮下温は徐々に低下し、低温曝露 2 時間後から皮下温の有意な低下が観察された。この皮下温の低下に対し、JR-ext 200 mg/kg の単回投与は抑制傾向を示し、JR-ext を 7 日間連日経口投与すると、その低下は有意に抑制された。

低温暴露 4 時間後の皮下温の低下に及ぼす KR-ext および pentoxifylline の影響も検討した結果、KR-ext 200 mg/kg 投与群にはその低下を抑制する作用が認められず、pentoxifylline 200 mg/kg 投与群には皮下温低下をさらに低下させる作用が認められた (Fig. 6)。

肝グリコーゲン量: Fig. 7a に示したごとく、肝グリコーゲン量は低温曝露 1 時間後で約半量まで低下し、6 時間後においてもさらに低下した。JR-ext 200 mg/kg 投与は低温曝露 2 時間後まで、肝グリコーゲン量を曝露前のレベルに維持した。

血糖値: Fig. 7b に示したごとく、血糖値は低温曝露によって暫時低下し、低温曝露 2 時間後から有意な低下が観察された。JR-ext 200 mg/kg 投与群にはその低下を抑制する傾向が認められた。

中性脂肪量: Fig. 7c に示したごとく、中性脂肪量も低温曝露によって暫時低下し、低温曝露 2 時間後から有意な低下が観察された。JR-ext 200 mg/kg 投与群にはそ

の低下を抑制する傾向が認められた。

遊離脂肪酸量: Fig. 7d に示したごとく、遊離脂肪酸量は低温曝露によって暫時増加し、低温曝露 1 時間後から有意な増加が観察された。JR-ext 200 mg/kg 投与は低温曝露による遊離脂肪酸量の増加をさらに促進させた。

5. 水浸負荷ラットの皮下温に及ぼす影響 (cooling-rewarming test)

ラットを $20 \pm 1^\circ\text{C}$ の水に 10 分間水浸負荷させると、皮下温は $37.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ から $26.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$ まで低下し、水浸負荷終了 60 分後の皮下温は $36.7 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であり、88.5% 回復した。Fig. 8 には処置前の皮下温を 100% とし、処置後の皮下温を 0% とした時の皮下温の変動率を示した。その結果、JR-ext 200 mg/kg は水浸負荷後の皮下温の回復を有意に促進させた。Pentoxifylline 200 mg/kg はこの皮下温の回復を抑制した。さらに、水浸負荷終了時から 60 分後までの経過時間と皮下温の変化との間の相関式を算出し、皮下温が水浸前の皮下温まで回復するために要する時間を求めたところ、対照群、JR-ext 200 mg/kg 投与群および pentoxifylline 200 mg/kg 投与群の 100% 回復時間は、それぞれ、 74.9 ± 2.9 、 63.1 ± 2.1 および 87.4 ± 4.2 分であった。

考 察

「血虚」とは血液量の不足あるいは血液の機能の減退をきたした病態であり、その結果、血色不良、意識薄弱、倦怠感、四肢の痺れ感、冷感などを呈する病態と考えられる。そのため、現代医学的に捉えると貧血や末梢循環の低下した状況である「血虚」を改善する補虚養血作用は血行動態改善作用や造血作用などが担っていると考えられ、これまで、著者らは熟地黄の末梢循環障害改善作用を明らかにしてきた¹⁻³⁾。今回、熟地黄の補虚養血作用をさらに解明するため、末梢組織の栄養状態に大きな影響を及ぼす赤血球の量的あるいは質的变化に及ぼす熟地黄の影響を検討した。さらに、貧血および低温曝露による体温低下を「血虚」状態と捉え、熟地黄の補虚養血作用による生体機能改善を、貧血時の行動量および低温曝露時の皮下温を指標に検討した。

生命体にとって血液循環はなくてはならない機能であり、その中で赤血球は酸素および二酸化炭素の運搬などの機能を有することから、生命維持には必要不可欠なものである。赤血球は体積当たりの表面積を最大にして、酸素や二酸化炭素との接触面積を広げるため、biconcave disc の形態を維持する一方、その大きさが微小循環領域の血管径より大きいため、微小循環領域を通過する際には、赤血球は自身の形態を変形させる。そのため、赤血

球は形態の維持と変形を繰り返しているが、この能力と赤血球内 ATP 含量とは密接に関連している。著者らは、この赤血球内 ATP 含量を JR-ext が増加させ、その結果、赤血球変形能を改善することを明らかにしている³⁾。この ATP 産生には多くの解糖系酵素が関与しているが、その中で律速酵素としては hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase (PK) が挙げられる⁴⁾。そこで、赤血球内 PK 酵素活性に及ぼす影響を検討したところ、JR-ext はその酵素活性を高めた。この作用メカニズムとしては、赤血球内の酵素への直接作用と赤血球新生を介した間接的作用が考えられたが、熟地黄が造血系へ影響を及ぼし^{1,6,7)}、さらに、連日経口投与により赤血球変形能亢進作用を発揮することから、赤血球新生を介した間接的作用の関与が高いと考えられた。この赤血球新生に対する熟地黄の影響を明らかにするため、赤血球変形能、赤血球内 ATP 含量、赤血球内酵素活性と相関する赤血球の aging⁴⁾ に及ぼす熟地黄の影響を、赤血球の比重を指標に検討した。赤血球は aging により比重が増加し、これに対して、JR-ext は全赤血球に占める低比重の PK 酵素活性の高い新生赤血球の比率を高めた。この結果は、熟地黄の造血系の活性化^{1,6,7)} による新生赤血球の増加促進と、脾臓組織血流亢進作用²⁾ による脾臓での老化赤血球の排除亢進とが相互に働き、赤血球のターンオーバーが促され、生じたものと考えられた。さらに、新生赤血球は、老化赤血球と比較すると、ATP 高含量、解糖系酵素高活性のため赤血球変形能や酸素運搬能などの機能が高いことから、熟地黄は赤血球全体の質的機能を高め、その結果、熟地黄が末梢組織への酸素の供給・二酸化炭素の除去を促し、末梢組織の機能を高める可能性が推察された。

次に、血虚の一つである貧血に及ぼす熟地黄の影響を検討した。貧血とは赤血球が量的、質的に低下した状態であるが、貧血により全身の組織への酸素運搬が低下し、動悸、息切れ、脱力感、運動機能低下や意識薄弱などを呈することから、「血虚」状態といえる。これまでの研究において、地黄が造血系を活性化することは報告⁶⁾ されており、著者らも熟地黄が造血能の低下しているラット adjuvant 関節炎モデルにおいて増血作用を認めている¹⁾。今回、強制的に血液を除去した瀉血モデルと赤血球の量的・質的に低下した鉄欠乏性貧血に及ぼす熟地黄の影響を検討した。まず、少量 (1 ml) の血液を 3 日に分けて瀉血した貧血モデルに対して、熟地黄は赤血球数の回復を促進する傾向が観察されたが、正常な造血機能を有する生体自身は回復力が強いいため、その作用は軽度なものであり、出血などによる急性的な貧血には熟地黄の作用は弱いと考えられた。次に、鉄欠乏性貧血に及ぼす影響に

ついて検討した。日本人の鉄の摂取は栄養学的に十分ではなく、そのために生じる鉄欠乏性貧血は日本人が罹患しやすい疾患とされている⁸⁾。この鉄欠乏性貧血に対し、JR-ext は貧血像を改善する作用を有し、慢性的な貧血に対して熟地黄は有効性が高いことが明らかとなった。一方、正常ラットは 1 日当たり約 5.0 mg/kg 相当の Fe を補給しているのに対し、その 1/10 相当量の Fe 0.5 mg/kg 投与は鉄欠乏性貧血の発症を阻止した。以上のことから、熟地黄は造血機能が低下し、慢性的な貧血に対し、有用性がより高い生薬であり、その作用を介し、赤血球を量的・質的に改善していると考えられる。さらに、貧血時の運動活性に及ぼす熟地黄の影響を検討した。鉄欠乏性貧血 (鉄欠乏食 3 週間摂取) ラットの自発行動量は、活動期～休息期を通して、正常ラットの自発行動量と差がなかった。しかし、貧血時には末梢組織への酸素供給が不足し、易疲労状態にあり、ストレスの影響も受けやすい⁹⁾。そこで、鉄欠乏性貧血ラットを強制的に歩行させ、その後の行動量を測定し、疲労回復状態を観察した。その結果、貧血ラットの強制歩行後の行動量は正常ラットのそれよりも低く、運動活性が低下した状態であることが認められた。これに対して、鉄欠乏性貧血の発症を阻止した Fe 0.5 mg/kg 投与はその行動量の低下を有意に抑制し、約 6 割の回復が観察された。一方、JR-ext は、赤血球数の回復が Fe 投与による効果に比較して十分ではないにもかかわらず、強制歩行後の行動量を正常域まで回復させた。つまり、熟地黄は単に赤血球を増加させるだけでなく、これまで明らかになってきたように赤血球変形能や酸素運搬能などの赤血球機能を質的にも改善し、末梢血流を高めることにより、効率的に末梢組織の活性化に寄与した結果、行動量がより回復したと考えられる。

次に、低温環境曝露下における熟地黄の体温保持作用を検討した。動物を低温下に放置すると熱放散が熱産生を上回り背部皮下温は徐々に低下した。この皮下温低下を JR-ext は有意に抑制した。また、臨床において、血行状態の低下による冷え症の度合いを観察する手法でもある cooling-rewarming test においても、JR-ext は有効であった。一方、熟地黄と同様に赤血球変形能亢進作用を有し、循環改善剤として用いられている pentoxifylline は低温曝露による体温低下を促進し、cooling-rewarming test の体温回復も遅延させ、熟地黄とは相反する作用を呈した。そのため、熟地黄の体温保持作用は、単に赤血球変形能亢進作用などの末梢循環改善作用だけが働いた結果ではなく、これまで記してきた赤血球の質的改善作用などの作用が複合的に働いた結果、発揮されたものと推察された。また、低温下に曝露すると熱産生を促すた

めにエネルギー代謝は糖代謝と同時に脂質代謝も亢進する。低温曝露ラットの生化学的パラメータを観察すると、肝グリコーゲン量が急速に減少するとともに中性脂肪値が低下し、遊離脂肪酸値が増加していた。これは糖の供給源であるグリコーゲンが減少し、単位あたりの熱産生の高い脂肪酸がトリグリセライドから遊離すると共に脂肪組織からの脂肪酸の動員が生じた結果であると考えられる。これに対して、JR-ext は肝グリコーゲン量および中性脂肪値の低下を抑え、遊離脂肪酸値の増加を促進させた。このことから、熟地黄がエネルギー源と酸素を末梢組織へ効率的に供給することにより、エネルギー代謝効率が促進し、熱変換が高まった結果、グリコーゲンの減少が抑制され、脂肪細胞からの脂肪酸の動員が脂肪酸の代謝を上回ったと推察された。

以上のことから、熟地黄には赤血球新生に伴う赤血球に対する質的および量的機能亢進作用が明らかになり、さらに既に報告している末梢循環改善作用とが複合的に働いて低下した末梢組織の機能を高め、血虚によって生じた生体機能の低下を改善する作用が明らかになった。このことは、金元時代の李東垣は「補虚には熟地黄を使用した方がよい」と論述している¹⁰⁾ ごとく、今回の結果は補虚養血作用を期待する場合、熟地黄を用いるのが妥当であることを裏付ける一結果と考えられる。

*〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1

近畿大学薬学部薬用資源学研究室 久保道徳

References

- 1) Kubo, M., Asano, T., Shiimoto, H. and Matsuda H.: Studies on *Rehmanniae Radix*. I. Effects of 50% ethanolic extract from steamed and dried *Rehmanniae Radix* on hemorheology in arthritic and thrombosis rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1282-1286, 1994.
- 2) Matsuda, H., Asano, T. and Kubo, M.: Studies on *Rehmanniae Radix*. II. Effects of 50% ethanolic extract from crude, dried and steamed *Rehmanniae Radix* on hemodynamics. *J. Trad. Med.*, **12**, 250-256, 1995. (in Japanese)
- 3) Kubo, M., Asano, T., Matsuda, H., Yutani, S. and Honda, S.: Studies on *Rehmanniae Radix*. III. The relation between changes of constituents and improvable effects on hemorheology with the processing of roots of *Rehmannia glutinosa*. *Yakugaku Zasshi* (薬学雑誌), **116**, 158-168, 1996. (in Japanese)
- 4) Salvo, G., Caprari, P., Samoggia, P., Mariani, G. and Salvati, A.M.: Human erythrocyte separation according to age on a discontinuous Percoll density gradient. *Clin. Chim. Acta*, **122**, 293-300, 1982.
- 5) Puming, H. and Yasumoto, K.: Age-associated changes in glutathione peroxidase and oxidized protein in the erythrocytes of senescence-accelerated mice. *Nihon Eiyou Shokuryou Gakkai Shi* (日本栄養・食糧学会誌), **43**, 121-125, 1990. (in Japanese)
- 6) Yuan, Y., Hou, S., Lian, T. and Han, Y.: Studies of *Rehmannia glutinosa* Libosh. f. *hueichingensis* as a blood tonic. *Zongguo Zhong Yao Za Zhi*, **17**, 366-368, 1992.
- 7) Kojima, S., Ezaki, N., Inoue, M., Matsumi, S. and Sugawara, Y.: Studies of tonification in traditional Chinese medicine IV : Analyses of drug combination of Shimotsu-to in hematopoietic effect. *J. Trad. Med.*, **12**, 235-240, 1995. (in Japanese)
- 8) Uchida, T., Tanaka, T., Umeno, M., Shichishima, T., Kokubun, R., Yui, T., Kimura, H., Muroi, S., Matsuda, S. and Kariyone, S.: Prevalence and causes of iron deficiency in Japanese women. *Nippon Naika Gakkai Zasshi* (日本内科学会誌), **70**, 1401-1407, 1981. (in Japanese)
- 9) Kitajima, H., Shiimoto, H., Osada, K. and Yokogoshi, H.: Co-administration of proline and inorganic iron enhance the improvement of behavioral and hematological function of iron-deficient anemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **49**, 7-12, 2003.
- 10) Wang Haogu (王 好古): "Tang-ye Bencao (湯液本草)", middle volume (卷中), People's Medical Publishing House (人民衛生出版社), Beijing, pp. 35-36, 1956.