

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 牧野 利明

経産ラットでの卵巣摘出モデル

Chungら¹⁾は、経産ラットの卵巣を摘出したときの当帰芍薬散の作用を検討した。経産ラットの卵巣を摘出し、刻み生薬(白朮配合)から熱水抽出した当帰芍薬散エキス(ヒト常用量の約6~25倍量)を、摘出手術1週間後から1日1回14日間強制経口投与した。その後、全採血し、全身をバラホルムアルデヒドで灌流固定し、子宮を摘出した。正常群と比較して、卵巣摘出(OVX)群では子宮重量、組織切片化したときの子宮の断面積と子宮内腔面積、血漿中エストラジオール濃度とプロゲステロン濃度が有意に減少していたが、当帰芍薬散投与群ではそれらはプロゲステロン濃度を除き有意に回復していた。子宮における血管内皮成長因子(VEGF)とアクアポリン(AQP)2発現量は、正常群と比較してOVX群では有意に減少していたが、それらは当帰芍薬散投与により有意に回復していた。以上のことから、当帰芍薬散は女性の更年期障害に対する治療薬として有用であることが推測された。

アジュバント関節炎モデル

金井ら²⁾は、アジュバント関節炎モデルラットにおける当帰芍薬散の作用を検討した。乾燥結核死菌体を流動パラフィンに混濁してラットの右後肢に皮内投与して、アジュバント関節炎を惹起させた。その6ヵ月後、尾部体表温をサーモグラフィーで測定したところ、アジュバント関節炎モデルラットでは正常ラットと比較して尾部体表温が有意に低下していた。そのラットに対して医療用当帰芍薬散エキス原末(以下、TSSと略す)(蒼朮配合、ヒト常用量の約6倍量)を強制経口投与したところ、30分後の尾部体表温の有意な上昇が認められた。水道水を投与したラットでは投与30分後の尾部体表温には変化は認められなかった。以上のことから、当帰芍薬散は炎症に伴う体表の冷えに対しても有用であることが示唆された。

卵巣摘出動物

武田ら³⁾はOVXラットにおける冷えに対する当帰芍薬散の作用について検討した。ラットの卵巣を摘出し、その3週間後にラットの尾の体表温をサーモグラフィーで測定した。偽手術群と比較して平均尾部体表温が低下していた卵巣摘出ラットに対して、TSS(蒼朮配合、ヒト常用量の約6倍量)を強制経口投与したところ、投与30分後の尾部体表温は、投与前と比較して有意に上昇していた。偽手術群に当帰芍薬散エキスを投与しても、尾部体表温に変化は認められなかった。このことから、当帰芍薬散には更年期障害に伴う体表部の冷えに対して有用であることが示唆された。

Toriiyukaら⁴⁾は、OVXマウスでの当帰芍薬散の作用について検討した。マウスの卵巣を摘出し、その後、生薬から調製した当帰芍薬散熱水抽出エキス(蒼朮配合、ヒト常用量の15~20倍量)を、飲水に混ぜて投与しながら飼育した。10日後に前頭大脳皮質、背側海馬、腹側海馬を採取し、コリンアセチルトランスフェ

ラーゼ(ChAT)活性を測定したところ、大脳皮質と背側海馬では、偽手術群と比較してOVX群ではそれぞれ有意に低下していたが、当帰芍薬散投与群でそれぞれ有意に回復していた。偽手術群と比較してOVX群では前頭大脳皮質と腹側海馬でのノルエピネフリン(NE)量は有意に減少し、背側海馬でのNE量は有意に増加していたが、当帰芍薬散投与群では背側海馬のNE量が有意に回復していた。20日後の前頭大脳皮質、背側海馬、腹側海馬では、当帰芍薬散投与群ではChAT活性には影響が認められなかったが、OVX群でみられた前頭大脳皮質と腹側海馬での有意なNE量の減少は当帰芍薬散の投与により有意に回復していた。20日後に採取した脾臓リンパ球の幼若化反応は、偽手術群と比較してOVX群で有意に低下していたが、当帰芍薬散投与群では有意に回復していた。卵巣摘出の7日後に受動的回避試験装置で電気刺激を与えて学習させ、その後、20日までの間に5回再生試行したときの時間を測定したところ、偽手術群と比較してOVX群で4回目、5回目で再生試行時間が有意に低下し、記憶の消失が認められたが、当帰芍薬散投与群ではそのような低下は認められなかった。以上のことから、当帰芍薬散は更年期障害に伴う精神神経系や免疫系に関連する諸症状の改善に有用であることが示唆された。

朴ら⁵⁾は、OVXマウスにおける神経機能の影響に対する当帰芍薬散の作用について検討した。マウスの卵巣を摘出し、手術当日からTSS(蒼朮配合、ヒト常用量の約13倍量)を自由飲水により投与しながら10日間飼育し、その後、脳を採取した。大脳皮質と海馬におけるChAT活性と神経成長因子(NGF)量は、卵巣摘出により有意に減少していた。ChAT活性は、当帰芍薬散投与群ではどちらの組織においても有意に回復していたが、NGF量については有意な差は認められなかった。このことから、当帰芍薬散は卵巣機能の活性化や神経伝達物質の変化を介してコリン作動性神経系の機能を賦活させ、その結果、記憶学習能の改善を示すことが示唆された。

老化促進マウスと老齢動物

平松、小松ら⁶⁻⁸⁾は、老化促進マウスにおける脳内神経伝達物質に対する当帰芍薬散の影響について検討した。老化促進マウスに医療用当帰芍薬散エキス製剤(蒼朮配合、ヒト常用量と同用量)を自由飲水により投与しながら12週間飼育し、その後、大脳皮質、海馬および線条体を採取した。雄マウスでの当帰芍薬散投与群では、大脳皮質中のドパミン(DA)の代謝産物である3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸(DOPAC)とホモバニリン酸(HVA)、グルタミン酸、グルタミン、海馬中のDOPAC、グルタミン酸、グルタミン、線条体中の5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、DOPAC、グルタミン酸、グルタミンが、それぞれ有意に減少していた。雌マウスでの当帰芍薬散投与群では、大脳皮質中のNE、DA、グルタミン、線条体の5-HIAA、HVA、3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルグリコール(MHPG)、グルタミン酸、海馬でのグルタミン酸が、それぞれ有意に減少し、大脳皮質中でのセロトニン(5-HT)が増加していたが、大脳皮質、線条体および海馬中のGABA、グリシ

ン、アラニンと、海馬中のMHPGとHVAが、それぞれ有意に増加していた。また、正常マウスに医療用当帰芍薬散エキス製剤(蒼朮配合、ヒト常用量と同用量)を自由飲水により投与しながら12週間飼育し、その後、大脳皮質、海馬および線条体を採取した。雄マウスでの当帰芍薬散投与群では、大脳皮質中のMHPG、5-HIAA、線条体におけるMHPG、5-HIAA、5-HT、グルタミン、海馬におけるMHPG、5-HIAAが、それぞれ有意に減少していた一方で、海馬中のHVAと線条体中のグリシンが有意に増加していた。雌マウスでの当帰芍薬散投与群では、線条体中のDOPACが減少していたのに対して、大脳皮質中のグルタミン酸、タウリン、海馬中の5-HT、タウリン、グリシン、GABAがそれぞれ有意に増加していた。当帰芍薬散の作用は雌雄で異なること、脳の各部位で特異的であることが明らかとなった。

Kouら⁹⁾は、老齢マウスにおける当帰芍薬散の神経保護作用を検討した。マウスに当帰芍薬散(唐当帰、唐川芎、白朮を使用、配合比率は日本とは異なる)の熱水抽出エキスを日本におけるヒト常用量の約3または6倍量を3か月間経口投与した(投与量の記載はあるものの、どのくらいの間隔でどのようにして経口投与したのかが不明)。マウスを受動的回避試験装置で電気刺激を与えて学習させ、その24時間後に再生試行したときの時間を測定した。若齢マウスと比較して老齢マウスでは再生試行での時間が有意に短縮していたが、当帰芍薬散投与群では用量依存的な回復がみられ、低用量、高用量群ともに有意差が認められた。その後屠殺し、脳を摘出したところ、大脳皮質重量は若齢マウスと比較して老齢マウスでは有意に軽くなっていたのに対して、当帰芍薬散投与群では用量依存的な回復がみられ、低用量、高用量群ともに有意差が認められた。大脳皮質中のNE、DA量は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは有意に低下し、5-HT量には低下傾向がみられたのに対して、当帰芍薬散投与群では用量依存的な回復がみられ、DAと5-HTにおいては低用量、高用量群ともに、NEにおいては高用量群のみで有意差が認められた。以上のことから、当帰芍薬散は高齢に伴う記憶力低下を改善する作用があることが示唆された。

Quら¹⁰⁾は老齢ラットでのメラトニン合成に対する当帰芍薬散の作用を検討した。ラットに当帰芍薬散(唐当帰、唐川芎、白朮を使用、配合比率は日本に近い)の熱水抽出エキス(日本におけるヒト常用量の約17倍量)を毎日午後11時に3週間強制経口投与した。その翌日の午前11時30分と午後11時30分に尾静脈から採血し、午後11時30分から12時の間に屠殺して松果体を採取した。日中に採取した血漿中のメラトニン濃度には、各群で差は認められなかったが、夜に採取した血漿では、若齢群と比較して老齢群では有意なメラトニン濃度の低下が認められ、それは当帰芍薬散投与群では有意に回復していた。松果体におけるN-アセチルトランスフェラーゼmRNA発現量とリン酸化CREB(cAMP応答配列結合タンパク)発現量は、老齢群のそれぞれと比較して当帰芍薬散投与群では有意に高い値を示した。このことから、当帰芍薬散は睡眠障害を改善させる作用があることが推測された。

アミロイドβタンパク投与によるアルツハイマー病モデル

鍾ら¹¹⁾は、アルツハイマー病モデルラットに対する当帰芍薬散の作用を検討している。アミロイドβタンパク₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂)をラットの海馬の両側に注射し、その2日後から当帰芍薬散(唐当帰、唐川芎、白朮を使用、配合比は日本のものとは異なる)の熱水抽出エキス(もとの生薬として日本におけるヒト常用量の約2および4倍量)を21日間経口投与した。Morris水迷路試験による空間認知能力とステップダウン型受動的回避学習装置による記憶能力

は、Aβ₁₋₄₂を投与した群では正常群と比較して有意に低下していたが、当帰芍薬散を投与したラットでは有意な改善がみられた。その後、海馬からmRNAを採取して、サイトカイン類の発現量を評価したところ、Aβ₁₋₄₂を投与した群の海馬では腫瘍壊死因子(TNF)-α、インターロイキン(IL)-1β、IL-6のmRNA量が増加していたが、当帰芍薬散投与群では有意に回復していた。採取した海馬組織におけるNO代謝物の定量およびTUNEL染色を行ったところ、Aβ₁₋₄₂を投与した群では顕著なNO代謝物の増加と神経細胞のアポトーシスが観察されたが、当帰芍薬散投与群ではそれぞれ有意に低下していた。以上のことから、当帰芍薬散は海馬における抗炎症作用と神経細胞のアポトーシス抑制作用により、アルツハイマー病を予防することが推測された。

コルヒチン誘発記憶障害モデル

Lu¹²⁾は、コルヒチンにより誘発した空間認知能力障害に対する当帰芍薬散の作用を検討した。ラットの海馬にコルヒチンを注入し、その後当帰芍薬散(唐当帰、唐川芎、白朮を使用、配合比率は日本とは異なる)の熱水抽出エキス(日本でのヒト常用量の約6または13倍量)を14日間連続経口投与した。ラットをステップスルー型受動的回避試験装置で電気刺激を与えて学習させ、その24時間後に再生試行したときの時間を測定した。その結果、正常群と比較してコルヒチン投与群では有意に再生試行時間が短縮したが、当帰芍薬散投与群では用量依存的に回復し、低用量、高用量群ともに有意差が認められた。その後、脳を摘出し、SOD活性を測定したところ、正常群と比較してコルヒチン投与群では有意に低下していたが、当帰芍薬散投与群では低用量、高用量群ともに有意に回復していた。以上のことから、当帰芍薬散には記憶障害改善作用があることが明らかになった。

スコポラミン誘発記憶障害モデル

Hatip-Al-Khatibら¹³⁾は、スコポラミンにより誘発した空間認知能力障害に対する当帰芍薬散の作用を検討した。ラットを8方向放射状迷路(RAM)を用いて14日間トレーニングして空間認知記憶試験に慣れさせた後、当帰芍薬散(蒼朮配合)の各構成生薬の熱水抽出エキスを経口投与し、その60分後にスコポラミンを腹腔内投与し、30分間のRAMを用いた試験を行った。スコポラミン投与による記憶力低下(正答率の低下と誤答率の増加)は、沢瀉熱水抽出エキス(ヒト常用量の約8倍量)、当帰(同約0.1倍量)、蒼朮(同約8倍量)の前投与により有意に回復していた。当帰エキスをさらに分画したところ、その活性はブタノール層に移行し、N-メチル-β-カルボリン-3-カルボキシアミドとアミン類が有効成分であることが示唆された。当帰芍薬散の記憶障害改善作用は、主に当帰が関与していることが推測された。

脳虚血モデル

Puら¹⁴⁾は、脳虚血モデルにおける記憶障害に対する当帰芍薬散の作用を検討した。ラットをRAMを用いてトレーニングして空間認知記憶試験に慣れさせた。その後、麻酔下で椎骨動脈を電気メスで結紮し、総頸動脈を両側とも露出させ、10分間閉塞、60分間開放、再び10分間閉塞して開放させる脳虚血手術を施した。その30分後、TSS(蒼朮配合、ヒト常用量の約1~4倍量)を経口投与し、1日1回7日間経口投与した。最終投与の1時間後にRAMを用いて試験したところ、脳虚血を施していない偽手術群と比較して脳虚血群では正答回数も誤答回数も有意に減少していたが、当帰芍薬散投与群では用量依存的な正答回数の有意な増加

と誤答回数の有意な減少が認められた。その後ラットを屠殺し、海馬CA1領域の病理組織切片を作成して評価したところ、脳虚血を施していない偽手術群と比較して脳虚血群では無傷な細胞数が有意に減少していたが、当帰芍薬散投与群では用量依存的に有意に回復していた。脳虚血手術後3日目の海馬を摘出し、グルタミン酸受容体GluR2のmRNA発現量を評価したところ、偽手術群と比較して脳虚血群では有意な発現量の低下が認められたが、当帰芍薬散投与群ではそれは有意に回復していた。以上のことから、当帰芍薬散は脳虚血に伴う記憶障害に対して保護作用を示すことが推測された。

さらにHatip-Al-Khatibら¹⁵⁾は、同モデルに対する当帰芍薬散の作用機序を検討した。背側海馬にマイクロダイアリスプローブを設置したラットに、同様の脳虚血手術を施し、医療用当帰芍

薬散エキス(蒼朮配合、原末か顆粒剤かは不明、原末ならヒト常用量の約4倍量、顆粒剤なら約2倍量)を2回目の閉塞終了と同時に経口投与した。閉塞終了(当帰芍薬散投与)の60分前から120分後まで20分おきに背側海馬からのマイクロダイアリスサンプルを採取し、アセチルコリンの濃度を測定した。背側海馬のアセチルコリン濃度は、偽手術群と比較して脳虚血群においては80~120分後に有意に低下した。偽手術群に当帰芍薬散を投与すると、背側海馬のアセチルコリン濃度は40分~120分で有意に増加、背側海馬における血流は40分後と60~90分後の間で有意に増加した。脳虚血群に当帰芍薬散を投与しても、背側海馬のアセチルコリン濃度は変化しなかった。以上のことから、当帰芍薬散は海馬の血流を増加させることで、脳虚血に伴う記憶障害を保護する作用を示すものと推測された。

表 各種モデルに対する試験結果(まとめ)

	著者	使用動物	投与量 (有意差のあった最少用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)
経産動物	Chungら ¹⁾	Wistarラット(♀:経産) (250~300g, n = 4)	熱水抽出エキス(白朮) 1.0g/kg/日 連続経口投与(14日間)	卵巣摘出による子宮重量、子宮の断面積と内腔面積、血漿中エストロジオール濃度の減少を有意に回復 子宮におけるVEGF、AQP2発現量の減少を有意に回復
アジュバント関節炎モデル	金井ら ²⁾	SDラット(♀) (6週齢, n = 5)	TSS(蒼朮) 0.5g/kg 単回経口投与	炎症に伴う体温低下を有意に回復
卵巣摘出モデル	武田ら ³⁾	Wistarラット(♀) (8週齢, n = 26)	TSS(蒼朮) 0.5g/kg 単回経口投与	尾部体表温の低下を有意に回復
	Toriizukaら ⁴⁾	C57BL/6マウス(♀) (7週齢, n = 5~6)	熱水抽出エキス(蒼朮) ヒトの15~20倍量 飲水投与(10, 20日間)	大脳皮質と海馬におけるChAT活性やNE量の低下を有意に回復 脾臓リンパ球幼若化反応の低下を有意に回復 受動的回避試験での再生潜時の短縮を有意に回復
	朴ら ⁵⁾	C57BL/6CrSlcマウス(♀) (6週齢, n = 5)	TSS(蒼朮) 1.0g/kg/日 飲水投与(10日間)	大脳皮質と海馬におけるChAT活性の低下を有意に回復 NGF量の低下には有意な変化なし
老化促進モデル	平松、小松ら ⁶⁻⁸⁾	SAMP8/ddyマウス(♂♀) (12週齢, n = 4~10)	顆粒剤(蒼朮) 4.0g/L(0.125g/kg/日) 飲水投与(12週間)	大脳皮質、海馬、線条体におけるモノアミンやその代謝産物、アミノ酸に対し、雌雄によって各部位に特異的に影響
高齢動物	Kouら ⁹⁾	ICRマウス(♀) (18ヵ月齢, n = 6, 12)	熱水抽出エキス(白朮) 0.25, 0.5g/kg/日 連続経口投与(3ヵ月間)	受動的回避試験の再生潜時の短縮を有意に回復 脳皮質重量の低下を有意に回復 大脳皮質中のNE、DA、5-HT濃度の低下を有意に改善
	Quら ¹⁰⁾	SDラット (20ヵ月齢, n = 10)	熱水抽出エキス(白朮) 生薬として6.0g/kg 連続経口投与(3週間)	夜間血漿中メラトニン濃度の低下を有意に回復 松果体のNAT遺伝子とリン酸化CREBの発現量を有意に増加
アルツハイマー病モデル	鍾ら ¹¹⁾	SDラット(♂) (280±20g, n = 3~10)	熱水抽出エキス(白朮) 生薬として0.75, 1.5g/kg/日 連続経口投与(21日間)	Aβ投与による空間認知と記憶能力の低下を有意に回復 海馬における炎症性サイトカインやNO代謝物の増加を有意に回復、アポトーシスを有意に抑制
コルヒチン誘発 記憶障害モデル	Lu ¹²⁾	SDラット(♂) (200~250g, n = 6)	熱水抽出エキス(白朮) 0.5, 1.0g/kg/日 連続経口投与(14日間)	受動的回避試験での再生潜時の短縮を有意に回復 脳のSOD活性の低下を有意に回復
スコポラミン誘発 記憶障害モデル	Hatip-Al-Khatibら ¹³⁾	Wistarラット(♂) (8週齢, n = 8)	各構成生薬の 熱水抽出エキス(蒼朮) 単回経口投与	沢瀉と当帰、蒼朮の各エキスが記憶力低下を有意に回復
脳虚血モデル	Puら ¹⁴⁾	Wistarラット(♂) (250~300g)	TSS(蒼朮) 0.1, 0.3g/kg/日 連続経口投与(7日間)	RAMでの成績向上、海馬の細胞数減少とGluR2遺伝子の発現量低下を有意に回復
	Hatip-Al-Khatibら ¹⁵⁾	Wistarラット(♂) (220~230g, n = 5~7)	TSS(蒼朮、原末か顆粒剤か不明) 0.3g/kg 単回経口投与	背側海馬のアセチルコリン濃度の低下には影響はなかった。

【参考文献】

- 1) Chung MH, et al.: Estrogenic effects of a Kampo formula, Tokishakuyakusan, in parous ovariectomized rats. Biol Pharm Bull 31(6): 1145-1149, 2008
- 2) 金井成行 ほか: 実験的冷え症モデルラットに対する漢方薬の検討(第2報). 関西鍼灸短期大学年報 15: 45-47, 2000
- 3) 武田大輔 ほか: 実験的冷え症モデルラットに対する漢方薬の検討. 漢方と最新治療 9(3): 259-262, 2000
- 4) Torizuka K, et al.: Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San), on choline acetyltransferase activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. J Ethnopharmacol 71(1-2): 133-143, 2000
- 5) 朴正福 ほか: 卵巣摘出マウス脳内のChAT活性、NGF及びNGF-mRNAの変動に対する当帰芍薬散及びエストロジオールの作用. 和漢医薬学雑誌 18(5): 210-216, 2001
- 6) 平松 緑 ほか: 老化促進モデルマウスの脳内神経伝達物質に及ぼす当帰芍薬散の影響の雌雄差について. 産婦人科漢方研究のあゆみ 14: 108-113, 1997
- 7) 小松真紀子 ほか: 老化促進モデルマウスとddyマウスの脳内神経伝達物質に及ぼす当帰芍薬散の雌雄差への影響について. 産婦人科漢方研究のあゆみ 15: 52-56, 1998
- 8) Komatsu M, et al.: Different changes in concentrations of monoamines and their metabolites and amino acids in various brain regions by the herbal medicine/Toki-Shakuyaku-San between female and male senescence-accelerated mice (SAMP8). Neurochem Res 24(7): 825-831, 1999
- 9) Kou J, et al.: Neuroprotective effects of the aqueous extract of the Chinese medicine Danggui-Shaoyao-san on aged mice. J Ethnopharmacol 97(2): 313-318, 2005
- 10) Qu HG, et al.: Effects of the aqueous extract of the Chinese medicine Danggui-Shaoyao-San on rat pineal melatonin synthesis. Neuroendocrinol Lett 29(3): 366-372, 2008
- 11) 鍾樹志、馬世平、洪宗元、金曉梅: 基于抗炎作用的当归芍药散抗阿尔茨海默氏症的实验研究. 中国中药杂志 36(22): 3155-3160, 2011
- 12) Lu MC: Danggui shaoyao san improve colchicine-induced learning acquisition impairment in rats. Acta pharmacol Sin 22(12): 1149-1153, 2001
- 13) Hatip-Al-Khatib I, et al.: Determination of the effectiveness of components of the herbal medicine Toki-Shakuyaku-San and fractions of Angelica acutiloba in improving the scopolamine-induced impairment of rat's spatial cognition in eight-armed radial maze test. J Pharmacol Sci 96(1): 33-41, 2004
- 14) Pu F, et al.: Post-ischemic treatment with toki-shakuyaku-san (tang-gui-shao-yao-san) prevents the impairment of spatial memory induced by repeated cerebral ischemia in rats. Am J Chin Med 33(3): 475-489, 2005
- 15) Hatip-Al-Khatib I, et al.: Effect of Toki-shakuyaku-san on acetylcholine level and blood flow in dorsal hippocampus of intact and twice-repeated ischemic rats. Phytother Res: 21(3): 291-294, 2007