

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 牧野 利明

各種ストレスモデル

(前号より続き)

Huangら¹⁾は、当帰芍薬散の抗うつ作用について検討した。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(香港でのヒト常用量の約6または12倍量、日本の量では約18または36倍量)を1日1回7日間強制経口投与し、最終投与の1時間後にレセルピンを投与した。さらにその1時間後、レセルピンにより誘導される眼瞼下垂の程度をスコアにより評価したところ、当帰芍薬散低用量投与群では有意に抑制されていた。7種類の異なるストレスを1日1回21日間ランダムに負荷する予測不能慢性ストレス負荷マウスモデルに対して、当帰芍薬散エキスを21日間連続経口投与した。正常群と比較してストレス負荷群では22日目のスクロース嗜好試験でスクロース消費量が有意に低下していたが、それは当帰芍薬散高用量投与群においてのみ有意に改善していた。また、その後摘出した脳においてセロトニン(5-HT)、ノルアドレナリン(NA)、ドバミン(DA)含量は、正常群と比較してストレス負荷群でいずれも有意に低下していたが、NAとDA含量は当帰芍薬散高用量投与群においてのみ有意に回復していた。その時に採取した血清中のSOD活性は、正常群と比較してストレス負荷群でいずれも有意に低下していたが、当帰芍薬散低用量、高用量投与群ではいずれも有意に回復していた。以上のことから、当帰芍薬散に抗うつ作用があることが認められた。

Zhouら²⁾は、慢性拘束ストレス負荷にともなう睡眠障害に対する当帰芍薬散の作用を検討した。マウスに1日8時間の絶水絶食下での拘束ストレスを10日間負荷した。生薬(唐当帰、唐川芎、白朮を使用、配合比率は日本とは異なる)を熱水抽出することにより調製した当帰芍薬散エキス(日本におけるヒト常用量の約7~31倍量)を1日1回ストレス負荷の1時間前に、強制経口投与した。10日間の体重および摂餌量推移の曲線下面積、11日目に行ったオープンフィールド試験における自発的運動量は、ストレス負荷群で有意に減少したが、当帰芍薬散投与群において用量依存的に有意な回復が認められた。また、12日目に

行ったペントバルビタール腹腔内投与後の睡眠時間は、ストレス負荷群で有意に延長したが、当帰芍薬散投与群において用量依存的に有意な回復が認められた。以上のことから、当帰芍薬散はストレスによる睡眠障害を改善させる作用があることが示唆された。

四塩化炭素肝障害モデル

王³⁾らは四塩化炭素による肝障害モデルに対する当帰芍薬散の改善作用を検討している。ラットに四塩化炭素を毎週腹腔内投与しながら14週間飼育し、肝障害を惹起させた。この間、当帰芍薬散(唐当帰、唐川芎、白朮配合、配合比率は日本とは異なる)の50%エタノールエキス(日本におけるヒト常用量の約12倍量)を、1日1回強制経口投与した。四塩化炭素処理したラットでは、腹水量、血漿中ALT、AST、血漿中バソプレッシン濃度と、プロトロンピン時間(PT)が正常群と比較して有意に増加し、尿量が有意に低下していたが、当帰芍薬散投与群では腹水量で有意差は得られず傾向のみが認められたが、その他の値では有意な改善が認められた。以上のことから、当帰芍薬散には肝保護作用があることが推測された。

アレルギーモデル

Taharaら⁴⁾は、マウスにおけるIgE依存性二相性皮膚反応に対する当帰芍薬散の作用を検討した。マウスに抗ジニトロフルオロベンゼン(DNFB)-IgE抗体を静脈内投与し、その24時間後にDNFBを皮膚に塗布することで、皮膚反応を惹起した。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または13倍量)は、皮膚反応惹起2時間前に経口投与した。薬物非投与群では、DNFB塗布1および24時間後に耳が肥厚し、二相性皮膚反応を示すが、当帰芍薬散投与群では用量依存性は認められなかったものの、いずれの群においても有意な抑制作用を示した。このことから、当帰芍薬散は即時型および遅発型アレルギー反応の両方を改善させる作用があることが明らかになった。

潰瘍性大腸炎モデル

Sreedhar⁵⁾らは、当帰芍薬散の潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いた抗炎症作用を検討した。マウスにデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を3%含む飲水で8日間飼育し、TSS(蒼朮配合、原末か製剤か不明)をDSS投与開始6日目から3日間連続で1日1回強制経口投与(原末ならヒト常用量の約13倍、製剤ならヒト常用量の約7倍)した。マウスの飼育中、体重減少、糞便の固さ、糞便中の出血をスコア化して評価したところ、DSS投与開始2日目からスコアは有意に上昇したが、6日目にTSSを投与開始直後から有意な改善が認められた。その後大腸を摘出し、タンパク質を抽出してウェスタンプロットで解析したところ、アポトーシス関連タンパク質であるカスパー γ 12、カスパー γ 3と7それぞれの活性化体、サイクリンD1の発現量がDSS投与群でそれぞれ有意に増加していたが、当帰芍薬散投与群では有意に改善していた。また、炎症と関連のあるインターロイキン(IL)-1 β とToll様受容体2(TLR2)のタンパク質発現量も、DSS投与群でそれぞれ有意に増加していたが、当帰芍薬散投与群では有意に改善していた。チロシンキナーゼ受容体であるc-kitの発現量は、DSS投与群で有意に減少していたが、当帰芍薬散投与群では有意に改善していた。以上のことから、当帰芍薬散は潰瘍性大腸炎に対して抗炎症作用、アポトーシス抑制作用を介して改善作用を示すことが示唆された。

移植による拒絶反応モデル

白主⁶⁾、Zhangら⁷⁾、Jinら⁸⁾は、マウスにおける移植拒絶反応に対する当帰芍薬散の抑制作用について検討した。主要組織適合複合体が完全に不一致となるCBAマウス(レシピエント)とC57BL/6マウス(ドナー)を用い、ドナーマウスの心臓の上行大動脈と肺動脈を、レシピエントマウスの腹部大動脈と下大動脈に吻合し、心臓移植手術を行った。TSS(蒼朮配合、ヒト常用量の約2.5または25倍量)もしくはその量に相当する各構成生薬のエキス末を、手術当日からレシピエントマウスの胃内に8日間連続強制経口投与した。薬物非投与群では、ドナーの心臓を生存中間値(MST)7日で拒絶したが、当帰芍薬散群ではMSTを低用量群では27日に、高用量群では100日にそれぞれ有意に延長した。各構成生薬単独を投与した群では、いずれの生薬でも延長効果は認められなかった。それぞれのマウスの白血球同士の反応性を評価する混合白血球培養試験(MLR)では、心臓移植を受けて14日後のレシピエントマウスの脾臓細胞に対してドナー側の脾臓細胞を合わせて培養すると、合わせなかつた時と比較して細胞増殖が顕著

に刺激されたが、当帰芍薬散を投与したレシピエントマウスではその反応が有意に減弱していた。その時、培養液中のIL-2、IL-6、インターフェロン γ の濃度も有意に低下していた。当帰芍薬散により30日間拒絶反応が見られなかつたレシピエントマウスの脾臓細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、CD4陽性細胞中のFoxp3陽性細胞数とCD25陽性細胞数、CD25陽性細胞中のFoxp3陽性細胞数の割合が有意に増加していた。その脾臓細胞またはCD4陽性細胞を、新たなレシピエントマウスに静脈内投与し、そこへドナーマウスの心臓を移植すると、MSTは100日以上に延長した。このことから、当帰芍薬散は制御性T細胞を誘導することにより、移植拒絶反応を抑制することが明らかとなった。

次に、個々の生薬(論文では末を投与したことになっており、その時はヒト常用量の約25~30倍。もしエキスであれば、相当する投与量はさらに多くなる)を手術当日からレシピエントマウスの胃内に8日間連続強制経口投与し、MSTを求めたところ、茯苓、川芎、芍薬においてそれぞれ有意なMSTの延長が認められた。その3種の生薬のうち2種を合わせたとき、茯苓と芍薬、茯苓と川芎の組み合わせでは延長作用がみられなくなつたが、芍薬と川芎を合わせたときにMSTが100日以上に有意に延長した。芍薬と川芎を同時に投与することにより30日間拒絶反応がみられなかつたレシピエントマウスの脾臓細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、CD4陽性細胞中のFoxp3陽性細胞数とCD25陽性細胞数、CD25陽性細胞中のFoxp3陽性細胞数の割合が有意に増加し、その脾臓細胞を新たなレシピエントマウスに静脈内投与し、そこへドナーマウスの心臓を移植すると、MSTは33日に有意に延長した。しかし、両者の組み合わせで、それぞれ投与量を10分の1にした時は、MST延長作用がみられなくなつた。このことから、当帰芍薬散の移植拒絶反応抑制作用、制御性T細胞誘導作用には、芍薬と川芎が大きく寄与していることが推測された。

金ら^{9, 10)}は、マウスにおける移植拒絶反応に対する当帰芍薬散の匂い成分の抑制作用について検討した。密閉したケージ内で、TSS(蒼朮配合)を水で沸騰させて蒸気を充満させ、前述した心臓移植マウスをケージに入れて匂い成分に曝露させた(曝露時間の記載はない)。この操作を連日行ったところ、水蒸気のみを曝露させたマウスでのMSTが8.5日だったのに対して、当帰芍薬散の匂いに曝露されたマウスでは48日と有意に生着が延長した。当帰芍薬散の蒸気に曝露して30日間拒絶反応がみられなかつたレシピエントマウスの脾臓細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、CD4陽性細胞中のFoxp3陽性細胞数とCD25陽性細胞数の割合が有意に増加していた。さらにその脾臓細

胞またはCD4陽性細胞を、新たなレシピエントマウスに静脈内投与し、そこへドナーマウスの心臓を移植すると、MSTはそれぞれ100日以上、60日以上に延長した。各生薬を煎じた時の蒸気ではいずれもMSTの延長は認められず、また当帰芍薬散から一つ生薬を除いた一抜き処方では、6種類のどの生薬を一つ抜いた処方でも当帰芍薬散と同等の結果は得られなかった。このことから、当帰芍薬散の移植拒絶反応抑制作用、制御性T細胞誘導作用は、6種類すべての生薬の精油成分が作用していることが推測された。

薬物相互作用

Makino¹¹⁾らは、当帰芍薬散と抗不安薬であるエチゾラム間の薬物相互作用についてラットを用いて検討してい

る。ラットにエチゾラムを経口投与し、その3時間後までの血中濃度推移を測定した。エチゾラム経口投与の37、25、13、1時間前にTSS(白朮配合、ヒト常用量の約2倍量)を経口投与したとき、当帰芍薬散投与群とコントロール群との間でエチゾラムの血中濃度には差が認められなかつたが、当帰芍薬散の過剰量(約20倍量)を経口投与したときには、エチゾラムの血中濃度が有意に低下していた。当帰芍薬散エキスの高分子画分には、エチゾラムを吸着する作用があった。このことから、当帰芍薬散は過剰量投与時にはエチゾラムを物理的に吸着してその吸収を遅延させる作用があるが、ヒト常用量ではその吸着は問題なく、通常使用時では当帰芍薬散とエチゾラム間では薬物動態学的な薬物相互作用は生じないことが示唆された。

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 (有意差のあった用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)	
各種ストレスモデル	予測不能慢性ストレス	Huangら ¹⁾	ICRマウス(♂) (20~25g, n = 8)	熱水抽出エキス(白朮) 1.5、3.0g/kg/日 連続経口投与 (7日間or21日間)	レセルビン投与による眼瞼下垂の程度を有意に抑制 スクロース消費量の低下を有意に改善 脳内NA、DA含量と血清中SOD活性の低下を有意に回復
	慢性拘束ストレス	Zhouら ²⁾	ICRマウス(♀) (約22g, n = 8)	熱水抽出エキス(白朮) 0.625~2.5g/kg/日 連続経口投与(10日間)	体重と摂餌量および自発的運動量の減少とペントバルビタール誘発睡眠時間の延長を用量依存的に有意に改善
肝障害モデル	王ら ³⁾	SDラット(♂) (220g, n = 10)	50%EtOH抽出エキス(白朮) 8.6g/kg/日 連続経口投与(13週間)	血漿中ALT、AST、パソブレッシン濃度とPTの増加および尿量の低下を有意に改善	
アレルギーモデル	Taharaら ⁴⁾	BALB/cマウス(♀) (6週齢, n = 3)	TSS(蒼朮) 0.5、1.0g/kg 単回経口投与	二相性皮膚反応を有意に抑制	
潰瘍性大腸炎モデル	Sreedharら ⁵⁾	C57BL/6Jマウス(♀) (週齢体重不明, n = 6~8)	TSS(蒼朮) 1.0g/kg/日 連続経口投与(3日間)	体重減少および糞便の性状を有意に改善 アポトーシス及び炎症関連タンパク質の増加を有意に改善 c-kit発現量の減少を有意に改善	
移植拒絶反応モデル	白土 ⁶⁾	レシピエント: CBAマウス(♂)、 ドナー: C57BL/6マウス(♂) (8~12週齢, n = 3~8)	TSS(蒼朮) 0.2、2.0g/kg/日 生薬エキス 2.0g/kg/日 連続経口投与(8日間)	心臓移植片のMSTを有意に延長、生薬単独で効果なし MLRにおいて細胞増殖の亢進を有意に減弱、IL-2、IL-6、IFN γも有意に低下	
	Zhangら ⁷⁾	Jinら ⁸⁾	Jinら ^{9, 10)}	脾臓細胞のCD4 ⁺ 、CD25 ⁺ 中のFoxp3 ⁺ 細胞数を有意に増加 生薬では芍薬と川芎の組み合わせで同様の効果発現	
	金ら ^{9, 10)}				
薬物相互作用	Makinoら ¹¹⁾	SDラット(♀) (8週齢, n = 8)	TSS(白朮) 0.1、1.0g/kg/回 ETZ投与の37、25、13、 1時間前に経口投与	ヒト常用量ではエチゾラム(ETZ)血中濃度に影響なし、過剰量投与では有意に低下	

【参考文献】

- Huang Z, et al.: Mechanistic study on the antidepressant-like effect of danggui-shaoyao-san, a Chinese herbal formula. *eCAM* 2012; 173565, 2012
- Zhou K, et al.: Beneficial effect of Danggui-Shaoyao-San, a traditional Chinese medicine, on drowsiness induced by chronic restraint stress. *Neurosci Lett* 597: 26-31, 2015
- 王成业, 等: 当归芍药散对肝硬化腹水大鼠的干预作用研究. 中国中药杂志 38(6): 871-874, 2013
- Tahara E, et al.: Effect of kampo medicines on IgE-mediated biphasic cutaneous reaction in mice. *J Trad Med* 15(2): 100-108, 1998
- Sreedhar R, et al.: Toki-shakuyaku-san, a Japanese kampo medicine, reduces colon inflammation in a mouse model of acute colitis. *Int Immunopharmacol* 29(2): 869-875, 2015.
- 白土裕之: 当帰芍薬散によるマウス心臓移植片の生着延長効果と免疫制御細胞の誘導. 日東医誌 61(2): 169-179, 2010
- Zhang Q, et al.: Induction of regulatory T cells and prolongation of survival of fully allogeneic cardiac grafts by administration of Tokishakuyaku-san in mice. *Surgery* 150(5): 923-933, 2011
- Jin X, et al.: Combination of paeoniae radix and cnidii rhizoma prolonged survival of fully mismatched cardiac allografts and generated regulatory cells in mice. *eCAM* 2014: 841408, 2014
- Jin X, et al.: The smell of Tokishakuyaku-san (TJ-23) induces generation of regulatory T cells and prolongation of survival of fully allogeneic cardiac grafts in mice. *Transplant Proc* 44: 1070-1072, 2012
- 金相元 ほか: 当帰芍薬散(TJ-23)の匂いによるマウス移植心の生着延長効果について. *Aroma Res* 15(1): 57-59, 2014
- Makino T, et al.: Pharmacokinetic interactions between Japanese traditional kampo medicine and modern medicine (IV): Effect of Kamisoyosan and Tokisakuyakusan on the pharmacokinetics of etizolam in rats. *Bio Pharm Bull* 28(2): 280-284, 2005