

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 牧野 利明

桂枝茯苓丸の「方剤薬理シリーズ」¹⁾は、1995年6月に発表されているので、本稿ではそれ以降に発表された桂枝茯苓丸の基礎薬理試験についてまとめる。

正常動物

山田ら²⁾は、ウサギを用いて桂枝茯苓丸の血流に対する作用を検討した。ウサギに医療用桂枝茯苓丸エキス(以下KBGと略す)原末(ヒト常用量の約7倍量に相当)を単回経口投与し、その後の心拍数、網膜中心動脈、外眼動脈の血流速度を超音波パルスドプラ法により測定した。桂枝茯苓丸投与群では、投与15分後と6時間後から7日後までの間の測定において、有意に心拍数が上昇した。網膜中心動脈の平均流速は2時間後から7日後まで有意に上昇し、末梢血管抵抗指数は45分後まで有意に増加した。外眼動脈の平均流速は2時間後および6時間後にのみ有意に高値を示した。桂枝茯苓丸は外眼動脈よりもむしろ網膜中心動脈の血流に対して血流改善作用を示すことが推測された。

自然発症非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデル

Takahashiら^{3, 4)}は、自然発症NASHモデルマウスを用いて、桂枝茯苓丸の作用を検討した。レプチン受容体欠損マウスに、KBG(製剤が原末かが不明、製剤ならヒト常用量の約2倍量、エキス原末なら約8倍量)を1.5%含む高脂肪食で6週間飼育し、血清と肝臓を採取した。正常コントロール群は普通餌で飼育した。高脂肪食で飼育した群では、血清中AST、ALT、グルコース、レプチン、アディポネクチンの各濃度が有意に上昇し、インスリン濃度の増加傾向がみられたが、桂枝茯苓丸投与群では、インスリン、レプチン、アディポネクチンの各濃度が有意に抑制された。肝臓の病理組織学的評価では、桂枝茯苓丸投与群で差は認められなかった。次に、同マウスをメチオニン・コリン欠乏食で4週間飼育して、脂肪肝を誘導した。正常コントロール群と比較して、メチオニン・コリン欠乏食で飼育した群では、血清中AST、ALT、総コレステロール、レプチン、アディポネクチンの各濃度が増加し、トリグリセリド、グルコース、インスリン濃度が減少していたが、桂枝茯苓丸投与群ではレプチン濃度が有意に回復していた。肝臓の病理組織学的評価では、桂枝茯苓丸投与群において、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色切片における脂肪変性、小葉における炎症性病変、バルーン化、脂肪肝、線維化の各スコアには差は認められなかったが、シリウスレッド染色切片での陽性面積や、抗平滑筋アクチン抗体を用いた免疫染色切片での陽性面積は、有意な改善が認められた。また、肝臓におけるトランスフォーミング増殖因子(TGF)- β 1 mRNA発現量、マロンジアルデヒド(MDA)量も、桂枝茯苓丸投与群で有意に減少していた。以上のことから、桂枝茯苓丸は高脂肪食に依らないNASHに対して有用性を示すことが期待された。

チオアセトアミドによる小結節性肝硬変モデル

Yamamotoら⁵⁾は、チオアセトアミドによる小結節性肝硬変モデルで桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットをKBG製剤(ヒト常用量の約7倍量)とチオアセトアミドを含有する飼料で10週間飼育し、血液と肝臓を採取した。チオアセトアミドにより血清ALP、 γ -グロブリン、IV型コラーゲンの各濃度が上昇したが、桂枝茯苓丸投与群では γ -グロブリン濃度において有意な抑制が認められた。アザン染色による肝線維化の病理組織学的評価でも、改善傾向が認められた。桂枝茯苓丸は肝保護作用を有することが期待された。

高コレステロール食による脂質異常症、動脈硬化、脂肪肝モデル

Sekiyaら⁶⁻⁸⁾は、高コレステロール食による脂質異常症・動脈硬化モデルウサギを用いて、桂枝茯苓丸の作用を検討した。ウサギに、コレステロールを1%、桂枝茯苓丸の生薬末を1%含む餌(ヒト常用量の約6倍量)を摂取させながら8週間飼育し、血液と胸部大動脈を採取した。血漿中の脂質濃度は桂枝茯苓丸投与群で差は認められなかったが、胸部大動脈に発生したプラークの面積は有意に減少していた。また、同モデルで4週間飼育したウサギから採血したところ、血漿中脂質濃度には差は認められなかったものの、血漿中過酸化脂質の濃度が桂枝茯苓丸投与群において有意に減少していた。血液から好中球を分離し、N-ホルミルメチオニロイルシルフェニルアラニン(fMLP)およびミスチン酸ホルボール酢酸塩(PMA)で刺激したときに発生する活性酸素は、桂枝茯苓丸投与群から調製した好中球で有意に増加していた。胸部大動脈から血管リングを調製したときの内皮依存性弛緩作用は、桂枝茯苓丸投与群で差は認められなかった。さらに、ウサギに、コレステロールを1%、KBG原末を1%含む餌(ヒト常用量の約10倍量)を摂取させながら8週間飼育したとき、血清中のクレアチンキナーゼ、過酸化脂質濃度は、桂枝茯苓丸投与群で有意に減少していた。

Qianら⁹⁾は、高コレステロール食による脂質異常症モデルラットを用いて桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットをKBG原末を1%含む高コレステロール飼料(ヒト常用量の約7倍量)で12週間飼育した。高コレステロール食での飼育により、体重、肝重量、血清コレステロール濃度、血清中ALT、ALP、血清中細胞間接着分子1(ICAM-1)、レチノール結合タンパク質(RBP)4濃度、肝臓および脂肪組織におけるRBP4、心臓由来脂肪酸結合蛋白質、皮膚型脂肪酸結合蛋白質、単球走化性タンパク質(MCP)1、C-Cケモカイン受容体(CCR)2の各mRNA発現量、腹大動脈におけるICAM-1発現量がそれぞれ増加したが、桂枝茯苓丸投与群では血清中ALT、ALP、ICAM-1濃度、肝臓および脂肪組織中CCR2 mRNA発現量、腹大動脈におけるICAM-1発現量において有意な回復が認められた。

Fujimotoら¹⁰⁾は、ウサギを高脂肪食で飼育したときに生じる脂肪肝に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。ウサギを、KBG原末

を1% (ヒト常用量の約24倍量)、コレステロールを1%含む餌で12週間飼育した。一晚絶食の後に採血し、屠殺後に生理食塩水で肝臓を灌流して解析を行った。普通餌飼育群と比較して、コレステロール負荷群では体重が有意に減少し、肝臓の重量、血中および肝組織中の脂質濃度、TGF- β 1とヒアルロン酸の濃度、血中および肝臓中の脂質過酸化物の濃度、尿中8-OHdGの濃度の有意な増加が認められたが、桂枝茯苓丸投与群では血中総コレステロール、LDL、遊離脂肪酸濃度、ヒアルロン酸濃度、アディポネクチン、脂質過酸化物の濃度、肝組織中の総コレステロール、遊離コレステロールの濃度、尿中8-OHdG濃度、それぞれの値が有意に回復していた。肝臓の病理組織学的評価では、コレステロール負荷群で見られた肝臓における線維化、星状細胞における脂肪細胞分化関連タンパク発現量の増加が、桂枝茯苓丸投与群では改善していた。

以上のことから、桂枝茯苓丸の血中脂質増加抑制作用は弱いものの、血管における動脈硬化病変の発症および肝臓に対する保護作用があることが期待された。

自然発症糖尿病モデル

Gotoら^{11, 12)}は、自然発症糖尿病モデル(WBN/Kob) ラットを用いて、桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットを桂枝茯苓丸の生葉末を1%または3%含む餌(ヒト常用量の約3、10倍量)で30週間飼育した後、胸部大動脈を摘出し、血管リングを調製、マグヌス装置で張力を測定した。アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩率は、3%桂枝茯苓丸投与群で有意に増加した。N^o-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル(L-NAME、NO合成酵素阻害剤)の存在下で、キサンチンとキサンチンオキシダーゼとを反応させたときに産生する酸素ラジカルにより生じる血管の収縮、ならびにホスホリパーゼA2による血管の収縮は、桂枝茯苓丸投与群において用量依存的に有意に低下していた。血清中のNO代謝物の濃度は、桂枝茯苓丸投与群において用量依存的に有意に減少していた。血液の粘度は、桂枝茯苓丸投与群で有意に低下していた。

また、同モデルに桂枝茯苓丸の生葉末を3%含む餌で25週間飼育したときの摘出血管において、アンギオテンシンIIによる血管収縮率は、桂枝茯苓丸投与群において有意に減少していた。SELDI-TOF-MSによる血漿プロテオーム解析の結果、分子量3280、3612、4459、4490、6506の5つのシグナルにおいて、対照群と比較して有意な変化が認められた。

また、Nakagawaら^{13, 14)}は、同モデルラットで誘導した糖尿病性腎症に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラット(血糖値200 mg/dL以上のもの)に対して、生葉から調製した桂枝茯苓丸エキスを1%または3%含む餌(ヒト常用量の約6倍、18倍量)で30週間飼育した。コントロール群と比較して桂枝茯苓丸投与群では、用量依存的に体重と腎組織中スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性が増加し、血清中クレアチニン、チオバルビツール酸反応物質(TBARS、過酸化物質のパラメーター)の各濃度と、腎臓重量、腎組織中のTBARSと終末糖化産物(AGEs)の濃度、尿中タンパク質量の用量依存的な有意な減少が認められ、体重、血清中TBARS濃度、尿中タンパク質量は3%投与群から、それ以外は1%投与群から有意差を認めた。血糖値は、桂枝茯苓丸投与群で有意な変化は認められなかった。腎臓の病理組織学的評価では、糸球体硬化、血管性病変、尿細管病変、いずれも1%投与群から用量依存的に有意な改善が認められた。

さらに同モデルラットを高脂肪食で18週間飼育し血糖値200 mg/dL以上となったものに対して、生葉末で調製した桂枝茯苓丸

を3%含む餌(ヒト常用量の約10倍量)でさらに25週間飼育した。コントロール群と比較して桂枝茯苓丸投与群では、腎臓と肝臓の重量、血中クレアチニン濃度、尿中タンパク質濃度、尿中8-OHdG濃度、肝臓および腎臓中の過酸化脂質量、腎皮質中のTGF- β 1量、フィブロネクチン量、それぞれの減少が認められたが、体重と血中脂質濃度、BUN、AST、ALTには差は認められなかった。

ストレプトゾトシンによる糖尿病性腎障害モデル

Nakagawaら¹⁵⁻¹⁷⁾は、ストレプトゾトシンによる糖尿病性腎症モデルラットでの桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットに麻酔下で左腎の半分を摘出し、その7日後に右腎の全摘手術を行った。その後、ストレプトゾトシンを腹腔内に注射して糖尿病性腎症ラットを作成した。その後、KBG原末(ヒト常用量の約4倍量)を1日1回、強制経口投与しながら5週間飼育し、血液、腎臓および尿を採取した。正常群と比較して、コントロール群では、体重とクレアチニンクリアランスの有意な減少と、腎臓の重量、血清中のグルコース、糖化タンパク質、尿素窒素、トリグリセリドとMDAの各濃度、腎組織中のAGEs、ソルビトールの各濃度、尿中タンパク質濃度が有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群ではいずれも有意に改善していた。

続けて同モデルラットで、ストレプトゾトシン投与後、生葉から抽出して調製した桂枝茯苓丸エキスを同用量で飲水として投与しながら10週間飼育し、血液、腎臓および尿を採取した。正常群と比較してコントロール群では、体重の有意な減少と、腎臓の重量、尿量、血清中のグルコース、糖化タンパク質、クレアチニン、MDAの各濃度、腎組織中のAGEs濃度、尿中タンパク質濃度がそれぞれ有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では、腎臓の重量、血清中のグルコース、糖化タンパク質、クレアチニン、MDAの各濃度、尿中タンパク質濃度が有意に改善していた。また、投与4週後、8週後に測定した収縮期血圧では、正常群と比較してコントロール群で有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意な変化は認められなかった。腎臓の病理組織学的評価では、糸球体の浸出性病変スコアの有意な改善が認められた。

同モデルで、ストレプトゾトシン投与後、生葉から抽出して調製した桂枝茯苓丸エキス50、100、200mg/kg/日(ヒト常用量の約1.4、3、6倍量)を1日1回、強制経口投与しながら15週間飼育した。3週毎に測定した血糖値では、正常群と比較してコントロール群ではいずれの時期でも有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では100および200mg/kg/日投与群において、6週目以降で有意に減少していた。3週毎に測定した尿中タンパク質量は、正常群と比較してコントロール群ではいずれの時期でも有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では200 mg/kg/日投与群において、15週目で有意に減少していた。体重は、正常群と比較してコントロール群ではいずれの時期でも有意に減少していたが、桂枝茯苓丸投与群ではいずれの投与量群においてもコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。15週後に屠殺し、血液、腎臓および尿を採取した。正常群と比較してコントロール群では、血清中の糖化タンパク質、尿素窒素、クレアチニン、トリグリセリド、総コレステロール、MDAの各濃度の有意な増加と総タンパク質とアルブミン濃度の有意な減少、腎組織中のAGEs、MDA、ソルビトールの各濃度の有意な増加が認められたが、桂枝茯苓丸投与群では、血清糖化タンパク質、尿素窒素、トリグリセリド、総タンパク質、アルブミン、MDAの各濃度、腎組織中AGEs濃度の用量依存的な改善が認められ、腎組織中AGEsでは50mg/kg/日投与群から、血清中糖化タンパク質、尿素窒素、総タンパク質、MDAの各濃度では100mg/

kg/日投与群から、血清中アルブミン濃度、トリグリセリド濃度では200mg/kg/日投与群から、有意な差を認めた。また、腎組織中ソルビトール濃度は、100mg/kg/日投与群でのみ有意な改善を認めた。腎臓の病理組織学的評価では、糸球体のびまん性および結節性病変スコアが100mg/kg/日投与群から、浸出性病変スコアと糸球体への硝子様物質の沈着と腎細小動脈硝子化スコアでは200mg/kg/日投与群から、それぞれ用量依存的に有意な改善が認められた。

自然発症脂質異常症モデル

Nakagawaら¹⁸⁾は、脂質異常症(Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty、OLETF)ラットを用いて桂枝茯苓丸の作用を

検討した。ラットに対して、生薬から調製した桂枝茯苓丸末を3%含む餌(ヒト常用量の約25倍量)で、6週間飼育した。コントロール群と比較して桂枝茯苓丸投与群では、肝臓重量、肝臓中トリグリセリド量、血中グルコース、インスリン、アディポネクチンの各濃度には差は見られなかったが、肝臓中総コレステロール、血中総コレステロール、トリグリセリド濃度、レプチン濃度、グルコース負荷試験での血中グルコース濃度の増加を有意に抑制し、また、骨格筋中のTNF- α 濃度を有意に低下させた。精巣上体脂肪組織中の白色脂肪細胞の数は、桂枝茯苓丸投与群で有意に増加していた。

以上のことから、桂枝茯苓丸には、少なくとも抗酸化活性により、糖尿病の時に見られる血管障害、腎障害を保護する作用を示すことが推測された。

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 (有意差のあった用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)
正常動物	山田ら ²⁾	Dutch種家兎(♀) (2.4kg, $n = 15$)	KBG 0.2g/kg単回経口投与	網膜中心動脈の流速(↑)
NASHモデル	Takahashiら ^{3, 4)}	db/dbマウス(♂) (8週齢, $n = 6$)	KBG 1.5%含有餌投与 (4, 6週間)	インスリン、レプチン、アディポネクチン(↓) 肝組織の線維化、肝臓TGF- $\beta 1$ mRNA発現量とMDA(↓)
小結節性肝硬変モデル	Yamamotoら ⁵⁾	Wistarラット(♂) (3週齢, $n = 5$)	KBG製剤 1g/kg/日含有餌投与 (10週間)	γ -グロブリン(↓)
高コレステロール食による脂質異常症、動脈硬化、脂肪肝モデル	Sekiyaら ^{6, 7)}	日本白色種兎(♂) (2kg, $n = 6, 8$)	生薬末 1%含有餌100g/日投与 (4, 8週間)	胸部大動脈のプラーク面積、血漿中過酸化脂質(↓) 好中球の刺激に伴う活性酸素発生量(↑)
	Sekiyaら ⁸⁾	日本白色種兎(♂) (2kg, $n = 6$)	KBG 1%含有餌100g/日投与 (8週間)	血清中クレアチンキナーゼ、過酸化脂質(↓)
	Qianら ⁹⁾	Wistarラット(♂) (8週齢, $n = 5$)	KBG 1%含有餌25g/日投与 (12週間)	血清中ICAM-1、ALT、ALP、肝臓・脂肪組織中CCR2 mRNA発現量、 腹大動脈ICAM-1発現量(↓)
	Fujimotoら ¹⁰⁾	日本白色種兎(♂) (2kg, $n = 8$)	KBG 1%含有餌投与 (12週間)	血中T-CHO、LDL、FFA、ヒアルロン酸濃度、アディポネクチン、 脂質過酸化物質、肝組織中T-CHO、F-CHO、尿中8-OHdG(↓) 肝線維化、星状細胞活性化(↓)
自然発症糖尿病モデル	Gotoら ^{11, 12)}	WBN/Kobラット(♂) (24週齢, $n = 7$)	生薬末 1, 3%含有餌投与 (25, 30週間)	内皮依存性血管弛緩率(↑) 血清中NO代謝物、血液粘度、血管収縮率(↓)
	Nakagawaら ^{13, 14)}	WBN/Kobラット(♂) 血糖値200mg/dL以上 (42, 45週齢, $n = 8, 10$)	エキス 1, 3%含有餌投与 (25, 30週間)	体重、腎組織中SOD活性(↑) 腎臓・腎臓重量、血清中クレアチニン、TBARS、腎組織中TBARS、 AGEs、TGF- $\beta 1$ 、フィブリンゲン、尿中タンパク質、8-OHdG、肝臓・ 腎臓中過酸化脂質量(↓)
ストレプトゾトシンによる糖尿病性腎障害モデル	Nakagawaら ^{15, 16)}	Wistarラット(♂) (160~170g, $n = 8$)	KBG 150mg/kg/日経口投与 (5, 10週間)	体重、クレアチニンクリアランス(↑) 腎臓重量、血清中グルコース、糖化タンパク質、尿素窒素、TG、MDA、 腎組織中AGEsとソルビトール、尿量、尿中タンパク質(↓) 糸球体の浸出性病変スコア(↓)
	Nakagawaら ¹⁷⁾	Wistarラット(♂) (160~170g, $n = 10$)	エキス 50, 100, 200mg/kg/日経口投与 (15週間)	血清中グルコース、糖化タンパク質、尿素窒素、TG、MDA、腎組織中 AGEs、尿中タンパク質、腎組織病変スコア(↓) 総タンパク質、アルブミン(↑)
自然発症脂質異常症モデル	Nakagawaら ¹⁸⁾	OLETFラット(♂) (45週齢, $n = 8$)	生薬末 3%含有餌30g/日投与 (6週間)	血中グルコース、T-CHO、TG、骨格筋中TNF- α (↓) 精巣の白色脂肪組織数(↑)

(T-CHO : 総コレステロール、F-CHO : 遊離コレステロール、TG : トリグリセリド、FFA : 遊離脂肪酸)

[参考文献]

- 鳥居塚和生: 方劑薬理シリーズ 桂枝茯苓丸. 漢方医学 19: 194-199, 1995
- 山田利津子 ほか: 桂枝茯苓丸の眼循環動態に及ぼす効果. 日本眼科紀要 52: 846-849, 2001
- Takahashi Y, et al.: Japanese herbal medicines shosaikoto, inchinkoto, and juzentaihoto inhibit high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in db/db mice. *Pathol Int* 64: 490-498, 2014
- Takahashi Y, et al.: Inhibitory effects of Japanese herbal medicines sho-saiko-to and juzen-taihoto on nonalcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One* 9: e87279, 2014
- Yamamoto M, et al.: The inhibitory effects of single and combined administration of Sho-saiko-to, red ginseng, Keishi-bukuryo-gan and Hochu-ekki-to on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *J Trad Med* 14: 121-128, 1997
- Sekiya N, et al.: Keishi-bukuryo-gan prevents the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *Phytother Res* 13: 192-196, 1999
- Sekiya N, et al.: Keishi-bukuryo-gan preserves the endothelium dependent relaxation of thoracic aorta in cholesterol-fed rabbit by limiting superoxide generation. *Phytother Res* 16: 524-528, 2002
- Sekiya N, et al.: Oren-gedoku-to and Keishi-bukuryo-gan-ryo inhibit the progression of atherosclerosis in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Biol Pharm Bull* 28: 294-298, 2005
- Qian W, et al.: Effects of Kampo Formulas on the Progression of Hypercholesterolemia and Fatty Liver Induced by High-Cholesterol Diet in Rats. *Yonago Acta Medica* 57: 147-158, 2014
- Fujimoto M, et al.: Evidence-based efficacy of Kampo formulas in a model of non alcoholic fatty liver. *Exp Biol Med* 233: 328-337, 2008
- Goto H, et al.: Effects of Keishi-bukuryo-gan on vascular function and hemorheological factors in spontaneously diabetic (WBN/kob) rats. *Phytomedicine* 11: 188-195, 2004
- Goto H, et al.: Effects of two formulations for overcoming oketsu on vascular function and expression patterns of plasma proteins in spontaneously diabetic rats. *J Trad Med* 22: 237-243, 2005
- Nakagawa T, et al.: Amelioration of kidney damage in spontaneously diabetic WBN/Kob rats after treatment with Keishi-bukuryo-gan. *J Trad Med* 20: 156-164, 2003
- Nakagawa T, et al.: Protective effects of keishibukuryogan on the kidney of spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *J Ethnopharmacol* 110: 311-317, 2007
- Nakagawa T, et al.: A study of Kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J Trad Med* 18: 161-168, 2001
- Nakagawa T, et al.: Evaluation of Keishi-bukuryo-gan in a diabetic nephropathy model by comparison with aminoguanidine, butylated hydroxytoluene and captopril. *J Trad Med* 19: 200-208, 2002
- Nakagawa T, et al.: Therapeutic usefulness of Keishi-bukuryo-gan for diabetic nephropathy. *J Pharm Pharmacol* 55: 219-227, 2003
- Nakagawa T, et al.: Keishibukuryogan ameliorates glucose intolerance and hyperlipidemia in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Diabetes Res Clin Pract* 80: 40-47, 2008