

自然発症高血圧モデル

Kasaharaら¹⁾、横瀬ら²⁾は、自然発症高血圧モデルラット (SHR) を用いて桂枝茯苓丸の作用を検討した。Kasaharaらは、SHRに生薬から調製した桂枝茯苓丸熱水抽出エキス (ヒト常用量の約11倍量) を自由飲水により14週間投与した。その後、採血し、胸部大動脈を摘出して血管リングを作成し、マグヌス装置により張力を測定した。非投与群と比較して、体重に差は認められなかったが、血圧と血漿粘度、血漿中過酸化脂質濃度は、桂枝茯苓丸投与群において有意に低下していた。アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩作用は、桂枝茯苓丸投与群において有意に増加したが、ニトロプルシドNaによる内皮依存性血管弛緩作用に差は認められなかった。プロスタグランジン (PG) F₂処理後、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フリーラジカルにより誘発される内皮依存性血管収縮作用は、桂枝茯苓丸投与群で有意に減少していたが、内皮を剥離した血管標本ではその作用は認められなかった。

一方、横瀬らはSHRに医療用桂枝茯苓丸エキス (以下KBGと略す) 原末を飼料に混合して (ヒト常用量の約5および10倍量) 自由摂取で6週間投与した。血圧は4、6週後で桂枝茯苓丸両用量群ともに有意な低下が認められ、心拍数は4週後で両用量群とも、6週後で高用量群のみ有意な低下が認められた。6週後の血漿中アドレナリン、ノルアドレナリン濃度、血中好中球数、CD4⁺T細胞/CD8⁺T細胞比は高用量群で有意に低下し、血中リンパ球数、CD4⁺T細胞数、CD8⁺T細胞数は有意に増加していた。血漿中副腎皮質ホルモン (ACTH)、コルチゾール、デヒドロエピアンドロステロン硫酸 (DHEA-S) 濃度には差は認められなかった。

以上により、桂枝茯苓丸は降圧作用と免疫系調節作用と、高血圧による血管内皮機能の低下を保護する作用を有することが明らかとなり、作用機序の一部に交感神経系の抑制が関与している可能性が示唆された。

脳虚血再灌流障害モデル

Liら³⁾は、ラットに脳虚血再灌流を施したモデルで桂枝茯苓丸の作用を検討している。ラットに麻酔下で頸動脈からナイロンフィラメントを挿入して脳局所における虚血処理を2時間行い、その後再灌流して脳虚血再灌流障害モデルを作成した。桂枝茯苓丸 (中国薬典準拠、生薬末の混合物) (日本でのヒト常用量の約9、26倍量) を処理後30分および9.5時間後に経口投与した。再灌流して24時間後に屠殺し、血液と脳組織を摘出した。虚血再灌流処理による脳梗塞部の体積と脳の水分含量の増加は、桂枝茯苓丸投与群では用量依存的に有意に減少していた。血清中および脳組織中のIL-10、IL-1 β 、TNF- α の濃度は虚血再灌流処理により有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では用量依存的に、IL-10濃度はさらに増加、IL-1 β とTNF- α では減少していた。脳組織中のIL-10およびIL-10受容体mRNA発現量は、虚血再灌流処理により有意に増加し、桂枝茯苓丸投与群ではさらに用量依存的に増加していた。また、脳組織中のIL-1 β およびTNF- α の

mRNA発現量は、虚血再灌流処理により有意に増加し、桂枝茯苓丸投与群では用量依存的に抑制されていた。以上のことから、桂枝茯苓丸は抗炎症作用によって、脳虚血再灌流障害に対する有用性を示すと推測された。

血流低下モデル

Iwaokaら⁴⁾は、卵白リゾチーム (HEL) によって発症させた血流低下に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。マウスにHELを完全フロイントアジュバントと共に皮内投与した後、尾の血流をレーザードップラー血流計で毎日測定した。生薬を煎じて調製した桂枝茯苓丸熱水抽出エキス (ヒト常用量の約6倍量) を、HEL皮内投与当日、3、6、9日目に経口投与した。薬物非投与群では、HEL投与後5日目から血流低下が認められたが、桂枝茯苓丸投与群では6~9日目においてマウスの血流低下が有意に回復していた。同様に、構成生薬それぞれのエキス (ヒト常用量の約10~18倍量) を投与したところ、芍薬、牡丹皮、桃仁の各エキスを投与したマウスで有意な血流低下の改善が認められた。

沼口ら⁵⁾は、拘束ストレスを負荷したラットにおける桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットにKBG原末を0.3%含む飼料 (ヒト常用量の約8倍量) を自由摂取させながら7日間飼育した。その後、4時間の拘束ストレスを負荷し、終了後5分以内に血液をヘパリン存在下で採取した。拘束ストレス負荷により毛細管の血液透過時間が有意に増加し、それは桂枝茯苓丸投与群において有意に回復していた。以上のことから、桂枝茯苓丸には血流改善作用があることが示唆された。

卵巣摘出による更年期障害モデル

左雨ら⁶⁾は、卵巣摘出ラットにおける桂枝茯苓丸加薏苡仁の作用を検討した。ラットに医療用桂枝茯苓丸加薏苡仁エキス原末 (ヒト常用量の約10倍量) を1日1回強制経口投与しながら陰開口するまで飼育した。その結果、体重、子宮、副腎、脾臓の各重量と、陰開口日には桂枝茯苓丸加薏苡仁投与による影響は無かったが、肝臓の重量が有意に低下していた。次に、ラットの卵巣を摘出し、その8週間後に医療用桂枝茯苓丸加薏苡仁エキス原末 (ヒト常用量の約10倍量) を1日1回強制経口投与しながら8週間飼育したところ、桂枝茯苓丸加薏苡仁投与群において血清DHEA-S濃度と副腎重量が有意に増加していた。体重、脾臓重量、血清中の黄体形成ホルモン (LH)、卵巣刺激ホルモン (FSH)、プロゲステロン、エストロン、エストラジオール、カルシウム濃度には影響は無かった。このことから、桂枝茯苓丸加薏苡仁は副腎および視床下部一下垂体系への作用は弱いことが推測された。

武田ら⁷⁾は、卵巣摘出ラットにおける冷えに対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。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温度が低下していた卵巣摘出ラットに対して、KBG原末 (ヒト常用量の約15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増加していた。

このことから、桂枝茯苓丸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。

Noguchiら⁸⁾は卵巣摘出ラットにおける更年期障害様症状に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットを麻酔下で卵巣を摘出し、その2週間後からKBG(原末かエキス製剤か不明、原末ならヒト常用量の約29倍量、エキス製剤なら約7倍量)を飲水に懸濁させて、1日1回7日間経口投与した。その後、ウレタン麻酔下でカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を静脈内投与したときの体温上昇を測定したところ、偽手術群に比べて卵巣摘出群では有意に体温が上昇したが、桂枝茯苓丸投与群では用量依存的に有意にその体温上昇が抑制されていた。摘出した腸間膜血管床をマグナス装置に設置し、PGF2 α によって収縮させた血管にCGRPを作用させてみられる血管弛緩作用は、卵巣摘出ラットからの血管で有意に亢進していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。腸間膜血管から調製した細胞膜画分にCGRPを作用させたときの受容体結合活性は、卵巣摘出ラットからの血管で有意に亢進していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。血漿中のCGRP濃度は、卵巣摘出により有意に減少していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。

森元ら⁹⁾は、卵巣摘出ラットにヨヒンビンを投与したときのホットフラッシュに対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットの両側卵巣を摘出し、その翌日からKBG原末(ヒト常用量の約22倍量)を1日1回7日間経口投与した。その後、無麻酔下で尾部皮膚温と直腸温をプローブによりモニターした。偽手術群と比較して卵巣摘出群では、ヨヒンビンの皮内投与による尾部皮膚温の上昇と直腸温の低下の有意な亢進が観察されたが、桂枝茯苓丸投与群では尾部皮膚温の上昇において有意な回復が認められ、直腸温の低下では回復傾向がみられた。卵巣摘出により体重が増加し、子宮重量は減少したが、桂枝茯苓丸はそれぞれに影響を与えなかった。

以上のことから、桂枝茯苓丸は更年期障害にみられるホットフラッシュをCGRPを介して改善させる作用をもつことが推測された。

性腺刺激ホルモン放出ホルモンによる更年期障害モデル

譲原ら¹⁰⁾、Noguchiら¹¹⁾は、正常ラットに性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)誘導体であるリュープロレリン酢酸塩を皮下投与したときに生じる更年期障害様症状に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。正常ラットにGnRH誘導体を皮下投与し、翌日からKBG原末(ヒト常用量の約29倍量)を1日1回12日間投与した。その後ウレタンで麻酔して伏臥位で尾静脈からCGRPを投与し、測定部の皮膚温を測定した。その結果、CGRPによる皮膚温上昇は、GnRH誘導体投与群では正常コントロール群と比較して有意に亢進したが、桂枝茯苓丸投与群では有意な回復が認められた。その後採取した精嚢、前立腺の重量と血清中テストステロン濃度は、GnRH誘導体投与群では有意に減少していたが、桂枝茯苓丸投与群では回復は認められなかった。また、正常ラットにGnRH誘導体を皮下投与し、生薬から調製した桂枝茯苓丸熱水抽出エキス(ヒト常用量の約29倍量)を1日1回経口投与しながら14日間飼育した。最終投与の翌日に皮膚温の変化を測定したところ、CGRPによる皮膚温上昇は正常コントロール群と比較してGnRH誘導体投与群では有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。血漿中のCGRPの濃度は、正常コントロール群と比較してGnRH投与群では有意に低下していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。摘出した下垂体中のFSHとLH濃度、卵巣と子宮の重量、血漿中の17 β エストラジオール濃度は、正常コントロール群と比較してGnRH投与群で有意に減少していたが、桂枝茯苓丸の投与による影響は認められなかった。

以上のことから、桂枝茯苓丸にはエストロゲン活性を示さずに、更年期障害様症状、ホットフラッシュに対する有用性が期待できることが推測された。

色素沈着モデル

Norimotoら¹²⁾は、紫外線照射時のメラニン形成に対する桂枝茯苓丸加意苡仁の作用を検討した。マウスに桂枝茯苓丸加意苡仁エキス原末(ヒト常用量の約5倍量)を1日1回経口投与しながら14日間飼育し、その間に1日1回計10回のUV-B照射または1日1回計14回のプロゲステロンの腹腔内投与を行った。正常コントロール群に対して、UV-Bまたはプロゲステロン処理したマウスでは、耳組織中の表皮色素細胞がそれぞれ増加したが、桂枝茯苓丸加意苡仁投与群では、プロゲステロン投与による増加は有意に抑制されたが、UV-B照射による増加に対して差は認められなかった。プロゲステロン投与により血清中のLH、FSH、黄体ホルモン放出ホルモン(LH-RH)の濃度には各群とも差は認められなかった。以上のことから、桂枝茯苓丸加意苡仁は、ただの組織障害による色素沈着ではなく、黄体ホルモンによる色素沈着を抑制する可能性が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¹³⁾は、アジュバント関節炎モデルラットにおける桂枝茯苓丸の作用を検討した。乾燥結核死菌体 *Mycobacterium butyricum* 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、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KBG原末(ヒト常用量の約20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が、水道水を投与したラットでは変化は認められなかった。以上のことから、桂枝茯苓丸は炎症に伴う体表の冷えに対して有用であることが示唆された。

Nozakiら¹⁴⁾は、アジュバント関節炎モデルラットにおける関節炎症状に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。ラットに桂枝茯苓丸の生薬末を3%含む飼料(ヒト常用量の約10倍量)を自由摂取により1週間投与しながら飼育し、熱処理 *M. butyricum* を含む完全フロイントアジュバントを皮内投与することにより関節炎(AIA)を誘発した。24日後の体重はAIAコントロール群で有意に減少していたが、桂枝茯苓丸投与群では有意に回復していた。関節炎スコアには、桂枝茯苓丸投与による影響は認められなかった。摘出した胸部大動脈切片では、AIAコントロール群でアセチルコリンによる内皮依存性の弛緩が抑制され、キサンチン-キサンチンオキシダーゼによる血管収縮は有意に増加していたが、桂枝茯苓丸投与群ではそれぞれ有意に回復していた。血漿中過酸化脂質濃度は、AIA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に回復していた。胸部大動脈組織における内皮型NO合成酵素(eNOS)、誘導型NO合成酵素(iNOS)、血管性細胞接着分子(VCAM)-1の発現量は、AIA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に回復していた。このことから、桂枝茯苓丸の抗炎症作用は弱いが、炎症に伴う血管内皮障害を保護する作用があることが示唆された。

担がん動物

王ら¹⁵⁾は、担がん動物における桂枝茯苓丸の作用を検討した。結腸腺がん細胞株CT26をマウスの脾臓内に注入し、その3日後から生薬から調製した桂枝茯苓丸熱水抽出エキス(桂枝を使用)

(日本での常用量の約3倍量)を経口投与しながら15日間飼育した。その後屠殺し、肝臓の病理組織学的切片を評価した。肝組織中のテロメラゼ、p53、上皮成長因子受容体、Bcl-2の各タンパク発現量は、桂枝茯苓丸投与群で有意に抑制されていた。このことから、桂枝茯苓丸にはがん細胞の転移抑制作用があることが示唆された。

左雨ら¹⁶⁾は、子宮腺筋がんと乳がんを自然発症するマウス(SHN系マウス)を用いて、桂枝茯苓丸の作用を検討した。SHN系マウスにKBG製剤を1%含む飼料(ヒト常用量の約6倍量)を60日間自由摂取させたのち屠殺した。下垂体、副腎、卵巣の各重量、血中LH、FSH、プロラクチン濃度、子宮チミジンキナーゼ活性には差は認められなかったが、子宮腺筋症の発症率、子宮チミジル酸合成酵素活性では桂枝茯苓丸投与群で有意に低下していた。

以上のことから、桂枝茯苓丸は子宮内膜組織の増殖をピリミジン代謝のデノボ経路を介して抑制する可能性が推測された。

薬物相互作用

間瀬ら¹⁷⁾は、桂枝茯苓丸のワルファリンとの薬物相互作用について検討した。ラットにワルファリンを11日間投与し、その後KBG原末(ヒト常用量の約57倍量)を経口投与した。その24時間後に血漿を採取し血液凝固能を測定したところ、ワルファリンによる抗凝固作用はコントロール群、桂枝茯苓丸投与群ともに差は認められなかった。このことから、桂枝茯苓丸は過剰量投与時でもワルファリンとは薬物相互作用を示さないことが推測された。

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)
自然発症 高血圧モデル	Kasaharaら ¹⁾	SHR(♂) (12週齢, n = 8)	エキス0.4g/kg/日飲水投与 (14週間)	血圧、血漿粘度、過酸化脂質(↓)、Ach内皮依存性血管弛緩作用(↑)、XOD内皮依存性血管収縮作用(↓)
	横瀬ら ²⁾	SHR(♂) (12週齢, n = 6)	KBG原末0.25、0.5%含有餌投与 (6週間)	心拍数、アドレナリン、ノルアドレナリン、好中球、CD4 ⁺ T細胞/CD8 ⁺ T細胞比(↓)、リンパ球、CD4 ⁺ T細胞、CD8 ⁺ T細胞(↑)
脳虚血再灌流 障害モデル	Liら ³⁾	SDラット(♂) (230~250g, n = 3~6)	生葉末0.3、0.9g/kg単回経口投与	脳梗塞部の体積と脳の水分含量(↓)、脳組織中IL-10とIL-10受容体mRNA発現量(↑)、脳組織中IL-1β、TNF-αと各mRNA発現量(↓)
血流低下 モデル	Iwaokaら ⁴⁾	ddyマウス(♂) (5週齢, n = 5)	エキス0.2g/kg/日経口 投与(0、3、6、9日目)	血流(↑)、生薬別では芍薬、牡丹皮、桃仁で血流(↑)、
	沼口ら ⁵⁾	Wistarラット(♂) (8週齢, n = 10)	KBG原末0.3%含有餌投与(7日間)	血液透過時間(↓)
更年期障害 モデル	左雨 ⁶⁾	SDラット(♀) (9週齢, n = 6)	桂枝茯苓丸加減苡仁エキス末 0.75g/kg/日経口投与(8週間)	血清DHEA-Sと副腎重量(↑)、LH、FSH、プロゲステロン、エストロン、 エストラジオール、カルシウムに影響なし
	武田ら ⁷⁾	Wistarラット(♀) (8週齢, n = 6~7)	KBG原末0.5g/kg単回経口投与	尾部体表温(↑)
	Noguchiら ⁸⁾	SDラット(♀) (10週齢, n = 8~13)	KBG原末or製剤1.0g/kg/日飲水 投与(7日間)	CGRP投与時: 体温、膵臓血管弛緩作用、CGRP受容体結合活性(↓)、 血漿中CGRP(↑)
	森元ら ⁹⁾	SDラット(♀) (8週齢, n = 7)	KBG原末1.0g/kg/日経口投与 (7日間)	ヨヒンビン投与時: 尾部皮膚温(↓)、直腸温(↑傾向)
	譲原ら ¹⁰⁾	SDラット(♂) (9週齢, n = 10)	KBG原末1.0g/kg/日経口投与 (12日間)	CGRP投与時: 皮膚温(↓)、精囊と前立腺重量、血清中テストステロン 影響なし
	Noguchiら ¹¹⁾	SDラット(♀) (9週齢, n = 5~6)	エキス1.0g/kg/日経口投与 (14日間)	CGRP投与時: 皮膚温(↓)、血漿中CGRP(↑)、FSH、LH、卵巣と子宮重量、 17βエストラジオール影響なし
色素沈着 モデル	Norimotoら ¹²⁾	DBA/2マウス(♀) (5週齢, n = 6)	桂枝茯苓丸加減苡仁エキス末 0.18g/kg/日経口投与(14日間)	耳組織中の表皮色素細胞: プロゲステロン投与時(↓)、UV-B照射時影響 なし
アジュバント 関節炎モデル	金井ら ¹³⁾	SDラット(♀) (6週齢, n = 6)	KBG原末0.5g/kg単回経口投与	尾部体表温(↑)
	Nozakiら ¹⁴⁾	Lewisラット(♂) (10週齢, n = 8)	生葉末3%含有餌投与(1週間)	体重、Ach内皮依存性弛緩(↑)、XOD血管収縮、血漿中過酸化脂質、 eNOS、iNOS、VCAM-1発現量(↓)
担がん動物	王ら ¹⁵⁾	BALB/Cマウス(♂♀) (17~20g, n = 10)	エキス(生葉として0.9g/kg) 経口投与(15日間)	テロメラゼ、p53、上皮成長因子受容体、Bcl-2の各タンパク発現量(↓)
	左雨ら ¹⁶⁾	SHNマウス(♀未経産) (90日齢, n = 10)	KBG製剤1%含有餌投与(60日間)	子宮腺筋症発症率、子宮チミジル酸合成酵素活性(↓)
薬物相互作用	間瀬ら ¹⁷⁾	SDラット(♂) (6週齢, n = 6~8)	KBG原末2.0g/kg単回経口投与	ワルファリンの抗凝固作用に影響なし

Ach: アセチルコリン, XOD: キサンチンオキシダーゼ

【参考文献】

- 1) Kasahara Y, et al.: Effects of Keishi-bukuryo-gan (Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan) on endothelial function in spontaneously hypertensive rats. J Trad Med 18: 113-118, 2001
- 2) 横瀬友好 ほか: 桂枝茯苓丸の高血圧自然発症ラットにおける血圧、交感神経系、内分泌系及び免疫系に及ぼす影響. 日大医誌 61: 435-441, 2002
- 3) Li T-J, et al.: Protective Effects of Guizhi-Fuling-Capsules on rat brain ischemia/reperfusion injury. J Pharmacol Sci 105: 34-40, 2007
- 4) Iwaoka E, et al.: Development of an in vivo assay method for evaluation of "oketsu" using hen-egg white lysozyme(HEL)-induced blood flow decrease. J Trad Med 26: 97-103, 2009
- 5) 沼口佳世 ほか: 拘束ストレス誘発性脳血モデルに対する桂枝茯苓丸の影響. 薬理と治療 40: 473-479, 2012
- 6) 左雨秀治: 幼若正常ならびに成熟オス雌ラットに対する生薬薏苡仁を含む漢方薬の基礎的研究. 和漢医薬学雑誌 14: 59-65, 1997
- 7) 武田大輔 ほか: 実験的冷血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: 259-262, 2000
- 8) Noguchi M, et al.: Effects of the Japanese herbal medicine Keishi-bukuryo-gan and 17β-estradiol on calcitonin gene-related peptide-induced elevation of skin temperature in ovariectomized rats. J Endocrinol 176: 359-366, 2003
- 9) 森元康夫 ほか: ヨヒンビン投与卵巣摘出ラットにおけるホットフラッシュ様症状に対するエストロゲン及び桂枝茯苓丸の作用. Yakugaku Zasshi 131: 1241-1250, 2011
- 10) 譲原光利 ほか: GnRHアナログを処置した雄性ラットのCGRP誘発皮膚温上昇に対する桂枝茯苓丸の抑制作用. 日東医誌 54: 791-795, 2003
- 11) Noguchi M, et al.: Skin temperature rise induced by calcitonin gene-related peptide in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated female rats and alleviation by Keishi-bukuryogan, a Japanese herbal medicine. Life Sciences 76: 2079-2090, 2005
- 12) Norimoto H, et al.: Effects of keishibukuryoganryokayokuinin (gui-zhi-fu-ling-wan-liao-jia-yiyin) on the epidermal pigment cells from DBA/2 mice exposed to ultraviolet B (UVB) and/or progesterone. Yakugaku Zasshi 131: 1613-1619, 2011
- 13) 金井成好 ほか: 実験的冷血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
- 14) Nozaki K, et al.: Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats. Biol Pharm Bull 30: 1042-1047, 2007
- 15) 王 程 ほか: 活血化癥經典方剤対小鼠大腸癌肝轉移模型端粒酶及p53, c-erbB-2, Bcl-2基因表达的影响, 第一军医大学学报. 24: 758-760, 2004
- 16) 左雨秀治 ほか: マウス子宮腺筋症および乳癌に与える桂枝茯苓丸の影響. 産婦人科漢方研究のあゆみ 24: 114-117, 2007
- 17) 間瀬明人 ほか: 各種漢方薬がwarfarinの抗凝固作用に及ぼす影響. 医薬品相互作用研究 25: 3-8, 2001