原著

マウス脳内モノアミン関連物質に及ぼす
柴胡加竜骨牡蛎湯の影響伊藤 忠信 村井 繁夫 斉藤 弘子 伊藤 真紀
小田島潤一¹⁾ 道尻 誠助²⁾ 橋本 信孝³⁾Effect of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on the Monoamine-Related
Substances in Several Regions of Mouse BrainTadanobu ITO Shigeo MURAI Hiroko SAITO Maki ITO
Junichi ODASHIMA¹⁾ Seisuke MICHIJIRI²⁾ Nobutaka HASHIMOTO³⁾

- 1) M. D., Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27, Chuodori, Morioka-shi, Iwate 020, Japan
2) Pharmacist, Department of Hospital Pharmacy, Takko Town Hospital, Aomori
3) Pharmacist, Hachinohe Red Cross Blood Center, Aomori

We studied the effect of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to (crude extract powder for research purposes) on central monoamine-related substances in mice. The formulation was given in a dose of 50mg/kg or 400mg/kg and was administered once or repeatedly (twice a day for seven days). The brain was removed and segmented in the conventional method. The monoamine-related substances were measured by a method using HPLC-ECD. The main results were as follows. The single or repeated administration of 50mg/kg increased DOPAC and HVA contents in the cerebral cortex. In the hypothalamus, the single 50mg/kg treatment decreased NE, and the repeated 50mg/kg treatment decreased NE but increased DOPA. In the corpus striatum, the single 50mg/kg administration increased DA, DOPAC, HVA, and 5-HIAA while the repeated administration increased NE and MHPG as well. In this region, the single 400mg/kg treatment increased NE and 5-HIAA, and the repeated treatment increased NE. In the hippocampus, the repeated 50mg/kg treatment increased MHPG, and the repeated 400mg/kg treatment decreased HVA. These results indicate that the effect of this formulation on murine brain monoamines is greater at 50mg/kg than at 400 mg/kg and that the effect varies among the regions of the brain.

Nihon Toyo Igaku Zasshi (Japanese Journal of Oriental Medicine), 45, 97-106, 1994
(accepted 17 Dec. 1993)

はじめに

柴胡加竜骨牡蛎湯は漢方療法において、その有

用性が示されている¹⁾⁻³⁾が、西洋医学的立場から、本薬方がどのような疾患に有効であるかは未だ明らかにされていない。

- 1) 医, 岩手医科大学歯学部薬理学教室, 岩手, 〒020 盛岡市中央通り1-3-27, 2) 薬, 田子町立病院薬局, 青森, 3) 薬, 八戸赤十字血液センター, 青森
[1993年12月17日受理]

著者らは、柴胡加竜骨牡蛎湯の神経・精神症状⁸⁾⁷⁾に及ぼす影響を明らかにするため、実験薬理学的立場から検討を進めている。最近、柴胡加竜骨牡蛎湯がてんかん様痙攣発作を有する患者の症状改善に有用であることが報告され⁸⁾⁹⁾、著者らもマウスにおける実験的誘発痙攣にたいして、本薬方が軽度抑制作用を示すことを報告した¹⁰⁾。さらに、著者らはマウスにおける行動薬理学的研究¹¹⁾ならびに中枢セロトニン関連物質に及ぼす影響の研究¹²⁾において、本薬方が動物側の身体的機能状態の如何によって作用効果が異なることを示唆した。

今回は、柴胡加竜骨牡蛎湯の中枢モノアミン関連物質に及ぼす影響について、マウスを用いて検討した。

方 法

1) 実験動物

実験には ddY 系雄性マウス (実験開始時、生後 5 週齢、体重 22~25g) を 1 群 8 匹として用いた。マウスは室温 25±1℃、湿度 55~65% の 12 時間明暗サイクル (明期; 7:00~19:00, 暗期; 19:00~7:00) の部屋で飼育し、餌と水は自由に摂取させた。

2) 被検薬と投与量

柴胡加竜骨牡蛎湯は株式会社ツムラより提供された研究用エキス原末 (以下柴竜と略す, Lot. No. 890012001p1) である。柴竜の投与量の算定は、通常ヒトで用いられている本薬方の一日当たりの複合生薬 (柴胡 5.0g, 半夏 4.0g, 桂皮 3.0g, 茯苓 3.0g, 黄芩 2.5g, 大棗 2.5g, 人參 2.5g, 牡蛎 2.5g, 竜骨 2.5g, 生姜 1.0g) からの粗エキス量の収率 (凡そ 10%) を基準にして行った。すなわち、ヒト (平均体重 60kg として) での一日量をマウスには一回当たりの投与量とし、本研究においてはその量を 50mg/kg とした。また、大量投与ではその 8 倍の 400mg/kg を選定した。

柴竜は 0.5% carboxymethyl-cellulose 溶液に懸濁し、その投与量 (50mg/kg および 400mg/kg) がマウス体重 10g 当たり 0.05ml の割合になるように調整して、経口的に単回または反復 (午前と午

後の 1 日 2 回, 7 日間) 投与した。対照群には溶媒を等量投与した。マウスの屠殺は、被検薬投与終了 2 時間後に、マイクロウェーブ照射装置 (TMW-6402C, Toshiba) を用いて 5 KW, 0.6 sec. の条件で行った。

3) 脳分割

マイクロウェーブ照射による屠殺後、全脳を摘出した。その後、脳組織は Glowinski and Iversen 法¹³⁾の変法により、氷上で大脳皮質、視床下部、線条体、海馬の 4 部位に分割、摘出した。摘出脳組織は秤量後、抽出まで -80℃ で凍結保存した。

4) 測定試料の作製

脳組織は 0.1mM EDTA を含む 0.1M perchloric acid 溶液中で超音波破碎、遠心分離 (12,000 g×10min, 4℃) 後、0.45μm フィルターで濾過した上清を -80℃ で測定時まで凍結保存した。

5) モノアミンおよびその関連物質含量の測定条件

Norepinephrine (NE), 3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol (MHPG), dopamine (DA), 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) 含量の測定は、HPLC-ECD を用いる Murai らの方法¹⁴⁾により行った。使用したクロマトグラフの条件と機器は、以下の通りである。

HPLC ポンプ (L-5000, 柳本), 分析カラム (MA-ODS, エイコム), ECD (VMD-501, 柳本), グラッシーカーボン電極 (WE-3G, エイコム+0.8V), インテグレイター (C-R6A, 島津), カラム温度調整用ヒーター (UC-65, 東京理科機械), 16% methanol, 0.033% sodium heptane-sulfonate, 0.1mM EDTA を含む 0.02M sodium acetate/0.0125M citrate 緩衝液 (pH3.92, 流速 2.5ml/分, 30℃)。

6) 試薬類

NE bitartrate, 5-HT creatinine sulfate は和光純薬より; DA hydrochloride, EDTA disodium salt は関東化学より; HVA, MHPG hemipiperazine salt は Sigma 社より; DOPAC, 5-HIAA,

図1 マウス大脳皮質のモノアミン関連物質含量に及ぼす柴竜の影響

柴竜は0.5% caboxymethyl-cellulose 溶液に懸濁し、50mg/kg または400mg/kg の割合で経口的に単回(A), または1日2回7日間反復(B)投与した。得られた結果(平均値±標準誤差)は対照群に対する割合で示した。

NE: norepinephrine (対照群 372.0 ± 13.0 ng/g 組織重量), MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (対照群 37.0 ± 1.0), DA: dopamine (対照群 708.0 ± 35.0 nmol/g), DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (対照群 88.0 ± 5.0), HVA: homovanillic acid (対照群 187.0 ± 13.0), 5-HT: serotonin (対照群 698.0 ± 16.0), 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid (対照群 180.0 ± 6.0)

heptanesulfonate sodium salt は Aldrich 社より購入した。その他の試薬および溶媒は、特級および HPLC 用のものを用いた。

7) 統計学的処理

それぞれの測定結果は平均値±標準誤差と対照群に対する百分率(%)で表した。結果の統計学的

図2 マウス視床下部のモノアミン関連物質含量に及ぼす柴竜の影響

柴竜は0.5% caboxymethyl-cellulose 溶液に懸濁し、50mg/kg または400mg/kgの割合で経口的に単回(A), または1日2回7日間反復(B)投与した。得られた結果(平均値±標準誤差)は対照群に対する割合で示した。

NE: norepinephrine (対照群 $1673.0 \pm 1.8 \text{ ng/g}$ 組織重量), MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (対照群 109.0 ± 3.0), DA: dopamine (対照群 537.0 ± 29.0), DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (対照群 138.0 ± 5.0), HVA: homovanillic acid (対照群 216.0 ± 12.0), 5-HT: serotonin (対照群 1728.0 ± 37.0), 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid (対照群 572.0 ± 15.0)

有意性は一元配置分散分析法と Dunnett の t 検定を用いて判定した。

結 果

1. 大脳皮質におけるモノアミン関連物質含量

図3 マウス線条体のモノアミン関連物質含量に及ぼす柴竜の影響

柴竜は0.5% caboxymethyl-cellulose 溶液に懸濁し、50mg/kg または400mg/kg の割合で経口的に単回(A), または1日2回7日間反復(B)投与した。得られた結果(平均値±標準誤差)は対照群に対する割合で示した。

NE: norepinephrine (対照群 199.0 ± 6.0 ng/g 組織重量), MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (対照群 37.0 ± 1.0), DA: dopamine (対照群 9465.0 ± 191.0), DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (対照群 523.0 ± 8.0), HVA: homovanillic acid (対照群 904.0 ± 22.0), 5-HT: serotonin (対照群 631.0 ± 13.0), 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid (対照群 369.0 ± 12.0)

の変化

1) 単回投与

単回投与では、図1 Aに示すように、柴竜の50

mg/kg 投与群の DOPAC と HVA 含量のみが対照群より有意な増大を示したが、400mg/kg 投与群では影響は認められなかった。

図4 マウス海馬のモノアミン関連物質含量に及ぼす柴竜の影響

柴竜は0.5% caboxymethyl-cellulose 溶液に懸濁し、50mg/kg または400mg/kg の割合で経口的に単回(A), または1日2回7日間反復(B)投与した。得られた結果(平均値±標準誤差)は対照群に対する割合で示した。

NE: norepinephrine (対照群 406.0 ± 7.0 ng/g 組織重量), MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (対照群 25.0 ± 1.0), DA: dopamime (対照群 63.0 ± 3.0), DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (対照群 13.0 ± 1.0), HVA: homovanillic acid (対照群 28.0 ± 1.0), 5-HT: serotonin (対照群 551.0 ± 17.0), 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid (対照群 268.0 ± 9.0)

2) 反復投与

反復投与では、単回投与の場合と同様に、柴竜の50mg/kg 投与群の DOPAC と HVA 含量の

みが対照群より有意な増大を示し、その他では影響は認められなかった(図1B)。

2. 視床下部におけるモノアミン関連物質含量

表 1 柴竜によるマウス脳内モノアミン関連物質の変動

	50mg/kg		400mg/kg	
	単回投与	反復投与	単回投与	反復投与
大脳皮質	DOPAC ↑ HVA ↑	DOPAC ↑ HVA ↑		
視床下部	NE ↓	NE ↓ DOPAC ↑		
線 条 体	DA ↑ DOPAC ↑ HVA ↑ 5-HIAA ↑	NE ↑ MHPG ↑ DA ↑ DOPAC ↑ HVA ↑ 5-HIAA ↑	NE ↑ 5-HIAA ↑	NE ↑
海 馬		MHPG ↑		HVA ↓

柴竜は経口的に単回または反復（1日2回，7日間）投与した。投与終了2時間後にマイクロウェーブ照射装置を用いてマウスを屠殺した。常法に従って脳組織を摘出し，モノアミン関連物質の測定は HPLC-ECD を用いる方法で行った。

↑：含量の増大を示す，↓：含量の低下を示す。

NE: norepinephrine, MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol,

DA: dopamine, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid.

HVA: homovanillic acid, 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid.

の変化

1) 単回投与

単回投与では、図 2 A に示すように、柴竜の 50 mg/kg 投与群の NE 含量のみが対照群よりも有意な低下を示したが、400mg/kg 投与群では影響は認められなかった。

2) 反復投与

反復投与では、柴竜の 50mg/kg 投与群の NE 含量の有意な低下と DOPAC 含量の有意な増大が認められたが、400mg/kg 投与群では影響は認められなかった（図 2 B）。

3. 線条体におけるモノアミン関連物質含量の変化

1) 単回投与

図 3 A に示すように、柴竜 50mg/kg の単回投与群では DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA 含量が；400mg/kg 投与群では NE と 5-HIAA 含量が対照群より有意な増大を示した。しかし、その他のモノアミン関連物質含量には影響は認められな

った。

2) 反復投与

図 3 B に示すように、柴竜 50mg/kg の反復投与群では NE, MHPG, DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA 含量が；400mg/kg 投与群では NE 含量が対照群より有意な増大を示したが、その他のモノアミン関連物質含量には影響は認められなかった。

4. 海馬におけるモノアミン関連物質含量の変化

1) 単回投与

柴竜 50mg/kg および 400mg/kg の単回投与群ともモノアミン関連物質含量には影響は認められなかった（図 4 A）。

2) 反復投与

反復投与では、柴竜の 50mg/kg 投与群の MHPG 含量の有意な増大と、400mg/kg 投与群の HVA 含量の有意な低下が認められた（図 4 B）。

考 察

本研究において、マウスの大脳皮質、視床下部、線条体、海馬のモノアミン関連物質含量に及ぼす柴竜の影響について検討した。主な結果は表1に示す。

柴竜400mg/kgは脳内モノアミン関連物質含量には殆ど影響を及ぼさないが、50mg/kgでは明らかに強い効果が認められた。したがって、柴竜の大量投与では作用効果が弱く、少量で強い効果を示したことは、柴竜の脳内モノアミン関連物質含量への影響がベル型効果の可能性を示唆しているかも知れない。

柴竜50mg/kg投与群において、大脳皮質および線条体のDA、NEおよび5-HT代謝は増大し、しかも脳部位に依存した変化を示した。すなわち、5-HT代謝物質の含量は、線条体において有意な増大を示したことから、5-HT神経系の機能亢進が考えられる。このことは、伊藤ら¹²⁾や平松ら¹⁵⁾の実験では認められていないことである。次に、DA代謝物質の含量は、大脳皮質や線条体において有意な増大を示したことから、この部位のDA神経系の機能亢進が考えられ、視床下部や海馬ではそのような効果は弱いものであった。また、NE含量は、視床下部において有意な減少を示したことから、NE神経系の機能低下が考えられる。一方、線条体においてはNE含量の有意な増大を示したことから、NE神経系の機能亢進が考えられる。

従来、脳内モノアミン神経系の活性が抑制されると痙攣の閾値は低下するが、反対に、その活性が促進されると痙攣の閾値は上昇することが知られている^{16)~18)}。したがって、痙攣発作時には脳内のDA含量やNE含量が減少していることが考えられる。このことは脳内のNE、DAや5-HT含量の減少時には、痙攣発作の発現が有意に促進され、これに対して、脳内のNE含量が増大している時には、痙攣発作の進展が減弱されることが報告¹⁹⁾²⁰⁾されていることから支持される。それ故に、脳内モノアミン、特にNEが痙攣発作の準備状態やその進展を修飾する要因の一つである¹⁷⁾

と考えられる。

先の著者ら¹⁰⁾のマウスにおける実験的誘発痙攣の実験において、柴竜が軽度抑制作用を示したこと、また今回の実験において、柴竜がマウスの大脳皮質や線条体においてDA代謝物質であるDOPACやHVA含量ならびにNE含量を増大させたことから、柴竜の抗痙攣作用には柴竜によるDA神経系やNE神経系の亢進が関与しているものと考えられる。

次に、中枢NE神経系²¹⁾や5-HT神経系²²⁾の機能亢進が学習や記憶を促進し、アルツハイマー型痴呆患者²³⁾や老人性痴呆患者²⁴⁾の脳ではNE、MHPG、5-HTおよび5-HIAA含量の減少が報告されている。本実験において、学習や記憶の形成と深い関係にあるとされている海馬において、NE神経系が亢進(MHPG含量の増大)を示したことは興味深い。

平松ら¹⁵⁾は柴竜が大脳皮質や線条体のDA含量やNE含量には影響を与えなく、大脳皮質の5-HT含量を増大させたことを報告している。本実験では、柴竜が大脳皮質や線条体のDA含量やNE含量を増大し、線条体の5-HT含量も増大を示したが、平松らの結果と一致しない。この相違は実験方法や測定方法の違いによるものと考えられる。

本実験の結果から、柴竜は脳内モノアミン神経系に対して、脳部位に依存した変化を示すことが明らかになった。このような知見は、柴竜の漢方療法における使用目標の一つである動悸、不眠、イライラなどの神経・精神症状に及ぼす影響を説明するのに役立つかも知れない。しかしながら、柴竜は脳内モノアミン関連物質のほかに、アセチルコリン、グルタミン、GABAなど多くの脳内神経伝達物質にも影響を及ぼす可能性が考えられることから、さらなる検討が必要である。

まとめ

柴胡加竜骨牡蛎湯(柴竜)の中枢モノアミン関連物質に及ぼす影響について、マウスを用いて検討した。その結果、柴竜は大脳皮質のDA代謝物質含量の増大；線条体のNE、DAおよび5-HT代謝物質含量の増大；視床下部のNE含量の減少

を引き起こし、脳部位に依存したモノアミン含量の変化を示した。以上のことから、柴竜はマウス脳内モノアミン神経系の活性に影響を及ぼし、その効果は部位によって異なることが示唆される。

稿を終えるにあたり、柴胡加竜骨牡蛎湯エキス原末を提供して下さいました株式会社ツムラに感謝いたします。

文 献

- 1) 大塚敬節：柴胡加竜骨牡蛎湯方に就いて、漢方と漢薬, **1**(7), 1-8, 1934
- 2) 山田光胤：漢方処方の鑑別(19), 柴胡加竜骨牡蛎湯と鑑別を要する 処方, 薬局, **15**(1), 93-98, 1964
- 3) 矢数道明：柴胡加竜骨牡蛎湯の運用について, 日本東洋医学会誌, **3**(1), 9-16, 1977
- 4) 大塚敬節：傷寒論解説, p.279-232, 創元社, 1984
- 5) 大塚敬節：漢方治療三十年, p.158, 創元社, 1989
- 6) 坂井昭夫：精神科における柴胡加竜骨牡蛎湯の使用経験, 漢方医学, **9**(9), 20-27, 1985
- 7) 大原健士郎, 深沢裕記, 他：神経症に対する柴胡加竜骨牡蛎湯, 半夏厚朴湯の臨床効果について, 新薬と臨床, **34**(1), 131-141, 1985
- 8) 鶴田光敏：難治性てんかんの漢方治療, 現代東洋医学, 臨増, **10**(1), 230-231, 1989
- 9) 岡田 保：薬剤師からみたテンカン患者の漢方薬服用についての一考察, 医薬ジャーナル, **25**(2), 325-332, 1989
- 10) 伊藤忠信, 道尻誠助, 他：実験的誘発痙攣に対する柴胡加竜骨牡蛎湯の効果, 漢方と最新治療, **1**(3), 274-278, 1992
- 11) 伊藤忠信, 金 恩瑕, 他：マウスにおける回転カゴ運動の概日性変動に及ぼす柴胡加竜骨牡蛎湯および抑肝散の影響, 和漢医薬学会誌, **12**(2), 357-364, 1985
- 12) 伊藤忠信：柴胡加竜骨牡蛎湯および加味逍遙散の中樞 serotonin 関連物質に及ぼす影響, 漢方医学, **10**(9), 14-19, 1986
- 13) Glowinski, J. and Iversen, L. L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655-669, 1966
- 14) Murai, S., Saito, H., et al.: Rapid determination of norepinephrine, dopamine, serotonin, their precursor amino acids, and related metabolites in discrete brain areas of mice within ten minutes by HPLC with electrochemical detection. *J. Neurochem.*, **50**, 473-479, 1988
- 15) 平松 緑, 新谷祐子, 他：柴胡加竜骨牡蛎湯の脳内カテコールアミンおよびセロトニンに及ぼす効果, 基礎と臨床, **14**(14)4591-4593, 1980
- 16) 原 俊夫, 平井富雄, 他：てんかんの臨床と理論, 医学書院, p.586-598, 1974
- 17) 森 昭胤, 小林清史：てんかんの物質的背景, 痙攣と生体アミン; 秋元波留夫(監修), てんかん研究の進歩, 第2集, 東京医学社, p.231-238, 1979
- 18) 佐藤光源：辺縁系発作と脳カテコラミン—特に脳ドーパミンニューロン系の関与について—; 秋元波留夫(監修), てんかん研究の進歩, 第2集, 東京医学社, p.253-271, 1979
- 19) Gray, W. D. and Rauh, C. E.: The anticonvulsant action of inhibitors of carbonic anhydrase.: relation to endogenous amines in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **155**, 127-134, 1967
- 20) Arnold, P. S., Racine, R. J., et al.: Effects of atropine, reserpine, 6-hydroxydopamine, and handling on seizure development in the rat. *Exp. Neurol.*, **40**, 457-470, 1973
- 21) Archer, T. I., Ogren, S. O., et al.: DSP 4-induced twoway active avoidance impairment in rats: involvement of central and not peripheral noradrenaline depletion. *Psychopharmacology(Berlin)*, **76**, 303-309, 1982
- 22) 江川三生, 江口富夫, 他：4-(α -Benzylhenoxy)-N-methyl-butylamine hydrochloride (MCI-2016) の脳内 monoamine 動態に対する作用, 日薬理誌, **82**(5), 351-360, 1983
- 23) Arai, H., Hosaka, K., et al.: Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *J. Neurochem.*, **42**, 388-393, 1984
- 24) Gotfries, C. G., Adolfsson, R., et al.: Biochemical changes in dementia disorders of Alzheimer type (AD/SDAT). *Neurobiol. Aging*, **4**, 261-272, 1983

要旨 柴胡加竜骨牡蛎湯(研究用エキス原末; 以下柴竜と略す)の中樞モノアミン関連物質に及ぼす影響について, マウスを用いて検討した。柴竜は50mg/kg または400mg/kg を経口

的に単回または反復（1日2回，7日間）投与した。脳の摘出，分割は常法に従って行い，モノアミン関連物質の測定は HPLC-ECD を用いる方法で行った。主な結果は，次の通りである。

大脳皮質では，50mg/kg の単回および反復投与で DOPAC，HVA 含量の増大；視床下部では，50mg/kg の単回投与で NE 含量の減少，反復投与で NE 含量の減少と DOPAC 含量の増大；線条体では，50mg/kg の単回投与で DA，DOPAC，HVA，5-HIAA 含量の増大，反復投与ではそのほかに NE，MHPG 含量の増大，400mg/kg の単回投与で NE，5-HIAA 含量の増大と反復投与で NE 含量の増大；海馬では，50mg/kg の反復投与で MHPG 含量の増大，400mg/kg の反復投与で HVA の減少が認められた。以上のことから，柴竜は400mg/kg よりも50mg/kg 投与のほうがマウス脳内モノアミン含量への影響が強く，その効果は脳部位によって異なることが示唆される。