

小柴胡湯のF344ラットによる13週間毒性試験

坂本 義光*, 多田 幸恵*, 田山 邦昭*, 長澤 明道*
福森 信隆*, 矢野 範男*, 湯澤 勝廣*, 池田 虎雄*
高橋 博*, 青木 直人*, 小縣 昭夫

Toxicity Test of Sho-saiko-to in F344 Rats by Dietary Administration for 13 Weeks

Yoshimitsu SAKAMOTO*, Yukie TADA*, Kuniaki TAYAMA*, Akemichi NAGASAWA*
Nobutaka FUKUMORI*, Norio YANO*, Katsuhiko YUZAWA*, Torao IKEDA*
Hiroshi TAKAHASHI*, Naoto AOKI* and Akio OGATA*

Groups of F344 rats, each consisting of 10 male and 10 female rats, were fed a pelleted diet containing Sho-saiko-to (SST), a Chinese medicine, at concentrations of 0 (control), 0.2, 0.8 and 3.2% for 13 weeks. The dose of 0.2% Sho-saiko-to corresponds to the therapeutic dose for humans. No animals died during the experimental period in any groups of either sex. There were no dose-related changes in body weight, food intake or water consumption in the male or female rats. Changes indicating obvious toxicity of SST were not observed in organ weights or in hematological and serum biochemical examinations. Histologically, there were no dose-related changes in any treated groups. Under the experimental conditions of this study, there were no adverse effects of Sho-saiko-to on the male and female rats.

Keywords : 漢方薬 Chinese medicine, 小柴胡湯 Sho-saiko-to(Xiao-Jian-Hu-Tang), 13週間投与試験 13 week feeding test, ラット rats

緒 言

小柴胡湯 (Sho-saiko-to; Xiao-Jian-Hu-Tang, 以下SST) は7種類の生薬から構成されている漢方方剤である。はきけ, 食欲不振, 胃炎, 疲労感及びかぜの後期の症状の改善に効果があり, 臨床的に諸種の急性熱性病, 肺炎, 感冒などの補助療法, 慢性胃腸障害, 肝機能障害等に应用されている^{1, 2)}。実験的に肝障害抑制作用³⁾, 抗炎症作用⁴⁾, 免疫機能亢進作用^{5, 6)}, 及び肝癌細胞の増殖抑制作用^{7, 8)}などが報告されている。しかし副作用として間質性肺炎⁹⁾が起こることが知られており, また毒性学的な評価については報告^{10, 11)}は少なく, 安全性に関する基礎的資料としての情報は充分ではない。著者らは当所東洋医学プロジェクト研究 (漢方方剤・生薬の品質および生体作用に関する研究: 平成7 - 11年度) の分担研究として, これまでに六味丸^{12, 13)}, 十全大補湯^{14, 15)}をとりあげ, ラット等の実験動物を用い漢方方剤の安全性及び有効性について検討した結果を報告してきた。今回はこのプロジェクト研究の一環として, 小柴胡湯 (SST) の安全性評価のための基礎データを得る目的で行ったラットによる13週間投与試験の結果を報告する。

実験材料および方法

被験物質及び動物 : 小柴胡湯エキス末 (株ツムラ製) は柴胡7, 半夏5, 黄芩, 大棗, 人参各3, 甘草2, 生姜1の配合率で乳糖の含まれていないものを用いた。動物はF344/DuCrjラット, 雌雄, 4週齢を日本チャ-ルスリバ- (株)より購入し, 実験環境への順化と一般状態の観察を目的として1週間予備飼育を行った後実験に用いた。動物はバリヤ-飼育施設内の, ベルト式架台に設置した懸下式ステンレス製ケ-ジに個別に収容して飼育した。実験期間中飼料及び水 (ろ過滅菌器経由水道水) を自由に摂取させた。飼育室内環境は温度22-24℃, 湿度50-60%, 換気1時間に10回 (効率99.9%HEPAフィルタ-経由) に設定されている。

試験及び検査方法 : 被験物質はいずれも基礎飼料としての粉末飼料CE-2 (日本クレア製) に添加し固形飼料として動物に摂取させた。小柴胡湯の濃度は0.2, 0.8, 3.2%とした。飼料中濃度0.2%はヒトの1日薬用量である4.5 g/50 kg体重 (90 mg/kg体重) に相当する。投与はラットが5週齢になった時点から13週間行った。実験期間中の一般状態の観察, 体重及び摂餌・摂水量の測定は投与開始週より毎週1回行った。投与終了後, 動物はエ-テル麻酔下で大腿動静脈よ

* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

り採血し、瀉血後剖検した。採取した血液について、Coulter Model S-Plus IV (Coulter Electric INC) を用い8項目 (Table 2) について血液学的検査を行った。また採取した血液から調製した血清についてAutomatic Analyzer 705を用い12項目 (Table 3) について血清生化学的検査を行った。解剖は終了時屠殺例のすべてについて行ない、秤量臓器 (Table 4) の他、唾液腺、甲状腺及び副甲状腺、気管、縦隔、食道、胃、小腸及び大腸、脾臓、精巣上体、精囊、膀胱、大腿骨、骨格筋について10%緩衝ホルマリン固定後、パラフィン包埋切片を作製しHE染色を行なった。

統計学的分析: 体重、血液学的検査、血清学的検査及び臓器重量の検定はBartlett検定を用い、分散の均一性について検定し、分散が一樣であれば一元分散分析及びSheffeの多重比較検定を行った。また分散が非一樣であればKruskal-Wallis検定及びSheffe型の順位和検定を行った。危険率はすべて5%においた。

結 果

一般状態および生存率: 対照群および各投与群ともに投与期間中異常行動や外観の異常は認められず、投与終了時いずれも全例が生存した。

体重: Fig. 1 に示すように投与期間中の雌雄の各投与群の体重増加推移は各対照群と同様であった。また投与終了時の体重はTable 1 に示すように雌雄ともに対照群と各投与群で差はなかった。

摂餌量及び被験物質摂取量: 投与群の実験期間を通しての摂餌量の推移をFig. 2 に示した。雌雄ともに対照群と顕著な差はなかった。各週の摂餌量から求めた平均摂餌量はTable 1 に示すように雌雄ともに対照群と投与群で有意な差はなかった。各週の摂餌量から求めた被験物質摂取量の試験期間を通しての平均摂取量はTable 1 に示すように設定した用量に対応しており、3.2%群では雄で2019、雌で2104 mg/kg/dayであった。

摂水量: 各投与週における投与群の摂水量は対照群と差がなかった。

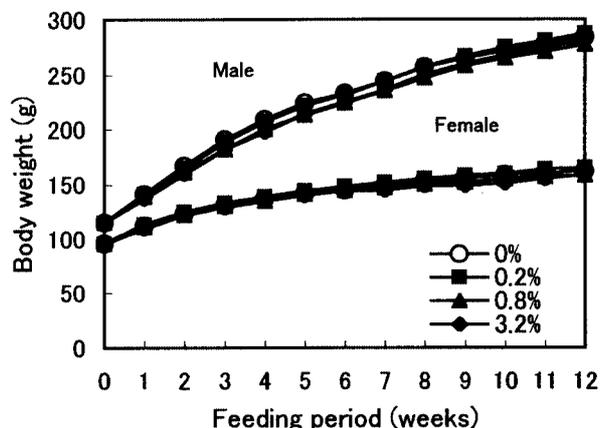


Fig.1 Mean body weight changes of rats fed Sho-saiko-to in diet for 13 weeks

血液学的検査: Table 2 に示すように、各測定項目に小柴胡湯投与と関連した変化は見られなかった。

血清生化学的検査: 雌雄の結果をTable 3 に示した。雄0.8%群でカリウム (K) 値の有意な増加が見られた他は各投与群の値はいずれも対照群と差はなかった。

臓器重量: 雌雄の臓器重量をTable 4 に示した。各投与群におけるいずれの臓器重量も対照群と比べ差はなかった。

組織学的検査: 各臓器に小柴胡湯投与に特徴的な組織変化は見られなかった。対照群と投与群に共通した変化として雄では腎の尿細管上皮内の好酸体の出現及び尿細管上皮の好塩基化、雌では腎皮随境界部の鉍質沈着がいずれもほぼ全例に極く軽度な変化として認められた。そのほか雌雄に共通して肝の細胞浸潤、心筋変性が散見された。以上の変化の頻度や程度は各群間で差はなかった。

考 察

漢方方剤である小柴胡湯の0.2、0.8及び3.2%添加飼料による13週間投与と試験を行った。今回の実験における投与量は成人 (体重50 kg) の1日薬用量に比べて雄で1.3~22.4倍、雌で1.3~23.4倍に相当している。また摂餌量に変化がないことから、各投与群の動物は設定濃度を反映した小柴胡湯量を摂取しており、今回の試験はヒトの薬用量から極量までの広い範囲における小柴胡湯の作用を十分に観察できる条件を満足していたと考えられる。

今回の実験では投与期間を通して、いずれの投与群においても一般症状の異常、死亡例及び体重の変化もなく、動物の発育は対照群と同様良好であり、また各検査結果にも投与による明らかな異常は認められなかった。血清生化学的検査で雄0.8%群でカリウム (K) 値の増加が見られたが投与との関連はなく偶発的な変化と考えられた。また組織学的に対照群と投与群に共通して腎、肝、心の各臓器に軽度な変化が見られたがいずれも自然発生病^{16, 17)}として知られている変化であり、また当所で行った同様な実験においても、対照群にも観察されている変化であった^{14, 18)}。またこれらの組織変化の頻度や程度には各群間で差がない

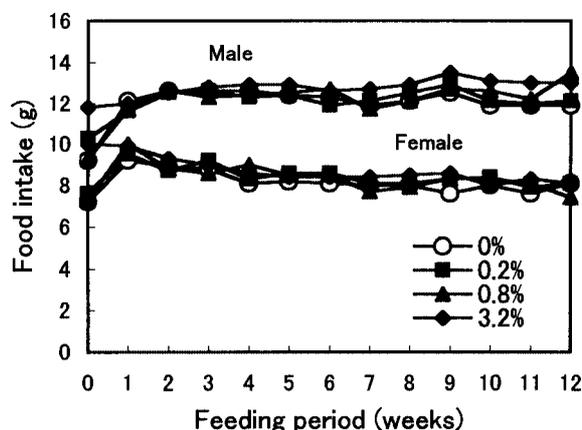


Fig.2 Mean food intake of rats fed Sho-saiko-to in diet for 13 weeks

Table 1. Survival, Body Weight, Intake of Diet and Sho-saiko-to (SST) in Rats Fed Sho-saiko-to in Diet for 13 Weeks

Dose level (%) ^{a)}	Survival	Body weight(g)		Mean food intake	SST intake
		Initial	final	(g/rat/day)	(mg/kgBW/day)
Male					
0 (control)	10/10 ^{b)}	115 ± 5 ^{c)}	286 ± 13	12.0 ± 0.9	0
0.2	10/10	115 ± 6	290 ± 19	12.1 ± 0.6	116.3
0.8	10/10	115 ± 5	280 ± 14	12.2 ± 1.0	477.7
3.2	10/10	115 ± 5	286 ± 19	12.7 ± 0.5	2019.4
Female					
0 (control)	10/10	96 ± 4	163 ± 11	8.1 ± 0.5	0
0.2	10/10	96 ± 3	165 ± 7	8.4 ± 0.5	121.2
0.8	10/10	96 ± 3	159 ± 12	8.3 ± 0.7	472.0
3.2	10/10	96 ± 3	158 ± 15	8.7 ± 0.6	2104.1

a) % of Sho-saiko-to in the diet. b) initial number/number at autopsy. c) mean ± SD

Table 2. Hematological Examination in Rats Fed Sho-saiko-to in Diet for 13 weeks

Parameters	Dose level(%) ^{a)}			
	0 (Control)	0.2	0.8	3.2
Male				
	10 ^{b)}	10	10	10
WBC × 10 ³	6.9 ± 0.7 ^{c)}	6.8 ± 0.8	6.8 ± 0.8	6.7 ± 1.3
RBC × 10 ⁶	9.96 ± 0.15	9.87 ± 0.34	9.97 ± 0.20	9.91 ± 0.23
Hgb gm	16.8 ± 0.3	16.6 ± 0.5	16.7 ± 0.3	16.7 ± 0.3
Hct %	49.6 ± 0.7	49.2 ± 1.5	49.7 ± 0.8	49.3 ± 0.9
MCV μ ³	49.8 ± 0.4	49.9 ± 0.6	49.8 ± 0.6	49.7 ± 0.4
MCH μμg	16.9 ± 0.3	16.8 ± 0.4	16.8 ± 0.3	16.8 ± 0.4
MCHC %	33.9 ± 0.5	33.7 ± 0.4	33.7 ± 0.4	33.8 ± 0.7
PLT × 10 ³	669 ± 46	654 ± 22	688 ± 51	637 ± 81
Female				
	10	10	10	10
WBC × 10 ³	5.8 ± 1.1	5.9 ± 0.9	5.6 ± 0.6	5.8 ± 1.0
RBC × 10 ⁶	9.23 ± 0.27	9.13 ± 0.22	9.07 ± 0.18	9.16 ± 0.17
Hgb gm	16.5 ± 0.4	16.4 ± 0.3	16.2 ± 0.3	16.3 ± 0.3
Hct %	48.4 ± 1.2	48.0 ± 1.2	47.6 ± 1.0	48.1 ± 0.9
MCV μ ³	52.5 ± 0.3	52.5 ± 0.2	52.5 ± 0.4	52.5 ± 0.2
MCH μμg	17.9 ± 0.4	18.0 ± 0.3	17.9 ± 0.3	17.8 ± 0.3
MCHC %	34.1 ± 0.5	34.2 ± 0.6	34.1 ± 0.4	33.8 ± 0.4
PLT × 10 ³	602 ± 83	647 ± 23	600 ± 53	624 ± 64

Abbreviation : WBC ; white blood cells, RBC ; red blood cells, Hgb ; hemoglobin Hct ; hematocrit, MCV ; mean corpuscular volume, MCH ; mean corpuscular hemoglobin, MCHC ; mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT ; platelets

a) % of Sho-saiko-to in diet. b) Number of rats examined. c) Mean ± SD

ことから、小柴胡湯は自然発生病変の発現を強める等の影響を及ぼさないものと思われる。

臨床的に小柴胡湯による間質性肺炎が起こることが知られている。小柴胡湯による肺病変の発現には、小柴胡湯成分によるアレルギー-機序が関係していると考えられている⁹⁾。今回の添加飼料による投与試験では、高濃度群においても肺への作用は認められなかったが、小柴胡湯による間質性肺炎の実験的な検討には免疫機能を考慮した実験系での試験が必要である。

以上のように添加飼料中の濃度3.2%、一日摂取量として雄2019、雌2104 mg/kg体重の用量での13週投与によって

も血液学的、血清生化学的検査及組織学的検査結果に投与と関連した変化が認められないことから、小柴胡湯の一般毒性は極めて低いものと考えられた。小柴胡湯の亜慢性毒性試験としてはラットを用いた水溶液による125, 250, 2000 mg/kg、13週間投与試験が報告されている^{10, 11)}。125及び2000 mg/kgの用量は今回の実験における0.2及び3.2%群の小柴胡湯摂取量 (Table 1) にほぼ相当するが、水溶液による投与試験においても小柴胡湯の明らかな障害作用は報告されていない。このことから小柴胡湯の無毒性量 (無影響量) は2000 mg/kg体重以上であり、通常の使用においてはその安全性は高いものと考えられる。

Table 3. Blood Biochemical Examination in Rats fed Sho-saiko-to in Deit for 13 weeks

Parameter	Dose level (%) ^{a)}			
	0 (Control)	0.2	0.8	3.2
Male	10 ^{b)}	10	10	10
ALP IU/L	536 ± 49 ^{c)}	494 ± 64	521 ± 38	516 ± 38
AMY IU/L	1656 ± 211	1624 ± 122	1676 ± 207	1585 ± 79
AST U/L	89 ± 22	85 ± 13	91 ± 24	82 ± 15
ALT U/L	50 ± 10	48 ± 9	48 ± 8	46 ± 8
ALB g/dL	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1
CHO mg/dL	62 ± 4	61 ± 4	60 ± 4	60 ± 3
CRE mg/dL	0.50 ± 0.04 0.48	± 0.05	0.49 ± 0.04	0.46 ± 0.04
TP g/dL	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.3	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.2
UN mg/dL	23.3 ± 0.9	22.2 ± 2.1	22.7 ± 1.1	21.5 ± 1.5
Na mEq/dL	139.0 ± 1.4	139.6 ± 1.1	139.5 ± 0.9	138.8 ± 0.9
K mEq/L	4.98 ± 0.22 5.08	± 0.14	5.39 ± 0.27*	5.25 ± 0.34
Cl mEq/L	99.0 ± 1.1	99.5 ± 1.5	99.7 ± 1.1	99.6 ± 0.6
Female	10	10	10	10
ALP IU/L	455 ± 37	448 ± 48	438 ± 35	442 ± 34
AMY IU/L	1098 ± 89	1102 ± 204	1039 ± 69	1051 ± 44
AST U/L	94 ± 16	94 ± 22	92 ± 19	91 ± 21
ALT U/L	46 ± 6	46 ± 7	49 ± 19	45 ± 7
ALB g/dL	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.1
CHO mg/dL	71 ± 2	70 ± 3	72 ± 2	68 ± 5
CRE mg/dL	0.49 ± 0.04	0.49 ± 0.04	0.48 ± 0.04	0.47 ± 0.02
TP g/dL	5.6 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.1
UN mg/dL	20.1 ± 1.1	20.9 ± 1.4	19.5 ± 1.0	19.6 ± 1.6
Na mEq/dL	139.2 ± 1.1	139.4 ± 2.0	139.4 ± 1.5	140.0 ± 1.3
K mEq/L	4.71 ± 0.46	4.51 ± 0.25	5.00 ± 1.17	4.61 ± 0.24
Cl mEq/L	101.6 ± 1.4	102.0 ± 1.5	102.1 ± 1.7	102.7 ± 1.4

Abbreviation : ALP ; alkaline phosphatase, AMY ; amylase, AST ; aspartate aminotransferase, ALT ; alanine aminotransferase, ALB ; albumin, CHO ; total cholesterol, CRE ; creatine, TP ; total protein, UN ; urea nitrogen, Na ; sodium, K ; potassium, Cl ; chloride

a) % of Sho-saiko-to in the diet. b) Number of rats examined. c) Mean ± SD

* : Significantly different from control (p<0.05).

Table 4. Organ Weights of Rats Fed Sho-saiko-to in Diets for 13 Weeks

Organ	Dose level(%) ^{a)}			
	0 (Control)	0.2	0.8	3.2
Male	10 ^{b)}	10	10	10
Brain(mg)	1945 ± 58 ^{c)} (681 ± 31 ^{d)}	1972 ± 51 (681 ± 36)	1954 ± 25 (699 ± 33)	1967 ± 50 (690 ± 41)
Liver(g)	9.30 ± 0.53 (3.25 ± 0.19)	9.30 ± 0.85 (3.20 ± 0.22)	9.26 ± 0.73 (3.30 ± 0.17)	9.06 ± 0.61 (3.17 ± 0.08)
Heart(mg)	796 ± 46 (278 ± 9)	796 ± 59 (274 ± 14)	798 ± 52 (285 ± 17)	799 ± 60 (280 ± 11)
R-Kidney(mg)	874 ± 35 (306 ± 11)	890 ± 50 (307 ± 10)	886 ± 45 (316 ± 11)	870 ± 53 (304 ± 6)
Spleen(mg)	554 ± 34 (194 ± 6)	598 ± 98 (206 ± 33)	547 ± 23 (195 ± 3)	556 ± 36 (195 ± 9)
R-Testis(mg)	1516 ± 68 (531 ± 19)	1494 ± 78 (516 ± 16)	1493 ± 40 (533 ± 18)	1507 ± 63 (528 ± 28)
Prostate(mg)	252 ± 50 (88 ± 15)	245 ± 73 (84 ± 22)	229 ± 42 (82 ± 14)	238 ± 37 (84 ± 13)
R-Adrenal(mg)	17.0 ± 1.5 (6.0 ± 0.5)	17.3 ± 1.2 (6.0 ± 0.6)	17.6 ± 1.4 (6.3 ± 0.4)	17.3 ± 2.2 (6.0 ± 0.7)
Thymus(mg)	153 ± 15 (54 ± 5)	158 ± 52 (55 ± 19)	173 ± 51 (62 ± 16)	151 ± 17 (53 ± 4)
Female	10	10	10	10
Brain(mg)	1828 ± 40 (1124 ± 69)	1853 ± 28 (1128 ± 51)	1827 ± 27 (1156 ± 85)	1815 ± 36 (1156 ± 105)
Liver(g)	4.89 ± 0.47 (2.99 ± 0.13)	4.87 ± 0.35 (2.96 ± 0.15)	4.73 ± 0.49 (2.98 ± 0.14)	4.78 ± 0.50 (3.02 ± 0.13)
Heart(mg)	523 ± 36 (320 ± 15)	532 ± 30 (324 ± 13)	513 ± 33 (324 ± 16)	521 ± 59 (329 ± 13)
R-Kidney(mg)	568 ± 35 (349 ± 20)	562 ± 18 (342 ± 16)	553 ± 31 (349 ± 25)	559 ± 26 (356 ± 25)
Spleen(mg)	368 ± 25 (226 ± 6)	358 ± 14 (218 ± 10)	356 ± 22 (224 ± 9)	361 ± 38 (228 ± 14)
R-Ovary(mg)	28.4 ± 4.1 (17.4 ± 2.2)	26.1 ± 4.6 (15.8 ± 2.6)	27.5 ± 2.6 (17.3 ± 0.9)	24.2 ± 3.5 (15.3 ± 1.8)
Uterus(mg)	428 ± 53 (263 ± 35)	442 ± 68 (268 ± 38)	438 ± 69 (276 ± 45)	422 ± 74 (267 ± 44)
R-Adrenal(mg)	20.8 ± 1.5 (12.8 ± 0.8)	18.8 ± 4.5 (11.4 ± 2.6)	20.1 ± 2.2 (12.7 ± 0.8)	20.1 ± 2.3 (12.7 ± 0.7)
Thymus(mg)	132 ± 14 (80.7 ± 6.0)	136 ± 13 (83.1 ± 8.6)	129 ± 11 (81.1 ± 6.3)	128 ± 19 (80.6 ± 7.1)

a) % of Sho-saiko-to in the diet. b) Number of rats examined. c) Absolute weight(mean ± SD).

d) Relative weight(mg or g/100g body weight, mean ± SD).

文 献

- 1) 矢数道明：臨床応用漢方処方解説，263-271, 1966，創元社，大阪
- 2) 日本薬剤師会編，改訂4版，漢方業務指針，p141, 1997，薬事日報社，東京
- 3) 藤原研司,太田裕彦，岡 博，他：和漢医薬学会誌，5, 238-241, 1988

- 4) Iio,M., Ishimoto, S., Nishida,Y., et.al.:*Chem. Pharma. Bull.*, 50, 1073-1074, 1986
- 5) 斉藤孝一，佐藤恵美，大沼京子，他：漢方医学，15, 17-20, 1991
- 6) 長谷川 格，溝口靖紘，市川裕三，他：和漢医薬学会誌，7, 280-281, 1990
- 7) 岡 博子，金鎬俊，溝口靖紘，他：和漢医薬学会誌，

- 7, 264-265, 1990
- 8) Okita, K., Li, Q., Murakamio, T. and Takahashi, M. :
Eropean J. Cancer Prevention **2**, 169-176, 1993
- 9) 富岡洋海 : 最新医学 , **47**, 84-90, 1992
- 10) Minematsu, S., Atkinson, J.E., Bolte, H.F., et.al. : *Ôyô Yakuri/Pharmacometrics*, **43**, 19-42, 1992
- 11) Yanagisawa, E., Ishihara, K., Imai, K., et. al. : *Ôyô Yakuri/Pharmacometrics*, **44**, 649-657, 1992
- 12) 坂本義光 , 安藤 弘 , 池田虎雄 , 他 : 東京衛研年報 ,
46, 225-231, 1995
- 13) 藤井 孝 , 三栗谷久敏 , 矢野範男 , 他 : 東京衛研年報 ,
47, 324-336, 1996
- 14) 藤井 孝 , 三栗谷久敏 , 矢野範男 , 他 : 東京衛研年報 ,
46, 243-253, 1995
- 15) 坂本義光 , 池田虎雄 , 高橋 博 , 他 : 東京衛研年報 ,
48, 327-338, 1997
- 16) 田中寿子 : 泌尿器 , 実験動物病理組織 , 榎本 , 林 , 田
中編 , 380-398, 1981 , ソフトサイエンス社,東京
- 17) 毒性病理学 , 病変観察の基礎 , 榎本 眞 , 赤崎兼義編 ,
175, 1987 , ソフトサイエンス社 , 東京
- 18) 坂本義光 , 多田幸恵 , 田山邦昭 , 他 : 東京衛研年報 ,
49, 255-266, 1998