Japan Society of Obstetrics and Gynecology

日本産科婦人科学会雑誌 ACTA OBST GYNAEC JPN Vol. 41, No. 5, pp. 525—529, 1989（平1，5月）

ラット卵胞アロマターゼ活性に対する芍薬の刺激作用

秋田大学医学部産科婦人科教室
太田 博孝　福島 峰子　真木 正博

Stimulatory Action of Shakuyaku on Aromatase Activity in Cultured Rat Follicles

Hirotaka OTA, Mineko FUKUSHIMA and Masahiro MAKI
Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita

概要 排卵障害に有効な漢方薬における卵巣直接作用のうち，とくにアロマターゼへの影響をラット卵胞を用いて検討した．卵胞はPMSG処理未熟雌ラットから分離した．また卵胞のアロマターゼ活性を阻害する目的で4-hydroxy-4-androstene-3, 17-dione（4-OHA；10^{-5}M）を用いた．各卵胞は培養液中で種々の濃度（10～500μg）の当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，温経湯，あるいはその生薬成分を加え，24時間器官培養した．

培養液中に4-OHA（10^{-5}M）を添加すると培養液中estradiol（E_2）分泌量は対照群の38%（$p<0.05$）まで低下した．同時に上記漢方薬を添加すると，100，500μgの量でいずれもE_2分泌を有意に増加させた．このE_2分泌刺激作用がこれら漢方薬の構成生薬のいずれの作用によるかを知るため，シャクヤク，センキュウ，トウキ，ボタンピ，ケイヒにつき検討した．その結果シャクヤクのみがE_2分泌刺激作用を示した．シャクヤクはこれら3種の薬剤に共通に含まれる唯一の生薬であることを考えるときわめて興味深い．

Synopsis The direct action of herbal medicines on aromatase activity was investigated in cultured rat follicles.

Mature follicles were obtained from PMSG-treated immature rats. Aromatase inhibitor, 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione (4-OHA) was also used in the experiment. Follicles were incubated in the medium for 24 hour with Toki-shakuyaku-san, Keisi-bukuryo-gan, Unkei-to (10～500μg) or their ingredients (100μg), respectively.

The addition of 4-OHA reduced estradiol secretion in a dose-response manner. The addition of each medicine (100, 500μg) as well as 4-OHA (10^{-5}M) restored estradiol secretion to the control level. Among the ingredients, Shakuyaku stimulated estradiol secretion in the medium in the presence or absence of 4-OHA. It is noteworthy that Shakuyaku alone had a stimulatory action on aromatase activity and is the only one which is equally contained in the threee medicines.

Key words: Herbal medicine・Shakuyaku・Aromatase・Estradiol・Follicle

緒　言

従来，不妊症に有効なものとして繁用されている漢方薬は当帰芍薬散[2)10)]，桂枝茯苓丸[10)]，温経湯[1)]，芍薬甘草湯[3)11)]などである．たとえば当帰芍薬散はとくに黄体機能不全症に奏効し，エストロゲン，プロゲステロンの分泌を刺激する[2)]．桂枝茯苓丸は瘀血を伴う排卵障害例に，また芍薬甘草湯は高テストステロン血症[3)11)]や高プロラクチン血症を伴う排卵障害例[4)]に奏効する．

漢方薬は多種類の生薬から構成されているため，その薬理作用は複雑となり，作用機序は充分に解明されていない．しかし，現在まで報告された成績を見ると，温経湯では視床下部，下垂体レベルに作用し，LH-RH[6)]，ゴナドトロピン[9)]の放出を促進する機序が報告されている．また，芍薬甘草湯の高プロラクチン血症に対する作用機序については，著者らの検討によると芍薬甘草湯は下垂体レベルに作用し，ドーパミン受容体を刺激する[5)]．一方直接卵巣レベルでプロラクチンのアロマターゼ活性抑制作用に拮抗し，エストロゲンの分泌を促進させる作用[8)]もあるようである．

本研究では漢方薬の卵巣直接作用について知る

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

目的で，ラット卵胞培養系に種々の濃度の漢方薬を添加し，とくにアロマターゼ活性，すなわちエストロゲン分泌におよぼす影響について検討した．

実験材料および方法

1．卵胞採取法

27日齢のウイスター今道系未熟雌ラット（動物繁殖研究所，埼玉）に8IU（生理食塩水0.2ml中）のPMSG（妊馬血清ゴナドトロピン；帝国臓器）を腹腔内に注射した．対照群には0.2mlの生理食塩水を投与した．ラットは14時間照明・10時間暗黒の照明サイクルで，常時22±1℃に調節された空調室で飼育した．ラットは48時間後頚部を過伸展させて屠殺し，無菌的に卵巣を摘出した．摘出した卵巣は少量の培養液とともに滅菌シャーレ上におき，実体顕微鏡下で直径0.7～1mmに発育した成熟卵胞（3～10個/ラット：平均6個）をつぶさないように分離した．また卵胞壁に付着した脂肪組織等はクーパーでできるだけ取り除いた．

2．卵胞培養法

卵胞はmultiwell tissue culture plate（Falcon 3047）内の培養液（1ml）中に，各wellあたり1個ずつ静置した．用いた培養液はMcCoy's 5a（modified；GIBCO）で，penicillin 100IU/ml, streptomycin 100μg/ml, L-glutamine 2mM/mlを添加した．培養液中には種々の濃度（10, 100, 500μg）の当帰芍薬散（ツムラ），桂枝茯苓丸（ツムラ），温経湯（ツムラ），あるいはそれらの生薬成分のうちシャクヤク，センキュウ，トウキ，ボタンピ，ケイヒ，各100μgを加え全量で1mlとなるようにした．4-hydroxy-4-androstene-3, 17-dione（4-OHA）[12]は100%エタノール液を加え10^{-2}Mに調整後培養液で希釈し，実験に用いた．各卵胞は95%air, 5%CO_2, 37℃, 100%湿度の条件下で24時間器官培養した．培養終了後，培養液はホルモン測定日まで−20℃に保存した．また各卵胞は10%ホルマリンで固定後，ヘマトキシリン・エオジン染色し，組織学的に閉鎖傾向を示した卵胞の培養液は除外した．

3．培養液中の滲透圧，電解質の測定法

漢方薬添加によるE_2分泌能への影響が，培養液の滲透圧，あるいは電解質の変動を介するものかどうかを知るため，各漢方薬（100, 500μg），4-OHA（10^{-5}M）を単独，あるいは同時に添加し，培養液の滲透圧，Ca, Na, K濃度を検討した．滲透圧の測定はPrecision systems Inc.社製のキット“μ OSMETTE”を用い，氷点降下法により測定した．Ca濃度の測定は和光純薬工業社製の“カルシウムC-テストワコー”を用い，OCPC法により測定した．Na, K濃度はNova-biomedical社のNOVA-1を用い，イオン電極法で測定した．

4．ステロイドホルモン測定法

培養液のestradiol（E_2）濃度は2抗体法によるRIAキット（CIS；ミドリ十字）を用いて測定した．得られた値は平均値とその標準誤差で示し，各群間の有意差検定はDuncanのnew multiple range testを用いて行つた．

成　績

1．種々の濃度の漢方薬添加によるestradiol濃度の変動

はじめに卵胞からのE_2分泌を充分に抑制し得る4-OHAの濃度について検討した（図1）．4-OHA非添加時E_2濃度は219±44pg/mlで，4-OHA添加によりE_2濃度は用量依存性に低下し，10^{-5}Mで対照群の38%（$p<0.05$）まで低下した．そこで以下の実験にはすべて10^{-5}Mの4-OHAを使用した．

次に種々の濃度の当帰芍薬散を添加し，培養液中に分泌されるE_2濃度の変動を検討した（図2）．4-OHA非添加時当帰芍薬散単独添加によるE_2値の変動はなかつた．しかし，4-OHA添加によりア

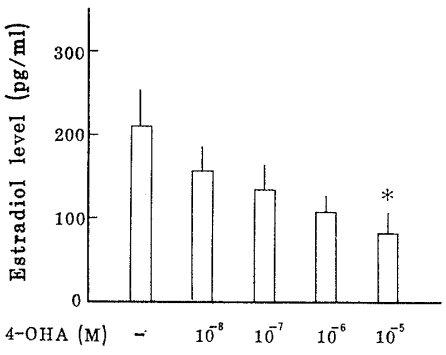

図1　4-OHA添加によるestradiol分泌の変動．
*$p<0.05$（4-OHA非添加群に対し）

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

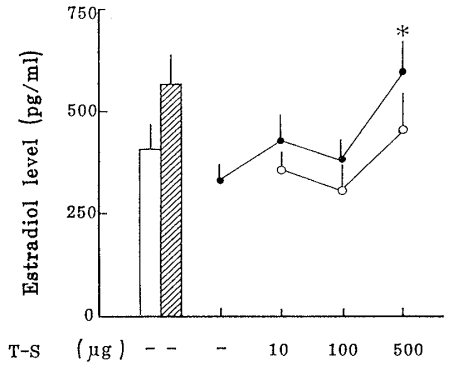

図2　当帰芍薬散（T-S）添加によるestradiol分泌の変動．□：4-OHA非添加群の対照群，▨：4-OHA添加群の対照群，*p<0.01（4-OHA単独群に対し），○—○；4-OHA非添加群，●—●；4-OHA同時添加群

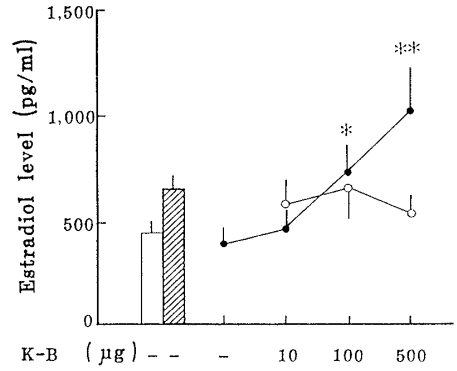

図3　桂枝茯苓丸（K-B）添加によるestradiol分泌の変動．□：4-OHA非添加群の対照群，▨：4-OHA添加群の対照群，*p<0.05，**p<0.01（4-OHA単独群に対し），○—○；4-OHA非添加群，●—●；4-OHA同時添加群

ロマターゼ活性を抑制するとE₂分泌は刺激され，500μg添加群で4-OHA単独群の180%まで有意に（p<0.01）増加した．

桂枝茯苓丸群では4-OHA非添加時当帰芍薬散群と同様にE₂分泌の変動はなかつた（図3）．しかし，4-OHAを同時に添加するとE₂分泌は刺激され，100，500μg投与群では4-OHA単独群のそれぞれ181，246%まで有意に（p<0.05，0.01）増加した．

温経湯投与群でも同様の傾向を示した（図4）．すなわち，温経湯単独添加では培養液中へのE₂分泌に変動はないが，4-OHAを同時添加すると100，500μg投与群で4-OHA単独群のそれぞれ211，207%まで有意に（p<0.01，0.05）増加した．

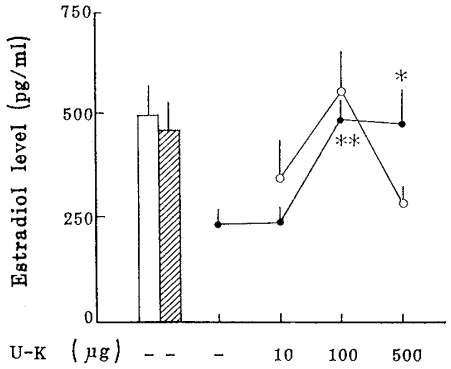

図4　温経湯（U-K）添加によるestradiol分泌の変動．□：4-OHA非添加群の対照群，▨：4-OHA添加群の対照群，*p<0.05，**p<0.01（4-OHA単独群に対し），○—○；4-OHA非添加群，●—●；4-OHA同時添加群

表1　生薬添加によるestradiol分泌の変動

生　薬	4-OHAの有無	E_2値	4-OHAの有無	E_2値
—	−	388±125　(7)	−	577±80　(7)
—	−	—	+	282±54　(8)
シャクヤク	−	671±172*　(7)	+	441±30**(7)
センキュウ	−	325±35　(6)	+	318±68　(8)
トウキ	−	272±46　(6)	+	313±58　(7)
ボタンピ	−	346±75　(6)	+	307±24　(7)
ケイヒ	−	550±116　(6)	+	224±35　(8)

*p<0.01（対照群に対し），**p<0.05（4-OHA単独群に対し）

2．各生薬成分添加によるE₂濃度の変動

これら漢方薬によるE₂分泌刺激効果が構成する生薬のいずれの作用によるかを知るため，シャクヤク，センキュウ，トウキ，ボタンピ，ケイヒ各100μgを培養液中に加え，E₂分泌に与える影響を検討した．その結果シャクヤクは4-OHA添加の有無にかかわらずアロマターゼを刺激し，E₂分泌を促進した（表1）．しかし他の生薬には全くアロマターゼ活性刺激作用は見られなかつた．

3．漢方薬添加による培養液の滲透圧，Ca，Na，K濃度の変動

培養液のみの滲透圧は295±1mOsm/kgであつた（表2）．培養液に4-OHA（10^{-5}M）を添加すると，滲透圧は310±1mOsm/kgと有意に（p<0.01）上昇した．しかし各漢方薬添加による滲透圧の変動はなかつた．一方，培養液中のCa，Na，K濃度はそれぞれ2.86±0.22mg/ml，148±1mEq/l，

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

表2 漢方薬添加による培養液の滲透圧，Ca，Na，K濃度の変動（n＝3）

番号	群＼項目	滲透圧 (mOsm/kg)	Ca (mg/ml)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)
I	M	295±1	2.86±0.22	148±1	5.1±0.1
II	M+4-OHA	310±1*	3.36±0.13	148±0	5.1±0
III	M+T-K	297±1	3.45±0.04	149±0	5.2±0
IV	M+4-OHA+T-K	313±1**	3.61±0.14	149±1	5.2±0.1
V	M+K-B	298±1	2.83±0.17	146±1	5.4±0.1
VI	M+4-OHA+K-B	313±0**	2.95±0.18	141±1	5.3±0.1
VII	M+U-K	293±3	3.32±0.11	146±1	5.3±0.1
VIII	M+4-OHA+U-K	314±1**	3.33±0.17	142±6	5.6±0.1

M；培養液，T-K；当帰芍薬散(100μg)，K-B；桂枝茯苓丸(100μg)，U-K；温経湯(100μg)，*$p<0.01$，**$p<0.001$（I群；培養液単独群に対し）

5.1±0.1mEq/lであつた（表2）．しかし4-OHAや，各漢方薬添加による電解質の変動は全く見られなかつた．なお成績は示さないが，各漢方薬500μg添加による実験でも同様の結果が得られた．

考　案

漢方薬は西洋薬のように単一の有効成分を分離，精製，また合成したものではなく，多種類の生薬から構成される．そして各生薬はそれぞれ異なる薬理作用を持つ．しかしながら，漢方薬の生体への作用は各生薬の個々の薬理作用が単純に合わさつて発現されるのではなく，巧妙な配合をもつて統合された一つのものとして効果を表すと考えられる．

アロマターゼはアンドロゲンをエストロゲンに転換する酵素で，卵巣，肝，脂肪組織等に広範囲に存在する．卵巣でアロマターゼは卵胞の顆粒膜細胞，黄体細胞内に存在し，卵胞の発育や黄体機能に深く関与している．アロマターゼ活性を促進する物質には，FSH[7)17)]，アンドロゲン[13)]，PGE_2[13)]，甲状腺ホルモン[16)]などがある．逆に同活性を抑制するホルモンとして，プロラクチン[7)]，LH-RHアナログ[15)]，糖質コルチコイド[14)]などがあげられる．このようにアロマターゼは卵巣で複数の因子により調節を受けている．このアロマターゼ活性を阻害する4-OHAはBrodie et al.[12)]により見出された合成ステロイドである．4-OHAはマイクロゾーム分画にあるアロマターゼに競合的に結合し，その活性を抑制する．本研究でも4-OHAは卵胞からのE_2分泌を用量依存性に抑制することを明らかにした．

表3 当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，温経湯の主な構成生薬

漢方薬＼生薬	シャクヤク	センキュウ	トウキ	ボタンピ	ケイヒ
当帰芍薬散	○	○	○		
桂枝茯苓丸	○			○	○
温経湯	○	○	○	○	○

今回の検討から当帰芍薬散，桂枝茯苓丸，温経湯は100μg/ml以上の濃度で4-OHAのアロマターゼ活性抑制作用に拮抗し，E_2分泌を促進することを明らかにした．一方，このような変動が培養液中への各薬剤の添加により惹起された化学的効果による可能性も考えられた．しかし，4-OHA添加による滲透圧の軽度上昇が見られたのみで，電解質代謝への影響は全く認められず，そうした可能性は否定された．

今回試みた3種の漢方薬はそれぞれ6，5，12種の生薬成分から構成されている．各生薬のうちシャクヤク，センキュウ，トウキ，ボタンピ，ケイヒについて各々100μgを培養液中に添加し，E_2分泌促進作用について検討した．その結果シャクヤクのみが4-OHAのアロマターゼ活性抑制作用に拮抗し，卵胞からのE_2分泌を促進した．シャクヤクは表3に示すようにこれら3種の漢方薬に共

NII-Electronic Library Service

Japan Society of Obstetrics and Gynecology

通に含まれる唯一の生薬成分である点はきわめて興味深い．勿論この漢方薬にあるアロマターゼ活性促進作用が，本研究では検討しなかつた残りの生薬成分にある可能性については不明である．しかし，少なくとも卵胞培養系でシャクヤクにアロマターゼ活性促進作用があることは今回の実験で証明された．ただ3種の漢方薬とも4-OHA非添加時にはアロマターゼ活性促進作用は見られなかつた．一方，4-OHA添加によりアロマターゼ活性を抑制すると漢方薬投与でE_2の上昇が見られたが，その値は4-OHA添加前の値に近似した．これらのことはバランサーとしての漢方薬の特質とも関連して誠に興味深いものがある．

稿を終わるにあたり，4-OHAを供与いただいた米国メリーランド大学のA.M.H. Brodie教授に感謝します．

文　献

1. **朝海　怜，岡田紀三男，左雨秀治，熊井昭彦，小畑英介，岡本良平**：漢方薬温経湯の無月経患者に対する投与条件・作用機序．産婦人科漢方研究のあゆみI，25，診断と治療社，東京，1984.
2. **福島峰子**：黄体機能不全—当帰芍薬散単独投与の内分泌学的，臨床的効果—．産婦の世界，34(増刊号)：127，1982.
3. **福島峰子**：Clomiphene無効の多嚢胞卵巣症候群に対する芍薬甘草湯の効果．現代東洋医学，7(増刊号)：194，1986.
4. **福島峰子，成田章子，一関和子，太田博孝，五十嵐信一，脇坂　晟**：芍薬甘草湯の薬物誘導性高プロラクチン血症への基礎的，臨床的検討．産婦人科漢方研究のあゆみIII，47，診断と治療社，東京，1986.
5. **福島峰子，成田章子，太田博孝，脇坂　晟**：芍薬甘草湯の下垂体dopamine receptorへの作用．産婦人科漢方研究のあゆみIV，93，診断と治療社，東京，1987.
6. **三宅　侃，田坂慶一，大塚志郎，西崎孝道，吉本康弘，谷澤　修，青野敏博**：和漢薬の視床下部—下垂体環流系におけるLH-RHとLH分泌に対する作用．産婦人科漢方研究のあゆみIV，74，診断と治療社，東京，1987.
7. **太田博孝，福島峰子**：性腺系におけるプロラクチンの作用機序，とくに卵巣直接作用．産と婦，54：1477，1987.
8. **太田博孝，福島峰子，真木正博**：芍薬甘草湯のラット卵胞性ステロイド分泌に及ぼす影響．日不妊誌，32：486，1987.
9. **武谷雄二，林　直樹，久具宏司，水野正彦**：下垂体前葉に対する温経湯の直接作用．産婦人科漢方研究のあゆみIV，69，診断と治療社，東京，1987.
10. **玉舎輝彦，大野洋介，山田俊夫，和田圭介，藤本次良，岡田弘二**：不妊症患者ならびに排卵障害を訴える未婚女性に対する漢方の試み．日不妊誌，27：472，1982.
11. **柳沼　忞，小林拓郎，藤盛亮寿**：「ツムラ芍薬甘草湯」の血中testosterone濃度低下作用とその臨床応用．産婦人科漢方研究のあゆみI，36，診断と治療社，東京，1984.
12. *Brodie, A.M.H., Garrett, W.M., Hendrickson, J. R., Tsai-Morris, C.H. and Williams, J.G.:* Aromatase inhibitors, their pharmacology and application. J. Steroid Biochem., 19：53, 1983.
13. *Daniel, S.A. J. and Armstrong, D.T.:* Site of action of androgens on follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells. Endocrinology, 114：1975, 1984.
14. *Hsueh, A.J.W. and Erickson, G.F.:* Glucocorticoid inhibition of FSH-induced estrogen production in cultured rat granulosa cells. Steroids, 32：639, 1978.
15. *Hsueh, A.J.W. and Erickson, G.F.:* Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone：Direct inhibition of ovarian steroidogenesis. Science, 204：854, 1979.
16. *Maruo, T., Hayashi, M. and Mochizuki, M.:* Thyroid hormone as a biological amplifier of the actions of FSH on ovarian cells. VIth World Congress on Human Reproduction. 175, Tokyo, 1987. (Abstract)
17. *Richards, J.S., Ireland, J.J., Rao, M.C., Bernath, G.A., Midgley, A.R. Jr. and Reichert, L.E. Jr.:* Ovarian follicular development in the rat：Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. Endocrinology, 99：1562, 1976.

（No. 6521　平1・1・10受付）

NII-Electronic Library Service