

酸棗仁湯の基礎薬理学的研究

2. 抗不安及び鎮痛効果の 行動薬理学的解析

東京医科大学薬理学教室 (主任: 渋谷 健教授)

渋谷 健 松田宏三 渡辺泰雄
四方義幸 施 宏哲 石井 巖
松永寛幸 高木邦格 辻 裕子
張 光雄 周 明勇 謝 明村

A Pharmacological Study on Suanzaorentang

2. The evaluation of behavioral pharmacological studies on the antianxiety and analgesic function

**Takeshi SHIBUYA, Hiromi MATSUDA, Yasuo WATANABE,
Yoshiyuki SHIKATA, Hung-Che SHIH, Iwao ISHII,
Hiroyuki MATSUNAGA, Kuninori TAKAGI, Hiroko TSUJI,
Kuang Hsiung CHANG, Chou Ming-YUNG, Ming-Tsuen HSIEH.**

Department of Pharmacology, Tokyo Medical College
(Director: Prof. T. SHIBUYA)

Suanzaorentang (SZR)-induced hypnotic action was recently demonstrated by the methods of clinical and basic pharmacology. SZR also seems to have anxiolytic activity, and in the present study, the anxiolytic activity of SZR was evaluated using behavioral pharmacological experiments, and was compared to that of diazepam (DZP). In olfactory bulbectomized rats (OB rats), the administration of DZP inhibited the emotional change induced by the operation. However, SZR-treated rats were unchanged, and were similar to vehicle-treated rats. The repeated administration of either drug produced inhibition of the emotional disorder in OB rats. Repeated SZR treatment gradually suppressed the excitation, but DZP treatment was weakened day by day. The combined administration of DZP and SZR greatly attenuated the excitation and this enhanced attenuation could be seen after repeated administration. Studies of anti-conflict behavior also showed similar results as those in the OB rats. These results suggest that the repeated administration of SZR can produce anxiolytic activity, and further that the combined administration of SZR and DZP may be an ideal treatment for anxiety. In addition, the combined administration of DZP and SZR had an analgesic effect via the central benzodiazepine and opioid systems, as we previously reported.

(昭和61年10月27日受付, 昭和61年11月23日受理)

Key words: 酸棗仁湯 (suanzaorentang), 催眠作用 (hypnotic action),
抗不安効果 (antianxiety activity), 鎮痛効果 (analgesic effect), ジアゼパム (diazepam)

緒 言

われわれは、前報において、酸棗仁湯 (Suanzaorentang; SZR) の催眠作用を報告した¹⁾。一方、Chenらは、臨床薬理学的研究から SZR に抗不安作用のあることを実証し、SZR の抗不安作用は benzodiazepine (BZP) 類似の作用機序によることを示唆している^{2),3)}。しかし、基礎薬理学的研究から SZR の抗不安作用の機序を現代的薬理学的手法を用いて証明したものはみられない。

従来、抗不安作用は、嗅球摘出ラット (OB ラット) による特異的異常行動の観察あるいは電気刺激を条件反射として惹き起こされる conflict 症状に対する拮抗作用等を指標とする検索方法が用いられてきた。本研究は、SZR の抗不安作用をこれら基礎薬理学的手法を用いて BZP と比較すると共に、また、BZP 類は基礎薬理学的研究及び臨床薬理学的研究から脳内 GABA 神経系や opioid 神経系と相互作用を有し、鎮痛機序に何らかの関連性がある⁴⁻⁷⁾ と報告されていることから SZR の鎮痛作用を tail pinch 法を用いて検索した。

実験材料及び実験方法

1. 実験材料

i) 使用薬物

実験には DZP (日本ロシュ (株)), SZR (明通製薬公司), carboxymethyl cellulose (CMC; Kokusan chemical Works, Ltd) 及び pentobarbital-Na (Nembutal®) を用いた。

これらの薬物は 0.5% CMC 溶液に懸濁して、DZP 5 mg/kg, SZR 500 mg/kg の用量で経口投与した。

ii) 使用動物

実験には、体重 20~22 g の dd 系雄性マウス及び体重 300~350 g の SD 系雄性ラットを用いた。

2. 実験方法

i) 嗅球摘出ラット (OB ラット) の情動過多に及ぼす影響

Pentobarbital-Na 35 mg/kg (i.p.) 麻酔下ラットの頭頂骨を露出し、直視下で歯科用ドリルにて穿孔して、両側の嗅球を吸引除去した後 1 週間単独隔離飼育を行い、Ueki et al. の方法⁸⁾ に準拠して、情動反応を採点した。即ち、attack response (攻撃反応), startle response (驚愕反応), struggle response (逃

走反応) 及び vocalization (鳴啼反応) の 4 項目についてそれぞれ 0~4 までの 5 段階の score で表わし、4 項目の score の合計を total score として情動反応を計数化した。本実験では 4 項目の total score が 9 点以上のものを陽性とし、muricide は OB ラットをマウスと共にケージに入れてから 3 分以内に killing behavior を示したものを陽性とした。

被験薬は毎日一定時刻に 5 日間連続経口投与した。行動観察は、単回投与群では、投与前 (before administration), 投与後 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 及び 240 分、連日投与群では被験薬投与前、投与後 60, 120 及び 180 分後に行った。

ii) 条件回避反応に及ぼす影響 (condition avoidance response)

実験に使用した条件回避装置は、Mowrer-Miller 型 shuttle box である。本装置は、全面がガラスの直方体 (幅 80×奥行 35 cm×高さ 30 cm) で中央が隔壁により区切られた左右対称の二室より成り、中央隔壁には床上 9.5 cm を中心とする直径 8.5 cm の回避孔を設け、一方の部屋に条件刺激 (95 ホーン) 用ブザーを取り付け、両室共、刺激装置により通電可能 (AC) の grid を 0.8 cm 間隔で床に敷き、0~200 V が随時加えられるようになっている。

訓練は、同時条件付けで行った。即ち、ラットを出発部屋に入れ、条件刺激 (condition stimulus, CS) と無条件刺激 (uncondition stimulus, UCS) を同時に与え、ラットが目標部屋に回避するまで、これらの両刺激を繰り返した。この行程を 1 日 20 試行し、7 日間連日訓練を行った。その際回避に要する時間及び回避の有無 (回避率) を観察した。但し、回避の成立とは CS 後 1 分以内に目標部屋に回避するものをいい、本実験では、回避率が 100% のものを使用した。

被験薬は OB ラットと同様、5 日間連日投与した。条件回避反応の測定は単回投与群及び連続投与群の第 1 日目は、投与前、投与後 15, 30, 60, 90, 120, 180 及び 240 分、また、連日投与群では 2 日目以降は、被験薬投与前、投与後 60, 120 及び 180 分に行った。

iii) ラット conflict 行動に及ぼす影響

上述の条件回避反応測定装置を用いて、7 日間訓練した後、ラットが回避孔を通り抜けて、目標部屋に到達した後も目標部屋には通電を行い、conflict 様状態に陥らせた。観察は回避孔を通り抜けるに要する時間 (response time) を測定条件として行っ

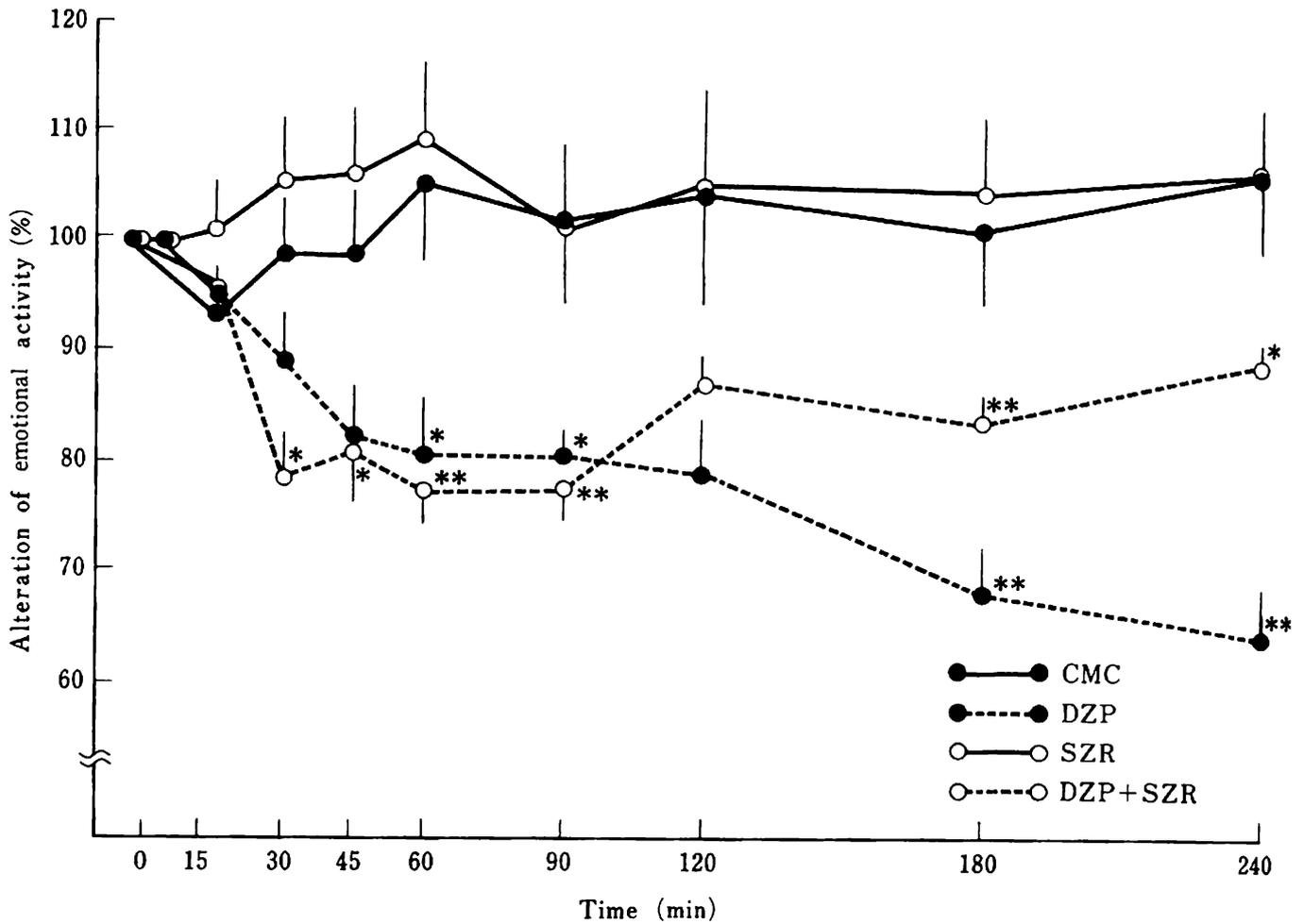


Fig. 1 Alteration of emotional activity after the administration of diazepam and/or suanzaorentang on the olfactory bulbectomized rats (n=6~10).

Ordinate shows the percentage of total score on the emotional activity after the each drug administration. Each percentage is calculated from the total score which is the control value (0 min) as 100%.

Abscissa appear the time(min) after the administration of drug.

* ; Significantly different from CMC-treated group (*p<0.05, **p<0.01)

た。また、被験薬投与群の観察は、条件回避反応の観察時間(実験方法ii)に準じた。

iv) OB ラットにおける鎮痛作用の観察

OB ラットを用いて、tail pinch 法により、各薬物の鎮痛作用を観察した。Takagi らの方法⁹⁾に準じて、次の5段階の score で採点した。

0 : 無反応, 1 : 対象への関心, 2 : 対象への防御又は逃避行動, 3 : 噛みつく等の攻撃行動, 4 : 攻撃行動。

被験薬投与後の採点時間は i) に準じた。

実験結果

1. OB ラットの情動過多に及ぼす影響

各投与群における1日目の情動反応の推移を対照群の control score を 100% として換算し、Fig. 1

に示した。DZP 投与群では60分で有意 (p<0.05) に抑制され、以下240分まで抑制が持続した。SZR 投与群は CMC 投与群と同様に影響を及ぼさなかった。併用群 (DZP+SZR) では30分で有意 (p<0.05) に抑制され、投与後90分から徐々に回復傾向を示した。

次に各薬物を5日間連投した場合の情動反応の推移を Fig. 2 に示した。DZP 投与群では2日目以降抑制作用の持続は見られなかった。一方、SZR 及び併用群では、経日的に抑制傾向が増大した。

Muricide に対する作用は各投与群とも全く見られなかった。

2. 条件回避反応に及ぼす影響

SZR を5日間連投し、各投与群について条件回避反応に及ぼす影響を指標として比較した。いずれも

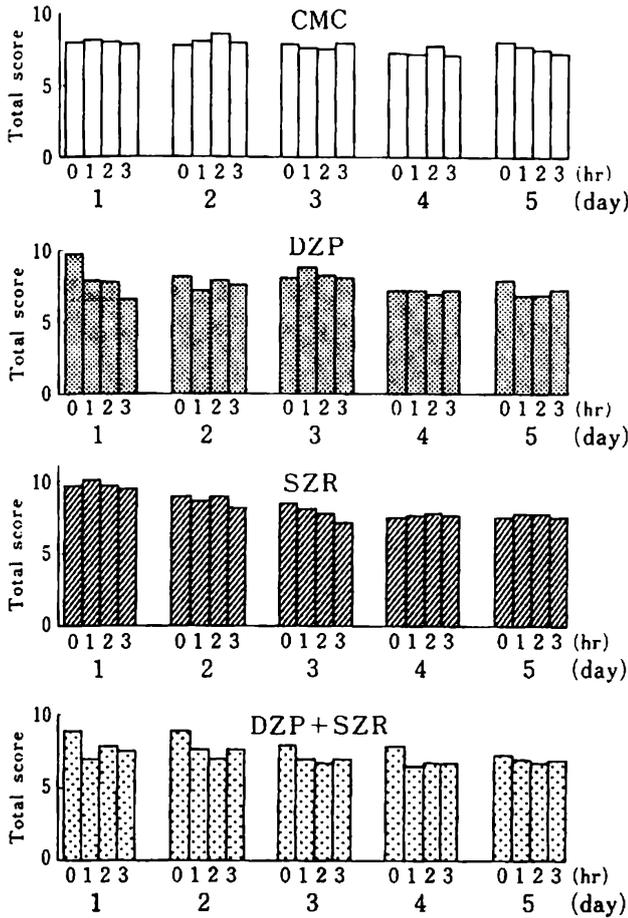


Fig. 2 Alteration of total score after the repeated administration of diazepam and suanzaorentang on the olfactory bulbectomized rats (n=6~10).

The repeated administration was done for five days.

*1 The time (hour) after the administration of each day.

*2 The day of the administration.

回避率 100% には影響を及ぼさなかった。

3. ラット conflict 行動に及ぼす影響

Conflict 様状態に対する各薬物の影響を Table 1 に response time (sec) で示した。DZP 投与群では投与後 45 分に response time が有意 (p<0.05) に延長したが、180, 240 分後には投与前の状態に復した。併用群では 45, 60 分後で有意に延長したが、その効果は DZP 投与群に比べて弱かった。

また、5 日間の連投による response time の推移を Fig. 3 に示した (各投与日における response time は投与後 1 時間値で表示した)。SZR 投与群では 4, 5 日目で有意 (p<0.05) に、併用群では投与期間中を通じて有意 (p<0.05, p<0.01) に response time が延長した。一方、DZP 投与群では 1, 2 日目で延長作用が見られたが有意差はなかった。

4. OB ラットにおける鎮痛作用の観察

Tail pinch 法による各投与群 1 日目の結果を Fig. 4 に示した。DZP 投与群では、投与後 90 分 (p<0.05), 240 分 (p<0.01) で score は有意に低下し、鎮痛作用が見られた。SZR 投与群ではそのような作用は見られなかったが、併用群では 30 分 (p<0.05), 60 分 (p<0.01) で有意な低下が見られた。この結果は DZP 投与群に比べてより顕著であった。次に各投与群 5 日間の score を Table 2 に示した。DZP, SZR 投与群は各投与日とも有意な変化は見られなかった。一方、併用群では 2 日目で鎮痛作用が発現し、経日的にその作用は顕著となった。

Table 1 Alteration of rat conflict behavior after the administration of diazepam and/or suanzaorentang using the shuttle box.

Drug	response time (sec)								
	before	15	30	45	60	90	120	180	240
CMC	1.10 ± 0.21	1.40 ± 0.15	1.14 ± 0.29	1.04 ± 0.13	0.97 ± 0.17	1.04 ± 0.045	1.16 ± 0.097	1.13 ± 0.22	1.24 ± 0.17
DZP(5mg)	1.38 ± 0.21	1.53 ± 0.29	6.10 ± 1.98	8.81 ± 1.89*	6.49 ± 3.00	4.36 ± 1.97	2.37 ± 0.62	1.69 ± 0.19	1.34 ± 0.14
SZR(500mg)	1.39 ± 0.16	1.52 ± 0.29	1.24 ± 0.17	1.53 ± 0.57	1.40 ± 0.30	1.70 ± 0.75	2.43 ± 0.89	2.34 ± 0.51	2.98 ± 0.30
DZP+SZR	1.52 ± 0.086	2.17 ± 0.34	2.53 ± 0.89	2.71 ± 0.46*	2.37 ± 0.69	2.94 ± 0.68*	2.28 ± 0.42	1.78 ± 0.16	1.62 ± 0.066

Each value shows the response time on electro shock after the acute treatment at the first experimental day.

*: Significantly different from the CMC-treated group (*p<0.05, **p<0.01)

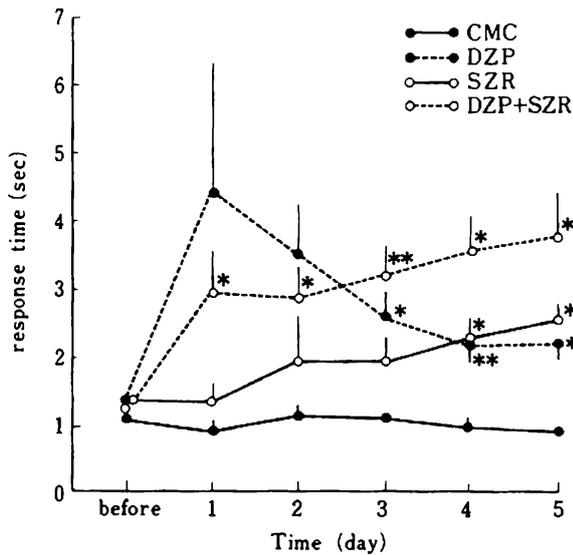


Fig. 3 Alteration of rat conflict behavior after the repeated administration of diazepam and/or suanzaorentang using the shuttle box (n=3).

(Ordinate) The response time of 1 hr after the administration of each day.

(Abscissa) The day of the administration.

* ; Significantly different from CMC-treated group (*p<0.05, **p<0.01)

考 察

SZR の抗不安作用を基礎薬理学的に検索するため、嗅球摘出 (OB) ラットを用いて情動反応抑制作用及び鎮痛作用を、また、条件回避反応抑制作用あるいは馴化作用、及び抗 conflict 作用を検討した。本研究では、抗不安薬の代表的薬物である BZP 類のうち DZP を使用し、SZR の抗不安作用を行動薬理学的に比較検討すると共に、更に併用効果について検索した。

一般に抗不安薬は OB ラットの情動反応を抑制することが知られている。今回の実験結果においても DZP 5 mg/kg で投与 1 日目に有意な抑制が見られた。しかし、2 日目以降その作用は徐々に消失した。この結果は、BZP 系薬物による急性耐性が生じたことを示唆している¹⁰⁾¹¹⁾。一方、SZR 500 mg/kg 投与では連投するに連れ徐々に馴化作用が現れた。発現時間の遅延に関しては、SZR の消化管吸収が遅い事が原因として考えられる。一方、DZP と SZR との併用群では 1 日目から抑制作用が現われ、その傾向は経日的に顕著になった。一方、muricide に対して

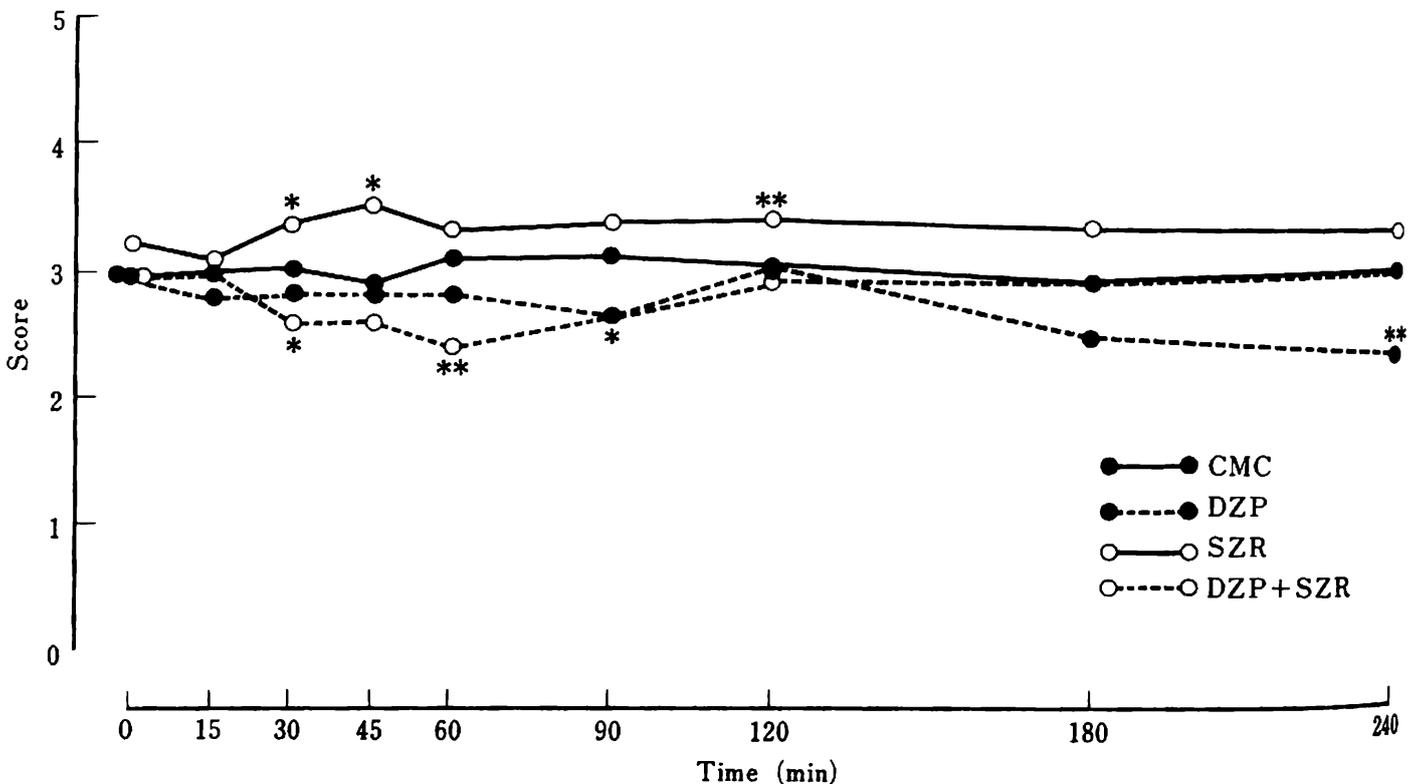


Fig. 4 Analgesic effects after the administration of diazepam and/or suanzaorentang on the olfactory bulbectomized rats (n=6~10).

(Ordinate) Tail pinched score

(Abscissa) The time (min) after the administration.

* ; Significantly different from CMC-treated group (*p<0.05, **p<0.01)

Table 2 Analgesic effects of the repeated administration of diazepam and/or suanzaorentang on the olfactory bulbectomized rats.

A) 1st day

hour Drug	before	1	2	3
CMC	3.0±0.0	3.1±0.1	3.0±0.0	2.9±0.1
DZP	3.0±0.0	2.8±0.2	3.0±0.0	2.5±0.2
SZR	3.2±0.1	3.3±0.2	3.4±0.1	3.3±0.2
DZP+SZR	3.0±0.0	2.4±0.2**	2.9±0.1	2.9±0.1

B) 2nd day

CMC	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
DZP	3.0±0.0	2.8±0.2	3.0±0.0	2.8±0.2
SZR	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
DZP+SZR	3.0±0.0	2.8±0.1	2.5±0.2*	2.8±0.1

C) 3rd day

CMC	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
DZP	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0	2.8±0.2
SZR	3.0±0.0	2.9±0.1	2.9±0.1	3.0±0.0
DZP+SZR	2.5±0.2**	2.3±0.2**	2.1±0.1**	2.5±0.2

D) 4th day

hour Drug	before	1	2	3
CMC	3.0±0.0	2.9±0.1	3.0±0.0	2.9±0.1
DZP	2.8±0.2	3.0±0.0	3.0±0.0	3.0±0.0
SZR	2.8±0.1	3.0±0.0	2.9±0.1	2.9±0.1
DZP+SZR	2.3±0.2**	2.2±0.1**	2.2±0.1**	2.5±0.2

E) 5th day

CMC	3.0±0.0	2.9±0.1	3.0±0.0	2.9±0.1
DZP	3.0±0.0	2.7±0.2	2.7±0.2	3.0±0.0
SZR	2.9±0.1	3.0±0.0	2.9±0.1	2.9±0.1
DZP+SZR	2.5±0.2*	2.2±0.1**	2.1±0.1**	1.9±0.2**

Analgesic effects were evaluated by our modified method of Takagi et al.⁹⁾

The repeated administrations were done for five days. Each value shows the tail pinched score in rats at 0, 1, 2 and 3 hr after administration.

*: Significantly different from the CMC-treated group (*p<0.05, **p<0.01)

は、各投与群とも影響を及ぼさなかった。一般に OB ラットの muricide は、抗うつ薬、例えば、imipramine や desipramine 等によって特異的に抑制されるため、いわゆる抗うつ薬のスクリーニング法の一つと考えられており、DZP では高用量において muricide の抑制が顕著にみられると報告されている⁸⁾。今回の結果から、DZP、SZR の単独投与群及び DZP と SZR の併用投与群のいずれもが muricide を抑制しなかったことから、恐らくこれら薬物の抗うつ作用は殆んどないものと考えられる。

以上要するに、SZR はそれ自体抗不安作用を有し、併用した場合には、DZP の作用を増強する傾向を示すことから、SZR の薬理作用は、DZP と類似し、しかも、相加作用を有すると考えられる。同様の結果は抗 conflict 作用の実験からも観察された。抗 conflict 作用の実験としては Geller 型、Waterlick 型、あるいは shuttle-box を用いることが多く、本実験では shuttle-box による方法を用いた。この結果も併用による連続投与群の場合に、最も抗 conflict 作用が著明であった。Geller 型の実験では

抗不安薬の conflict 緩解作用に耐性は出現し難いと報告されているが、本実験の shuttle-box では DZP に急性耐性の発現が見られたので、今後、更に検討を要するものと思われる。

一方、最近の知見において、BZP 系薬物と opioid 類の一つである methadone を併用することにより、methadone を減量することができ、しかも鎮痛作用が明確になること⁷⁾あるいは GABA neuron に影響を及ぼす薬物が鎮痛作用をもたらすことが報告¹²⁾されており、更に最近のわれわれの実験結果においても、脳内に BZP-opioid system が存在し、これらが鎮痛作用に影響を及ぼす可能性を示唆している⁴⁾⁵⁾。

これらの報告に加え、SZR の薬理作用が DZP の薬理作用に類似している本実験結果から、更に OB ラットを用いて tail pinch 法により SZR の鎮痛作用を検討したところ、併用群においてのみ鎮痛作用が著明に発現した。研究では tail pinch 法によるのみ検索を行ったため、必ずしも明確に結論づけることはできないが、本実験における OB ラット

及び抗 conflict 作用の結果を併せ考察すると次のように考えられる。Tail pinch 法は脊髄神経を刺激する深部痛と同様の痛みを惹起し、morphine 類のような麻薬性鎮痛薬の検定法の一つとされており、作用機序を異にする DZP や SZR 単独では、このような痛みを軽減しない。即ち、DZP や SZR は、opioid receptor には結合しにくいと思われる。一方、併用投与により、鎮痛作用が見られたが、この場合の効果は、opioid receptor への直接作用とは考え難く、他の機序、例えば、GABA and BZP/opioid system に関連を有するためと考えられる。しかも、この鎮痛作用は、抗不安作用の増強と共に顕著になり、当教室での抗不安、鎮痛作用に関する脳内 BZP/opioid system の報告^{4,5)}と併せ興味深い。

以上、SZR はそれ自身抗不安作用を有し、DZP を併用するとその作用は増強され、DZP による急性耐性発現を消失させる。更に DZP との併用では抗不安作用が消失すると共に麻薬性鎮痛薬とほぼ同程度の鎮痛効果が得られ、脳内の GABA 及び BZP/opioid system に対して影響を及ぼすことが示唆された。

謝辞 本研究のための SZR の試料を提供された明通製薬公司張西城董事長並びに絶大なる御協力を賜った西館徳次郎氏に対し深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 渋谷 健ほか：酸棗仁湯の基礎薬理学的研究
1. Ethanol による催眠効果に及ぼす影響。東医大誌44(6): 1018~1024, 1986
- 2) Chen, H-C and Hsieh, M-T: Clinical trial of suanzaorentang in the treatment of Insomnia. Clin. Ther. 7(3): 334~337, 1985
- 3) Chen, H-C and Hsieh, M-T: Studies on the suanzaorentang in the treatment of anxiety. Psycho-

- pharmacol. 85(4): 486~487, 1985
 - 4) Watanabe, Y et al: Prenatal and postnatal exposure to diazepam: Effects on opioid receptor binding in rat brain cortex. Europ. J. Pharmacol. 96: 141~144, 1983
 - 5) Shibuya, T et al: Development alterations in Maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments. Japan. J. Pharmacol. 40: 21~29, 1986
 - 6) Mantegazza, P et al: Modification of the antinociceptive effect of morphine by centrally administered diazepam and midazolam. Br. J. Pharmacol. 75: 569~572, 1982
 - 7) Preston, KL et al: Diazepam and methadone interactions in methadone maintenance. Clin. Pharmacol. Ther. 36(4): 534~541, 1984
 - 8) Ueki, S, Nurimoto, S and Ogawa, N: Characteristics in emotional behavior of the rat with bilateral olfactory bulb ablations. Folia. Psychiat. Neuronal. Japan. 26: 227~237, 1972
 - 9) Takagi, H, Inukai, T and Nakama, M: A modification of Haffner's method for testing analgesics. Japan. J. Pharmacol. 16: 287~294, 1966
 - 10) File, SE: Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rats. Psychopharmacol. 73: 240~245, 1981
 - 11) Henauer, SA, Galahet, EJ and Hollister, LE: Long lasting single-dose tolerance to neurologic deficits induced by diazepam. Psychopharmacol. 82: 161~163, 1984
 - 12) Andree, T, Kendall, DA and Enna, SJ: THIP analgesia: Cross tolerance with morphine. Life Sci. 32: 2265~2272, 1983
- (別刷請求先: ⊕ 160 東京都新宿区新宿 6-1-1
東京医科大学薬理学教室 渋谷 健)