

## 87. 生薬・漢方薬のサルコペニア予防作用に関する研究

牧野 利明

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 生薬学分野

Key words : サルコペニア, 牛車腎気丸, 牛膝, 車前子

### 緒 言

わが国では高齢化社会が問題となっており、内閣府の高齢社会白書によると平成 26 年の時点で総人口に対する 65 歳以上の割合は 25.1 % になっている。総人口に対する 65 歳以上の割合は今後も増加し、平成 72 (2060) 年には 39.9 % に及ぶとされ、2.5 人に 1 人が 65 歳以上の高齢者となると推計されている。2013 年に行われた 65 歳以上の男女を対象とした調査によると、European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) の作成した基準でサルコペニアと診断される割合は 65 歳以上の約 20 % 以上であり、これをもとに計算すると 2060 年には全人口の約 1 割程度の方がサルコペニアと診断されることになる。筋力が低下した状態では、転倒や転落のリスクが高くなり、場合によっては要介護状態につながる危険性もある。サルコペニアの治療法を確立し、高齢者の健康寿命を延ばすことは、国民の健康増進だけでなく国家の繁栄のためにも重要な課題となっている。

加齢性の筋肉の委縮は、漢方診断学では、生まれ持った生命エネルギーの衰退である「腎虚」と捉えられる。「腎虚」に対する代表的な処方としては牛車腎気丸があり、先行研究で老化促進マウス SAMP8 の加齢に伴う筋肉の委縮に対して牛車腎気丸が筋委縮抑制効果を示したという報告がされている<sup>1)</sup>。既存薬である牛車腎気丸がサルコペニア治療に有効であることが証明されれば、適応を拡大するだけで治療に使用出来るため、新薬開発に伴うドラッグラグの問題もない。安全かつ速やかなサルコペニアの保険治療の導入のために、牛車腎気丸の効果の基礎的エビデンスを構築することはサルコペニアの治療開発に対して重要な役割を担うであろう。

そこで本研究では、SAMP8 の加齢性筋肉萎縮ならびにマウス骨格筋由来 C2C12 細胞に対してデキサメタゾンを追加したときの MuRF1 の転写促進活性に対する抑制作用を指標として牛車腎気丸中の有効生薬の同定を目指した試験を行った。

### 方 法

六味丸 (沢瀉 3 g、茯苓 3 g、牡丹皮 3 g、山薬 3 g、乾地黄 5 g、山茱萸 3 g)、八味丸 (六味丸 + 附子 1 g、桂皮 1 g)、牛車腎気丸 (八味丸 + 牛膝 3 g、車前子 3 g)、牛膝抜き牛車腎気丸、車前子抜き牛車腎気丸は、それぞれの生薬の混合物に対して、生薬重量の 20 倍量のイオン交換水で 30 分間熱水抽出を行い、得られた煎液を凍結乾燥して作製した熱水抽出エキスを使用した。

4 週齢の雄性 SAMP8 および SAMR1 を日本エスエルシー (浜松) より購入した。実験開始前までは固形飼料及び水は自由に摂取させ、8 週齢からは飼料を粉末飼料に変更して飼育した。その後、9 週齢から 16 週齢まで、各種生薬エキスを 4 (w/w) % 含有する粉末飼料を用いて飼育した。Normal 群 (SAMR1) および control 群には、バレイショデンプンを同量含む粉末飼料を用いて飼育した。マウスを 16 週齢まで飼育した後、二酸化炭素ガスを吸入させることにより屠殺し、その後、腹大静脈より採血した。また、腓腹筋および下腿を摘出し、腓腹筋は重量を測定、下腿は 10 % ホルマリンで 1 週間処理をした。その後、流水で一晩洗浄した後に 10 % EDTA・2Na で 2 週間脱灰を行った。脱灰後、パラフィンに包埋し、4  $\mu$ m で薄切した切片を HE 染色した。切片に含まれる筋繊維の面積の写真を撮影し、WinROOF Software (三谷商事、福井) で解析した。血液は 2 時間室温で静置した後に 8,000  $\times$  g で 10 分間遠心し、血清を得た。血清中 IGF-1 濃度は Quantikine ELISA Mouse/Rat IGF-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を、

血清中 tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  濃度は ELISA MAX Mouse TNF- $\alpha$  (BioLegend, San Diego, CA, USA) を使用して測定した。

C2C12 細胞を播種したあと、リポフェクション法により pCMV-LacZ と pGL3-MuRF1<sup>2)</sup> を含む遺伝子を導入し、分化誘導培地で分化させた。そして、生葉エキス、デキサメタゾンを含む培地に交換し、24 時間培養した。細胞を溶解し、ルシフェラーゼ発光試薬を作用させ、発光量を測定した。

統計処理は、多重比較検定として Bonferroni/Dunn の多重比較  $t$  検定を採用し、危険率 5 % 未満を統計学的に有意とした。

## 結 果

Normal 群と比較して、control 群の下腿組織では優位に筋繊維の面積が小さくなり、筋萎縮を起こしていることが認められた。それに対して牛車腎気丸を投与した群では、有意に ( $P < 0.01$ ) 筋繊維の面積が大きかった。また、六味丸と八味丸を投与した群では、有意ではないものの、筋繊維の面積が control 群の値よりも大きく、筋萎縮からの回復傾向を示した。

次に、牛車腎気丸、八味丸、牛車腎気丸から牛膝、車前子をそれぞれ除いた群を設定し、それらの筋萎縮抑制効果を比較することで、牛膝、車前子の活性の寄与を明らかにすることを試みた。その結果、control 群と比較して各漢方処方を投与した群では筋繊維の断面積が大きくなる傾向が認められた (図 1)。

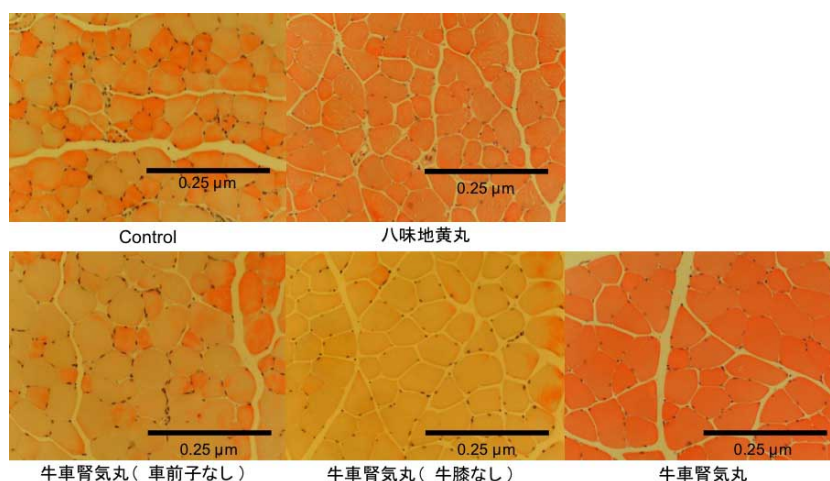


図 1. 老化促進マウスを用いた牛車腎気丸関連処方エキスの筋萎縮抑制作用  
下腿部を筋繊維に対して垂直に切断し、HE 染色した時の代表的な写真を示す。

また、腓腹筋を摘出してその重量を比較した結果、Control 群と比較して各漢方処方を投与した群では腓腹筋の重量が重くなる傾向があり、骨格筋萎縮が抑制されることが示唆された。このマウスの血清中の IGF-1 と TNF- $\alpha$  の濃度を測定したところ、牛車腎気丸を投与した群でのみ control 群と比較して血中 IGF-1 の濃度が有意に ( $P < 0.05$ ) 上昇したが、牛膝、車前子を除いた処方を与えた群では有意な変化は認められなかった。また、牛車腎気丸を投与した群と牛車腎気丸から車前子を抜いた群において control 群と比較して血中 TNF- $\alpha$  濃度が有意に ( $P < 0.01$ ) 低下したが、その他の処方を与えた群では有意な変化は認められなかった (図 2)。

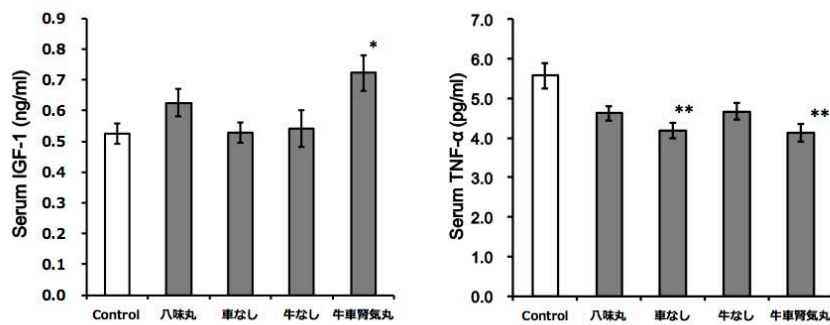


図2. 老化促進マウスに牛車腎気丸関連処方エキスを投与して飼育したときの血清中 IGF-1 (左) と TNF- $\alpha$  (右) の濃度

車なし：牛車腎気丸から車前子を除いた処方、牛なし：牛車腎気丸から牛膝を除いた処方。データは平均 $\pm$ 標準誤差 ( $n = 5 - 6$ ) で示し、Dunnett の多重比較検定を行った。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs control 群。

牛車腎気丸の構成生薬では、車前子、附子、山薬の各エキスにおいて、有意な MuRF1 転写活性抑制作用がみられた一方で、牡丹皮エキスにおいて有意な MuRF1 転写活性促進作用がみられた (図3)。

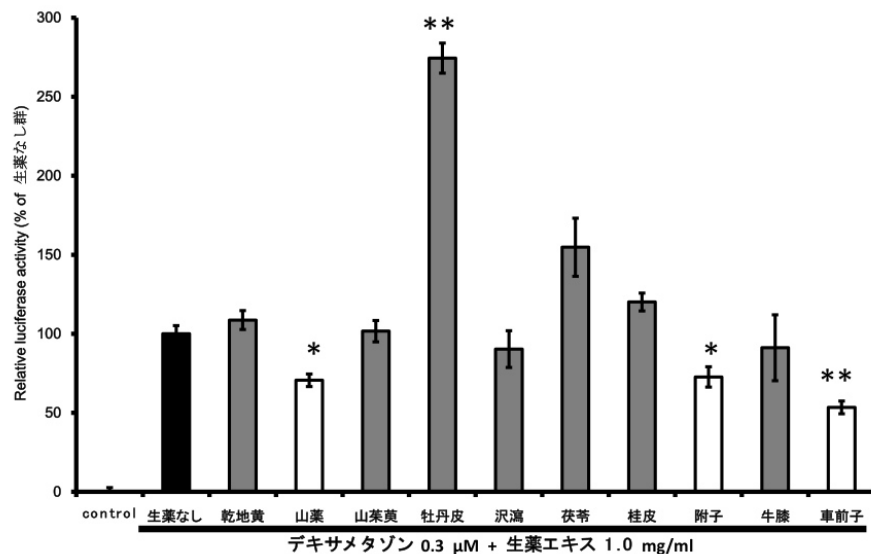


図3. 牛車腎気丸構成生薬の MuRF1 転写活性抑制作用

生薬なし：デキサメタゾンのみ。データは control 群のルシフェラーゼ活性の平均値を 0 %、生薬なし群の平均値を 100 % としたときの各群の活性を平均  $\pm$  標準誤差 ( $n = 4 - 5$ ) で示し、Dunnett の多重比較検定を行った。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  vs 生薬なし群。

## 考 察

本研究では、牛車腎気丸に含まれるサルコペニアに対する有効成分の単離と作用機序の解明を目的として行った。まず、牛車腎気丸を構成する生薬の中で筋肉萎縮抑制作用をもつ生薬を特定するために、SAMP8 を使用した *in vivo* の実験系で検証した。コントロール群と比較して牛車腎気丸を投与した群にのみ有意に ( $P < 0.05$ ) 筋萎縮を抑制する作用が認められた一方で、六味丸と八味丸では有意な差は認められなかったことから、牛車腎気丸にのみ含まれる牛膝、

車前子が、牛車腎気丸のサルコペニア改善作用に寄与していることが推測された。そこで、牛車腎気丸、八味丸、牛車腎気丸から牛膝を抜いた処方と車前子を抜いた処方をそれぞれ SAMP8 に投与して、筋萎縮の程度を比較した。筋繊維の委縮については有意な差は認められなかったが、血清中の IGF-1 の濃度は、コントロール群と比較して牛車腎気丸を与えた群において有意に上昇し、その他の処方を与えた群では認められなかった。また TNF- $\alpha$  の血中濃度は、牛車腎気丸を与えた群と牛車腎気丸から車前子を除いた群において有意に低下していたが、その他の群では認められなかった。以上のことから、血中 IGF-1、TNF- $\alpha$  濃度それぞれにおいて、牛車腎気丸に含まれる牛膝、車前子の寄与が推測され、牛膝、車前子の両方の作用による血中 IGF-1 濃度の上昇と、牛膝による血中 TNF- $\alpha$  濃度減少作用によって、牛車腎気丸が八味丸と比較してより強力な筋萎縮抑制効果を示すことが示唆された。今後は、*in vivo*、*in vitro* 両方の実験で有用性を見いだした車前子について、有効成分の単離を目指した研究を行いたい。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科漢方医学寄与講座の萩原圭祐准教授、岸田有紀講師、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・生体栄養学の二川健教授、安倍知紀助教である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Kishida Y, Kagawa S, Arimitsu J, Nakanishi M, Sakashita N, Otsuka S, Yoshikawa H, Hagihara K. (2015) Go-sha-jinki-Gan (GJG), a traditional Japanese herbal medicine, protects against sarcopenia in senescence-accelerated mice. *Phytomedicine*. 2015;22(1):16-22. doi: 10.1016/j.phymed.2014.11.005. PubMed PMID: 25636865
- 2) Hirasaka K, Maeda T, Ikeda C, Haruna M, Kohno S, Abe T, Ochi A, Mukai R, Oarada M, Eshima-Kondo S, Ohno A, Okumura Y, Terao J, Nikawa T. (2013) Isoflavones derived from soy beans prevent MuRF1-mediated muscle atrophy in C2C12 myotubes through SIRT1 activation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 59(4): 317-324. doi: 10.3177/jnsv.59.317. PubMed PMID: 24064732