



桂枝加苓朮附湯の関節炎改善作用と その作用機序に関する研究

小林製薬株式会社 中央研究所

松下哲也／萩野 輝／上杉晴香／柴原豪了／赤木淳二

● 要約

目的：変形性関節症（Osteoarthritis：以下、OA）をはじめとする関節炎は、関節内および関節周囲の炎症に加え、関節軟骨の変性や減少、関節腫脹を伴うことで、疼痛や可動域制限を生じる。漢方薬である桂枝加苓朮附湯（以下、KJ）は、関節痛の適応を持ち、OAの治療などに用いられるが、これまでにその薬理作用に関する研究は十分に行われていない。そこで本研究では、四肢に関節炎を発症させた関節炎モデルマウスに対するKJの機能的および組織学的な評価を行い、その作用機序について検討することとした。

方法：関節炎の評価にはコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いた。8週齢の雄性DBA/1J Jms Slc マウスにタイプIIコラーゲン/フロイント完全アジュバントを皮内投与し、一次感作を行った。一次感作から3週間後に二次感作として同様の投与を行い、関節炎を発症させた。KJを7週齢時から50日間経口投与（750 mg/kg 体重/day）し、二次感作後の四肢の関節炎スコアを経時的に記録した。KJの投与から45日目に前肢の指関節の可動域の評価として懸垂試験を行い、落下するまでの懸垂時間を測定した。50日間の投与後に膝関節を摘出し、関節軟骨、ヒアルロン酸（Hyaluronic acid：以下、HA）、およびII型コラーゲン染色による組織学的評価を行った。また、作用機序を明らかにする目的で、HA分解酵素であるヒアルロニダーゼならびに軟骨細胞のHA産生に対するKJの作用を*in vitro*で検討した。

結果：KJは関節炎スコアを有意に改善し、炎症に伴う関節の腫脹や発赤を抑制した。懸垂試験では懸垂時間の有意な延長を認めた。また、組織染色による評価では対照群において関節軟骨およびHAが減少したのに対し、KJ群では減少の抑制が認められた。また、*in vitro*においてKJに濃度依存的なヒアルロニダーゼ阻害活性および軟骨細胞におけるHA産生の促進がみられ、KJにHAの分解を抑える作用と生み出す作用の両作用が認められた。

考察：KJは、関節における抗炎症作用に加えて、関節組織の潤滑成分であるHAの分解抑制作用と産生促進作用により、関節軟骨の損失を抑え、OAなどの関節機能障害の改善に役立つものと考えられた。

Key words：桂枝加苓朮附湯、関節炎、ヒアルロン酸

はじめに

関節痛は様々な原因によって引き起こされ、男女を問わず年齢とともに関節痛を訴える人は増加する¹⁾²⁾。なかでも関節痛を引き起こす主な原因疾患

として、関節軟骨の損失と広範な骨変化を特徴とする変形性関節症（以下、OA）が挙げられ、膝、股、肩、手指、首など様々な関節部位で生じる。日本におけるOAの有病者数は膝だけでも約2,530万人と推定されており、超高齢化社会の進行に伴い今

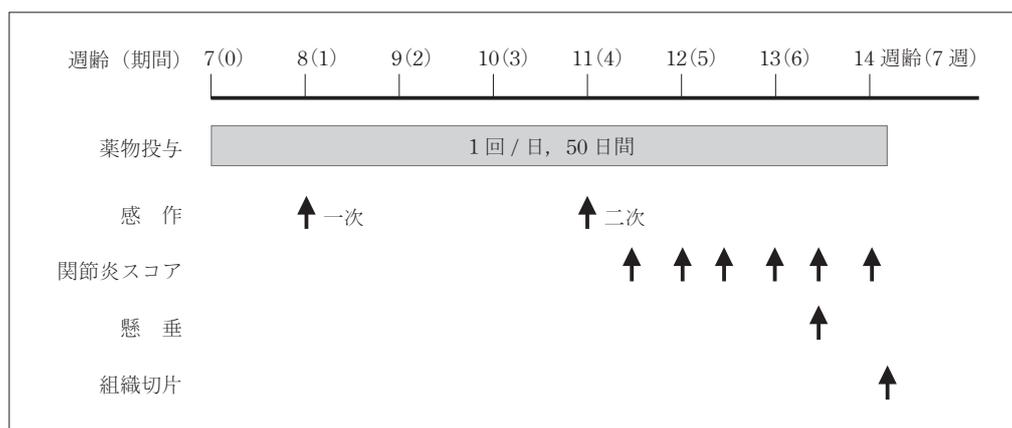


図1 試験スケジュールの概要

表1 関節炎スコアの評価

スコア (点)	症 状
0	症状なし
1	指など小関節 1 本の軽度発赤腫脹
2	小関節が 2 本以上, あるいは大きな関節の発赤腫脹
3	1 肢の発赤腫脹
4	1 肢の全体が最大限に発赤腫脹

後の患者の割合はさらに増加すると予想されている³⁾。OA は関節軟骨の変形および減少, 関節腫脹に加えて, 関節内および関節周囲に炎症を引き起こす疾患であり, 炎症に伴う関節液の貯留や, ヒアルロン酸 (以下, HA) の分解や合成の低下が軟骨面における適切な潤滑を妨げる^{4)~6)}。一般的な治療法として NSAIDs などの抗炎症鎮痛薬が用いられることが多いが, NSAIDs は長期の服用により消化器障害などを引き起こすことがあり, NSAIDs 以外の治療アプローチとして, HA やステロイドの関節内注射, コンドロイチン硫酸・グルコサミンの内服, 温熱療法, 運動療法などの手段が選択されることもある³⁾。

桂枝加苓朮附湯 (以下, KJ) は 8 種の生薬から構成される漢方薬であり, 関節痛や神経痛の適応を持つ。これまでに OA を始めとする関節炎の治療に広く用いられているが⁷⁾, その薬理作用に関する研究は十分に行われていない。そこで本研究では, KJ の OA に対する薬理作用の解明研究の一環として, コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスに対する機能的および組織学的な評価を行うとともに, *in vitro* にて HA の分解や産生に対する作用を検討した。

I. 材料および実験方法

1. 使用薬物

KJ は一般用漢方製剤製造販売承認基準⁸⁾ に従い, 桂皮 (4), 芍薬 (4), 大棗 (4), 白朮 (4), 茯苓 (4), 生姜 (1), 甘草 (2), 附子末 (0.5) を括弧内の重量比で混合した生薬を熱水抽出し, 乾燥させたものを使用した。

2. コラーゲン誘導性関節炎モデル作製と薬物投与

コラーゲン誘導性関節炎モデルとして雄性 DBA/1J Jms Slc マウス (日本エスエルシー) を 6 週齢にて購入し, 実験に使用した。飼育期間中, 固型飼料 (ラボ MR ストック, 日本農産工業) および水道水を自由に摂取させた。1 週間の予備飼育後, KJ 群には, 蒸留水に溶解した KJ を 750 mg/kg 体重/day の投与量となるように胃内ゾンデで 50 日間経口投与した。対照群には, 蒸留水のみを経口投与した。また, 比較群として, 蒸留水に溶解したコンドロイチン硫酸エステルナトリウム (以下, CS, 小林製薬) を 260 mg/kg 体重/day の投与量で経口投与した。薬物投与から 1 週間時点 (8 週齢) でタイプ II コラーゲンによる一次感作を行い, さらに

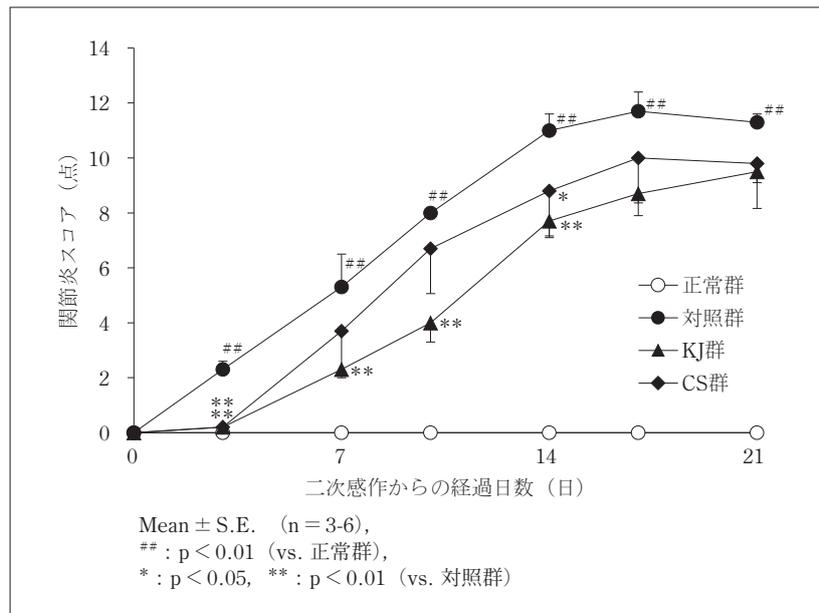


図2 関節炎スコア

に3週間後に二次感作を行い、関節炎を発症させた。タイプIIコラーゲンは、ウシ関節軟骨由来タイプIIコラーゲン末(コラーゲン技術研修会)を2 mg/mLとなるように50 mM酢酸水溶液に溶解し、等量のプロイント完全アジュバント(Difco Laboratories)を加えてエマルジョン化したものを使用した。これをイソフルラン吸入麻酔下で、マウス1匹当たり0.1 mLを尾根部に皮下投与した。なお、タイプIIコラーゲンによる感作を行わない動物を正常群とし、対照群と同様に蒸留水のみを経口投与した。

動物実験は、新薬リサーチセンター実験動物委員会にて審査・承認された内容に従い実施した。試験スケジュールの概要を図1に示した。

3. 関節炎スコア

二次感作後の四肢における関節炎の症状について、表1の関節炎スコア⁹⁾に従い、2回/週の頻度で評価を行い、四肢のスコアの合計値を算出した。

4. 懸垂試験

前肢の指関節における可動状況を評価するため、薬剤の投与開始から45日目に懸垂試験を実施した。体重の40%の錘を尾部に負荷し、高さ15 cmの位置に水平に張った針金に動物の両側前肢を掛けて懸垂させ、落下するまでの懸垂時間を記録した。

5. 病理組織学的検査

最終投与翌日に、動物をイソフルランによる吸入

麻酔下で放血安楽致死をさせ、左右後肢膝関節を摘出した。その後、余分な皮膚や筋肉を除去し、10%中性緩衝ホルマリンに固定した。固定した膝関節を10% EDTA液(pH 7.4)で脱灰後、大腿骨滑車溝・脂肪体(滑膜)・膝蓋骨を含む正中断面で切り出し、パラフィンブロック標本作製した。パラフィンブロック標本を薄切後、サフラニンOファストグリーンによる軟骨基質染色、HA結合蛋白(HABP)によるHA染色、および免疫染色によるII型コラーゲン染色をそれぞれ行った。

6. ヒアルロニダーゼ阻害試験

ヒアルロニダーゼ阻害試験はKakegawaらの方法¹⁰⁾を参考に行った。KJを0.1 M酢酸緩衝液(pH 4.0)に溶解し、上清を試料溶液とした。酵素溶液(4 mg/mL, ウシ由来ヒアルロニダーゼ, シグマアルドリッチジャパン), 基質溶液(0.8 mg/mL, ヒアルロン酸カリウム, 和光純薬工業), 酵素活性化液(0.5 mg/mL, Compound 48/80, シグマアルドリッチジャパン)を、いずれも酢酸緩衝液を用いて調製した。発色試液(0.1 g/mL, *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド, 和光純薬工業)は塩酸酢酸混合液(10 N塩酸:酢酸=3:22)を用いて調製し、使用直前に酢酸で10倍希釈して使用した。試料溶液, 酵素溶液, 酵素活性化液, 基質溶液の順に2:1:2:5の割合で混合し、37°Cで40分間酵素反応を行い、0.4 N水酸化ナトリウム水溶液を加えて反

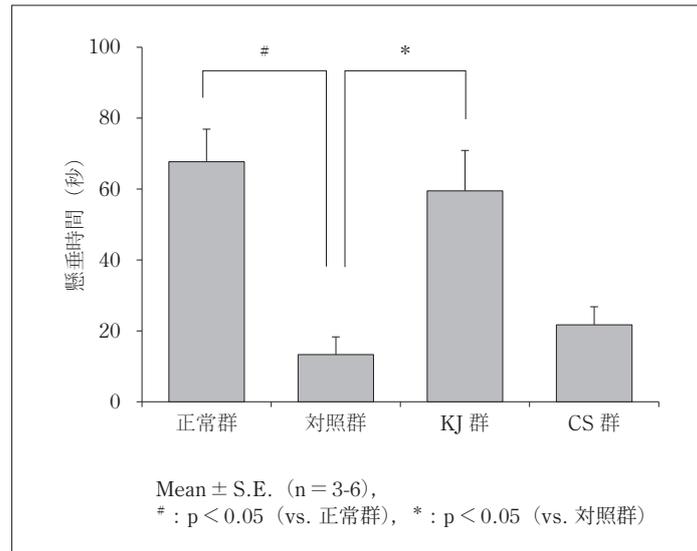


図3 懸垂時間

応を停止させた。0.8 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) を加え、105°Cで5分間加熱した後、発色試液を加えて37°Cで30分間反応させた後、585 nmにおける吸光度を測定した。ヒアルロニダーゼ阻害率は試料を添加した際の吸光度の変化量から算出し、50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。

7. HA 産生試験

Chondrocyte growth medium (C-27101, タカラバイオ) にて培養したヒト軟骨細胞 (Human Chondrocyte : HCH, C-12710, タカラバイオ) を 150,000 cells/well になるように 6 well プレートに播種し、一晚培養した。培養後、蒸留水で抽出した KJ を 0.2 μm フィルター処理し、終濃度が 1% になるように細胞に添加し、4日間培養した。培養後、培養上清を回収し、HA 量を QnE Hyaluronic Acid ELISA Assay Kit (BTP-96200, フナコシ) を用いて測定した。

8. 統計解析

結果はすべて平均値および標準誤差で示した。動物実験では、正常群と対照群の有意差検定には Student の t 検定を用い、対照群と KJ 群および CS 群との有意差検定には Dunnett 多重比較検定を用いた。また、酵素実験の有意差検定には Dunnett 多重比較検定を用い、細胞実験では Student の t 検定を用いた。いずれの検定においても有意水準は両側 5% とした。統計解析には Excel 統計 Ver.3.21 を使用した。

II. 結 果

関節炎スコアを図2に示した。対照群の関節炎スコアは二次感作からの経過日数とともに増加し、二次感作から3日目以降のすべてのスコアで正常群に対する有意な上昇がみられた。一方、KJ 群は二次感作から3, 7, 10, および14日目に対照群に対する有意な低下がみられた。CS 群は二次感作から3, 14日目に対照群に対する有意な低下がみられた。

懸垂試験における懸垂時間を図3に示した。また、懸垂試験の様子を図4に示した。正常群の懸垂時間は 67.7 ± 9.2 秒に対して、対照群は 13.3 ± 5.0 秒であり、対照群において懸垂時間の有意な低下がみられた。一方、KJ 群では 59.5 ± 11.4 秒であり、対照群と比べて有意に懸垂時間が延長した。CS 群は 21.7 ± 5.1 秒であった。

膝関節の組織染色の結果を図5に示した。正常群と比べて対照群やCS 群では関節軟骨の染色性が低下し、軟骨基質の損失が認められた。一方、KJ 群では染色性の低下は認められず、顕著な残存がみられた。HA の染色像においては、正常群において関節軟骨部位に HA の集積がみられるのに対し、対照群やCS 群では染色性は低下し、HA の減少が認められた。KJ 群では正常群と同レベルの染色性を示し、HA が維持されていた。一方、II型コラーゲンの染色像においては対照群、KJ 群、およびCS 群のいずれにおいても正常群に対して染色性の低下

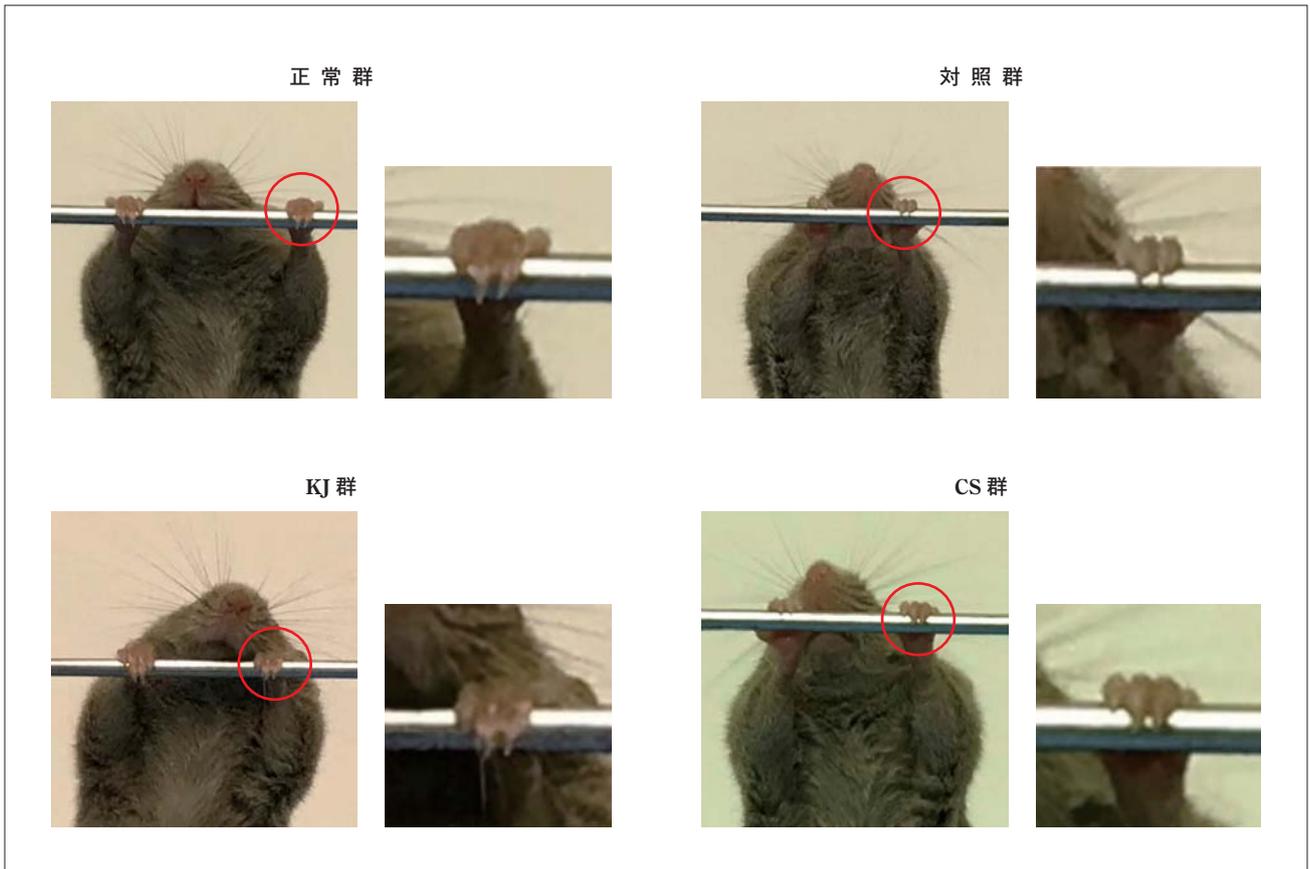


図4 懸垂試験時の様子 (典型例)

	正常群	対照群	KJ群	CS群
関節軟骨				
ヒアルロン酸 (HA)				
Ⅱ型コラーゲン				

図5 組織切片染色

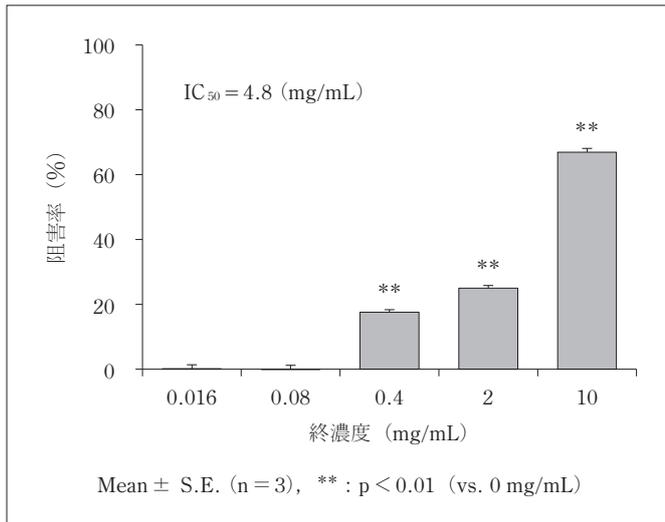


図6 ヒアルロニダーゼ阻害活性

がみられた。

ヒアルロニダーゼ阻害試験の結果を図6に示した。KJは終濃度0.4, 2, および10 mg/mLにおいて阻害率17.6, 25.0, および66.9%を示し、濃度依存的なヒアルロニダーゼ阻害活性が認められた($IC_{50} = 4.8$ mg/mL)。

軟骨細胞におけるHA産生量の測定の結果を図7に示した。Controlが 3820 ± 243 ng/mLのHA産生量に対して、KJでは 4502 ± 154 ng/mLであり、有意なHA産生量の増加がみられた。

III. 考 察

コラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いてKJの薬理作用について評価を行った結果、KJ群は二次感作後3日目から関節炎スコアの有意な改善を示し、KJに炎症による腫脹や発赤を抑える効果が確認された。また、関節炎が十分に進行した薬剤投与45日目(二次感作から17日目)に懸垂試験を実施した結果、KJ群において懸垂時間の有意な延長が認められた。手指の炎症や腫脹は関節可動の悪化を引き起こし、懸垂時間の低下に繋がることから、KJ投与によって炎症が抑えられたことで可動性が改善し、懸垂時間の延長に寄与したと推察される。次にKJ投与による関節組織への影響を検討するため、膝関節の組織学的評価を行った。その結果、対照群やCS群において関節軟骨およびHAの減少が認められたのに対し、KJ群ではこれら基質成分の残存が認められた。HAは関節の潤滑性に関

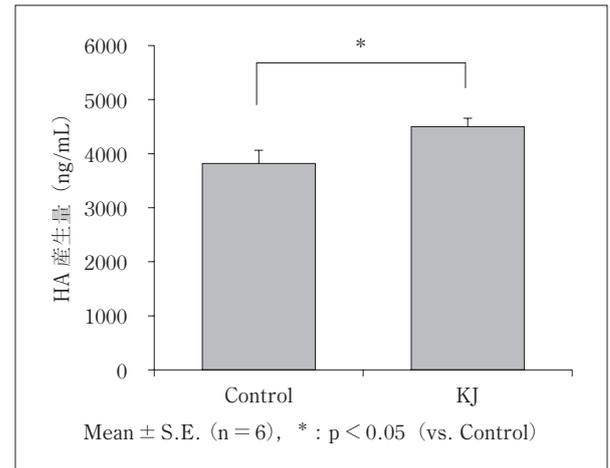


図7 HA産生量

与し、軟骨破壊を防ぐことから¹¹⁾、KJは関節組織において減少するHAを維持・増加させ、関節軟骨の破壊を抑制したと考えられる。また、HAは関節において炎症性サイトカイン産生抑制や疼痛抑制を示すことから⁵⁾、HAが維持されることで炎症が抑えられ、関節炎スコアの改善や懸垂時間の延長にも寄与したと考えられる。

通常、関節痛改善を目的にKJは満量処方として1日4.4～4.8 g、CSは1日1.56 gがヒトにおいて服用されており¹²⁾¹³⁾、KJの方が1日服用量が2.8～3.1倍多い。今回、このヒト用量比をもとに投与量を設定し、動物試験を行ったところ、KJ群およびCS群ともに関節炎スコアの改善が認められたものの、懸垂時間の延長はKJ群でのみ観察され、また、組織学的評価においても、KJ群でのみ関節軟骨やHAの維持が認められた。このことから、KJには関節軟骨組織の破壊を防ぐ作用があり、CSとは異なる働きを示すものと考えられた。

次に、HAの分解や産生に対するKJの作用を明らかにするため、HA分解酵素であるヒアルロニダーゼや、軟骨細胞におけるHA産生に対する作用を*in vitro*にて評価した。その結果、KJの濃度依存的なヒアルロニダーゼ阻害活性や、軟骨細胞におけるHA産生増加がみられたことから、KJにHAの分解を抑える作用と生み出す作用の両作用があることが分かった。これまでにKJの構成生薬のうち甘草においてヒアルロニダーゼ阻害作用やHA合成促進作用が報告されており¹⁴⁾¹⁵⁾、KJによるHAの維持に構成生薬の甘草が寄与している可能性が推察さ

れる。一方、漢方薬は複数の生薬の組み合わせでその薬効が発揮される多成分系の薬物であるため、活性に寄与する生薬や活性成分の特定については今後詳細な検討が必要と考えられる。

以上、本研究の結果から、KJには関節における抗炎症作用に加えて、関節組織の潤滑成分であるHAの分解抑制や産生促進作用が認められた。今後、KJの薬理作用の詳細がより明らかになり、OAなどの関節機能障害の治療に積極的に利用されることを期待したい。

IV. 引用文献

- 1) 斉藤聖二：関節痛（炎）：診断と治療の進歩。日本内科学会雑誌 **83** : 1871-1875, 1994.
- 2) 厚生労働省：平成25年国民生活基礎調査の概況。
- 3) 川口 浩：変形性関節症治療の国内外のガイドライン。日関病誌 **35** : 1-9, 2016.
- 4) 石田高志，関口剛美，川真田樹人：関節炎による痛みのメカニズムと薬物治療の最新の進歩。日本ペインクリニック学会誌 **25** : 53-62, 2018.
- 5) 小椋真理，高部稚子，八木雅之，米井嘉一：ヒアルロン酸と関節軟骨。Glycative Stress Research **5** : 12-20, 2018.
- 6) 医療情報科学研究所 編：病気がみえる vol. 11 運動器・整形外科。メディックメディア，東京，2017.
- 7) 下手公一，山下一也，萬谷直樹，小林祥泰：変形性膝関節症に対する防己黄耆湯と桂枝加苓朮附湯併用治療の試み。J Trad Med **19** : 148-152, 2002.
- 8) 一般用漢方製剤製造販売承認基準。平成29年4月1日厚生労働省医薬・生活衛生局。
- 9) 日本生化学会 編：新生物化学実験講座12。分子免疫学II，東京化学同人，360-372，東京，1989.
- 10) Kakegawa H, Matsumoto H, Sato T : Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hyaluronidase. Chem Pharm Bull **33** : 642-646, 1985.
- 11) 原田真理，宇月美和，石黒直樹，岩館克治，澤井高志：高分子ヒアルロン酸（HA）による軟骨保護作用のメカニズムの解明。臨床リウマチ，**27** : 51-63, 2015.
- 12) 株式会社医薬情報研究所：日本医薬品集 医療薬 2013年版。株式会社じほう，東京，2012.
- 13) 一般社団法人 日本 OTC 医薬品情報研究会 編：OTC 医薬品事典 2016-17 第15版。株式会社じほう：2016.
- 14) 沢辺善之，山崎勝弘，岩上正藏，梶村計志，中込和哉：生薬の皮膚関連酵素に対する阻害作用。薬学雑誌 **118** : 423-429, 1998.
- 15) 木曾昭典，川嶋善仁，大戸信明，周 艶陽，屋敷（土肥）圭子，村上敏之，新穂大介，神原敏光，水谷健二：甘草葉抽出物によるセラミドおよびヒアルロン酸合成促進作用。J Soc Cosmet Chem Jpn **43** : 267-273, 2009.