

|         |  |
|---------|--|
| 称号及び氏名  | 博士(獣医学) 市橋 優   |
| 学位授与の日付 | 平成22年2月20日   |
| 論文名     | Studies on preventive and improvement effects of a kampo<br>Medicine on the decline in reproductive functions and<br>peripheral blood flow in aged female rats<br>(漢方方剤の老齢雌ラットの生殖機能ならびに末梢血流量低下<br>に対する予防および改善効果に関する研究) |
| 論文審査委員  | 主査 久保 喜平<br>副査 小森 雅之<br>副査 岡田 利也<br>副査 竹中 重雄   |

## 論文要旨

### 緒言

加齢 (Aging) は生物学的プロセス, すなわち誕生から死までの時間経過であり, 長期にわたる組織や物質の変化の蓄積である. 老化 (Senescence) は, 性成熟期以降の加齢に伴う生体機能の衰えを示すものである. そのメカニズムは複雑であり多様性があるため, 未だ解明されていないことが多いが, 遺伝子機能の変化, 細胞機能の低下, フリーラジカルによる生体成分の酸化, 免疫力やホルモンレベルの低下などが注目されている. エイジング研究には適切な動物モデルが必要であり, マウスやラット等のげっ歯類が広く実験に用いられている. 特に生殖機能はすべての哺乳類にとって欠かすことのできない生物学的特徴の一つであり, ラットとヒト間でも相同性を有する生体機能のひとつである.

生殖機能に関する加齢性変化研究は, 主にLong-Evans, Sprague-DawleyあるいはWistarラットを用いて行われてきた. ラット性周期は, 生存期間を通して卵巣機能をよく反映し, 個々の生殖機能をモニタリングするのに便利で有用なパラメーターである.

現在、性周期を観察・分類する方法として膣スメア法と膣インピーダンス法が主に用いられている。しかしながら、膣インピーダンス法の性周期の乱れた動物での有用性は明らかになっていない。

アンチエイジングの手法として、食事制限、サプリメントや健康食品、ホルモン療法および漢方療法などが挙げられる。漢方方剤は一般的に安価で副作用の少ない薬剤であることが特徴とされ、慢性疲労、更年期障害、不妊症や冷え性など多種多様な疾患に処方されている。しかしながら、動物実験でこれらの効果が立証された研究は多くない。

本研究では、加齢に伴い性周期の乱れたラットを用い膣インピーダンス値と膣組織の相関性を調べた。さらに漢方方剤ナンパオの加齢に伴う性周期の乱れに対する作用を解析すると同時に、膣インピーダンス法の性周期モニタリングツールとしての有用性を検討した。また、ナンパオの老齢雌ラットの生体機能低下、特に生殖機能の衰えおよび末梢血流量低下に対する予防および改善効果を調べることを目的とした。

## 第一章 老齢雌ラットにおける膣インピーダンス値と膣組織像との相関性

膣インピーダンス法は膣粘膜上皮の角質層の形成に伴うインピーダンス(交流電気抵抗)値の増加(測定値 3.0k $\Omega$  以上)を指標として、雌ラットの交配適期を判定する簡便な方法として利用されている。今回、生殖機能の低下を示す月齢に達した 13 ヶ月齢および 19 ヶ月齢のラットを用い、膣インピーダンス値と膣粘膜上皮の形態学的な状態との相関について検討した。その結果、インピーダンス値は若齢のラットと同様に性周期の乱れたラットでも膣スメア像と相関することが示された。さらに、連続発情および持続的な休止期を示すラットのインピーダンス値は膣組織学的な形態を反映していた。以上のことから、膣インピーダンス法は加齢に伴う性周期の経時的な変化を捉えるのに有用であると結論した。

## 第二章 膣インピーダンス法を用いた加齢に伴う性周期の乱れに対する漢方方剤ナンパオの効果

雌ラットを用いて加齢による性周期の乱れに対する漢方方剤ナンパオの改善効果を経時的に検索した。また、性周期推移の研究における膣インピーダンス法の有用性を検討した。ラットを対照群、ナンパオ 30 mg/kg/day 投与群および 100 mg/kg/day 投与群の 3 群に振り分けた。14 日間の性周期観察および膣インピーダンス測定をナンパオまたは蒸留水処置前に該当する 6 ヶ月齢に実施した。投与開始後、同様の手法でこれらのデータを、約 1 ヶ月間隔で 10 ヶ月齢に至るまで収集した。投与 2~3 週 (7 ヶ月齢) および投与 6~7 週 (8 ヶ月齢) の観察において、100 mg/kg/day 投与群では対照群に比べて性周期の乱れが抑制された。さらに、投与 11~12 週 (9 ヶ月齢) および投与 17~18 週 (10 ヶ月齢) では、100 mg/kg/day 群だけでなく 30 mg/kg/day 群においても同様の効果が確認された。また、膣スメアあるいは膣インピーダンスによって判断された周期

性はほぼ一致した結果を示し、性周期の経時的な変動を性周期観察と同様、膣インピーダンス測定によっても検出することが可能であった。以上の結果から、ナンパオは短期間の服用で雌ラットの性周期の乱れを抑制することを示唆した。また、膣インピーダンス法は、性周期の変動を簡易に検出できる方法として有用であると結論した。

### 第三章 漢方方剤ナンパオの加齢に伴う雌ラットの生体機能低下に対する予防および改善効果

#### 第一節 漢方方剤ナンパオの加齢に伴う雌ラットの生殖機能低下に対する予防および改善効果

生殖機能に関するより詳細な検査項目を加えることで、漢方方剤ナンパオの母動物の生殖機能の低下に対する改善効果を検索した。5ヵ月齢のラットは、対照群、ナンパオ 30 mg/kg/day 投与群およびナンパオ 100 mg/kg/day 投与群の3群に振り分け、ナンパオまたは蒸留水を5ヵ月齢から経口投与した。第1回交配実験は投与21週（10ヵ月齢）に開始し、自然分娩により生殖機能を評価した。引き続き投与を継続し、第2回交配実験は投与31週（12ヵ月齢）に開始し、妊娠21日に帝王切開により生殖機能を評価した。ナンパオ投与群では対照群に比べ、性周期の乱れ、分娩率、妊娠率および平均胎児体重の低下が抑制された。また、ナンパオ 100 mg/kg/day 群では、平均生存出生児数および胎児数の低下が抑制された。これらの研究から、ナンパオは加齢に伴う性周期の乱れだけでなく受胎能の低下を抑制する作用を有すると結論した。

#### 第二節 漢方方剤ナンパオの冷えに対する効果；雌ラットの末梢血流量および体表温度を指標とした検討

漢方方剤ナンパオの冷えに対する効果を雌ラットを用いて評価した。5ヵ月齢のラットにナンパオを0（対照群）、30および100 mg/kg/dayの用量で経口投与し、末梢血流量をレーザー血流計、体表温度をサーモグラフィ装置を用いて測定した。末梢血流量は、対照群に比べてナンパオ投与群で多い傾向を示し、氷冷後の体表温度は対照群に比べナンパオ投与群で高かった。以上のことから、ナンパオが末梢血流量の減少に関連した「冷え性」の改善に働く可能性がある」と結論した。

### 総括

1. 生殖機能の低下を示す月齢に達したラットを用い、膣インピーダンス値と膣粘膜上皮の形態学的な状態との相関について検討した結果、膣インピーダンス法は加齢に伴う性周期の経時的な変化を捉えるのに有用である可能性を見出した。

2. 雌ラットを用いて加齢による性周期の乱れに対する漢方方剤ナンパオの改善効果を経時的に検索した。また、性周期推移の研究における膣インピーダンス法の有用性を

検討した結果から、ナンパオは雌ラットの性周期の乱れを抑制することを示唆した。また、膣インピーダンス法は、性周期の変動を簡易に検出できる方法として有用であると結論した。

3. 漢方方剤ナンパオの反復投与における生体機能低下に対する改善効果を検索した結果、ナンパオは加齢に伴う性周期の乱れだけでなく受胎能の低下を抑制する作用を有すると結論した。さらには、ナンパオは末梢血流量の低下に関連した冷えの改善効果を有することを見出した。

4. 以上の研究成果は、膣インピーダンス法が、生理学や繁殖学の研究分野において性周期の経時的な変化を捉えるために有用であることを示した。さらには、漢方方剤ナンパオが雌ラットの加齢に伴う生体機能の衰えおよび末梢血流量の低下を抑制することを証明し、ヒトでのさらなる臨床応用を検討する上で有用な科学的根拠を提示した。

## 審査結果の要旨

加齢 (Aging) は、誕生から死までの時間経過であり、長期にわたる組織や物質の変化の蓄積である。老化 (Senescence) は、性成熟期以降の加齢に伴う生体機能の衰えを示すものである。そのメカニズムは複雑であり多様性があるため、未だ解明されていないことが多いが、遺伝子機能の変化、細胞機能の低下、フリーラジカルによる生体成分の酸化、免疫力やホルモンレベルの低下などが注目されている。漢方方剤は、慢性疲労、更年期障害、不妊症や冷え性などの多様な疾患に処方されているが、動物実験でこれらの効果が立証された研究は多くない。

本研究では、加齢に伴い性周期の乱れたラットを用い膣インピーダンス値と膣組織の相関性を調べた。さらに、加齢に伴う性周期の乱れに対する漢方方剤ナンパオの作用を解析し、性周期モニタリングツールとしての膣インピーダンス法の有用性を検討した。また、ナンパオの生殖機能や末梢血流量低下に対する予防および改善効果を調べることを目的とした。

第一章では、生殖機能の低下を示す月齢に達した13ヵ月齢および19ヵ月齢の老齢雌ラットを用い、膣インピーダンス値と膣粘膜上皮の形態学的な状態との相関について検討した。その結果、インピーダンス値は若齢のラットと同様に性周期の乱れたラットでも膣スミア像と相関することが示されたことから、膣インピーダンス法は加齢に伴う性周期の経時的な変化を捉えるのに有用であることを明らかにした。

第二章では、膣インピーダンス法を用いた加齢に伴う性周期の乱れに対する漢方方剤ナンパオの効果を検討するために、6ヵ月齢雌ラットを蒸留水投与の対照群、ナンパオ

30 mg/kg/day投与群および100 mg/kg/day投与群の3群に振り分けた。投与開始後、14日間の性周期観察および膣インピーダンス測定を、約1ヵ月間隔で10ヵ月齢に至るまで収集した。この結果、投与11~12週（9ヵ月齢）および投与17~18週（10ヵ月齢）では、ナンパオ投与群において対照群に比べて性周期の乱れが抑制された。また、膣スメアあるいは膣インピーダンスによって判断された周期性はほぼ一致した結果を示した。以上の結果から、ナンパオは短期間の服用で雌ラットの性周期の乱れを抑制すること、また、膣インピーダンス法は、性周期の変動の簡易な検出法として有用であることを明らかにした。

第三章では、漢方方剤ナンパオの加齢に伴う雌ラットの生体機能低下に対する予防および改善効果を検討した。第一節ではナンパオの加齢に伴う雌ラットの生殖機能低下に対する予防および改善効果を検討するために、5ヵ月齢ラットに、ナンパオ30または100 mg/kg/dayを継続的に経口投与した。第1回交配実験は投与21週（10ヵ月齢）に開始し、自然分娩により生殖機能を評価した。引き続き投与を継続し、第2回交配実験は投与31週（12ヵ月齢）に開始し、妊娠21日に帝王切開により生殖機能を評価した。ナンパオ投与群では対照群（蒸留水投与）に比べ、性周期の乱れ、分娩率、妊娠率および平均胎児体重の低下が抑制された。また、ナンパオ100 mg/kg/day群では、平均生存出生児数および胎児数の低下が抑制された。これらの研究から、ナンパオは加齢に伴う性周期の乱れだけでなく受胎能の低下を抑制する作用を有することが示唆された。また、第二節では、漢方方剤ナンパオの冷えに対する効果を雌ラットの末梢血流量および体表温度を指標として検討した。5ヵ月齢のラットの対照群、ナンパオ30および100 mg/kg/day経口投与群について、末梢血流量および体表温度を、それぞれレーザー血流計およびサーモグラフィ装置を用いて測定した。末梢血流量は、対照群に比べてナンパオ投与群で多い傾向を示し、氷冷後の体表温度は対照群に比べナンパオ投与群で高かった。以上のことから、ナンパオが末梢血流量の減少に関連した「冷え性」の改善に働く可能性があると結論した。

以上、本研究は、ラットの加齢による性周期の乱れや生体機能低下に対する漢方方剤ナンパオの改善効果を明らかにし、加えて、性周期推移の研究における膣インピーダンス法の有用性を示した。これらの成果は、獣医学および医学の老化研究分野の発展に貢献するものであり、本論文の審査および学力確認試験の結果から博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。

