

高齢者の高次中枢機能の低下に対する 漢方薬の効果に関する研究

主任研究者：鳥居塚和生（北里研究所 東洋医学総合研究所
臨床研究部・副部長）

本年度は漢方薬の作用機構を明かとする研究に焦点を絞り検討した。その結果、虚血性脳循環障害モデル動物を用いた系で七物降下湯投与により脳の出血巣の数の有意な低下、梗塞巣の面積の有意な減少を観察した。また脳動脈での付着細胞はほとんど観察されないことが示された。このことは虚血性脳循環障害の病態進行に抑制的に働き、脳循環改善、内皮機能保護に作用すると考えられた。

当帰芍薬散が脳の興奮状態を緩和させる作用機序はCRF放出以降の反応は関与しないこと、当帰芍薬散自身には植物由来のestrogen様物質を含まないことが示された。更に当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用により、特に記憶の形成過程に効果を示すことが示され、コリン作動性神経の増強作用は複合作用であることが示唆された。また釣藤散の虚血性の中枢神経障害に対する有効性の一部には、釣藤散がグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウム流入阻害を介して抑制する機序によることが示され、厚朴成分honokiolの抗不安作用の有効量は一般的中枢抑制作用のおよそ1/500程度であり、効果発現にはGABA_Aーベンゾジアゼピン複合受容体の関与が明かにされた。

これらの成績は老化による血管機能低下の抑制作用が漢方薬に期待でき、高齢者の高次中枢機能低下、痴呆の予防や治療薬としての臨床利用の妥当性の根拠を与えるものと考えられる。

〔研究組織〕

- 鳥居塚和生（北里研究所・東洋医学総合
研究所・臨床研究部・副部長）
- 佐竹元吉（国立医薬品食品衛生研究所
生薬部・部長）
- 渡邊裕司（富山医科薬科大学・
和漢薬研究所・教授）
- 丸山悠司（群馬大学医学部・教授）
- 嶋田豊（富山医科薬科大学
医学部・講師）
- 木村通郎（関西鍼灸短期大学・教授）
- 石毛敦（ツムラ中央研究所・
漢方生薬研究所・部長）

A. 研究目的

2008年には「脳血管障害、老人性痴呆の予防

薬として漢方薬が臨床応用される」との予測が長寿科学未来予測調査班の報告でなされている。本研究は高齢者の知的能力の低下をはじめ睡眠障害、不安、感情障害などの中枢機能に対する漢方薬の作用や脳血液循環系の障害に対する漢方薬の作用、及びそれらの作用機序を解明することを目的としている。昨年度までに漢方方剤（当帰芍薬散・七物降下湯・四物湯・柴朴湯）の抗痴呆・睡眠障害改善・抗不安作用、血液循環改善作用を報告してきた。また構成生薬では芍薬・川キユウ・厚朴などの薬効発現への寄与を報告したが、本年度はこれらの成果を踏まえ、その作用機構を明かとする研究を行なった。

虚血性脳循環障害モデル動物を用いた系で七物降下湯の作用を薬理的、組織化学的に評価

した。また臨床研究から脳血管性痴呆に有効で

あることが二重盲検試験で示された釣藤散について、培養小脳顆粒細胞を用いて作用機序の一部を明かにした。さらに当帰芍薬散の作用機序を薬理学的および培養細胞を用いた系で検討し、柴朴湯の抗不安作用成分honokiolの作用機構と行動薬理学的特徴を現代薬と比較した。

B. 研究方法

(i) 雄性脳卒中易発性高血圧自然発症ラット (SHRSP/Izm) を用い8週齢時より七物降下湯投与を自由摂取させ脳卒中の症状、血圧を観察した。23週齢時に脳を取りだしホルマリン固定後病理組織化学的検討を行なった。(佐竹)

(ii) 脳血管性痴呆モデルラットを両側総頸動脈の永久結紮 (2VO) により作成し、この動物にみられる空間認知障害、脳組織障害に対する七物降下湯の影響を検討した。(渡辺)

(iii) 虚血性脳循環障害モデル (高コレステロール摂食ラット/脳卒中易発性高血圧自然発症ラットSHRSP) にみられる脳血管障害発生初期過程における動脈病変を指標として、漢方処方投与による抑制効果を走査電子顕微鏡法で形態的に検討し、動脈内皮での接着因子ICAM-1, VCAM-1の発現やCD4/CD8陽性Tリンパ球接着の細胞動態を検索した。(木村)

(iv) 培養ラット小脳顆粒細胞を用いて、グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤散およびその構成生薬エキスの効果を検討した。(嶋田)

(v) 培養神経細胞株を用い当帰芍薬散の中樞コリン作動性神経への作用についてエストロゲンとの関連から検討した。また感覚器異常による高次機能の変化と当帰芍薬散の記憶学習能への作用を嗅覚障害 (OL) マウスを用いて検討した。(鳥居塚)

(vi) ラットを用いストレスにより誘導されるペントバルビタール誘発睡眠時間の短縮および

自発運動量の亢進を指標として、卵巣摘出がCRF感受性に与える影響と、CRF脳室内投与によって誘導されるこれらの反応に対する当帰芍薬散の作用を検討した。またレポーター遺伝子アッセイ法を用い当帰芍薬散のestrogen活性を測定した。(石毛)

(vii) 柴朴湯の構成生薬「厚朴」成分honokiolについて高架式十字迷路装置を用い抗不安作用発現に関する作用機構ならびに不安誘発物質との併用効果をdiazepamの効果と比較検討した。(丸山)

C. 研究結果

(i, ii, iii) : 実験期間中にSHRSP/Izm血圧上昇に対する七物降下湯投与の抑制作用は認められなかったが、18週齢以降脳卒中の発症率は対照群に比べ投与群で有意に低下した。対照群では23週齢以降に脳で重度の出血巣、梗塞巣が認められるが、これに対し七物降下湯投与群では出血巣の数の有意な低下、梗塞巣の面積の有意な減少が観察され、その結果、延命効果を発揮すると考えられた。

両側総頸動脈永久結紮 (2VO) ラットにみられる空間学習行動障害は七物降下湯投与では改善しなかった。しかしながら2VOラットでは大脳皮質、線状体、海馬などの灰白質、脳梁の白質において顕著な変性が認められたが、七物降下湯投与群では変性の抑制傾向が認められた。

形態学的、免疫組織学的にはSHRSPの10週齢の大動脈ではマクロファージの血管内皮細胞への付着が目立ち、CD8リンパ球の浸潤が観察された。脳動脈では中大脳動脈、脳底動脈内皮細胞にCD8リンパ球が多く付着し、少数のCD4リンパ球の付着がみられた。これに対し、七物降下湯、桂枝茯苓丸、芍薬エキスの投与は脳動脈でのCD4リンパ球の付着がほとんど消失した。

(iv) : 培養ラット小脳顆粒細胞はグルタミン酸を培地に添加することで、cell viability が約40%に低下した。NMDA受容体アンタゴニストであるAP5を加えると、cell viability は100%近くにはまで回復した。グルタミン酸に釣藤散またはその構成生薬エキスを加えたところ、釣藤散エキスではcell viability が高い傾向がみられ、特に個々の生薬では、釣藤鈎エキスがグルタミン酸誘導細胞死に対して強い保護作用を示した。この作用は濃度依存的であり、また釣藤鈎エキスは濃度依存的にグルタミン酸による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入を有意に阻害した。この作用は生薬に含まれるマグネシウムによるものではないと考えられた。

(v) (vi) : 当帰芍薬散エキスは培養コリン作動性神経細胞株のアセチルコリン合成酵素(ChAT)活性を増強した。その増強作用は生薬単独ではみられず複合作用が示唆された。またカテコールエストロゲンのコリン作動性神経への作用はprotein kinase Aやtyrosine kinaseを介して関与すると考えられた。OL処置による学習障害には嗅球dopamine神経の変性以外の要因も関与し、OL処置直後に脳内でのdopamine遊離の低下が起こるなどの原因で二次的変化が生じ、学習障害の要因になっている可能性が考えられた。また当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用により、特に記憶の形成過程に効果を示すと考えられた。

CRF脳室内投与によって誘導されるペントバルビタール睡眠持続時間の短縮を指標として卵巣摘出によるCRFに対する感受性の相違を比較したところ感受性に関しては差異は認められず、卵巣摘出はCRFに対する感受性に影響を与えないと考えられた。またCRF脳室内投与の睡眠持続時間の短縮に当帰芍薬散は影響を与えなかった。当帰芍薬散の作用機序には単回ストレス時

のCRF放出以降の反応は関与しないことが示された。レポーター遺伝子アッセイ法を用いた検討では当帰芍薬散は終濃度12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でluciferase活性の上昇は認められず当帰芍薬散は植物由来のestrogen様物質(phytoestrogen)を含まない処方と考えられた。その作用メカニズムには植物由来のestrogen様物質に起因するものではないと考えられた。

(vii) : 厚朴成分honokiolの抗不安作用の有効量は一般的中枢抑制作用のおよそ1/500程度で認められ、同異性体のmagnololおよびdiazepam(1.0mg/kg)の5倍以上の効果を示した。Honokiolの抗不安作用はflumazenilとbicuculineおよび不安誘発作用を有するCCK-4, caffeineとの併用によって抑制された。Diazepamの効果は同じくflumazenil, bicuculineで減少したが、caffeineによって助長され、CCK-4の作用を完全に抑制し、honokiolとの作用機構の相違を示唆した。

D. 考察

高次中枢機能および脳血液循環系に対する作用を薬理的、組織学的に評価し、更に作用機序と活性本体について明かにすることを目的とした。本年度は作用機構について焦点を絞り検討した。

七物降下湯に関しては昨年度までにSHRSP、高コレステロール血症動物を用いた検討で、明らかな延命効果が認められることを報告した。また七物降下湯はラジカル産生抑制やラジカル消去作用をもつことを示した。本年度は脳組織障害に対する作用を組織学的に検討したところ、七物降下湯投与群では出血巣の数の有意な低下、梗塞巣の面積の有意な減少が観察された。また両側総頸動脈永久結紮ラットにみられる大脳皮質、線状体、海馬などの灰白質、脳梁の白質の変性が七物降下湯投与群で抑制される傾向が認

められた。また七物降下湯、芍薬エキスの経口投与で胸部大動脈、腹部大動脈での内皮細胞付着細胞は減少し、脳動脈では付着細胞はほとんど観察されないことが示された。

七物降下湯が梗塞巣の減少や脳組織の変性、脱落を抑制したことや、内皮細胞付着細胞を減少させたことは虚血性脳循環障害の病態進行に抑制的に作用することが予測され、昨年度の芍薬および芍薬タンニンのNOの関与による内皮依存性血管弛緩作用と併せ、脳循環改善、内皮機能保護に作用すると考えられた。

更年期以降の不定愁訴症候群では不眠、不安症状などの精神神経症状が見られる。昨年度までに卵巣摘出動物やメス老齢動物で記憶学習能の低下や大脳皮質や海馬でのアセチルコリン合成酵素（ChAT）活性の減少がおり、当帰芍薬散の投与で改善することや、E1マウスと卵巣摘出更年期モデルマウスでの検討から当帰芍薬散は脳の易感受性、易興奮性を改善することを示した。本年度の成果から当帰芍薬散の脳の興奮状態を緩和させる作用機序には単回ストレス時のCRF放出以降の反応は関与しないことが示された。当帰芍薬散のこのような作用の発現にはステロイドホルモンを介した機構も推定された。そこで当帰芍薬散由来のestrogen様物質をレポーター遺伝子アッセイ法で検討したが当帰芍薬散自身には植物由来のestrogen様物質を含まないと考えられ、外因性のステロイド性物質によるものではないと考えられた。また当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用により、特に記憶の形成過程に効果を示すことが示された。更に当帰芍薬散エキスは培養コリン作動性神経細胞株のアセチルコリン合成酵素（ChAT）活性を増強するが、その増強作用は生薬単独ではみられず処方としての複合作用が示唆された。

グルタミン酸は中枢神経系における重要なト

ランスミッターの一つであり記憶学習に重要な役割を果たしている。しかし脳虚血は脳内の過剰なグルタミン酸の放出につながり細胞内へのカルシウム流入を介して神経細胞死をまねくことも知られる。今回、釣藤鈎が培養ラット小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウム流入阻害を介して抑制すると考えられたことは釣藤散の虚血性の中枢神経障害に対する有効性の一部を説明するばかりでなく、七物降下湯の構成生薬であることから薬効への関与が考えられた。厚朴成分honokiolの抗不安作用の有効量は一般的中枢抑制作用のおよそ1/500程度で認められ、flumazenilとbicucullineとの併用によって抑制されdiazepamとの併用で増強されたことから、効果発現にはGABA_A-ベンゾジアゼピン複合受容体の関与が示唆された。

E. 結 論

高齢者の記憶学習などの高次中枢機能低下や中枢神経系の維持に関わる脳血液循環系の障害に対する漢方薬の作用を解明することを目的として四物湯・当帰芍薬散・七物降下湯という共通する生薬を含有する漢方方剤の検討を行なった。

その結果、今までに血液循環改善作用や抗痴呆・睡眠障害改善、抗不安作用などの精神神経症状の改善作用と作用機序の一部を明かにした。また芍薬中タンニン類、厚朴のhonokiolなどの活性成分を明らかにした。当帰芍薬散は脳の興奮性を抑制すること、コリン作動性神経に作用し記憶の形成過程に影響するものと考えられた。

これらは経口投与で高血圧や老化による血管機能低下の抑制作用が漢方薬に期待でき、高齢者の高次中枢機能低下、痴呆の予防や治療薬としての臨床利用の妥当性の根拠を与えるものと考えられる。

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究）
分担研究報告書

七物降下湯の脳組織障害に対する影響ならびに黄連解毒湯の一酸化窒素産生に
及ぼす影響に関する研究

分担研究者 佐竹 元吉 国立医薬品食品衛生研究所生薬部長

研究要旨 脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）に七物降下湯を投与し、外観より脳卒中の症状を観察し、脳の病理組織学的検索を行ったところ、出血巣の数を低下し、梗塞巣の面積を減少させることを明らかにした。また、黄連解毒湯をマウスに経口投与し、iNOS蛋白質の低下から、マクロファージによる一酸化窒素の産生を抑制することを明らかにした。

A. 研究目的

七物降下湯は高血圧症に用いられる処方である。我々はこれまでに、若齢期より悪性の高血圧症を引き起こし、脳卒中を発症して死亡する脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHRSP）に七物降下湯を投与したところ、降圧作用を示さず、有意な延命効果が認められることを報告した。

今年度は、この作用機序を明らかにする目的で、脳組織障害の発症に対する七物降下湯長期投与の効果を病理学的に検討した。

また、昨年度の報告で、ICRマウスにおける血中の一酸化窒素（NO）産生に及ぼす七物降下湯の効果を検討したところ、cNOSの活性化を促進し、一酸化窒素の産生亢進作用を示すことを明らかにし報告した。そこで今年度は、黄連解毒湯の示す抗炎症作用のメカニズムをマクロファージの一酸化窒素産生に及ぼす影響に商店を絞り検討した。

B. 研究方法

[七物降下湯の脳組織障害に対する影響]

SHR等疾患モデル共同研究会より供給された雄性SHRSP/Izmを使用した。七物降下湯エキスはウチダ和漢薬より購入した生薬を細刻し、本処方の分量比通りに混合した後、20倍量の熱水を加え、これに水蒸気を吹き込みながら1時間加熱した。抽出物を遠心分離機にかけて濾過し、濾液を液温50℃以下で減圧濃縮した後、スプレイドライ法によって調製した乾燥エキス末を用いた。収量は19.9%であった。この七物降下湯エキ

スを飲用水に混和し、1.5 g/kg/dayの用量で8週齢より自由摂取させ、外観より脳卒中の症状（発作、嗜眠状態）及び血圧を観察した。23週齢時に各群6匹ずつ（卒中確認3例、卒中未確認3例）エーテル麻酔下にて解剖し、脳を摘出して10%中性緩衝ホルマリン液で固定した後、大脳二横断面（頭頂葉断と前頭葉断）を切り出した。常法に従いパラフィン包埋後、3μm薄切切片を作成してHE染色を施し、病理組織学的検索を行った。

各切片あたりの出血巣の総数及び梗塞巣の総面積を計測した。各切片をマクロ顕微鏡下（objective×1）で撮影し、35mmカラスライドフィルムからscanningして、フォトレタッチソフトを用いて梗塞巣を抽出し、その画像の抽出部分の面積を画像解析ソフト（NIH image）を用いて測定した。梗塞巣面積は各切片での梗塞巣面積の総計をそれぞれ求め、各群一切片当たりの平均面積を求める方法と、各切片の梗塞巣面積を階層化して比較する方法を用いた。

病変の定量化における統計学的有意差の検定には、Mann-WhitneyのU検定を用いて、危険率が5%以下を有意とした。

[黄連解毒湯の一酸化窒素産生に及ぼす影響]

使用動物は、ICR雄性マウスを6週齢で購入し、一週間の予備飼育の後に実験に供した。黄連解毒湯は、研究室で調製した抽出エキスを体重換算して、ヒト一日常用量の2.5または10倍量に相当する量を精製水に溶かし、マウス一匹辺当たり0.2mlずつゾンデにより強制胃内投与した。

マクロファージは3%チオグリコレート培地2mlをマウスの腹腔内に投与し、4日後に浸出し

てきた腹腔浸出マクロファージを使用した。

一酸化窒素産生の測定は、腹腔浸出マクロファージを各マウス個体毎に計測して 2×10^6 cells/ml に調製し、

37℃、5%CO₂ インキュベータ内で 2 時間培養した後、非付着細胞を除き、RPMI1640/10%FCS 培地中で LPS (10 μg/ml) を添加し 20 時間培養し、その培養上清中に産生された NO を亜硝酸イオンとして Griess 法で測定した。

iNOS タンパク質の誘導は、LPS (10 μg/ml) と IFN-γ (100u/ml) で 20 時間刺激したマクロファージを、20mM Tris/137 mM NaCl/2 mM EDTA/10%

glycerol/1% Triton X-100/Protease inhibitor cocktail tablet よりなるホモジェナイズ緩衝液でホモジェナイズし、4℃で、20 分間、5000rpm で遠心して得られた上清を 100000Xg、60 分間遠心し、細胞質画分とミクロソーム画分を得た。

iNOS タンパク質の発現は一次抗体として anti-inducible NOS antibody (Santa cruz) を、二次抗体として Biotin-F (ab') goat anti-rabbit IgG (H+L) (Zymed) を使用しウエスタンブロット法で検討した。

マウスエンドトキシンショックモデルは、黄連解毒湯の粉末エキスヒト日常用量の 10 倍量に相当する量を一週間強制胃内投与し、方剤投与終了翌日に生理食塩水に溶解させた LPS (20mg/Kg) をマウス一匹あたり 100 μl ずつを尾静脈内注入して、エンドトキシンショックを惹起させた。LPS 静注 10 時間後に各臓器 (心臓、肺、肝臓、大腸、腎臓) を採取し、iNOS の発現を調べた。

C. 研究結果

[七物降下湯の脳組織障害に対する影響]

実験期間中七物降下湯投与による血圧上昇抑制作用は認められなかったが、18 週齢以降、七物降下湯投与群の脳卒中発症率は対照群に比して有意に低下した。

23 週齢以前に死亡した個体について同様に病理組織学的検索を行ったところ重度な出血巣が認められた (Fig. 1)。また、23 週齢以降に瀕死状態に陥った個体には重度な梗塞巣が認められた (Fig. 2)。23 週齢の対照群の脳では出血巣、梗

塞巣 (海綿状態、石灰変性、網状液化変性、空洞) が認められた (Fig. 3)。これに対し、七物降下湯投与群では出血巣の数が有意に低下し、梗塞巣の面積が有意に減少していた (Fig. 4)。

[黄連解毒湯の一酸化窒素産生に及ぼす影響]

黄連解毒湯のヒト日常用量の 10 倍に相当する量をマウスに一週間胃内強制投与し、腹腔マクロファージの NO 産生量を測定したところ、黄連解毒湯は NO 産生を有意に抑制した、そこで、NO 産生抑制作用に対する黄連解毒湯の用量依存性を検討したところ、黄連解毒湯は、5 倍量および 10 倍量で有意に NO 産生を抑制した。次に、iNOS タンパク質の発現に及ぼす降下を検討したところ、黄連解毒湯は用量依存的に iNOS タンパク質の誘導を抑制しており、NO 産生の抑制とよく関連していた。iNOS は主に細胞質に存在するが、膜画分にもその存在が知られており、eNOS と同様にその細胞内の局在を変えることにより活性の調節をしている可能性が考えられている。そこで、黄連解毒湯がマクロファージ内での iNOS 局在に及ぼす影響を検討するために、マクロファージを細胞質画分とミクロソーム画分に分画後、iNOS タンパク質の発現を調べた。結果は、黄連解毒湯は細胞質画分での iNOS タンパク質の発現にあまり影響を与えなかったが、ミクロソーム画分での iNOS タンパク質の発現を抑制した。

次に、in vivo での黄連解毒湯の効果を調べるため、エンドトキシンショックモデルマウスに及ぼす降下を検討した。エンドトキシンショックは、細菌や真菌などの感染によって引き起こされる全身性の急性炎症反応であり、エンドトキシンショックを惹起するメディエーターの一つとして、iNOS により過剰産生される NO が挙げられる。そこで、黄連解毒湯の効果を調べたところ、コントロール群ではマウスに LPS を静注後 72 時間の時点で全滅したのに対して、黄連解毒湯群では 72 時間以降も生存し続け、コントロール群に対して 50% の生存率改善作用を示した。エンドトキシンショックでは最終的に多臓器機能不全により死に至るとされている。そこで、黄連解毒湯の iNOS タンパク質の発現に及ぼす効果を臓器レベルで検討してみた。本エンドトキシンショックモデルにおいて、iNOS タンパク質の発現は肝臓と腎臓において顕著に現れたのに対して、大腸、心臓、肺においてはほとんど観察されなかった。そして、黄連解毒湯は肝臓に対してのみ iNOS の発現を抑制しており、その効果はマクロファージでの検討

と同様に、細胞質画分での iNOS タンパク質の発現を抑制した。

D. 考察

[七物降下湯の脳組織障害に対する影響]

SHRSP は若齢期（血圧が急激に上昇する時期）では脳出血による死亡が、老齢期（高血圧が持続された時期）では脳梗塞による死亡が多いとされる。

本研究より七物降下湯は SHRSP の脳の出血、梗塞ともに著しく軽減することが示唆された。この作用が本処方方の延命効果に関与しているものと推察される。

[黄連解毒湯の一酸化窒素産生に及ぼす影響]

黄連解毒湯は *ex vivo*, *in vivo* の系において NO 産生の抑制作用を示し、その作用は iNOS タンパク質の誘導の抑制であり、iNOS 遺伝子の転写、翻訳レベルで作用する成分が存在することが示唆された。また、黄連解毒湯による iNOS タンパク質の誘導の抑制が、細胞質ではなく、主にミクロソーム画分で観察され、黄連解毒湯は iNOS タンパク質の産生を抑制するだけでなく iNOS の局在化にも作用を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、エンドトキシンショックに対して有効であったことから、敗血症による血圧の低下に対して有効である可能性が示唆された。今後、黄連解毒湯の有する抗炎症作用の機序を探るために、iNOS だけではなく、マクロファージが産生する他の炎症性サイトカイン、プロスタグランジンなどの産生に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

E. 結論

[七物降下湯の脳組織障害に対する影響]

本研究によって、漢方方剤七物降下湯は SHRSP の血圧には直接作用せずに脳卒中の発症を軽減し、その結果として延命効果を発揮することが明らかとなった。

[黄連解毒湯の一酸化窒素産生に及ぼす影響]

黄連解毒湯はマクロファージの NO 産生を用量依存的に抑制し、その養成は iNOS タンパク質の発現抑制に相関するものであった。黄連解毒湯はミクロソームでの iNOS の発現を主に抑制し、iNOS タンパク質の発現抑制の他、iNOS の局在化にも影響を及ぼしていることが示唆された。そして、黄連解毒湯の iNOS 抑制作用は、*in vivo*

のエンドトキシンショックモデルでも観察され、黄連解毒湯の抗炎症作用の一旦が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

七物降下湯の脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット (SHRSP) の脳卒中予防とフリーラジカル関連酵素活性に対する効果：樋口行人、山下樹三裕、谷山紘太郎、佐竹元吉、尾崎正若、日薬理誌、108、13~22 (1996)

Preventive Effects of Shichimotsu-koka-to on Renal Lesions in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, Yukito Higuchi, Kageyoshi Ono, Setsuko Sekita, Hiroshi Onodera, Kunitoshi Mitsumori, Yasuo Nara, and Motoyoshi Satake, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 914-918 (1998)

2. 学会発表

「脳卒中易発症高血圧自然発症ラットの脳組織障害に対する七物降下湯の作用」

国立衛研 樋口行人, 小野景義, 関田節子, 小野寺博志, 三森国敏, 佐竹元吉

1999年3月 日本薬学会第119年会(徳島)

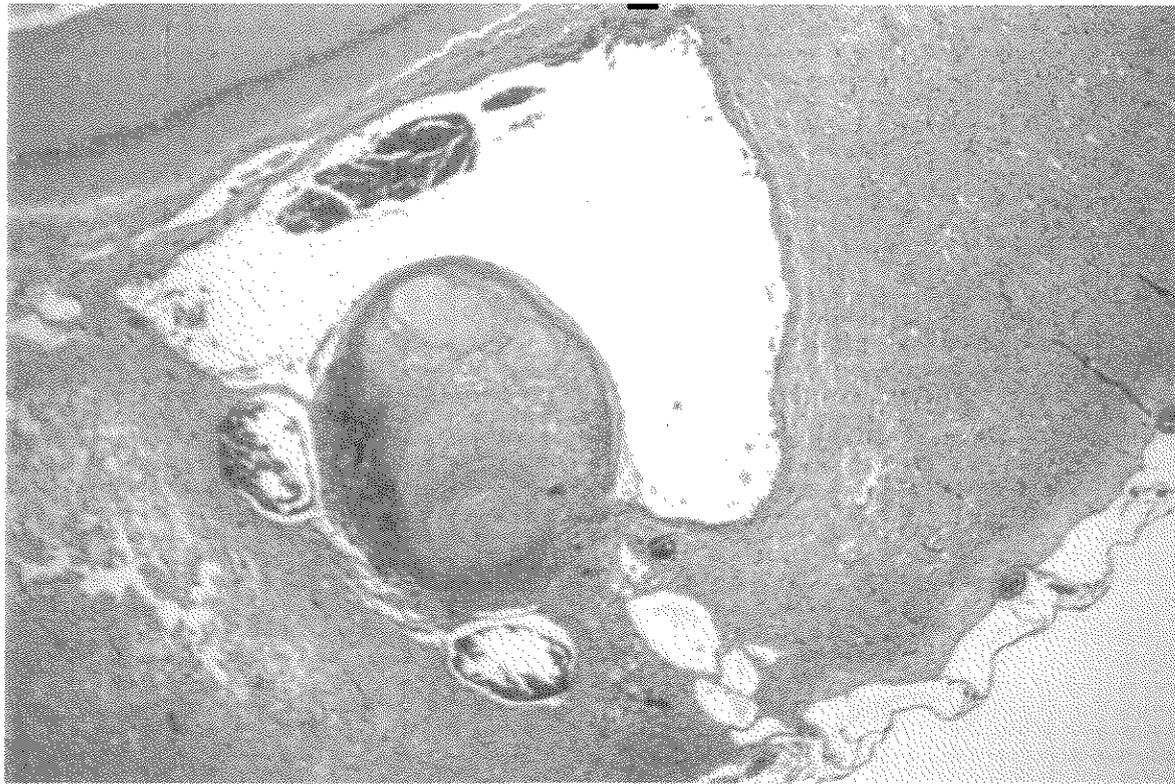


Fig. 1 The histological appearance in the brain of 15-weeks-died SHRSP.

scale bar = 200 μ m.

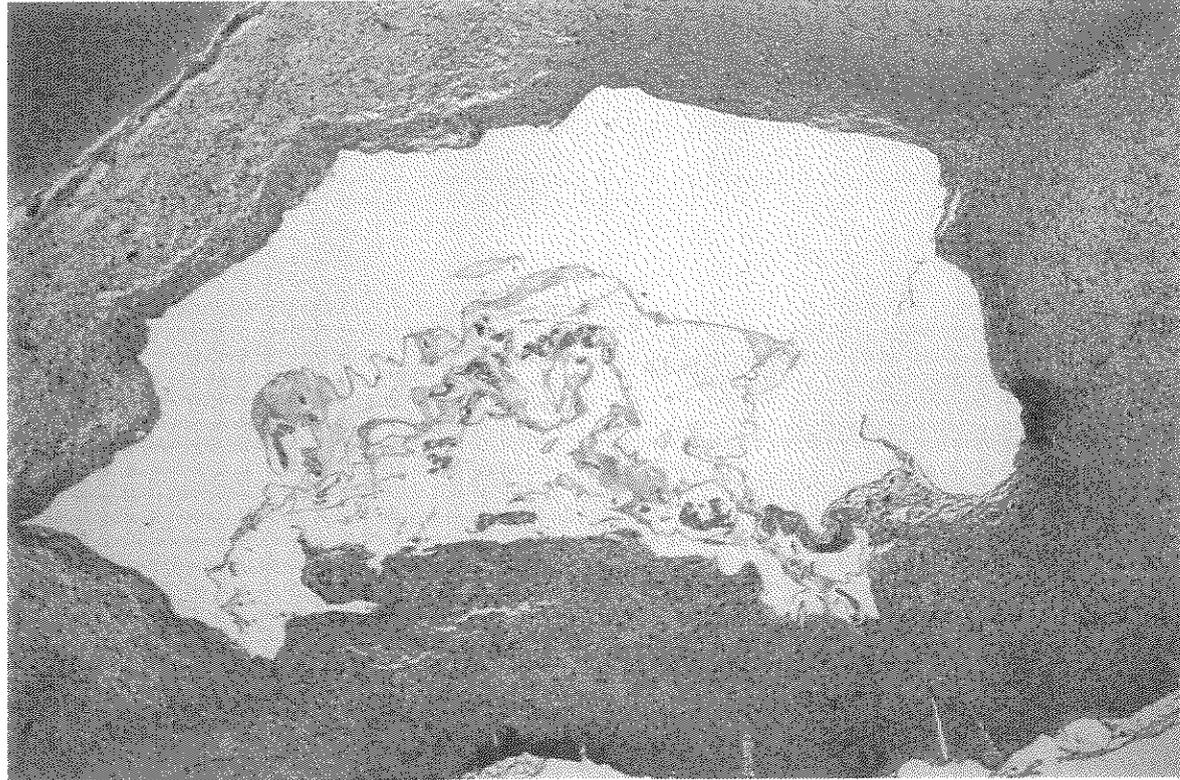


Fig. 2 The histological appearance in the brain of 23-weeks-moribund SHRSP.

scale bar = 200 μ m.

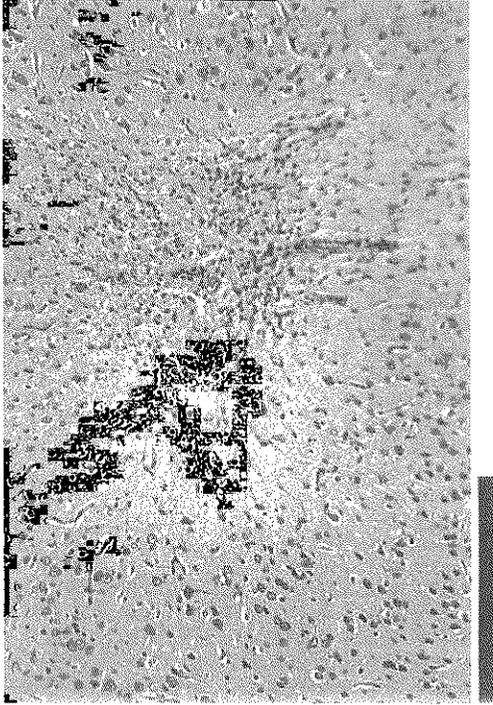
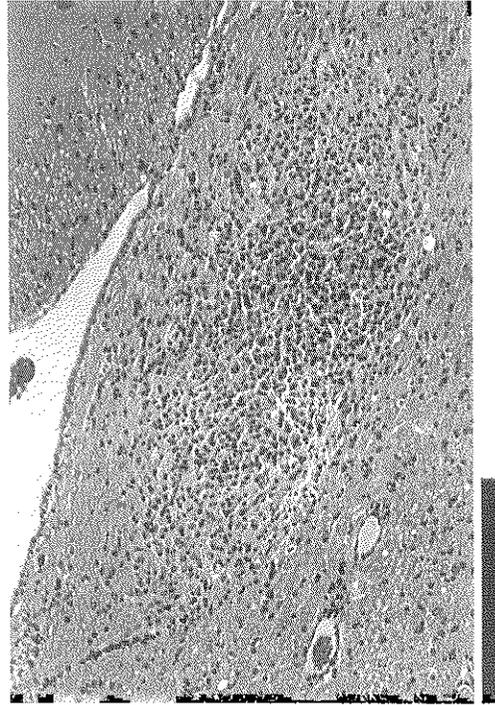
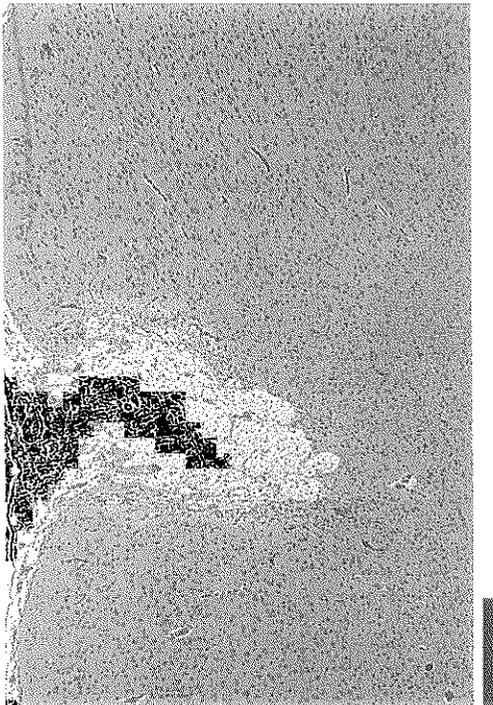
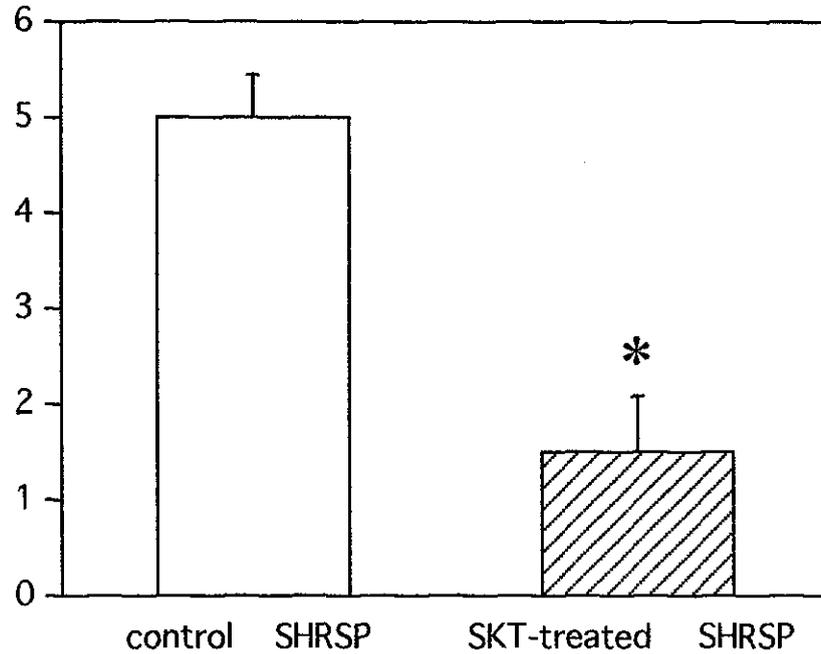
A**B****C****D**

Fig. 3 The histological appearance of spongiosis (A), calcification (B), reticulating colliquation (C) and cavitated area (D) in the brain of SHRSPs.

scale bar = 200 μ m.

A The number of hemorrhage



B The infarct area / section (n=12)

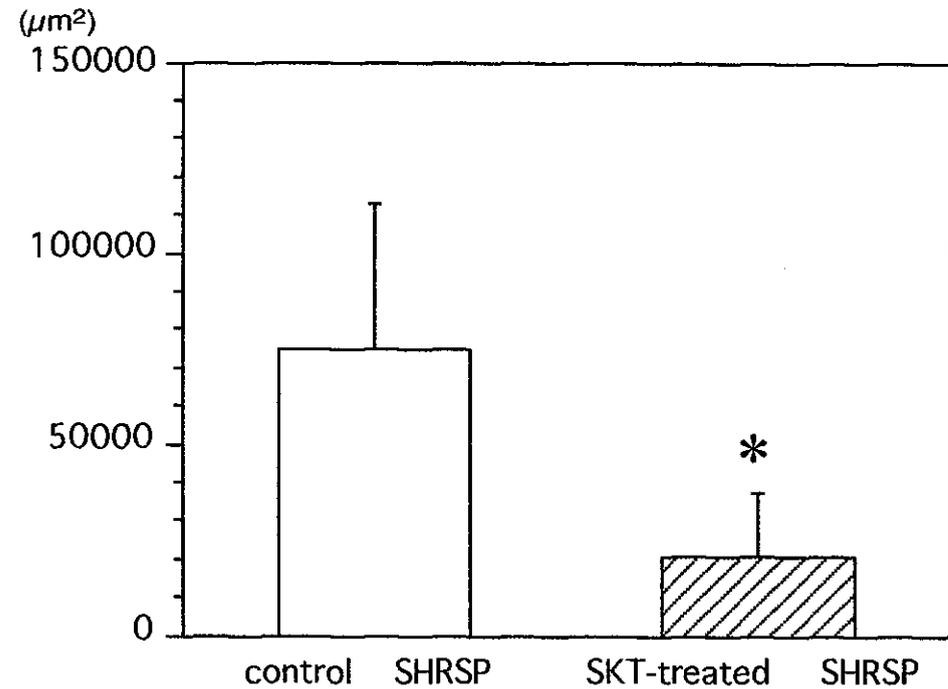


Fig. 4 Effects of SKT on hemorrhage (A) and infarction size (B) in the brain of SHRSPs.

Values are mean ± SE.

*: P < 0.05 compared with control by Mann-Whitney's U test.

脳血管性痴呆モデルラットの空間学習行動障害に対する 七物降下湯の影響

分担研究者 渡辺裕司

（富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験部門教授）

両側総頸動脈を永久結紮(2VO)したラットに認められる空間学習行動障害および脳組織障害に対する七物降下湯の影響を検討した。また痴呆患者では、知的能力の低下のみならず感情障害をはじめとした周辺症状が認められることを考慮して慢性脳循環不全モデルにおける情動変化についても検討した。2VO ラットの空間学習行動障害は七物降下湯の投与で改善されなかった。2VO ラットでは大脳皮質、線条体、海馬等の灰白質や脳梁等の白質において顕著な変性が認められたが、七物降下湯を永久結紮前から経口的に連続投与した 2VO ラット群では変性が抑制される傾向が認められた。高架式十字迷路課題では 2VO ラットに抗不安薬様の行動が観察されたが、七物降下湯投与はこの行動変化に影響を及ぼさなかった。

キーワード：七物降下湯、脳血管障害性痴呆モデル、放射状迷路、高架式十字迷路

A. 研究目的

痴呆は Alzheimer 型老年痴呆に代表される変性疾患と脳血管性痴呆の 2 群に大別される。このうち脳血管性痴呆は脳血管障害に起因する痴呆の総称で、さまざまな脳部での病変が原因となるが、その多くは白質障害に伴う痴呆（白質痴呆）である。これまで欧米の白人では Alzheimer 型痴呆が多いのに対し、日本人では脳血管性痴呆の頻度が比較的高いことが特徴とされてきた。しかし今日では、日本における割合はほぼ等しくなっていると

されている。このように脳血管性痴呆の割合が減少しているにも関わらず、いまだそれに対する有効な治療法が確立していない。

これまで種々の脳血管性痴呆モデルが作製されている。椎骨動脈焼灼後、両側総頸動脈を一時的に結紮した 4VO モデル¹⁾、中大脳動脈を結紮した MCA モデル²⁾、両側総頸動脈を一時的に結紮した一過性 2VO モデル³⁾などが知られている。そこで本研究では、慢性的な脳循環不全モデルである両側総頸動脈永久結紮 (2VO) ラットを用いた。2VO ラ

ットでは学習行動障害、脳組織障害が認められることから^{4, 5)}、ヒトでの脳血管性痴呆を検討する上で有効なモデルであると考えた。

近年、有効な合成医薬品が少ない脳梗塞などの脳血管障害による後遺症や老年期痴呆症の患者に対し、漢方方剤の適用が試みられ、特に高血圧症に汎用されている釣藤散が脳血管性痴呆症に有効であることが認められている⁶⁾。そこで本研究では釣藤散と同様に釣藤鉤を君薬とし、高血圧症に汎用される漢方方剤七物降下湯に着目し、本方剤の脳血管性痴呆症への有効性を検討するために、2VO ラットを用いて行動薬理学的に検討した。また痴呆患者では、知的能力の低下のみならず感情障害をはじめとした周辺症状が認められる⁷⁾ことから、慢性脳循環不全モデルにおける情動変化についても検討した。

B. 研究方法

1. 使用動物

実験には Wistar 系雄性ラット（13 週齢：日本エスエルシー株式会社、静岡）を用いた。ラットを 1 ケージあたり 4-5 匹で、12 時間の明暗サイクル（light on 07:00-19:00）、恒温（25±1℃）、恒湿（60%）の環境下で飼育した。水と飼料は自由に摂取させ、ラット購入時から 1 週間は研究室の飼育環境への慣らしを行い、その後、実験に使用した。

2. 両側総頸動脈永久結紮（2VO）手術

ペントバルビタールナトリウム（45 mg/kg、i.p.；東京化成）麻酔下で、ラットの頸腹部を切開した。神経を損傷させないように注意深く左右の総頸動脈を露出させ、左右同時に絹製縫合糸（黒軟質；シラカワ、東京）で結紮を行った。両側総頸動脈を結紮した群を

2VO 群、結紮を行わずに同様の処置を施した群を sham 群とした。また、2VO 群は 2VO-control 群と 2VO-薬物処置群に分けた。

3. 行動実験

3-1. 8 方向放射状迷路課題

本実験には、8 方向放射状迷路装置を使用した。装置は中央の正 8 角形のプラットホーム（直径 30 cm）と、そこから放射状に延びる 8 本のアーム（長さ 50 cm、幅 12 cm）からなり、装置全体は床から高さ 40 cm に固定されている。各アームの先端には報酬用の餌ペレット（45 mg；Bio-Serv、NJ、USA）を置くカップ（直径 3 cm、深さ 1 cm）があり、また各アームとプラットホームの間にはギロチンドアが設置されている。本実験装置とその周辺環境は実験期間中一定に保った。

本課題ではすべて 2VO 処置または疑手術処置から 1 ヶ月経ったラットを用いた。本課題開始に先立って、報酬となる餌ペレットへの慣らしを行った。また、実験期間中、ラットの体重を自由摂取時の体重の約 85% になるように食餌制限を行った。

訓練は 1 日 1 試行を行った。各アームの先端のカップに餌ペレットを各 2 個ずつ置き、すべてのギロチンドアを閉めた状態でラットを中央のプラットホームに置いた。ギロチンドアを一斉に開けて自由にアームを選択させ、1 本のアームに 4 本の足がすべて入った時点で、ラットがそのアームを選択したこととした。ラットが 1 本のアームを選択した時点で、残り 7 本のアームのギロチンドアすべてを閉めた。ラットがアーム先端の餌ペレットを食べ、プラットホームに完全に戻ってきた時点ですべてのギロチンドアを閉め、約 2 秒後に再びすべてのドアを一斉に開け、再び自由に

アームを選択させた。ラットがすべてのアームを選択し終えるか、または試行開始から10分が経過した時点で試行終了とした。ラットが既に進入したアームに再び入ることをエラーとし、試行終了時まで犯したエラー数を本課題の学習の指標として用いた。また、ラットが10分以内に8本以上のアームを選択しなかった場合、およびエラー数が10を超える場合はすべてエラー数を10とした。本課題の結果は、2試行ごとのエラー数の平均値で示した。

3-2. 高架式十字迷路課題

本実験には、高架式十字迷路装置を使用した。装置は直交する4本のアーム（それぞれ10 (W) × 45 (D) cm）と、それらが交差する部分のプラットホーム（10×10 cm）からなる。2本のクローズドアームには黒色不透明の側壁（40 (H) cm）が、残り2本のオープンアームにも同様に黒色不透明の側壁（3 (H) cm）が付いてあり、床も黒色不透明である。この装置全体は床から50 cmの高さに設置されている。

ラットを迷路装置中心のプラットホーム上にクローズドアーム側に頭を向けて静かに置いた。それから5分間にわたってのオープンアーム滞在時間、オープンアーム選択率、すべてのアームの選択数を測定した。なおプラットホームから4本の肢がすべてオープンアームまたはクローズドアームにでた場合をそのアームに移行したと判定した。実験中、実験者はラットから見えないように迷路装置と実験者の間をカーテンによってしきり、これらの実験はすべてビデオカメラにより撮影し、録画されたフィルムからデータを解析した。またこれらの実験は午後1時～午後6時の間

に行った。本課題は2VO処置の2週間後に行った。高架式十字迷路課題の反復実験では2VO処置後、19日経過したラットを用いて1回目の実験を行った。その15日後に再び同じラットに対し2回目の実験を行った。引き続き3日後に3回目の実験を行った。

4. 組織学的観察

4-1. 脳組織標本の作製

七物降下湯増量後（1.0-3.5 g/kg/day）の8方向放射状迷路課題終了後、ペントバルビタールナトリウム（60 mg/kg, i.p.）麻酔下でラットの胸腹部を切開し心臓を露出させた。心臓左心室から大動脈へカニューレーションし、10 μ /ml ヘパリン含有生理食塩水により灌流した。ラット体内の血液を十分に流出させた後、10% 中性緩衝ホルマリン液により、灌流固定を行った。完全に固定された後、断頭して脳を取り出し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸して再固定した。2~3 冷蔵保存（4℃）した後30% サッカロース液に浸し、再び2~3日冷蔵保存（4℃）し、脱水した。十分に脱水された脳を4 mm程度に小片化し、Tissue-tek クレオモルド3号により固定し、Tissue-tek O.C.T compoundにより包埋した。その後、ドライアイス含有アセトン（-80℃）で瞬間凍結させ、冷凍保存（-80℃）した。小片化したラットの脳からクリオスタット（jung Leica）により脳切片（bregmaから1.7 mm、-0.3 mm、-2.8 mm、-6.0 mmの4部位、厚さ14 μ m）を作製し、ゼラチンコーティングしたプレパラートに貼り付け、乾燥させた。乾燥脳切片を脱脂した後、0.1% Cresyl violetによりニッスル染色を行い、キシレンにより透徹した後、ENTELLAN neu（MERCK）により封入した。

4-2. 脳組織標本の観察

作製した脳組織切片を光学顕微鏡 (OLYMPUS PROVIS AX-80T) および画像解析装置 (C-IMAGING SYSTEMS、Corpix 社製) を用いて観察した。個々のラット毎に、2VO 処置により誘発する脳組織障害およびその障害に対する七物降下湯の影響を検討した。

5. 薬物投与方法

放射状迷路課題実験では七物降下湯は、投与量が乾燥生薬重量に換算して 0.1-0.5 g/kg/day、1.0-3.5 g/kg/day、3.5-7.0 g/kg/day、0.5 mg/kg/day になるように調製し、2VO 処置の3日前 (七物降下湯 1.0-3.5 g/kg/day の実験は 0.1-0.5 g/kg/day の実験終了時から途中増量した) から実験終了時まで、毎日飲水として給水瓶により与えた。また、sham 群および 2VO-control 群には同様に水道水を与えた。高架式十字迷路課題実験では試験の3日前から七物降下湯 0.5 g/kg/day を飲水として与えた。

6. 使用薬物

当帰 (*Angelica acutiloba* KITAGAWA)、芍薬 (*Paeonia lactiflora* Pallas)、川芎 (*Cnidium officinale* MAKINO)、地黄 (*Rehmannia glutinosa* LIBOSCHITZ)、黄耆 (*Astragalus membranaceus* Bunge)、黄柏 (*Phellodendron amurense* Ruprecht)、釣藤鈎 (*Uncaria rhynchophylla* Miquel) は、栃本天海堂 (大阪) より購入した。当帰、芍薬、川芎、地黄、黄耆を各 21 g、黄柏を 14 g、釣藤鈎を 28 g (合計 147 g) を 1470 ml の精製水に加え、室温で1時間放置した後、100℃で1時間加熱抽出した。熱いうちに一度ガーゼで濾した後、

後綿栓濾過を行い、その濾液を七物降下湯エキスとした。

7. 統計処理

放射状迷路課題の成績については Two-way repeated measure ANOVA を用いて異なる2群間の比較を行った。高架式十字迷路課題の成績については Mann-Whitney の U 検定および repeated measure ANOVA on Ranks を用いて2群間の比較を行った。

C. 研究結果

1. 学習行動障害に対する七物降下湯 (0.1-0.5 g/kg/day) の作用

Sham 群のエラー数は訓練を重ねるにつれ減少していったが、2VO-control 群では、学習行動障害が認められた ($P<0.05$)。この障害に対し、七物降下湯 (0.1-0.5 g/kg/day) は、有意な改善作用を示さなかった。

2. 七物降下湯 (1.0-3.5 g/kg/day) 増量の作用

引き続き、sham 群は 2VO-control 群に比べ有意に少ないエラー数を示した ($P<0.05$)。しかしながら 2VO-薬物処置群では、七物降下湯の投与量を 1.0-3.5 g/kg/day に増量しても有意エラー数の減少は認められなかった。

3. 脳組織障害に対する七物降下湯の作用

2VO-control 群では、脳梁 (corpus callosum) 部位の粗鬆化、大脳皮質 (cerebral cortex)、海馬 (hippocampus) 及び線条体 (striatum) での神経細胞の萎縮や空胞化、脳組織の脱落による偽嚢胞が認められた。七物降下湯 (1.0-3.5 g/kg/day) を投与した 2VO-薬物処置群でも脳梁部位の粗鬆化、神経細胞の萎縮、

空胞化等が認められたが、七物降下湯 3.5 g/kg/day 投与群では脳組織脱落の抑制傾向が観察された。

4. 学習行動障害に対する七物降下湯 (3.5-7.0 g/kg/day) の作用

Sham 群は訓練を重ねるにつれ、2VO-control 群に対して有意に少ないエラー数を示した ($P < 0.05$)。七物降下湯 3.5 g/kg/day 及び 7.0 g/kg/day 投与群はどちらも訓練を重ねても 2VO-control 群と比べ有意な差は認められなかった。

5. 高架式十字迷路課題における 2VO ラットの情動行動に対する七物降下湯の効果

2VO 群では sham 群に比べ、有意にオープンアーム滞在時間が延長し、オープンアーム選択率も増加した ($P < 0.01$ or 0.001)。七物降下湯 (0.5 g/kg/day) 投与は 2VO ラットのオープンアーム滞在時間、オープンアーム選択率および全アーム進入回数に影響を及ぼさなかった。

D. 考察

2VO ラットに見られる空間学習行動障害は、脳の機能を支える血流の慢性的低下によっておこる脳組織の変性を反映していると思われる。2VO 後、放射状迷路課題における空間学習行動の障害は徐々に発現する。先に我々はこのモデルにおいて、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤タクリンが 2VO 後の投与により改善効果を示すことを報告した⁹⁾。2VO 3ヶ月後でもタクリンの障害改善効果が認められたことから、この時期でも、アセチルコリン分解抑制により機能補完が可能であると推定された。本実験では、七物降下湯が

慢性脳循環不全によって生じる脳機能障害に対し改善効果を示すことを期待したが、七物降下湯は両側総頸動脈永久結紮 (2VO) ラットで認められる脳組織の脱落に対し抑制効果を示したものの、学習行動障害を改善しなかった。

一方、脳組織障害に関しては、七物降下湯 (0.5 g/kg/day から 3.5 g/kg/day に途中増量) を投与した 2VO 群では、細胞体の萎縮、脳室の拡大、白質の粗鬆化を防ぐことはできなかったものの、脳組織の脱落に対し抑制効果が認められた。七物降下湯にはラジカル産生の抑制やラジカル消去作用がある^{9, 10)}ことが知られているが、今回の脳組織観察から判断すると、本方剤が脳組織の脱落を抑制した主な理由として、虚血により生じる脳組織の軟化から偽嚢胞への過程の抑制が考えられ、七物降下湯が 2VO ラットにおける脳血流を増加させている可能性がある。

一方、高架式十字迷路課題では高架式十字迷路上に置かれたラットは未知の環境に対して探索行動を行うが、それと同時に高さが恐怖刺激となって不安を惹起する。高架式十字迷路の場合、オープンアームはクローズドアームに比べこの不安や恐怖を強く惹起させるため、ラットのクローズドアームへの移行、滞在時間はオープンアームに比べ多くなる。

今回用いた慢性脳循環不全モデルである両側総頸動脈永久結紮 (2VO) ラットは、sham 群に比べオープンアーム滞在時間を有意に長くし、オープンアーム選択率も有意に増やした。これは嫌悪環境に対する不安が軽減しているためと考えられ、また 2VO によって抗不安薬様の行動変化を引き起こすようになることがわかった。これまで高架式十字迷路課題において、中隔を障害したラットで抗不安

行動が認められるのに対して、扁桃体の障害では認められないことが報告されている¹¹⁾。¹²⁾また、中隔のベンゾジアゼピン受容体を刺激すると、高架式十字迷路課題において抗不安薬様の行動変化を示す¹³⁾。これらの知見を考え併せると本実験で観察された情動の変化が、2VOによる中隔の障害、もしくはγ-アミノ酪酸-ベンゾジアゼピン受容体系の活性化による可能性が考えられた。しかし、課題を繰り返した場合、sham群、2VO群共に有意にオープンアーム滞在時間やオープンアーム選択率が減少した。これらの成績は2VOによる抗不安薬様の行動が、持続的に認められるものではなく、2VOラットは本課題を嫌悪刺激として記憶できることを示す。一方、七物降下湯は2VOラットの抗不安薬様行動には影響を及ぼさなかったことから慢性脳循環不全による情動行動変化に影響しない可能性が示唆された。

E. 結論

8方向放射状迷路課題を用いて、両側総頸動脈永久結紮(2VO)ラットで認められる学習行動障害、脳組織障害および情動行動変化に対する七物降下湯の作用を検討した。

1. 七物降下湯は2VOラットで認められる学習行動障害を改善しない。
2. 七物降下湯は2VOによって生じる神経細胞死、白質の粗鬆化、脳組織の萎縮を抑えることができなかったが、脳組織脱落に対し保護作用が認められた。
3. 2VOラットは抗不安薬様の情動行動変化が認められたが、七物降下湯はこの行動変化に影響を及ぼさなかった。

F. 引用文献

1. Pulsinelli WA and Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**, 267-272 (1979)
2. Tamura A, Graham DI, McCulloch J and Teasdale GM: Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **1**, 53-60 (1981)
3. Kobayashi H, Ishizaki T, Matsukawa S, Kabuto M and Kubota T: Transient cerebral ischaemia in Mongolian gerbils pre-exposed to hypoxia. *Acta. Neurochir. (Wien)*. **139**, 678-683 (1997)
4. Ni JW, Ohta H, Matsumoto K and Watanabe H: Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain. Res.* **653**, 231-236 (1994)
5. Ni JW, Matsumoto K, Li HB, Murakami Y and Watanabe H: Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat. *Brain. Res.* **673**, 290-296 (1995)
6. Terasawa K, Shimada Y, Kita T, Yamamoto T, Tosa H, Tanaka N, Saito Y, Kanaki E, Goto S, Mizushima N, Fujioka M, Takase S, Seki H, Kimura I, Ogawa T, Nakamura S, Araki G, Maruyama I, Maruyama Y and Takaori S: Choto-san in the treatment of

vascular dementia: a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine* **4**, 15-22 (1997)

7. 塩崎一昌, 井関栄三: 老年者における向精神薬の薬理作用-老年期精神障害者への向精神薬投与にあたっての基礎および基暴的問題について-. *老年精神医学雑誌* **9**, 903-907 (1998)
8. Murakami Y, Tanaka E, Sakai Y, Matsumoto K, Li HB and Watanabe H: Tacrine improves working memory deficit caused by permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **75**, 443-446 (1997)
9. 樋口行人, 山下樹三裕, 谷山紘太郎, 尾崎正若: 七物降下湯の脳卒中予防とラジカル消去作用. *和漢医薬学雑誌* **12**, 380-381 (1996)
10. 佐久間善太郎, 井上誠, 荻原幸夫: 漢方処方解析 (第84報) 七物降下湯の抗高脂血症作用. *和漢医薬学雑誌* **13**, 310-311 (1997)
11. Treit D, Pesold C and Rotzinger S: Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. *Behav. Neurosci.* **107**, 770-785 (1993)
12. Treit D and Menard J: Dissociations among the anxiolytic effects of septal, hippocampal and amygdaloid lesions. *Behav. Neurosci.* **111**, 653-658 (1997)
13. Anseloni VZ, Motta V, Lima G and Brandao ML: Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus maze constructed with transparent walls. *Braz. J.*

Med. Biol. Res. **28**, 597-601 (1995)

G. 研究発表

学会発表

1. 松田嘉弘, 村上孝寿, 松本欣三, 李紅彬, 渡邊裕司: 両側総頸動脈永久結紮ラットの学習行動及び脳組織障害に対する七物降下湯の影響. 第15回和漢医薬学会大会, 1998, 8, 富山.

木村 通 郎 （関西鍼灸短期大学教授）

高齢者にみられる高次中枢機能低下（痴呆など）は加齢に伴う代謝異常や血管の病変に起因する虚血性脳血流循環障害の結果、脳実質に栄養が充分供給されずニューロン活動低下や遅発性神経細胞死などが誘起されるためと考えられている。本研究では虚血性脳循環障害モデル（高コレステロール摂食ラット／脳卒中易発症高血圧自然発症ラット）を対象に、高齢者脳循環障害の予防・治療に東洋医学臨床の場で注目されている駆瘀血薬（芍薬エキス、当帰芍薬散、桂枝茯苓丸・七物降下湯など）について、それらモデル動物脳動脈（中大脳動脈・脳底動脈とその枝）の病変発症抑制効果等（泡沫細胞巣形成—粥状硬化を誘導する動脈内皮細胞への単球接着に先行するTリンパ球特異接着）に焦点を合わせ、走査電子顕微鏡法を用い三次元形態学的解析を実施し、更に免疫組織化学的に、それら動脈内皮での、ICAM-1, VCAM-1 接着因子発現やCD4/CD8 陽性Tリンパ球接着の細胞動態等について検索した。その結果、それら駆瘀血薬経口投与動物脳動脈では血管内皮細胞の接着因子発現やCD8リンパ球特異接着に抑制や遅発がみられ、脳動脈硬化発症の初期段階での予防や緩和に芍薬エキスや桂枝茯苓丸は有効に作用することが示唆された。

キーワード：SHRSPラット、脳動脈硬化、血管内皮、接着因子、CD8リンパ球、芍薬、桂枝茯苓丸

A. 研究目的

高齢者の虚血性脳微小循環障害の予防や改善に、駆瘀血薬（芍薬エキスや桂枝茯苓丸など）が臨床の場で使われ、その有効性が注目されているが、それら脳微小循環組織細胞レベルでの薬理作用機序等に関しては不明な点が多い。本研究では、それら駆瘀血薬の抗動脈硬化作用、特に、脳動脈血管内皮生理活性保護作用に関し、実験的高コレステロール摂食ラット(CR)及び脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)を対象に、それら瘀血薬を経口投与し脳血管病変発症初期過程での脳動脈内皮細胞表面での単球特異接着（泡沫細胞形成）に先行するCD4/CD8リンパ球の特異接着や接着因子発現などについて平成9年度長寿科学

総合研究での成果を基盤に、走査電子顕微鏡による内皮細胞表面3次元像解析や、免疫組織化学的手法を用いin siteに解析する。

B. 研究方法

B-1. 実験動物

①高コレステロール血症ラット(CR)：Sprague-Dawley系ラット(6週齢)用い、本学動物実験センターにて4% cholesterol, 1% cholic acid, 0.5% thiouracil (和光純薬)を混合した標準Purinaラット食(オリエンタル・イースト社)にて10週間以上投与した個体(高コレステロール血症)を実験に供し、図1の如く実験期間中の体重(BW), 血中Total Cholesterol(TC), Triglyceride

(TG), Plasma lipid (PL)を測定した。

②脳卒中易発症高血圧自然発症ラット (SHRSP) : SHR 等疾患モデル共同研究会より賦与された Stroke-Prone SHR (6週齢) 6匹を用いた。

B-2. 漢方薬・投与方法

芍薬エキスは芍薬 (栃本天界堂) 100g を 500 ml の蒸留水中で 50 分煎じ、凍結乾燥粉末としたものを、また、当帰芍薬散・桂枝茯苓丸・七物降下湯はツムラ社の乾燥粉末を使用した。

それらの各粉末 200 g を飲料水 1,000 ml に 30 分加温溶解したもの 300ml を B-1 ①②それぞれの実験動物一頭平均 35ml/day の分量で 2 週間以上経口投与した。

B-3. 解析方法

①微細形態学的解析 : 2 週間経過した時点で、それぞれの動物をエーテル深麻酔下、採血 (③ CD4 リンパ球、CD8 リンパ球の FACS 解析) 後、左心室より 1/2 希釈した冷 karnovsky 固定液にて灌流固定し、それら動物の胸大動脈/腹大動脈/前大脳動脈/中大脳動脈/脳底動脈などを採取し透過・走査電子顕微鏡標本を作製した。

走査電子顕微鏡標本観察に際しては、実体顕微鏡下、血管内腔を露出し臨界点乾燥後白金パラジウムを蒸着し、血管内皮付着細胞を調べた (図 4)。

②免疫組織化学的解析 : ①同様の方法でエーテル深麻酔し採血後、冷 PLP 固定液を用い動物を灌流固定し血管試料を採取、PBS 液にて洗浄後、in situ にて、それら各動脈試料片を FITC 標識抗ラット CD4/CD8 マウス単クローン抗体 (シ

ダレーン社) 免疫反応し蛍光顕微鏡下、内皮付着細胞を調べた (図 5)。

③血中 CD4/CD8 リンパ球変動 : 外注 (ファルコバイオシステム総合研究所、京都) により FACS 解析を行った (図 2, 3)。

C. 研究結果

CR : 図 1 に示す如く高 cholesterol 食投与ラットでは 10 週経過した個体では血中 cholesterol 値が有意に高く、このような個体の胸大動脈・腹大動脈ともその内膜内皮細胞に多量の単核球 (CD4/CD8 リンパ球, 単球など) が付着し一部は内皮細胞下に浸潤し泡沫細胞の形態を示すモノも確認され内膜が場所によっては肥厚し、アテローム初期像を呈した。一方、脳動脈では内皮に僅かの CD8 リンパ球付着をみる程度であった。

それらの芍薬エキス、桂枝茯苓丸、七物降下湯経口投与 2 週間経過例個体の胸大動脈、腹大動脈内腔では内皮細胞付着細胞は減少しており、特に、CD4/CD8 リンパ球の付着が少ない像を呈した。それらの脳動脈内腔面では付着細胞は殆ど観察され無かった。図 2 にそれら、CR 個体の末梢血中 CD3/CD4/CD8 リンパ球サブセット FACS 解析所見を示すがリンパ球数、サブセット比率とも cholesterol 血症例と漢方薬投与例では差は認められなかった。

SHRSP : 6 週齢でも既に血圧 200mmHg 以上を示す個体がみられ、17 週目の飼育個体では脳卒中様態のものも出現した。それらの 10 週例での胸動脈、腹大動脈ではマクロファージの血管内皮