

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の脳血管障害の予防と進展防止を目的とした漢方薬による治療法の開発

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 嶋田 豊

平成13（2001）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書	
高齢者の脳血管障害の予防と進展防止を目的とした漢方薬による治療法の開発 ……	1
嶋田 豊	
II. 分担研究報告書	
1. 無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の短期効果の検討 ……	7
嶋田 豊	
2. 脳血管障害の脳循環、高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究 ……	11
小林祥泰	
3. 老化に対する瘀血病態の関連および駆瘀血剤の影響についての研究 ……	13
三瀧忠道	
4. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂皮の保護作用 ……	16
新谷卓弘	
5. 釣藤鈎の血管弛緩作用機序の検討 ……	18
長坂和彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷 ……	22

## 高齢者の脳血管障害の予防と進展防止を目的とした 漢方薬による治療法の開発

主任研究者 嶋田 豊 富山医科薬科大学医学部和漢診療学助教授

漢方薬による高齢者の脳血管障害の予防と進展防止を目的とした研究を開始した。3年間の研究期間の最重要課題である無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の長期投与の効果の検討に先がけて、本年度は短期投与（12週間）の効果を検討したところ、精神症状・自覚症状等の改善を認め、無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の有用性が示唆された。同時に、脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序に関する臨床的・基礎的研究を行ない、本年度はグルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂皮の保護作用、釣藤鈎の血管弛緩作用に関する作用機序と活性成分を明らかにする等の成果を挙げた。次年度以降も、さらに研究を推進する予定である。

### 分担研究者

小林祥泰 島根医科大学第3内科学教授  
三瀧忠道 飯塚病院漢方診療科部長  
新谷卓弘 鐘紡記念病院和漢診療科医長  
長坂和彦 諏訪中央病院東洋医学センター長

### A. 研究目的

近年日本では高齢化社会が急速に進行し、それに伴って高齢者の脳血管障害が医療の現場のみならず社会的にも大きな問題となってきた。その治療ならびに予防上の対策の向上が切望されている。一方、漢方薬は多臓器に疾患を抱え薬の副作用も出現しやすい高齢者にとって好ましい治療手段の一つとして認識されつつある。我々はこれまでも、厚生省長寿科学総合研究のなかで二重盲検試験によって漢方方剤・釣藤散の脳血管性痴呆に対する有用性を明らかにするなど、高齢者の脳血管障害に対する漢方薬の有効性について報告してきた。

漢方医学には瘀血という病態概念があり、これは微小循環障害などの血流障害と密接に関連することが明らかとなっている。また桂枝茯苓丸に代表される瘀血を改善する漢方薬の中には赤血球集能、赤血球変形能、血小板凝集能などの血液レオロジー因子に対する改善作用や血管拡張作用、降圧作用などを介して血流障害を改善する作用を有するものがあることが明らかとなっている。このような、瘀血改善薬を脳血管障害に応用することにより、脳血管障害に対する新しい治療手段が

生み出される可能性が期待できる。

今回の研究では、高齢者の脳血管障害の予防や進展防止に対する漢方薬の臨床効果を研究し、同時に基礎的研究により漢方薬の作用機序を明らかにすることにより、最終的に高齢者の脳血管障害に対する漢方薬による治療体系の確立を目指している。以下に本研究の本年度の具体的な目的を項目ごとに列挙する。

#### 1. 無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の効果 （嶋田、小林、三瀧、新谷、長坂）

最終的には、無症候性脳梗塞患者の知的機能、精神症状、自覚症状、MRI上の脳梗塞の進展防止に対する桂枝茯苓丸長期投与（3年間）の効果を検討するが、その手始めとして、本年度は短期投与（12週間）の効果を検討することを目的とした。

#### 2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

##### a. 脳血管障害の脳循環、高次機能に対する漢方薬の効果（小林）

無症候性脳梗塞例に対する漢方薬の脳循環に及ぼす影響をSPECTを用いて検討することを目的とした。本年度は桂枝茯苓丸1ヶ月投与の効果を検討した。

##### b. 老化と瘀血病態の関連及び瘀血改善剤の効果（三瀧）

漢方医学的病態である瘀血は微小循環障害と密接に関連することが知られている。血液凝固、血小板機能、線溶系を包括的に短時間で測定しうる血液凝固機能検査機器であるソノクロットを用い

て、高齢者の脳血管障害患者に対する瘀血改善薬の効果を検討することを目的とした。その前段階として、本年度はソノクロットを用いて高齢者の瘀血病態の解析を行なった。

c. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する漢方薬の保護作用（新谷）

脳虚血時には脳内にグルタミン酸（glutamate）が過剰に放出され、神経細胞のNMDA受容体に作用しCa<sup>2+</sup>の流入を介して神経細胞死を導くことが知られている。このグルタミン酸の神経毒性に対する薬剤の開発が行なわれているが、実用化には至っていないのが現状である。これらのことを背景として、培養神経細胞を用いてグルタミン酸誘導神経細胞死に対する漢方薬の保護作用を検討することを目的とした。本年度は桂枝茯苓丸の効果を検討した。

d. 血管弛緩作用に対する漢方薬の効果（長坂）

NO（一酸化窒素）を介する内皮依存性の血管弛緩反応や、NOを介さない内皮非依存性の血管弛緩反応によって、血管の拡張や血流が調整されていることが知られている。脳の血管においても同様であり、この血管弛緩機能は脳循環のうえで重要である。以上のことを背景としてorgan bath法によって、血管弛緩作用に対する漢方薬の効果を検討することを目的とした。本年度は、釣藤散の主要構成生薬である釣藤鈎の血管拡張作用及び血管収縮抑制作用の機序ならびに活性成分を検討した。

本研究組織の研究の目的と役割分担の模式図を図1に示す。なお、本総括研究報告書は研究組織全体の総括的な研究概要の報告とするため、分担研究の詳細は各分担研究報告書に記載する。

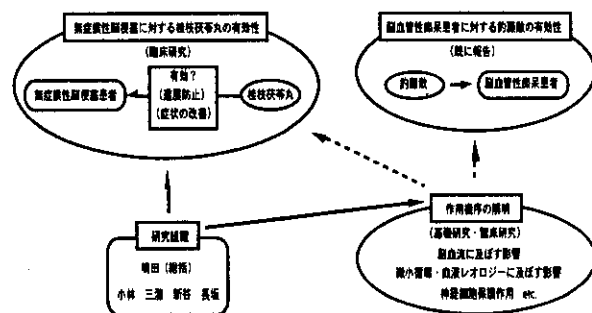


図1 研究の目的と分担

B. 研究方法

1. 無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の効果（嶋田、小林、三瀧、新谷、長坂）

無症候性脳梗塞患者142例を対象として、桂枝茯苓丸エキス1日量（TJ-25：7.5g）を1日3回食間に12週間投与し、改訂長谷川式簡易知能評価スケール（HDS-R）、Apathy scale（やる気スコア）、Self-Rating Depression Scale（SDS：うつ病スコア）を、また自覚症状、自覚症状全般改善度、有用度などについても評価した。

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. 脳血管障害の脳循環、高次機能に対する漢方薬の効果（小林）

無症候性脳梗塞例の脳循環に対する桂枝茯苓丸の効果をSPECTにより検討した。脳検診で無症候性脳梗塞を認めた健常者17名を対象に、桂枝茯苓丸（TJ-25）7.5g/日、1ヶ月間服用の脳血流に対する効果をXe133吸入法により評価した。同時に岡部式簡易知的評価尺度及びZungの抑うつ度尺度（SDS）を評価した。

b. 老化と瘀血病態の関連及び瘀血改善剤の効果（三瀧）

血液凝固、血小板機能、線溶系を包括的に短時間で測定しうる血液凝固機能検査機器であるソノクロットを用いて検討した。抗凝固療法や抗血栓療法を施行していない初診患者34例（平均年齢61.7±10.6歳、男性12例、女性24例）を対象とした。瘀血病態の評価には寺澤の瘀血スコアを用いた。

c. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する漢方薬の保護作用（新谷）

培養小脳顆粒細胞にglutamate（100 μM）を1時間添加し、それと同時に桂枝茯苓丸エキス及びその構成生薬エキスを添加し、MTT法によってそれらのglutamate誘導神経細胞死に対する保護作用を検討した。さらに、ラジオアイソトープ・<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を用いて、glutamateによって誘導されるカルシウムの細胞内流入に対する影響を検討した。

d. 血管弛緩作用に対する漢方薬の効果（長坂）

Organ bath法を用いて、ラット摘出大動脈リングに対する釣藤鈎エキス及びそのタンニン画分、アルカロイド画分の内皮依存性及び非依存性血管弛緩作用、フリーラジカルによる血管収縮反応に対する抑制作用、アルカロイド含有画分のカルシウム拮抗作用を検討した。

(倫理面への配慮)

桂枝茯苓丸はすでに医薬品として使用されており、重篤な副作用の報告はない。また、経験的に脳血管障害に頻用されており、研究対象者に利益はあっても不利益が生ずる可能性は少ない。仮に投与中に副作用が生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処理を行う。この旨を、研究対象者に説明し同意のもとに投与を行なった。なお、この臨床研究は富山医科薬科大学倫理委員会から承認済みである。実験動物を用いた基礎研究に関しては、national animal welfare committeeのガイドラインを遵守して行なった。

C. 研究結果

1. 無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の効果 (嶋田、小林、三瀧、新谷、長坂)

対象142例のうち139例は12週間桂枝茯苓丸を服用したが、3例は下痢、動悸、痒みの出現のため途中で服薬を中止した。改訂長谷川式簡易知能評価スケールは、開始時25.5±4.2点、4週後26.1±4.5点、8週後26.6±4.4点、12週後27.3±4.0点と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。Apathy Scaleは開始時13.1±7.1点、4週後12.0±7.3点、8週後11.5±7.7点、12週後11.7±8.5点と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。Self-Rating Depression Scaleは、開始時38.4±10.1点、4週後37.0±10.9点、8週後35.5±10.7点、12週後35.5±11.1点と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。自覚症状全般改善度は12週間後で著明改善1例(1%)、中等度改善10例(7%)、軽度改善57例(41%)、不変61例(44%)、悪化10例(7%)であった。全般改善度は、12週経過した時点で著明改善12例(9%)、中等度改善18例(13%)、軽度改善45例(32%)、不変61例(44%)、悪化3例(2%)であった(図2)。安全性も加味して総合的に判定された有用度では、極めて有用9例(6%)、有用30例(21%)、やや有用47例(33%)、特に有用といえない53例(37%)、好ましくない3例(2%)であった。

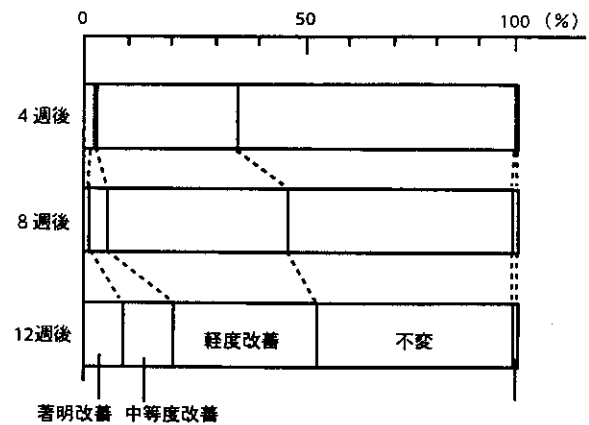


図2 全般改善度の経過

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. 脳血管障害の脳循環、高次機能に対する漢方薬の効果 (小林)

全体では桂枝茯苓丸投与前後の脳血流変化は有意でなく、岡部スコア、SDSスコアも不変であった。しかし、脳血流変化と年齢が強く相関していたため(図3)、70歳未満(7名;平均66歳)とそれ以上(10名;76歳)に分けて検討した。その結果、70歳未満群では全脳平均脳血流が増加傾向(p<0.1)を示し、70歳以上群に比し有意な増加を認めた。岡部スコア、SDSスコアには有意差を認めなかった。

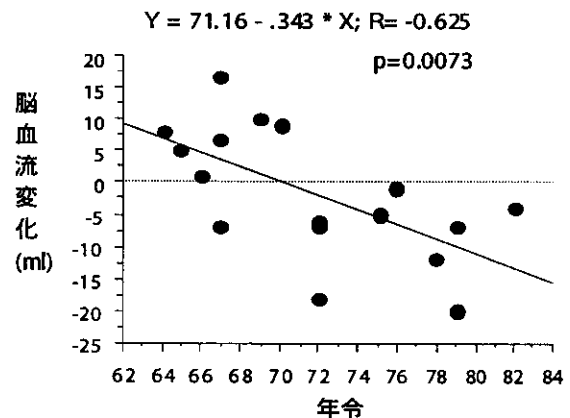


図3 年齢と全脳平均脳血流の変化量の相関

b. 老化と瘀血病態の関連及び瘀血改善剤の効果 (三瀧)

高齢者ではフィブリン形成が亢進していた(図4)。また、特に高齢者における瘀血病態では血小板機能に起因すると考えられるクロット退縮能の低下も加わっていた。

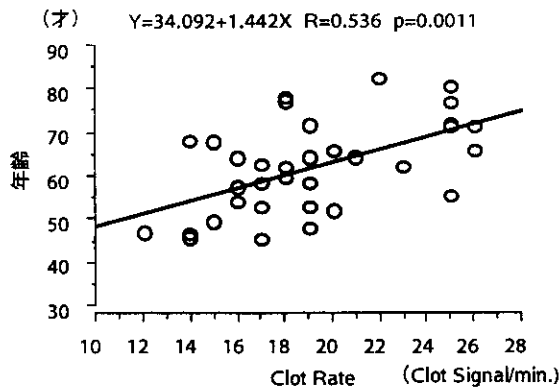


図4 年齢とClot Rateとの相関

c. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する漢方薬の保護作用 (新谷)

MTT法による cell viability では、桂枝茯苓丸エキスは $10^{-4}$  g/mlの濃度において glutamate 誘導神経細胞死を有意に抑制した。各構成生薬では、芍薬・桃仁・茯苓・牡丹皮エキスでは効果はみられなかったが、桂皮エキス ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  g/ml) は control に比べて glutamate 誘導神経細胞死を有意に抑制し、その効果は濃度依存的であった (図5)。また、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入は、桂皮エキス ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  g/ml) は control に比べて glutamate による  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  流入を有意に阻害し、その効果は濃度依存的であった。

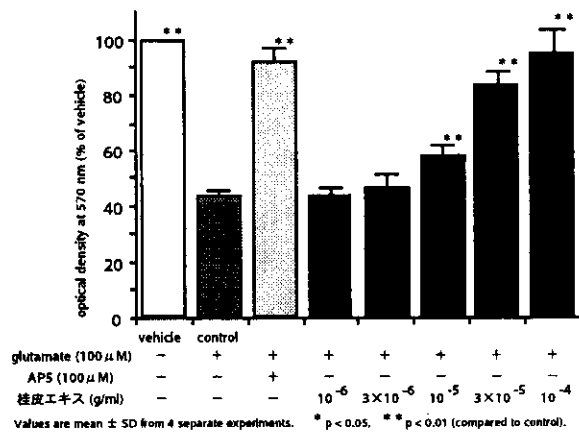


図5 グルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂皮エキスの効果

d. 血管弛緩作用に対する漢方薬の効果 (長坂)

釣藤鈎タンニン画分の最大血管弛緩率は、内皮保存血管 $87.1 \pm 3.1\%$ 、内皮除去血管 $-16.0 \pm 1.2\%$ 、I-NAME前処置内皮保存血管 $13.6 \pm 2.6\%$  (図6 A)、釣藤鈎アルカロイド画分の最大血管弛緩率は、内皮保存血管 $78.8 \pm 4.6\%$ 、内皮除去血管 $86.3 \pm 3.8\%$ 、

I-NAME前処置内皮保存血管 $83.8 \pm 4.2\%$ であった (図6 B)。フリーラジカルによる血管収縮反応に対しては、コントロールに比べてタンニン画分 ( $157 \pm 7.0\%$ )、アルカロイド画分 ( $145 \pm 4.5\%$ ) は血管収縮を有意に抑制した。また、アルカロイド画分はカルシウムによる血管収縮を有意に抑制した。

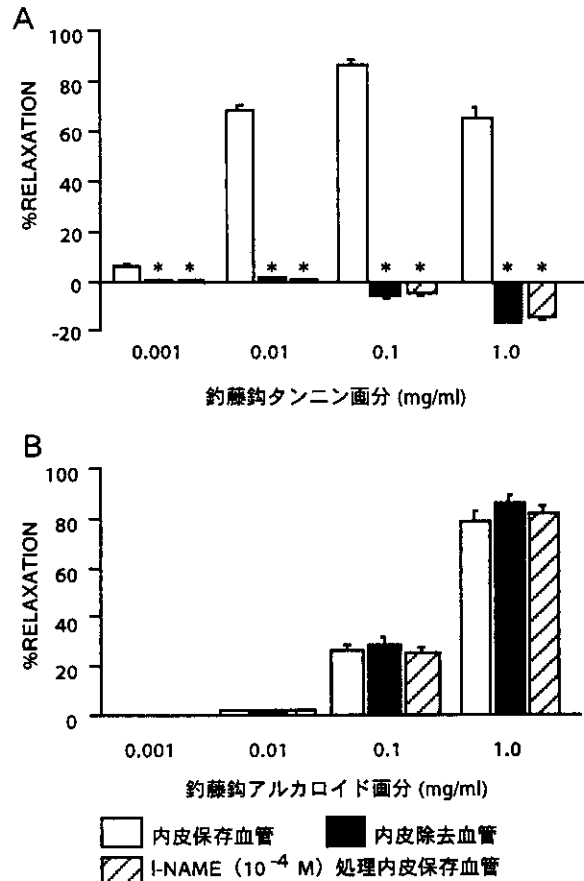


図6 釣藤鈎の血管弛緩作用

D. 考察

本研究プロジェクトの最重要課題として、無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の長期投与の効果をも施設におけるコホート研究によって評価することにある。この研究は研究組織の主任及び分担研究者全員が参加し、それを主任研究者が総括する。即ち、桂枝茯苓丸を3年間無症候性脳梗塞患者に投与し、自覚症状、精神症状、知的機能に及ぼす影響、ならびにMRIによる画像上の変化を投与前の状態と比較検討する。同時に、桂枝茯苓丸非投与群や脳ドック受診者などの自然経過群と比較する。

本年度はその臨床研究をスタートし、無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の12週間の短期投与の

効果を検討した。無症候性脳梗塞の臨床病態として、記憶などの認知機能障害、抑うつ傾向などの情緒障害、頭重感、めまいなどの非特異的症状などが報告されている。今回の検討では、12週間の桂枝茯苓丸の投与により改訂長谷川式簡易知能評価スケールの有意な改善を認めたことから、桂枝茯苓丸が認知機能に対して好影響を与える可能性が示唆された。また、Apathy Scaleで16点以上の無気力と判定される陽性者は、開始時139例中50例であったが、桂枝茯苓丸の服用後41例と減少し、平均値も桂枝茯苓丸投与前に比べて有意に低下した。SDSでは、40点以上のうつ状態と判定される陽性者は開始時61例認められたが、桂枝茯苓丸の12週間服用後49例と減少し、平均点も投与前に比べて有意に低下した。自覚症状の全般改善度は、桂枝茯苓丸の12週間の服用により、軽度改善以上が68例（49%）に認められ、頭重感、頭痛においてはさらに高率に改善を認めた。無症候性脳梗塞患者における認知機能障害、情緒障害、自覚症状の発症の一因として、脳循環の低下が報告されている。今回の検討では拡張期血圧の有意な低下を認めた。また、桂枝茯苓丸には血液レオロジー因子改善作用や血管拡張作用が報告されており、これらの作用が脳循環の改善を介して無症候性脳梗塞患者の認知機能障害、情緒障害、自覚症状の改善に寄与した可能性が考えられる。今後、桂枝茯苓丸の長期投与の効果について検討する予定である。

本研究のもう一つの課題は、脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序を基礎的ならびに臨床的に解明することにある。主任研究者の統率のもと密接に連携を取りつつ、分担研究者全員が各々のテーマを定めて研究を担当する。本研究では対象とする漢方薬として桂枝茯苓丸のほかに、以前、我々が本研究事業の中でプラセボを対照とした二重盲検試験で脳血管性痴呆に対する有効性を明らかにした釣藤散を選択した。

小林は、無症候性脳梗塞例の脳循環に対する桂枝茯苓丸1ヶ月服用の効果をSPECT（Xe吸入法）により検討した。その結果、桂枝茯苓丸服用前後の脳血流変化と年齢が強く相関し、特に70歳未満において桂枝茯苓丸は脳血流増加作用を持つことが示唆された。今後、釣藤散などの他の漢方方剤を同様に検討することにより、無症候性脳梗塞の脳血流の改善を目的とした漢方方剤使用のガイドラインが確立される可能性が考えられる。

三瀧は、脳血管障害の基盤となる微小循環障害

と密接に関連することが明らかとされている漢方医学的病態の一つである瘀血に着目し、高齢者の瘀血病態を血液凝固、血小板機能、線溶系を包括的に短時間で測定しうる血液凝固機能検査機器であるソノクロットを用いて検討した。その結果、高齢者ではフィブリン形成が亢進し、特に高齢者における瘀血病態では血小板機能に起因すると考えられるクロット退縮能の低下が加わることを示した。今後、この方法を用いて桂枝茯苓丸などの漢方方剤の効果を検討する予定である。

新谷は、本年度の分担研究において、グルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂皮の保護作用を報告した。近年の神経科学の進歩により、脳の虚血性傷害におけるグルタミン酸の関与が明らかとなっている。即ちグルタミン酸は、中枢神経系における重要なneurotransmitterの一つであり記憶や学習に重要な役割りを果たしている一方、高濃度のグルタミン酸は神経細胞傷害性に作用することが知られている。例えば、脳梗塞や一過性の脳虚血の状態ではグルタミン酸が脳内に過剰に放出され、これが神経細胞のNMDA受容体などのグルタミン酸受容体を過剰に刺激すると、カルシウムの多量の細胞内流入を生じ、それがひきがねとなり、カルシウム依存性蛋白分解酵素の活性化、フリーラジカルの活性化などを介して神経細胞が死に導かれる。これらのことを背景として、グルタミン酸の神経毒性に対する薬剤の開発研究がさかんに行なわれているが、実用化には至っていないのが現状である。我々は、以前の長寿科学研究事業において釣藤散の主要構成生薬である釣藤鈎が培養ラット小脳顆粒細胞のグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウムの細胞内流入阻害を介して抑制することを報告したが、本年度の研究によって、同じく脳血管障害に対して有効性が期待される桂枝茯苓丸の主要構成生薬である桂皮のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用が明らかとなった。これらの成果は、従来経験的に使用されてきた漢方薬の薬理的な根拠の一端を示すものといえる。

長坂は、本年度の分担研究において、釣藤鈎の血管弛緩作用の機序と活性成分に関して報告した。血管の運動性、とりわけ血管弛緩作用は血流の維持・調節の点で重要であり、その障害は脳血管障害の発症とも密接に関連する。一方、釣藤散の主要構成生薬である釣藤鈎に関しては、以前から降圧作用やカルシウムチャンネル拮抗作用が知られていた。我々は釣藤鈎が自然発症高血圧ラットの血圧上昇を血管内皮保護作用を介して抑制するこ

と、その機序として血管拡張作用や血管内皮に対する抗酸化作用が関与していることを明らかにしてきた。しかし、詳細のメカニズムや活性成分に関しては未検討であった。本年度の研究により、釣藤鈎はNOが関与する内皮依存性とカルシウム拮抗作用による内皮非依存性血管弛緩作用を有し、各々釣藤鈎含有タンニンと釣藤鈎含有アルカロイドが活性成分であることが明らかになった。また、釣藤鈎はSODと同様にフリーラジカルによる血管収縮を抑制する作用を有し、その活性成分は釣藤鈎含有タンニンとアルカロイドであることも明らかとなった。これらの成果も、従来経験的に使用されてきた漢方薬の薬理学的な根拠の一端を示すものといえる。

本年度の本研究組織の一連の研究によって、脳血管障害に対する漢方薬の有効性に関していくつかの根拠を臨床的及び基礎的に明らかにし得た。次年度以降も、本研究の目的を達成すべく、臨床的ならびに基礎的研究をさらに推進する予定である。

#### E. 結論

無症候性脳梗塞患者における桂枝茯苓丸短期投与の知的機能、精神症状、自覚症状に対する有効性が示された。桂枝茯苓丸は、70歳未満の無症候性脳梗塞例において脳血流増加作用を持つことが示された。高齢者ではフィブリン形成が亢進しており、特に高齢者における瘀血病態では血小板機能に起因すると考えられるクロット退縮能の低下も加わることが示された。桂皮のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用が示された。釣藤鈎の含有タンニンおよびアルカロイドの、各々内皮依存性および非依存性血管弛緩作用が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Y. Shimada, H. Goto, T. Kogure, K. Kohta, T. Shintani, T. Itoh, K. Terasawa: Extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* Blume prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *Phytother. Res.* 14: 466-468, 2000.

2) H. Goto, I. Sakakibara, Y. Shimada, Y. Kasahara, K. Terasawa: Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae Ramulus* on isolated rat aorta. *Am. J. Chinese*

*Med.* 28: 197- 203, 2000.

##### 2. 学会発表

1) 嶋田豊: 脳血管性痴呆と漢方薬. 第42回日本老年医学会学術集会. 2000. 6月. 仙台.

2) 後藤博三, 楊喬, 嶋田豊, 寺澤捷年, 喜多敏明, 引網宏彰: 無症候性脳血管障害患者における釣藤散の血中NO<sup>2</sup>/NO<sup>3</sup>, 過酸化脂質, 血清脂質に及ぼす影響. 第17回和漢医薬学会大会. 2000. 9月. 名古屋.

3) 嶋田豊, 後藤博三, 小暮敏明, 寺澤捷年, 柴原直利, 榊原巖, 佐々木博: 釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用の活性成分の検索. 第17回和漢医薬学会大会. 2000. 9月. 名古屋.

4) 関矢信康, 後藤博三, 新谷卓弘, 嶋田豊, 寺澤捷年: 桂枝茯苓丸のフリーラジカル誘発性ラット赤血球膜溶血抑制作用の検討. 第17回和漢医薬学会大会. 2000. 9月. 名古屋.

5) 嶋田豊: 釣藤散の抗痴呆効果. 日本生薬学会・和漢医薬学会合同シンポジウム. 2000. 12月. 富山.

6) 後藤博三, 嶋田豊, 寺澤捷年, 三瀨忠道, 新谷卓弘, 長坂和彦, 後藤壮一郎: 無症候性脳血管障害に対する桂枝茯苓丸の短期効果の検討. 第52回日本東洋医学会学術総会. 2001. 6月. 札幌.  
(発表予定)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の短期効果の検討

主任研究者 嶋田 豊 富山医科薬科大学医学部和漢診療学助教授

無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の長期投与の効果の検討に先がけて、本年度は短期投与（12週間）の効果を検討した。無症候性脳梗塞患者に漢方方剤・桂枝茯苓丸のエキス製剤を12週間投与し、知的機能、精神症状、自覚症状、血圧等に与える影響について検討した。その結果、桂枝茯苓丸エキスの内服により改訂長谷川式簡易知能評価スケール、Apathy Scale（やる気スコア）、Self-Rating Depression Scale（うつ病スコア）、ならびに頭重感、頭痛、めまい感などの自覚症状の改善を認め、拡張期血圧は有意に低下した。以上より、無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の短期投与の有効性が示された。

### A. 研究目的

無症候性脳梗塞は、近年、脳卒中や脳血管性痴呆と密接に関連していることが報告され、発症機序として加齢や高血圧を基礎とした脳血流の低下が示唆されている。しかし、西洋医学的な予防法として、抗凝固療法や抗血小板剤の予防投与は、出血等の副作用のため一般的でなく、血圧のコントロール程度しか予防法はないのが現状である。

一方、このような血流障害は、東洋医学の病理概念の一つの瘀血病態と密接な関わりを有する。その治療薬の一つである桂枝茯苓丸について、これまで我々は、臨床研究において血液レオロジー因子の改善作用、血小板凝集抑制作用を有していることを明らかにしてきた。また、基礎研究においても、血管拡張作用、抗酸化作用、自然発症高血圧ラットにおける降圧作用を明らかにしてきた。

そこで、本研究では無症候性脳梗塞患者に桂枝茯苓丸エキス製剤を長期（3年間）投与し、MRI上の脳梗塞の進展抑制効果や無症候性梗塞患者に合併する精神症状や自覚症状に及ぼす効果や血圧等に与える影響について検討することを計画した。本年度は3年間の研究の手始めとして、無症候性脳梗塞患者に対する桂枝茯苓丸12週間投与の知的機能、精神症状、自覚症状、血圧等に与える影響について検討した。

### B. 研究方法

1997年6月から2000年5月の3年間に当部ならびに関連施設を受診した患者で、厚生省循環器委託研究分担研究課題「無症候性脳血管障害の診断

基準に関する研究」班の無症候性脳梗塞の診断基準（試案）に基づきMRI上梗塞巣を認めるが、神経症候を認めない無症候性脳梗塞患者を対象とした。また、対象から寝たきり患者や重篤な合併症を有する患者は除外した。併用薬については、抗凝固療法、抗血小板療法を要する場合は対象外とし、投与4週間前から投与開始12週間経過後まで、併用薬の変更は行わなかった。また、対象患者にはインフォームドコンセントを実施時に施行し承諾を得た。

対象患者に桂枝茯苓丸エキス1日量（TJ-25：7.5g）を1日3回食間に12週間投与した。検討項目は、精神症状として改訂長谷川式簡易知能評価スケール（HDS-R）、Apathy scale（やる気スコア）、Self-Rating Depression Scale（SDS：うつ病スコア）の3項目について開始時から4週毎に12週間評価した。また、頭重感、頭痛、めまい感、肩こり、動悸、胸のつかえ、のぼせ感、耳鳴り、四肢のしびれ、四肢の冷え、全身倦怠感、食欲不振の自覚症状12項目の有無について正常、極軽度、軽度、中等度、重度の5段階で評価し、桂枝茯苓丸服用による影響を4週毎に12週間評価した。また、自覚症状全般についても5段階で評価し、改善度を著明改善、中等度改善、軽度改善、不変、悪化の5段階に分けて評価した。さらに、血圧を開始時と12週間後について比較検討した。12週間終了後に、担当医による全般改善度の評価を行い、安全性を加味した桂枝茯苓丸の有用度を主治医が判定した。

統計処理：結果は平均±標準偏差（mean±S.D.）



で示した。統計学的解析方法としてANOVA 分散分析、paired t-testを用いた。また、危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

(倫理面への配慮)

桂枝茯苓丸はすでに医薬品として使用されており、重篤な副作用の報告はない。また、経験的に脳血管障害に頻用されており、研究対象者に利益はあっても不利益が生ずる可能性は少ない。仮に投与中に副作用が生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処理を行う。この旨を、研究対象者に説明し同意のもとに投与を行なった。なお、この臨床研究は富山医科薬科大学倫理委員会から承認済みである。

### C. 研究結果

対象者は142例で、男性32例、女性110例、年齢は44歳から82歳で平均68.9±8.1歳であった。合併症は、高血圧症71例、糖尿病10例、高脂血症27例、虚血性心疾患8例であった。頭部MRI所見では、ラクナ梗塞数が、単発の症例が29例、2個以上の症例が113例であった。ラクナ梗塞の部位として、穿通枝領域が132例、脳幹部が8例、両者に認める症例が2例であった。脳室周囲高信号域 (PVH) は、無しまたは軽度が81例、軽度が41例、中等度が16例、高度が4例であった。投与開始後4週間以内に下痢、動悸、痒みのため3名が内服を中止した。

以下に、各検討項目の結果を示す。

改訂長谷川式簡易知能評価スケール (図1) : 開始時25.5±4.2点、4週後26.1±4.5点 (p<0.01)、8週後26.6±4.4点 (p<0.01)、12週後27.3±4.0点 (p<0.01) と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。

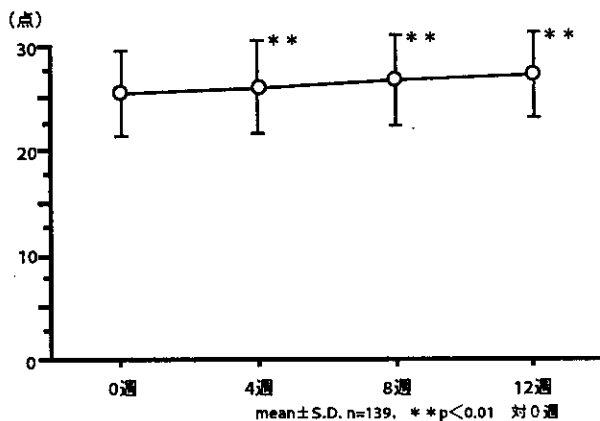


図1 改訂長谷川式簡易知能評価スケールの経過

Apathy Scale (図2) : 開始時13.1±7.1点、4

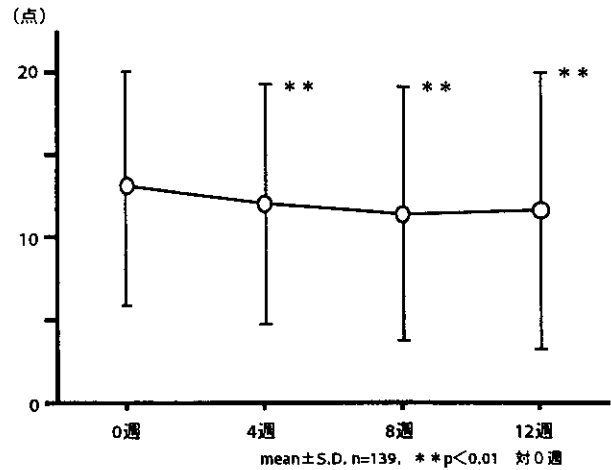


図2 Apathy Scale (やる気スコア) の経過

週後12.0±7.3点 (p<0.01)、8週後11.5±7.7点 (p<0.01)、12週後11.7±8.5点 (p<0.01) と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。

Self-Rating Depression Scale (図3) : 開始時38.4±10.1点、4週後37.0±10.9点 (p<0.05)、8週後35.5±10.7点 (p<0.01)、12週後35.5±11.1点 (p<0.01) と開始時に比べて各時点でいずれも有意の改善を認めた。

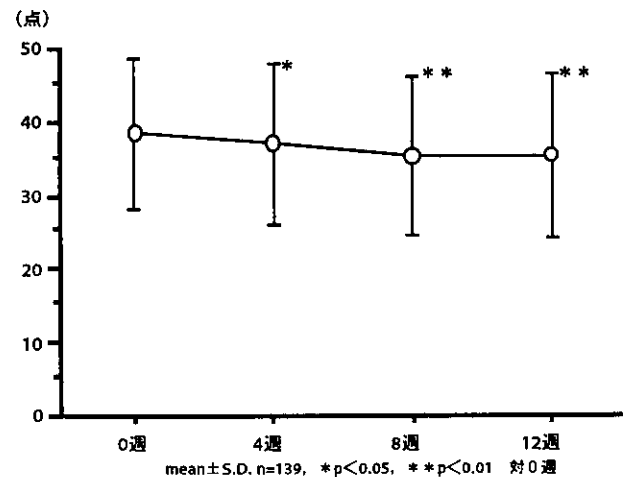


図3 Self-rating Depression Scale (うつ病スコア) の経過

自覚症状 (図4) : 自覚症状全般改善度は12週間後で著明改善1例 (1%)、中等度改善10例 (7%)、軽度改善57例 (41%)、不変61例 (44%)、悪化10例 (7%) であった。各項目別では、症状を有する症例が、頭重感78例 (56%)、頭痛79例 (57%)、めまい感60例 (43%)、肩こり102例 (73%)、動悸59例 (42%)、胸のつかえ44例 (32%)、のぼせ感57例 (41%)、耳鳴り59例 (42%)、四肢のしびれ82例 (59%)、四肢の冷え81例 (58%)、全身倦怠感88例 (63%)、食欲

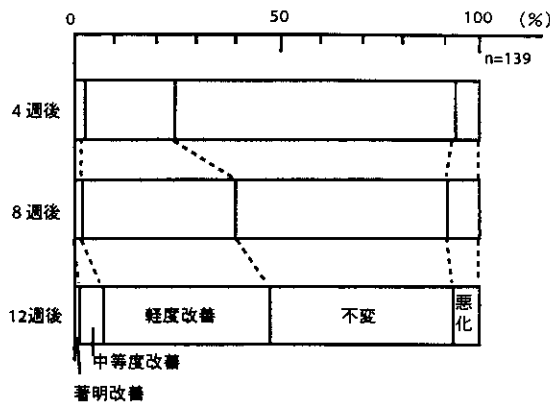


図4 自覚症状全般改善度の経過

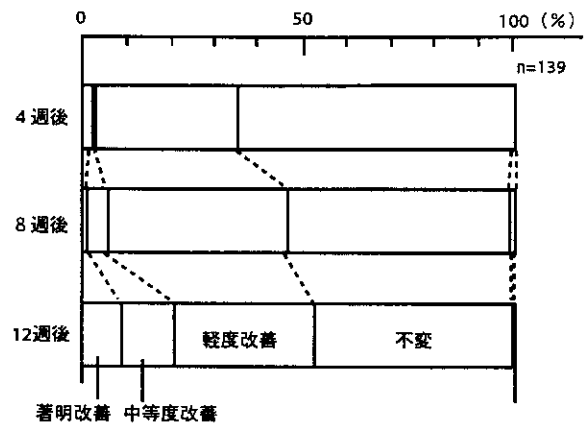


図6 全般改善度の経過

不振26例 (19%) であった。

有症状者で、桂枝茯苓丸の12週間の内服により、軽度以上の改善を認めた症例は、頭重感40例 (有症状者の51%)、頭痛48例 (61%)、めまい感36例 (60%)、肩こり54例 (53%)、動悸36例 (61%)、胸のつかえ27例 (61%)、のぼせ感31例 (54%)、耳鳴り31例 (53%)、四肢のしびれ40例 (49%)、四肢の冷え47例 (58%)、全身倦怠感42例 (48%)、食欲不振18例 (69%) であった。

血圧 (図5) : 収縮期血圧は開始時の140.0 ± 15.9mmHg が12週後には137.8 ± 16.5mmHg (p=0.1348) となり、拡張期血圧は開始時82.1 ± 11.5mmHgが12週後には80.0 ± 11.4mmHg (p<0.05) と有意に低下した。

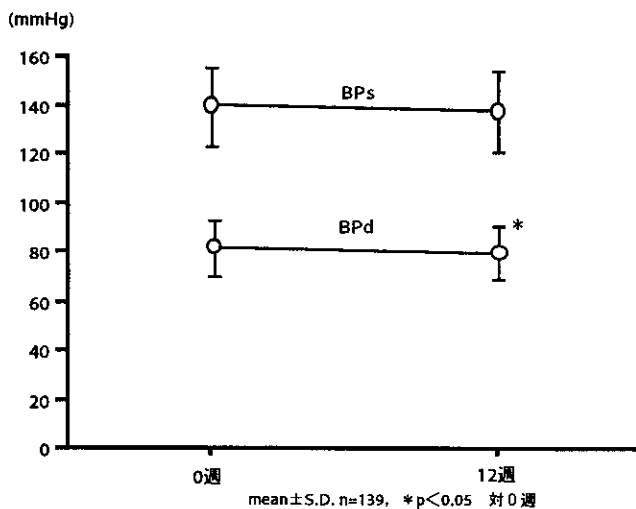


図5 収縮期 (BPs)・拡張期 (BPd) 血圧の経過

全般改善度 (図6) : 12週経過した時点で、全般改善度は著明改善12例 (9%)、中等度改善18例 (13%)、軽度改善45例 (32%)、不変61例 (44%)、悪化3例 (2%) であった。

全般安全度：副作用および臨床検査成績より判定した全般安全度は、安全である133例 (94%)、ほぼ安全である6例 (4%)、安全でない3例 (2%) であった。安全でないの3例は前述した副作用により内服を中止した症例である。

有用度：以上を総合した医師の評価による有用度は、極めて有用9例 (6%)、有用30例 (21%)、やや有用47例 (33%)、特に有用といえない53例 (37%)、好ましくない3例 (2%) であった。

#### D. 考察

無症候性脳梗塞の臨床病態として、記憶などの認知機能障害、抑うつ傾向などの情緒障害、頭重感、めまいなどの非特異的症状などが報告されている。

認知機能障害に関しては、無症候性脳梗塞が脳血管性痴呆に移行するかが重要な問題になっている。このためには、大規模かつ長期にわたる追跡調査が必要であり、現時点で確実な報告はない。断片的な検討において、脳梗塞多発例で知的機能が低下していたという報告やleukoarainosisと有意な関連を有するなどの報告がみられる程度である。今回の検討では、健常人を対照としていないため、開始時の改訂長谷川式簡易知能評価スケールが無症候性脳梗塞患者において健常人に比べて低下しているか明らかでない。しかし、12週の桂枝茯苓丸の投与により、スケールの有意な改善を認めたことから、桂枝茯苓丸が認知機能に対して好影響を与えた可能性がある。

各種の情緒障害に関しては、無症候性脳梗塞は抑うつ傾向との関連が強く示唆されている。特に老年期発症の情緒障害が無症候性脳梗塞と密接に関連するという報告は多く、なかでもうつ傾向との関連が示唆されている。今回の検討でも、

Apathy Scaleで16点以上の無気力と判定される陽性者は、開始時139例中50例であった。また、桂枝茯苓丸の内服後41例と減少し、平均値も桂枝茯苓丸投与前に比べて有意に低下した。SDSにおいては、40点以上のうつ状態と判定される陽性者は、開始時61例認められた。また、桂枝茯苓丸の12週間内服後49例と減少し、平均点も投与前に比べて有意に低下した。

自覚症状においては、肩こり、全身倦怠感を訴える症例が多くみられた。しかし、無症候性脳梗塞に特有の自覚症状として報告されている、頭重感、頭痛、めまい感を訴える症例も50%前後に認められた。このような自覚症状の全般改善度は、桂枝茯苓丸の12週間の内服により、軽度改善以上が68例(49%)に認められ、頭重感、頭痛においてはさらに高率に改善を認めた。

このような認知機能障害、情緒障害、自覚症状の発症の一因として、無症候性脳梗塞発症の要因とも関連して脳循環の低下が報告されている。今回、脳血流に対する直接的な評価は施行していないが、血圧において拡張期血圧の有意な低下を認めた。2mmHg程度のわずかな低下であり、臨床的な意味は今後の検討を要するが、桂枝茯苓丸の12週間の内服がこれまで報告されているような血液レオロジー因子の改善作用や血管拡張作用により、血圧降下作用を示した可能性が示唆された。

本年度の研究成績より、無症候性脳梗塞患者に合併した精神症状や非特異的な自覚症状に対する桂枝茯苓丸エキスの短期(12週間)投与の有効性が示された。次年度以降も本研究を継続し、無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸長期投与のMRI上の脳硬塞進展抑制効果や随伴する精神症状や自覚症状に及ぼす効果を検討する予定である。

## E. 結論

無症候性脳血管障害の臨床病態として意欲の低下やうつ状態など精神症状への影響が報告されている。桂枝茯苓丸エキス製剤の12週間の投与により有意に認知機能や意欲、うつ状態の改善が認められた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Y. Shimada, H. Goto, T. Kogure, K. Kohta, T.

Shintani, T. Itoh, K. Terasawa: Extract prepared from the bark of *Cinnamomum cassia* Blume prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *Phytother. Res.* 14: 466-468, 2000.

2) H. Goto, I. Sakakibara, Y. Shimada, Y. Kasahara, K. Terasawa: Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae Ramulus* on isolated rat aorta. *Am. J. Chinese Med.* 28: 197- 203, 2000.

### 2. 学会発表

1) 嶋田豊: 脳血管性痴呆と漢方薬. 第42回日本老年医学会学術集会, 2000. 6月. 仙台.

2) 後藤博三, 楊喬, 嶋田豊, 寺澤捷年, 喜多敏明, 引網宏彰: 無症候性脳血管障害患者における釣藤散の血中NO<sup>2</sup>/NO<sup>3</sup>, 過酸化脂質, 血清脂質に及ぼす影響. 第17回和漢医薬学会大会, 2000. 9月. 名古屋.

3) 嶋田豊, 後藤博三, 小暮敏明, 寺澤捷年, 柴原直利, 榊原巖, 佐々木博: 釣藤散のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用の活性成分の検索. 第17回和漢医薬学会大会, 2000. 9月. 名古屋.

4) 関矢信康, 後藤博三, 新谷卓弘, 嶋田豊, 寺澤捷年: 桂枝茯苓丸のフリーラジカル誘発性ラット赤血球膜溶血抑制作用の検討. 第17回和漢医薬学会大会, 2000. 9月. 名古屋.

5) 嶋田豊: 釣藤散の抗痴呆効果. 日本生薬学会・和漢医薬学会合同シンポジウム, 2000. 12月. 富山.

6) 後藤博三, 嶋田豊, 寺澤捷年, 三瀧忠道, 新谷卓弘, 長坂和彦, 後藤壮一郎: 無症候性脳血管障害に対する桂枝茯苓丸の短期効果の検討. 第52回日本東洋医学会学術総会, 2001. 6月. 札幌.  
(発表予定)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 脳血管障害の脳循環、高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究

分担研究者 小林祥泰 島根医科大学第三内科学教授

無症候性脳梗塞例の脳循環に対する桂枝茯苓丸の効果にXe133吸入法により検討した。方法：脳検診で無症候性脳梗塞を認めた健常者17名を対象に、ツムラ桂枝茯苓丸7.5g/日1ヶ月間服用の脳血流に対する効果をXe133吸入法により検討した。同時に岡部式簡易知的評価尺度およびZungの抑うつ度尺度（SDS）を評価した。結果：全体では桂枝茯苓丸投与前後の脳血流変化は有意でなく、岡部スコア、SDSスコアも不変であった。しかし、脳血流変化と年齢が強く相関していたため、70才未満（7名；平均66才）とそれ以上（10名：76才）に分けて検討した。その結果、70才未満群では全脳平均脳血流が増加傾向（ $p<0.1$ ）を示し、70才以上群に比し有意な増加を認めた。岡部スコア、SDSスコアには有意差を認めなかった。結論：桂枝茯苓丸は無症候性脳梗塞を有する70才未満の壮年者において脳血流増加作用を持つことが示唆された。

### A. 研究目的

桂枝茯苓丸は血管拡張作用、血液粘度低下作用、血小板凝集抑制作用、赤血球変形能促進作用などを有することが報告されており、脳血管障害における微小循環障害改善、血栓形成抑制効果が期待される。しかし、桂枝茯苓丸のヒトの脳循環に対する影響についての検討は今までなされていない。そこで、本研究では脳血管障害の中でも初期段階である無症候性脳梗塞例の脳循環に対する桂枝茯苓丸の効果を検討した。

### B. 研究方法

対象は筆者らが18年前から継続している地域高齢者脳検診で無症候性脳梗塞を認めた健常者17名（男10名、女7名、64～82才、平均72才）である。無症候性脳梗塞は0.2T-MRI（Simens社製）で3mm以上のT2強調画像高信号とそれに一致するT1強調画像低信号を認める限局性病変とした。局所脳血流はXe133吸入法により二次元測定法で皮質血流量を計測した。研究目的について十分に説明し、文書によるインフォームドコンセントを得た上で、ツムラ桂枝茯苓丸7.5g/日を1ヶ月間投与し、投与前と投与後の脳血流変化を検討した。同時に岡部式簡易知的評価尺度（60点満点）およびZungの抑うつ度尺度（SDS）を評価した。統計学的検定は脳血流等のパラメーターの変化にはpaired t-testを用い、年代群別等の比較では対応のないt-testを用いた。脳血流変化率と年齢の相関は単回

帰分析を用いて検討した。有意水準は危険率5%未満とした。

### C. 研究結果

1. 対象の背景因子としては高血圧が13名、糖尿病が4名に認められた。ヘマトクリット（Ht）は40%以上が10名、それ以下が7名であった。MRI上の脳室周囲高信号域（PVH）は軽度（PVH0-1）が6名、中等度（PVH2-3）が11名であった。岡部式簡易知的評価尺度は $44 \pm 7.5$ 、SDSは $33 \pm 7.8$ でうつ状態を示す40以上は3名のみであった。

#### 2. 桂枝茯苓丸投与による脳血流の変化

投与前の平均脳血流量は $51 \pm 12$  ml/100g/min、投与後は $49 \pm 11$  ml/100g/minであり、変化率は $-0.6 \pm 24\%$ と有意な変化を認めなかった。対応のあるt検定でも投与前後の脳血流の変化は認められなかった。しかし、脳血流変化と年齢の間に図1のような強い相関が認められたため（ $r=-0.625$ ,  $p=0.0073$ ）、70才未満（7名；平均66才）とそれ以上（10名：76才）に分けて検討した。その結果、70才未満群では全脳平均脳血流が増加傾向（ $p=0.0841$ ）を示し、70才以上群に比し有意な増加を認めた（ $p=0.0050$ ）。一方、70才以上群では脳血流は投与前 $53 \pm 11$  ml/100g/min、投与後 $46 \pm 12$  ml/100g/min、変化率 $-13 \pm 14\%$ と軽度ではあるが有意な減少を示した（ $p=0.0243$ ）。

#### 3. 岡部スコア、SDSスコアに対する影響

岡部スコアは投与前後で $42 \pm 8.2$ から $46 \pm 6.7$ 、

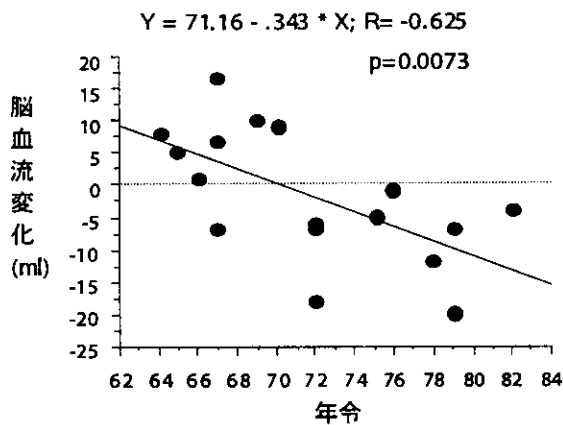


図1 年齢と全脳平均脳血流の変化量の相関

11.1±18.6%の増加を示したが統計学的には有意差を認めなかった。SDSは投与前33±7.8、投与後33±9.3と全く変化を示さなかった。個別にみても改善したもの2名、悪化したもの2名であった。

#### 4. 脳血流に関連するパラメーターの変化

血圧、Ht、呼気終末炭酸ガス濃度は投与前後の測定で有意な変化は示さなかった。

#### D. 考察

本研究の結果から桂枝茯苓丸の脳血流に対する効果に年齢が大きな影響を与えることが示された点は興味深いものである。図1のごとく、年齢と脳血流変化率の間に有意な相関を認め、70才未満では1名を除く全例が脳血流の増加傾向を示したのに対し、70才以上では逆にほぼ全例で減少傾向を示した。桂枝茯苓丸は血管拡張作用や血液粘度低下作用を有することから無症候性脳梗塞のような軽度の脳血流低下を伴う高齢者において脳循環改善効果をきたす可能性が期待され、70才未満の壮年者ではほぼ予測通りの結果が得られた。一方、70才以上の高齢者でなぜ脳血流が減少傾向を示したのか、その機序については明かでない。桂枝茯苓丸は瘀血の代表的治療薬であるので、その対極にある血虚に対しては有効でなく、場合によっては逆の作用を示す可能性も否定できない。したがって、70才未満の壮年者において瘀血の傾向が顕著であり、70才以上の高齢者において血虚の傾向が強かったと考えるとこの結果は説明できるかも知れない。今回の対象では東洋医学的診察は行っておらず、また血虚スコアや瘀血スコアも評価していないので、すべての例が桂枝茯苓丸の適応例ではなかった可能性は否定できない。しかし、このように脳血流に対する効果が年齢ではっきり分か

れることについては今後の検討が必要である。

#### E. 結論

桂枝茯苓丸は無症候性脳梗塞を有する70才未満の壮年者において脳血流増加作用を持つことが示唆された。しかし、血虚の可能性のある高齢者では逆に脳血流を減少させる可能性があることも示唆された。

#### F. 健康危険情報

当初18名が本研究に参加したが、投与後1週間で1名が悪心、食欲低下などの胃腸障害を訴え中止した。症状は中止後速やかに消失した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) S. Kobayashi, K. Okada, N. Suyama, A. Nagai, S. Yamagata, A. Shirasawa, S. Yamaguchi: Risk factors for clinical stroke in subjects who received a brain check-up. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 9(2): 138-139, 2000.

2) K. Aoyama, K. Matsubara, Y. Fujikawa, Y. Nagahiro, K. Shimizu, N. Umegae, N. Hayase, H. Shiono, S. Kobayashi: Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology* 47(4): 524-527, 2000.

3) T. Adachi, S. Kobayashi, S. Yamaguchi, K. Okada: MRI findings of small subcortical "lacunar-like" infarction resulting from large vessel disease. *Journal of Neurology* 247(4): 280-285, 2000.

4) Jiang Xu, S. Kobayashi, S. Yamaguchi, K. Iijima, K. Okada, K. Yamashita: Gender effects on age-related changes in brain structure. *American Journal of Neuroradiology* 21(1): 112-118, 2000.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 老化に対する瘀血病態の関連および駆瘀血剤の影響についての研究

分担研究者 三瀨忠道 飯塚病院漢方診療科部長

漢方医学的病態である瘀血は、血液レオロジーや血小板機能の異常など微小循環障害と関連していることが知られている。この微小循環障害は内皮障害から動脈硬化への進展に深く関わっていることも知られている。今回は高齢者における瘀血病態の特徴についてソノクロットを用いて検討した。その結果、高齢者ではフィブリン形成が亢進しており、特に高齢者における瘀血病態では血小板機能に起因すると考えられるクロット退縮能の低下も加わることが示唆された。瘀血病態は高齢者における血管障害の出現あるいは老化を促進する要因である可能性がある。

### A. 研究目的

Sonoclot Analyzer (Sienco社) は血液凝固、血小板機能、線溶系を包括的に、しかも短時間にかつベットサイドで測定しうる血液凝固機能検査機器である。このSonoclot Analyzerによる測定値瘀血病態との関連を明らかにすることにより、瘀血の診断を客観的かつ迅速に行いうる可能性がある。その結果、漢方医学的病態解析や臨床において有用な検査方法となるとが期待される。特に血管障害が出現しやすい高齢者において、瘀血病態を明らかにすることは、老化のメカニズムの解析、ひいては高齢者の医療において意義深いものと考えられる。そこで今回は、高齢者の瘀血病態に着目しSonoclot Analyzerで検討することにした。

### B. 研究方法

ソノクロット分析装置は、採血後の血液サンプル内で起こる物理的変化を経時的に検出する。この検出メカニズムには管状プローブが付いており、このプローブが血液サンプル内を上下に動き (oscillate)、このoscillatorの作動回路が、プローブの動き、抵抗を感知する。プローブの抵抗は、止血過程で起こる抵抗の違いにより変化する。結果的にアナログ信号が作成され、Clot Signalとしてプリントアウトされる (図1)。血液サンプルの凝固過程がリアルタイムにClot Signal値の変化として記録されたものが図2のSignatureである。グラフ開始時点からActivated clotting timeに相当する液相 (Liquid Phase) を経て、フィブリンが形成され始めるとClot Signalは増加し始める。グラフではFibrin Formation Phaseとして表されている部分で、Signatureのこの部分の勾配はClot Rate

(Signal/min.) として表される。次に血小板によるクロット退縮過程がありClot Retraction Phaseとして表現される。当初はクロットが退縮するにつれ、tighteningが起り、Signatureは上昇し、やがて、クロットはキューベットの表面から少しずつはがれ、プローブにかかる抵抗が減弱しSignatureは下向する。以上のような原理にもとずき、パラメータとして、Activated clotting time (sec.)、Clot Rate (clot signal/min.)、Time to Peak (min.)、Peak Angle (度)、Signal on Peak (clot signal) について測定した。

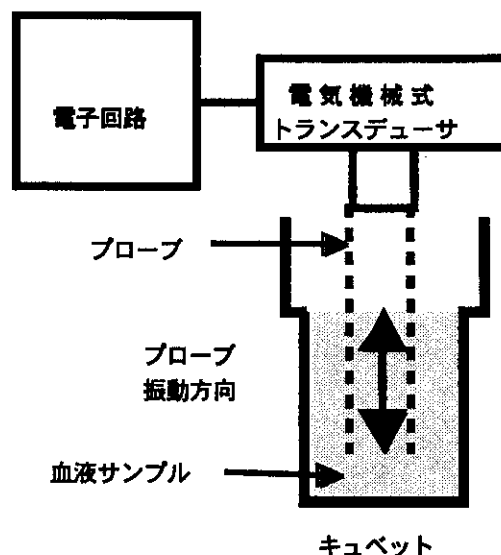


図1 ソノクロットの測定原理

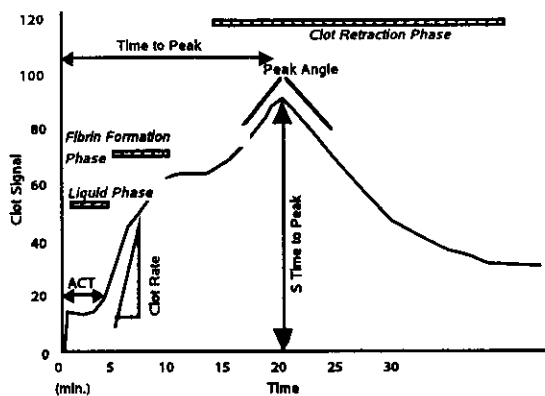


図2 ソノクロットのリアルタイム記録波形 (Signature)

対象は初診患者 (30才~90才) で抗凝固療法、抗血栓療法を施行しているものを除いた34例である。男性が10例、女性が24例。年齢は61.7±10.6 (45~81.7) 才。瘀血病態の診断には寺澤の瘀血スコアを用いた。検定方法は、年齢あるいは瘀血スコアとソノクロットの各パラメータとの相関は直線回帰分析を用い、ANOVA分散分析により、危険率5%以下を有意と判定した。

(倫理面への配慮)

本研究のために患者にいかなる負担も増えないように、临床上採血の必要があると認められた患者においてのみ一般採血の血液サンプルの一部をソノクロットの測定に用いた。また本研究に同意しなくても、患者にはいかなる不利益も生じないことを説明した。

### C. 研究結果

#### 1. 年齢とソノクロット

年齢とソノクロットの各パラメータとの正相関について検討した。年齢と有意な相関があったのはClot Rateであった (図3)。

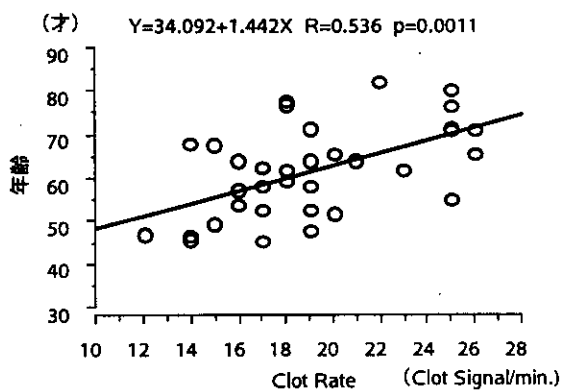


図3 年齢とClot Rateとの相関

#### 2. 瘀血とソノクロット

瘀血とソノクロットの各パラメータとの相関について検討した。瘀血スコアとPeak Angleには有意な正相関 ( $p<0.05$ ) を認め (図4)、Signal on Peakとは有意な負相関 ( $p<0.05$ ) を認めた (図5)。

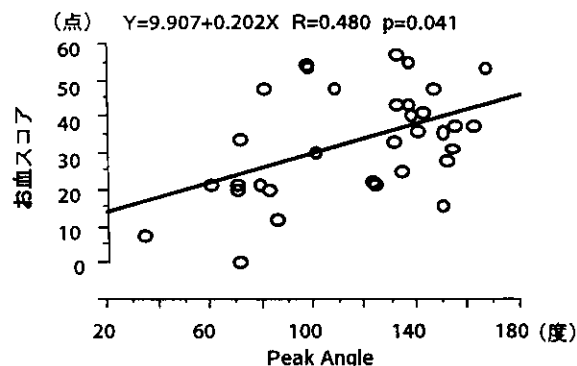


図4 瘀血スコアとPeak Angleとの相関

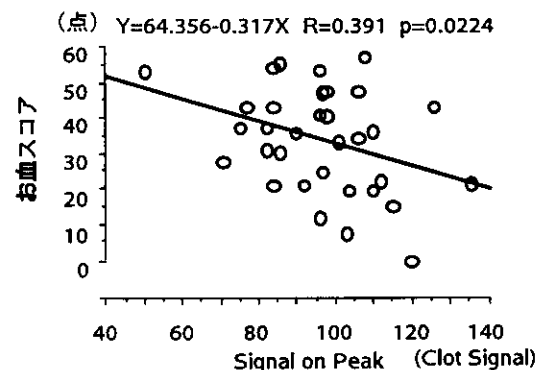


図5 瘀血スコアとSignal on Peakとの相関

#### 3. 60才未満とソノクロット

60才未満の患者は15例あったが、瘀血スコアと有意な正相関があったのは、Peak Angle ( $p<0.05$ ) のみであった (図6)。Signal on Peakとの有意な相関は認めなかった。

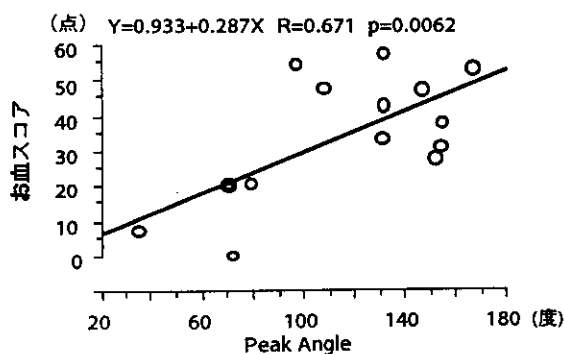


図6 瘀血スコアとPeak Angleとの相関 (60才未満)

#### 4. 60才以上とソノクロット

60才以上の患者は19例あったが、瘀血スコアと有意な負相関があったのは、Signal on Peak ( $p<0.05$ )のみであった(図7)。Peak Angleとの有意な相関は認めなかった。

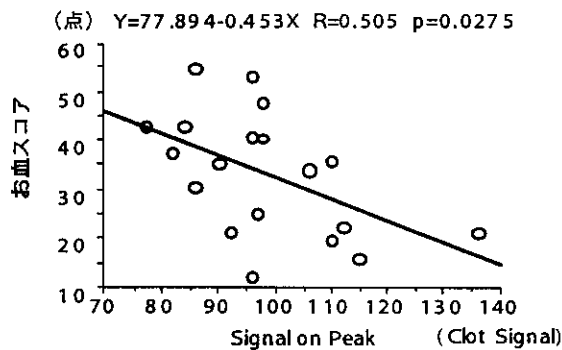


図7 瘀血スコアとSignal on Peakとの相関  
(60才以上)

#### D. 考察

加齢とともにClot Rateが高値を示し、Fibrin Formationの形成が急峻となることが示された。一般にFibrinogenは加齢にともない上昇することが知られており、その結果Clot Rateが高値を示したものと推測される。瘀血病態では、Peak Angleが大きくなり、つまりクロットの退縮能が低下することが示唆された。しかしPeak Angleと血小板数には有意な相関を認めなかったことより、瘀血病態におけるPeak Angleの増大は血小板機能の低下に起因するものと考えられた。また60才未満の若年群では瘀血スコアとPeak Angleとの相関が認められたが、60才以上の高齢群では瘀血スコアとPeak Angleとの相関はなくなり、Signal on Peakと負の相関を認めた。すなわち、60才未満の若年者では瘀血が強くなるにしたがってクロット退縮が質的に低下し、60才以上の高齢者では瘀血が強くなるにしたがいクロット退縮の量的低下が起こっていることが示唆された。

つまり今回のソノクロット測定値から、60才未満の若年者における瘀血病態では、血小板機能の低下が示唆された。一方、高齢者(60才以上)においてはFibrin formationが形成されやすく、加えて瘀血病態では血小板機能低下によりクロット退縮が充分に行われないと考えられた。このことは、加齢に瘀血病態が合併すると血管の修復過程に一層障害が出現しやすいと推察され、動脈硬化や血栓症の促進に影響を及ぼす可能性がある。今後さらに検討する必要がある。

#### E. 結論

今回、止血機構をリアルタイムにしかもグローバルに評価しうるソノクロットを用いて、高齢者における瘀血病態の意義について検討した。その結果、高齢者における瘀血病態では、加齢によりFibrin Formationが形成されやすくなることに加えて、血小板の機能低下に起因すると思われるクロット退縮能が低下することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

今回の研究において健康に危険を及ぼす内容はなく、特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## グルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂皮の保護作用

分担研究者 新谷卓弘 鐘紡記念病院和漢診療科医長

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桂枝茯苓丸ならびにその構成生薬エキスの保護作用を検討した。桂枝茯苓丸エキスは $10^{-4}$  g/mlにおいてグルタミン酸誘導神経細胞死を有意に抑制した。各構成生薬では、桂皮エキス ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  g/ml)のみがグルタミン酸誘導神経細胞死を有意に抑制し、かつ、グルタミン酸による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を有意に阻害した。桂枝茯苓丸の構成生薬である桂皮は、グルタミン酸誘導神経細胞死を $\text{Ca}^{2+}$ 流入阻害を介して抑制することが示唆された。

### A. 研究目的

グルタミン酸 (glutamate) は中枢神経系における主要な神経伝達物質の一つであるが、脳虚血時には脳内に過剰に放出され神経細胞のNMDA受容体に作用し $\text{Ca}^{2+}$ の流入を介して神経細胞死を導くことが知られている。我々はすでに、漢方方剤・釣藤散の構成生薬である釣藤鈎が培養ラット小脳顆粒細胞においてglutamate誘導神経細胞死を $\text{Ca}^{2+}$ 流入阻害を介して抑制することを報告している。今回は、脳血管障害に対する有効性及び血液粘度・赤血球集能能・赤血球変形能などの血液レオロジー学的指標の改善作用も報告されている漢方方剤・桂枝茯苓丸及びその構成生薬のglutamate誘導神経細胞死に対する効果を検討した。

### B. 研究方法

7~8日齢のWistar系ラットの小脳を摘出し、顆粒細胞を96穴plateに $10^6$  cells/mlの密度で培養し7~8日目に実験を行った。

生薬エキスは生薬100gを500mlの水で煎じ凍結乾燥したものをを用いた。エキス収率は、桂枝茯苓丸 (8.7%)、桂皮 (5.1%)、芍薬 (14.4%)、桃仁 (7.3%)、茯苓 (0.6%)、牡丹皮 (10.5%)であった。

Vehicleとして $\text{Mg}^{2+}$ -free Locke's solutionを用い、それにglutamate (100  $\mu\text{M}$ ) を溶解したものをcontrolとした。また、glutamateにNMDA受容体のantagonistであるAP5 (100  $\mu\text{M}$ ) または生薬エキス ( $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$  g/ml) を加えた。小脳顆粒細胞を各試薬を含んだ $\text{Mg}^{2+}$ -free Locke's solutionにて5%  $\text{CO}_2$ , 37°Cで1時間incubateした。Cell viabilityの指標にはMTT法を用いvehicleに対するパーセントで表示した。

さらに、小脳顆粒細胞をラジオアイソトープ・ $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) 及び各試薬を含んだ $\text{Mg}^{2+}$ -free Locke's solutionに1時間incubateし、細胞内に流入した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ をシンチレーションカウンターで測定し、vehicleに対する倍数で表示した。

### C. 研究結果

MTT法によるcell viabilityでは、AP5はcontrolに比べてglutamateによる細胞死を有意に抑制した。桂枝茯苓丸エキスも $10^{-4}$  g/mlにおいてglutamate誘導神経細胞死を有意に抑制した (図1)。

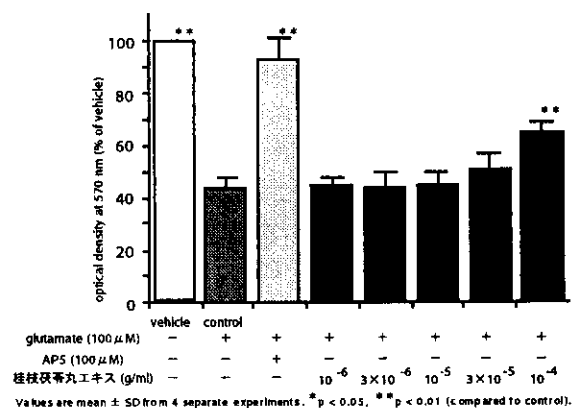


図1 グルタミン酸誘導神経細胞死に対する桂枝茯苓丸エキスの効果

- MTT法による細胞生存率 -

各構成生薬では、芍薬・桃仁・茯苓・牡丹皮エキスでは効果はみられなかったが、桂皮エキス ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  g/ml) はcontrolに比べてglutamate誘導神経細胞死を有意に抑制し、その効果は濃度依存的であった (図2)。

さらに、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入では、桂皮エキス ( $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  g/ml) はcontrolに比べてglutamate

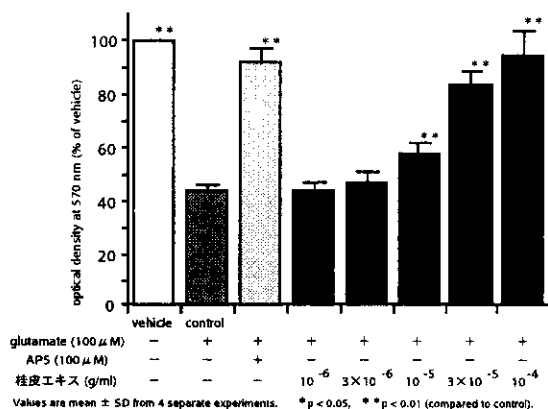


図2 グルタミン酸誘導神経細胞死に対する

桂皮エキスの効果

- MTT法による細胞生存率 -

による<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>流入を有意に阻害し、その効果は濃度依存的であった(図3)。

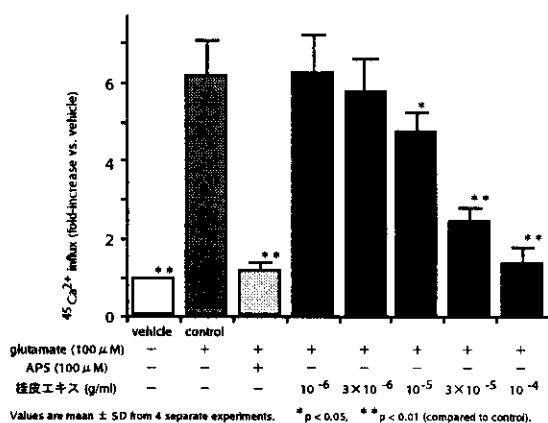


図3 グルタミン酸誘導<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>細胞内流入に

対する桂皮エキスの効果

#### D. 考察

グルタミン酸は、中枢神経系における重要な neurotransmitter の一つであり、記憶や学習に重要な役割を果たしている。しかし、一方では、高濃度のグルタミン酸は神経細胞傷害性に作用することも明らかとなっている。例えば、脳梗塞や一過性の脳虚血の状態では、グルタミン酸が脳内に過剰に放出され、これが神経細胞のNMDA受容体などのグルタミン酸受容体を過剰に刺激すると、カルシウムの多量の細胞内流入を生じ、それがひきがねとなり、カルシウム依存性蛋白分解酵素の活性化、フリーラジカルの活性化などを介して神経細胞が死に導かれることが知られている。また、このようなグルタミン酸の神経毒性は、NMDA受容体の antagonist であるMK801やAP5などで抑制されることも知られている。

以上のことを背景として、我々は、プラセボを用いた二重盲検試験にて脳血管性痴呆に対する有効性を報告している漢方方剤・釣藤散の主要構成生薬ある釣藤鈎が、培養ラット小脳顆粒細胞においてグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウムの流入阻害を介して抑制する作用があること明らかとした。今回は、血液粘度・赤血球集合能・赤血球変形能などの血液レオロジー学的指標や血管内皮機能を改善し、脳血管障害に対しての有効性も報告されている漢方方剤・桂枝茯苓丸に注目し、その効果を同様の手法で検討致した。

今回の培養小脳顆粒細胞を用いたin vitroの実験により、桂枝茯苓丸の構成生薬である桂皮エキス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ことが明らかとなった。この作用が、桂皮及び桂枝茯苓丸の脳血管障害に対する有効性の作用機序の一端を説明し得るものと考えられた。

#### E. 結論

培養ラット小脳顆粒細胞を用いたin vitroの実験において、桂皮エキスはグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウムの細胞内流入阻害を介して抑制した。この作用は、脳血管障害に対する桂皮及び桂枝茯苓丸の有効性の作用機序の一端を説明し得る。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Y. Shimada, T. Shintani, et al.: Extract prepared from the bark of Cinnamomum cassia Blume prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *Phytother. Res.* 14: 466-468, 2000.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 釣藤鈎の血管弛緩作用機序の検討

分担研究者 長坂和彦 諏訪中央病院東洋医学センター長

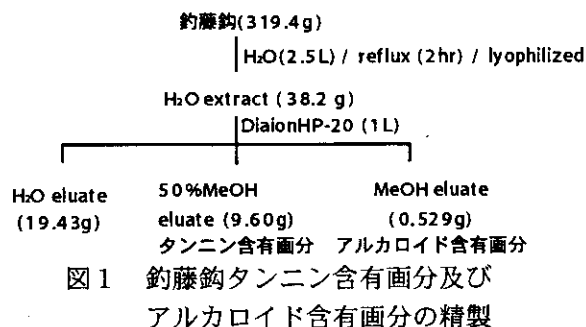
ラット大動脈を用いたorgan bath法により、釣藤鈎及びそのタンニン含有画分、アルカロイド画分の内皮依存性及び非依存性血管弛緩作用を検討した。一酸化窒素（NO）が関与する内皮依存性血管弛緩作用には釣藤鈎含有タンニンがSOD様作用を介して関与していることが明らかとなった。また、内皮非依存性血管弛緩作用には釣藤鈎含有アルカロイドがカルシウム拮抗作用を介して関与していることが明らかとなった。

### A. 研究目的

釣藤鈎は漢方方剤・釣藤散の主要構成生薬である。釣藤鈎含有アルカロイドの薬理作用として、降圧作用やカルシウムチャンネル拮抗作用が知られている。我々は、釣藤鈎エキスが自然発症高血圧ラットの血圧上昇を血管内皮保護作用を介して抑制することを報告した。さらに、我々はその機序として血管拡張作用や血管内皮に対する抗酸化作用が関与していることを示した。しかし、詳細のメカニズムや活性成分に関しては未検討であった。そこで、今回は釣藤鈎含有タンニン画分及びアルカロイド画分を用いて、血管拡張作用及び抗血管収縮作用の機序を検討した。

### B. 研究方法

釣藤鈎エキスは釣藤鈎を2時間、水で煎じ凍結乾燥したものを用いた。釣藤鈎320gから38.2gの釣藤鈎エキスを得た。釣藤鈎のタンニン画分及びアルカロイド画分は図1に示す方法により分取した。



Wistar系雄性ラット（350～400g）の胸部大動脈を摘出し、輪状標本（内皮保存標本と内皮除去標本）を作成した。これを95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>で通気した37℃のKrebs-Ringer液の入った5 mlのorgan

bath内に固定し、釣藤鈎の各画分について以下のことについて検討した。

#### 1) 内皮依存性及び非依存性血管弛緩作用

ラット大動脈リングにKCl（60mM）を添加し、安定した最大収縮が得られた後、acetylcholine（10<sup>-6</sup>M）を加えると内皮が保存されている血管は弛緩するが、内皮除去血管では弛緩がみられない。その後、Krebs-Ringer液を15分毎4回取り替えた。さらに、prostaglandin<sub>F2α</sub>（PGF<sub>2α</sub>）（3×10<sup>-6</sup>M）を添加し、血管収縮が最大で安定した後、釣藤散エキスを1×10<sup>-6</sup>から1×10<sup>-3</sup>g/mlの濃度で加えた。弛緩率はPGF<sub>2α</sub>による収縮に対するパーセントで表示した。一酸化窒素（NO）の影響を調べるため、血管標本を1-NAME（10<sup>-4</sup>M）を60分で前処置した実験も行なった。これらの実験を同様に、釣藤鈎タンニン画分及びアルカロイド画分でも行なった。

#### 2) フリーラジカルによる血管収縮反応に対する抑制作用

フリーラジカルによる血管収縮に対する影響を検討するため、大動脈リングにxanthin（10<sup>-4</sup>M）存在下でPGF<sub>2α</sub>（3×10<sup>-6</sup>M）を添加した。釣藤鈎エキス、釣藤鈎タンニン画分、アルカロイド画分（各々10<sup>-4</sup>g/ml）及びSOD（150 U/ml）は、PGF<sub>2α</sub>で前収縮させる10分前に添加した。さらにxanthine oxidase（1-9 mU/ml）を添加し、PGF<sub>2α</sub>による収縮に対するパーセントで表示した。

#### 3) アルカロイド含有画分のカルシウム拮抗作用

カルシウム（10<sup>-4</sup>-10<sup>-2</sup>M）による血管収縮に対する釣藤鈎アルカロイド画分（10<sup>-5</sup>・10<sup>-4</sup>g/ml）及びverapamil（10<sup>-7</sup>M）の影響を検討した。

### C. 研究結果

#### 1) 内皮依存性及び非依存性血管弛緩作用

釣藤鈎エキスの最大血管弛緩率は、内皮保存血管 $90.8 \pm 2.5\%$ 、内皮除去血管 $19.3 \pm 1.1\%$ 、I-NAME前処置内皮保存血管 $22.5 \pm 3.4\%$ であった(図2 a)。釣藤鈎タンニン画分の最大血管弛緩率は、内皮保存血管 $87.1 \pm 3.1\%$ 、内皮除去血管 $-16.0 \pm 1.2\%$ 、I-NAME前処置内皮保存血管 $13.6 \pm 2.6\%$ であった(図2 b)。また、釣藤鈎アルカロイド画分の最大血管弛緩率は、内皮保存血管 $78.8 \pm 4.6\%$ 、内皮除去血管 $86.3 \pm 3.8\%$ 、I-NAME前処置内皮保存血管 $83.8 \pm 4.2\%$ であった(図2 c)。釣藤鈎の水抽出画分は内皮保存血管及び内皮除去血管に影響を与えなかった。

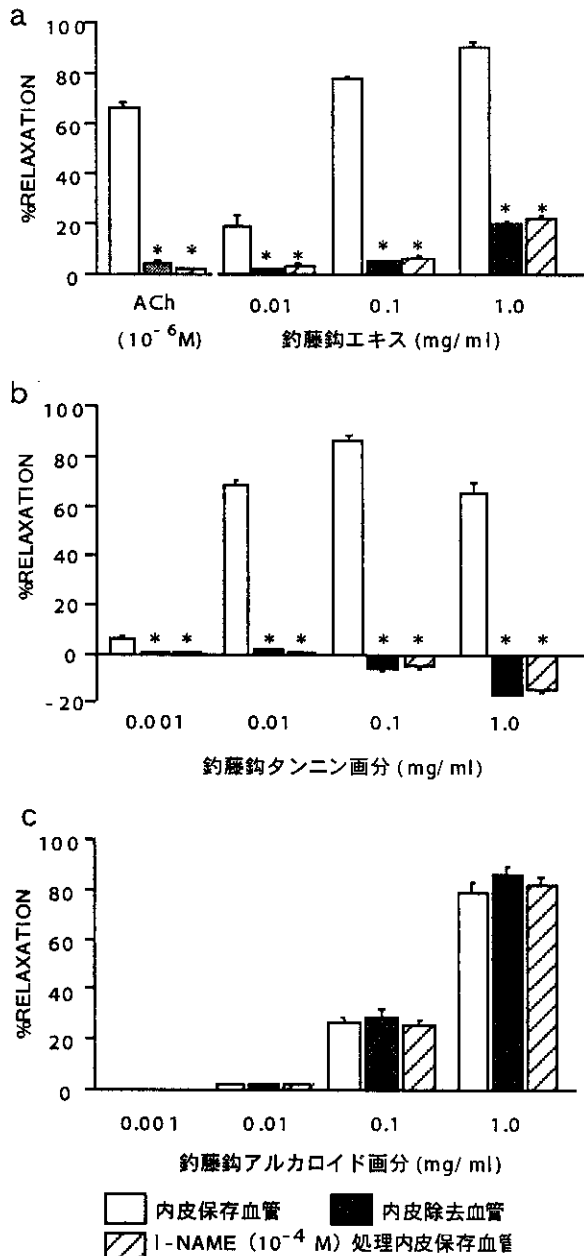


図2 釣藤鈎の内皮依存性及び非依存性血管弛緩作用

2) フリーラジカルによる血管収縮反応に対する抑制作用

PGF<sub>2α</sub>及びxanthine存在下で、xanthine oxidase (1-9 mU/ml) は濃度依存性に血管を収縮した。コントロールに比べて、釣藤鈎エキス $147 \pm 6.9\%$ 、釣藤鈎50%MeOH分画 $157 \pm 7.0\%$ 、釣藤鈎MeOH分画 $145 \pm 4.5\%$ と有意な収縮の抑制を認めた(n=6, mean±S.E.)。コントロールに比べて、釣藤鈎エキス(147±6.9%)、タンニン画分(157±7.0%)、アルカロイド画分(145±4.5%)及びSOD(121±5.6%)は血管収縮を有意に抑制したが、水抽出画分は抑制しなかった(図3)。

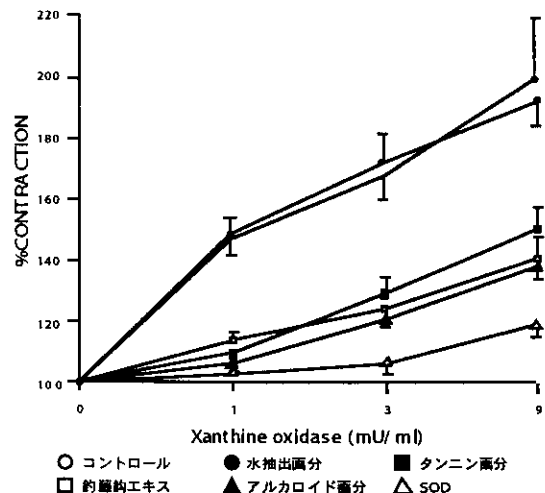


図3 フリーラジカルによる血管収縮反応に対する釣藤鈎の抑制作用

3) アルカロイド含有画分のカルシウム拮抗作用  
釣藤鈎のアルカロイド画分(10<sup>-4</sup> g/ml)及びverapamilはカルシウムによる血管収縮を有意に抑制した(図4)。

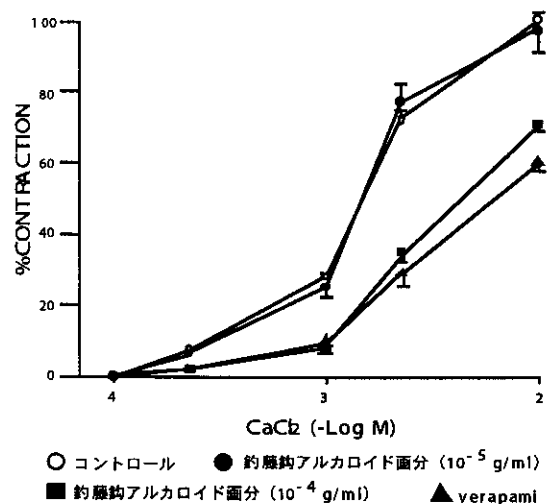


図4 釣藤鈎アルカロイド画分のカルシウム拮抗作用