

200/0265

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 嶋田 豊

平成14（2002）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を主とした和漢薬の長期投与効果の検討 …… 8  
嶋田 豊
2. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎フェノール成分の保護作用 …… 14  
嶋田 豊
3. 脳卒中後の認知障害に対する釣藤散の効果 - 事象関連電位による検討 - …… 18  
小林祥泰
4. 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 …… 21  
三瀧忠道
5. 自然発症高血圧ラットの血管作動性に及ぼす桂枝茯苓丸の効果に関する検討 …… 24  
後藤博三
6. 無症候性脳梗塞患者の血漿NO代謝物、過酸化脂質に及ぼす釣藤散の効果 …… 29  
長坂和彦

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 32

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 33

## 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

本年度は、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3年間の研究期間の2年目にあたる。本研究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中間検討によって、桂枝茯苓丸を主とした3年間の和漢薬治療により無症候性脳梗塞患者のうつ状態に対する改善作用が明らかとなった。また、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検討によって、桂枝茯苓丸の血圧上昇抑制作用、血管内皮機能保護作用、血栓形成改善作用、釣藤散の脳血管障害患者に対する微小循環改善作用、脂質代謝改善作用、認知障害改善作用、および釣藤鈎フェノール成分のグルタミン酸誘導神経細胞死抑制作用等が明らかになった。

### 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  
後藤博三 富山医科薬科大学和漢薬研究所  
漢方診断学部門助教授  
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合能、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。

本年度は3年間の研究期間の2年目にあたるが、我々は昨年度の研究によって、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、70歳未満の無症候性脳梗塞例における桂枝茯苓丸の脳血流増加作用、桂皮のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用、釣藤鈎含有タンニンおよびアルカロイドの内皮依存性および非依存性血管弛緩作用等を明らかにした。

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、後藤、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、本年度はこれまでに集計されたデータをもととした中間報告として、桂枝茯苓丸を主とした和漢薬の長期投与の精神症状、認知機能、自覚症状、血圧等に及ぼす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. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎フェノール成分の保護作用（嶋田）

グルタミン酸 (glutamate) は、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。釣藤鈎ならびにそのアルカロイド成分のグルタミン酸誘導神経細胞死抑制作用が報告されている。釣藤鈎にはアルカロイド成分の他に、フェノール成分も含まれていることが知られているため、今回の実験では釣藤鈎からフェノール成分を単離抽出し、それらのグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用を検討した。

### b. 脳卒中後の認知障害に対する釣藤散の効果 - 事象関連電位による検討 -（小林）

脳血管障害後の認知機能障害に対する釣藤散の効果を、事象関連電位P3の変化を指標として検討することを目的とした。

### c. 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（三瀧）

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。今回は代表的駆瘀血剤である桂枝茯苓丸の血液凝固線溶系に対する影響についてソノクロットを用いて検討した。

### d. 自然発症高血圧ラットの血管作動性に及ぼす桂枝茯苓丸の効果に関する検討（後藤）

高血圧症において血管内皮障害は、動脈硬化の初期病変として重要である。血管内皮細胞は、一酸化窒素 (NO) やトロンボキサンA<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) などのさまざまな血管作動因子を産生・分泌し血管平滑筋の緊張を維持し血圧調節に関与している。そのため、血管内皮障害は、弛緩因子減少と収縮因子増加の両面から血管のリモデリングを促し血管障害へ発展するとされている。今回、高血圧に伴う血管内皮障害に対する桂枝茯苓丸の効果を、高血圧の病態モデルである自然発症高血圧ラット (SHR) を用いて検討した。

### e. 無症候性脳梗塞患者の血漿NO代謝物、過酸化脂質に及ぼす釣藤散の効果（長坂）

釣藤散は、二重盲検試験により脳血管性痴呆に対する有効性が報告されている。今回は、釣藤散の効果を臨床的に調べる目的で、脳血流の低下を伴うことが知られている無症候性脳梗塞患者を対象として、釣藤散投与前後の眼球結膜微小循環、血漿NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>、過酸化脂質、脂質代謝に及ぼす

影響を検討した。

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。

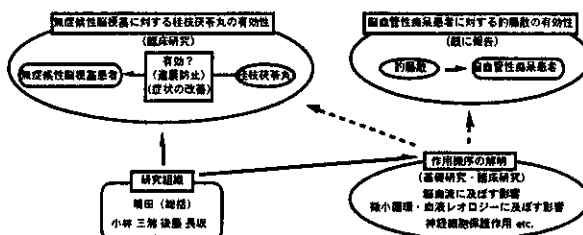


図1 研究の目的と分担

## 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、後藤、長坂）

無症候性脳梗塞患者に対して桂枝茯苓丸 (KB) エキス製剤を主体とした和漢薬治療を行ない、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: うつ状態スコア)、自覚症状を評価した。その上で、健常高齢者群との比較、桂枝茯苓丸を1年間6ヶ月以上服用していたKB-A群と6ヶ月未満のKB-B群の比較検討を行なった。

### 2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

#### a. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎フェノール成分の保護作用（嶋田）

培養小脳顆粒細胞に glutamate (100 μM) を1時間添加し、それと同時に釣藤鈎フェノール成分 (epicatechin、catechin、procyanidin B-1、procyanidin B-2、hyperin、caffeic acid) 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。

#### b. 脳卒中後の認知障害に対する釣藤散の効果 - 事象関連電位による検討 -（小林）

脳卒中発症後、軽度の認知機能障害を来した7名の患者に釣藤散7.5g/日を12週間投与し、その前後で事象関連電位P3（標的刺激に対するtarget P3および新奇刺激に対するnovelty P3）を高解像度脳波記録装置により記録した。同時にMini Mental State Examination (MMSE)、語想起検査を評価

した。

c. 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 (三瀧)

桂枝茯苓丸を服用し、凝固療法、抗血栓療法を施行しているものを除いた高齢者9例を対象とした。瘀血病態の診断には寺澤の瘀血スコアを用い、20点未満の非瘀血群3例と20点以上の瘀血群6例に分け、ソノクロット分析装置を用いて、Activated Clotting Time (ACT)、Clot Rate (CR)、Time to Peak (TP)、Peak Angle (PA)、Signal on Peak (SP) について群間比較を行った。

d. 自然発症高血圧ラットの血管作動性に及ぼす桂枝茯苓丸の効果に関する検討 (後藤)

11週齢雄性のSHR16匹を対照群と0.3%桂枝茯苓丸(KB)投与群の2群に分け14週間飼育し、血圧、NO代謝物、過酸化脂質、血液レオロジー因子を測定した。また、オルガンバス法によって血管作動性に及ぼす影響を評価した。

e. 無症候性脳梗塞患者の血漿NO代謝物、過酸化脂質に及ぼす釣藤散の効果 (長坂)

無症候性脳梗塞患者15例を対象として、釣藤散を4週間投与しその前後で血圧、ビデオ顕微鏡システムを用いて眼球結膜微小循環(血管内径、血流速度、血流量)、血漿NO代謝物( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ )、過酸化脂質、総コレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロールを測定した。

(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。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、後藤、長坂)

1年以上継続して和漢薬治療を行なっている無症候性脳梗塞患者161例が対象となった。そのうち3年以上経過したものは30例であり、これを和漢薬治療群とした。また、地域脳検診において3年間経過を追えた健常高齢者33例を対照とした。

HDS-Rは和漢薬治療群、健常高齢者群ともに3年後に改善傾向を認めたが、両群間には差がなかった。Apathy Scaleは両群間、両群内ともに差を認めなかった。SDSでは3年後の経過で和漢薬治療群は開始時に比べ有意に改善し、健常高齢者群に比べても改善が有意であった(図2)。

KB-A群(1年経過107例、2年経過61例、3年経過17例)とKB-B群(1年経過54例、2年経過24例、3年経過13例)との比較では、HDS-Rでは開始時に比べて、KB-A群で3年後で有意の改善、KB-B群では1年後および2年後で有意の改善をみたが、両群間には差は認めなかった。Apathy Scaleでは、両群内、両群間ともに差がなかった。SDSでは開始時に比べて、KB-A群で2年後、3年後で有意の改善をみたが、両群間には差は認めなかった。

自覚症状の項目において、1年間の経過後軽度以上の改善を認めた症例は、KB-A群で頭重感22例(有症状者の37%)、頭痛24例(42%)、めまい感22例(49%)、肩こり23例(27%)、のぼせ感21例(48%)、耳鳴り14例(26%)、四肢のしびれ22例(41%)、四肢の冷え26例(39%)、全身倦怠感20例(27%)、食欲不振8例(36%)であった。KB-B群では頭重感15例(有症状者の45%)、頭痛15例(50%)、めまい感5例(24%)、肩こり13例(42%)、のぼせ感11例(35%)、耳鳴り6例(26%)、四肢のしびれ9例(29%)、四肢の冷え10例(25%)、全身倦怠感10例(26%)、食欲不振4例(67%)であった。

血圧に関しては、KB-A群、KB-B群ともに有意な変化はみられなかった。

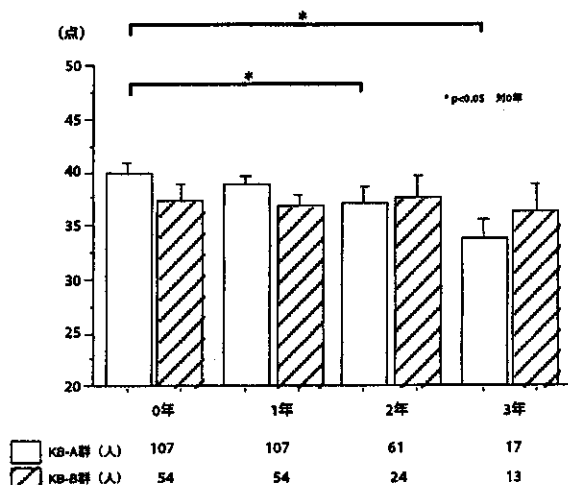


図2 和漢薬治療群と健常高齢者群とのSelf-Rating Depression Scale (うつ状態スコア)の比較

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎フェノール成分の保護作用 (嶋田)

MTT法による cell viability では、グルタミン酸誘導神経細胞死を、epicatechin は 100  $\mu$ M 以上の濃度で、catechin は 300  $\mu$ M で、procyanidin B-1 は 30  $\mu$ M 以上の濃度で、procyanidin B-2 は 100  $\mu$ M 以上の濃度で各々有意に抑制した。Procyanidin B-2 の成績を図 3 に示した。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入では、epicatechin 及び catechin は 300  $\mu$ M で、procyanidin B-1 及び procyanidin B-2 は 100  $\mu$ M 以上の濃度で  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入を、各々有意に抑制した。

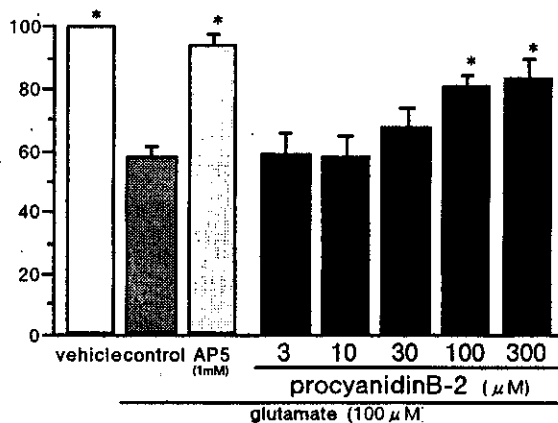


図 3 Procyanidin B-2 のグルタミン酸誘導神経細胞死保護作用 (MTT法)

b. 脳卒中後の認知障害に対する釣藤散の効果 - 事象関連電位による検討 - (小林)

釣藤散投与により MMES は有意に増加し、語想起数も増加傾向を示した。Target P3 はその潜時が薬剤投与後有意に短縮し、振幅も増加傾向を示した。標的識別の正解率も有意に上昇した。一方 novelty P3 の潜時は変化しなかったが、振幅が有意に増加し、その頭皮上分布がより前方に移動した (図 4)。

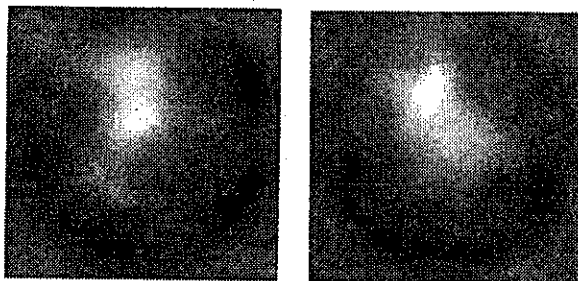


図 4 novelty P3 の頭皮上電位分布パターンの変化

c. 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 (三瀧)

ACT については、瘀血群は投与前 113.0  $\pm$  26.0、投与 2 週間後 142.2  $\pm$  14.2、投与 4 週間後 143.8  $\pm$  16.7 と投与前が低値であり、投与 2 週間後と投与 4 週間後には非瘀血群と同等の値となった (図 5)。

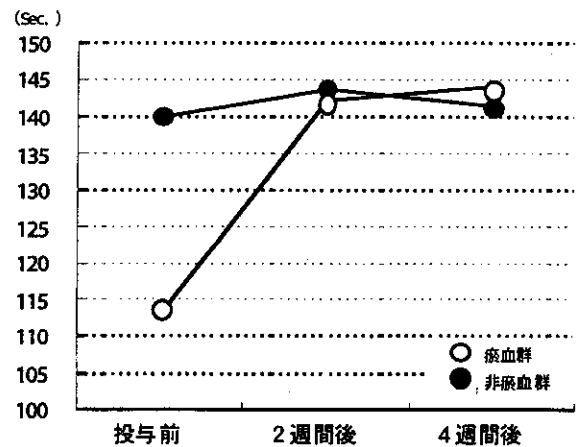


図 5 Activated Clotting Time の群間比較

d. 自然発症高血圧ラットの血管作動性に及ぼす桂枝茯苓丸の効果に関する検討 (後藤)

14 週間の飼育中、KB 群の収縮期血圧および平均血圧は SHR 対照群より有意に低下した。また、Ach による内皮依存性弛緩反応を検討したところ、弛緩率は SHR 対照群に比べて KB 群において有意な増加を認めた (図 6)。Xan-X.O. 誘発血管収縮反応では、内皮保存標本では、KB 群の収縮率は SHR 対照群と比較して有意に減少した。血漿 NO 代謝物濃度は、両群間で差がなく、血漿過酸化脂質濃度は KB 群で有意に低下した。血漿粘度やフィブリノーゲンも KB 群で有意に低値であった。

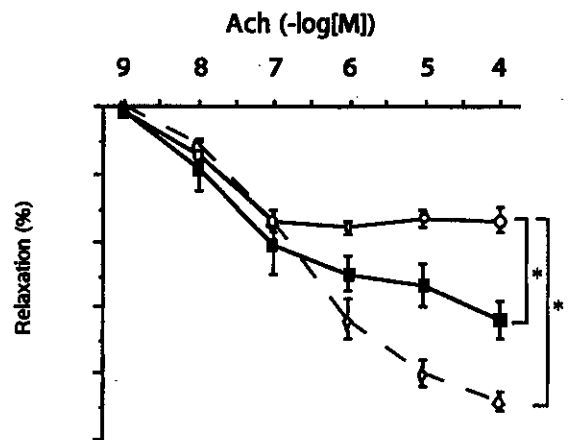


図 6 アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩作用 (SHR: 自然発症高血圧ラット、WKY: Wistar Kyoto ラット)

e. 無症候性脳梗塞患者の血漿NO代謝物、過酸化脂質に及ぼす釣藤散の効果（長坂）

4週間の釣藤散の服用前後で、血圧には有意の変化はみられなかった。眼球結膜微小循環に関しては、血流速度、血流量、血管内径は各々有意に増加した。血漿NO代謝物は増加傾向を示し、血漿過酸化脂質は有意に低下した（図7）。総コレステロール、LDL-コレステロールは有意に低下したが、HDL-コレステロール及び中性脂肪には変化はみられなかった。

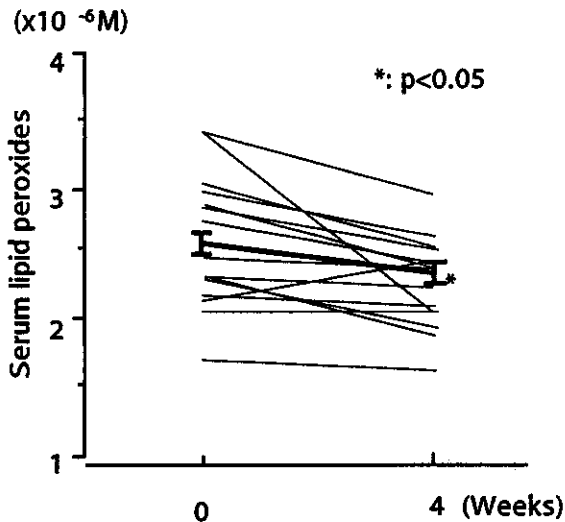


図7 釣藤散投与前後の血漿過酸化脂質の変化

#### D. 考察

本研究プロジェクトの最重要課題は、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多施設におけるコホート研究によって評価することである。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。

研究期間の初年度にあたる昨年度は、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。昨年度の検討では、12週間の桂枝茯苓丸の投与により、HDS-Rの有意の改善、Apathy Scaleの有意の改善、SDSの有意の改善が

みられ、自覚症状の全般改善度でも軽度改善以上が68例（49%）に認められた。

本年度は、桂枝茯苓丸を主とした和漢薬治療を長期間継続した症例について中間集計を行ない、併せて脳検診で経過を追えた健常高齢者群との比較検討、桂枝茯苓丸の服用量によって2群に分けた比較検討を行なった。その結果、特にうつ状態の評価手段であるSDSにおいて、桂枝茯苓丸を主とした和漢薬治療の長期投与の有用性が認められ、かつ、その効果は桂枝茯苓丸を比較的多く服用している症例で顕著であった。脳血流量の低下とうつ状態の発症に関する報告も多くみられることから、桂枝茯苓丸の血流改善作用との関連が示唆される。認知機能の指標となるHDS-Rでも桂枝茯苓丸を主とした和漢薬治療によって改善がみられたが、健常高齢者との差は認められなかったため引き続き経過を観察することが必要と思われた。今回は3年間の研究期間の中間年にあたり最終報告とは言えないため、今後も桂枝茯苓丸の無症候性脳梗塞に対する長期投与の効果について症例を集積し検討を重ねる予定である。

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、脳血管障害後の認知機能障害に対する釣藤散12週間投与の効果を事象関連電位P3の変化を指標として検討した。その結果、Target P3はその潜時が薬剤投与後有意に短縮し、振幅も増加傾向を示した。標的識別の正解率も有意に上昇した。一方novelty P3の潜時は変化しなかったが、振幅が有意に増加し、その頭皮上分布がより前方に移動した。また、同時に評価したMMESは有意に増加し、語想起数も増加傾向を示した。以上のことから、釣藤散は心理行動指標に加え電気生理学な指標においても脳血管障害後の認知機能障害を改善させることが明らかとなった。

三瀧は、高齢者を対象に桂枝茯苓丸の血液凝固線溶系に対する影響についてソノクロットを用いて検討した。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おり、桂枝茯苓丸

は瘀血を改善する代表的駆瘀血剤である。その結果、瘀血群のACTは、桂枝茯苓丸投与2週間後と4週間後には非瘀血群と同等の値となった。以上より、桂枝茯苓丸は凝固因子の活性を抑え、かつクロット退縮能を抑制することが示唆され、血栓形成傾向を改善させることが推測された。

後藤は、本年度の分担研究において、SHRに桂枝茯苓丸を経口投与し、その血管作動性に及ぼす影響をオルガンバスを用いて検討した。その結果、桂枝茯苓丸投与によってAchによる血管弛緩反応の低下抑制作用を認めた。また、Xan-X.O.誘発血管収縮反応では、内皮保存血管において桂枝茯苓丸投与により血管収縮率が低下した。Achによる内皮依存性血管弛緩反応はNOの関与で生じることが知られている。桂枝茯苓丸投与によって血漿過酸化脂質が低下したことを考え合わせると、桂枝茯苓丸がフリーラジカルのスカベンジ作用を生じ、NO作用を増強した可能性が示唆された。一方、血液レオロジー学的検討では、桂枝茯苓丸投与により血漿粘度の改善と血漿フィブリノーゲンの低下を認めた。血液粘度の上昇は必ずしも心力の増加を来し、必ずしも心力の増加は内皮障害の一因になるとの報告がある。このことから、桂枝茯苓丸は血液レオロジー面からも血管内皮に好影響を与えた可能性が考えられる。血管内皮機能低下は動脈硬化の初期病変と考えられることから、桂枝茯苓丸は高血圧症における動脈硬化の発症及び進展抑制作用を有する可能性が考えられる。

長坂は、釣藤散の脳血流改善効果の作用機序を検討する目的で、無症候性脳梗塞患者を対象に釣藤散4週間投与の眼球結膜微小循環、血漿NO代謝物、過酸化脂質、脂質代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、釣藤散の微小循環改善作用、過酸化脂質及び総コレステロール・LDL-コレステロール低下作用が認められた。無症候性脳梗塞患者は、健常人に比べて脳血流が低下していることが知られている。また、血流障害には血管内皮からのNO産生低下が関与することや、NOラジカルは内皮においてフリーラジカルによって不活化されることが知られている。過酸化脂質は血中のフリーラジカルの指標となるため、今回の結果から、釣藤散はラジカルスカベンジ作用により血管内皮のNO機能を改善する可能性が示唆された。さらに、釣藤散は脂質代謝を改善することによっても血流を改善している可能性が示唆された。

嶋田は、本年度の分担研究において、釣藤散のフェノール成分のグルタミン酸誘導神経細胞死に

対する保護作用を報告した。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し、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って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。既に、釣藤散に含まれるアルカロイドのisorhynchophylline、isocorynoxine、rhynchophylline、hirsuteine、hirsutineなどのグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用が報告されている。釣藤散にはアルカロイド成分の他に、フェノール成分も含まれている。今回の検討によって、釣藤散のフェノール成分であるepicatechin、catechin、procyanidin B-1及びprocyanidin B-2も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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入を有意に阻害することが明らかとなった。

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

桂枝茯苓丸長期投与の無症候性脳梗塞患者におけるうつ状態に対する有効性が示された。桂枝茯苓丸の自然発症高血圧ラットにおける血圧上昇抑制作用、血管内皮機能保護作用及び血栓形成改善作用が示された。釣藤散の脳血管障害患者に対する微小循環改善作用、脂質代謝改善作用及び認知障害改善作用が示された。釣藤散フェノール成分のグルタミン酸誘導神経細胞死抑制作用が示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Goto H., Yang Q., Kita T., Hikiami H., Shimada Y. and Terasawa K.: Effects of Choto-san on microcirculation, serum nitric oxide and lipid peroxides in patients with asymptomatic cerebral infarction. Am. J. Chin. Med. 29:83-89, 2001.



2) Shimada Y., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Sakakibara I., Sasaki H. and Terasawa K.: Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am. J. Chin. Med.* 29:173-180,2001.

3) Kasahara Y., Goto H., Shimada Y., Sekiya N., Yang Q. and Terasawa K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan on endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Trad. Med.* 18:113-117,2001.

## 2. 学会発表

1) Goto H. : Evaluation of herbal extracts in Japan. The 2001 Periodical Spring Conference of the Korea Society for Oriental Internal Medicine. 2001, May, Gwang-Ju, Korea.

2) 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回東洋医学会総会, 2001, 6月, 札幌.

3) 曹基湖, 後藤博三, 嶋田豊, 寺澤捷年: 脳卒中発症初期患者に対する星香正気散の有用性の検討. 第52回東洋医学会総会, 2001, 6月, 札幌.

4) 嶋田豊, 横山浩一, 後藤博三, 榊原巖, 酒井伸也, 萬谷直樹, 関矢信康, 寺澤捷年: 培養ラット小脳顆粒細胞におけるNO-donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

5) 笠原裕司, 後藤博三, 嶋田豊, 関矢信康, 楊喬, 寺澤捷年: 自然発症高血圧ラット摘出血管のラジカル誘発収縮に対する桂枝茯苓丸の収縮抑制効果. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

6) 古田一史, 木村豪雄, 南澤潔, 小尾龍右, 鉄村進, 三瀧忠道: Sonoclot Analyzerを用いた瘀血病態の検討. 第52回日本東洋医学会学術総会, 2001, 6月, 札幌.

7) Tanikawa, K., Goto, H., Tatsuno, Y. and Teraswa, K. : Endothelium-dependent vasodilator effect of tannin extract from *Cinnamomum Cortex* on isolated rat aorta. The 11th International Congress of Oriental Medicine, 2001, Oct., Seoul, Korea.

8) Shimada, Y., Goto, H., Kogure, T., Sakai, S., Mantani, N., Sekiya, N. and Teraswa, K. : Protective effect of extract prepared from the Bark of *Cinnamomum Cassia Blume* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. The 11th International Congress of Oriental Medicine, 2001, Oct., Seoul, Korea.

## 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を主とした 和漢薬の長期投与効果の検討

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

無症候性脳梗塞患者に桂枝茯苓丸を主とした和漢薬を長期間投与し、精神症状、自覚症状、血圧等に与える影響を検討した。その結果、無症候性脳梗塞患者は健常高齢者に比べ有意にSDS（うつ状態スコア）が高値であったが、和漢薬治療3年経過後で有意な改善を認めた。特にこのうつ状態の改善は桂枝茯苓丸を積極的に使用した群において効果が顕著であった。また、無症候性脳梗塞に伴う認知機能の低下においても和漢薬は有用である可能性が示唆された。

### A. 研究目的

無症候性脳梗塞は、神経症状がないにも関わらずMRIなどの画像診断において微小脳梗塞を認めるものである。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、非特異的な症状として頭痛や頭重感、めまい感を伴い、精神症状としてうつ症状や認知機能の低下が報告されている。また、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、漢方方剤・桂枝茯苓丸について、我々は、臨床研究において血液レオロジー因子改善作用や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血圧上昇抑制作用を明らかにしてきた。以上より、桂枝茯苓丸が脳血流低下を基礎とする無症候性脳梗塞に有用である可能性が示唆される。そこで、今回、無症候性脳梗塞患者に桂枝茯苓丸エキス製剤を中心とした和漢薬治療を行ない、無症候性脳梗塞患者に伴う認知機能の低下、うつ症状などの精神症状、自覚症状、血圧に及ぼす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年間に当科なら

びに関連施設を受診し、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。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。

方法は、対象患者に桂枝茯苓丸エキス製剤を主体とした和漢薬治療を施行し、1年毎に、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：うつ状態スコア）の3項目について検討した。自覚症状に関しては、頭重感、頭痛、めまい感、肩こり、のぼせ感、耳鳴り、四肢のしびれ、四肢の冷え、全身倦怠感、食欲の自覚症状10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、内服による影響を1年毎に検討した。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、収縮期血圧と拡張期血圧についても測定した。

この対象患者について1) 3年経過患者について、地域脳検診において経過を観察している脳卒中等の疾患がない健常高齢者群とHDS-R、Apathy Scale、SDSについて比較検討した。2) 桂枝茯苓丸の無症候性脳梗塞への効果を検討するため、昨年度施行した「無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓

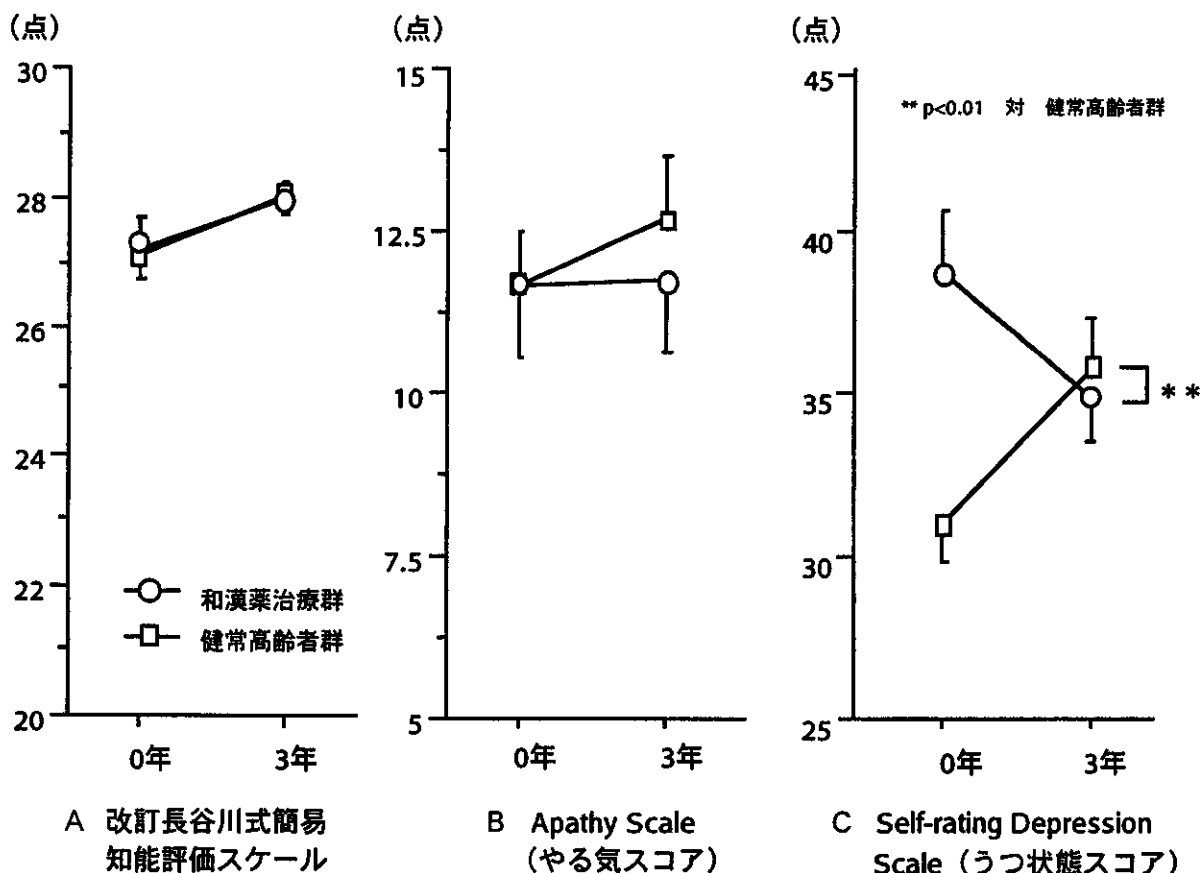


図1 和漢薬治療群と健常高齢者群との各スコアの比較

丸の短期効果の検討」の結果をふまえ、和漢薬治療群の中でも桂枝茯苓丸エキス製剤の有用度が高く1日量7.5gを1年間当たり平均6ヶ月以上内服しているKB-A群と、主に他の漢方方剤を内服し、桂枝茯苓丸エキス製剤は平均6ヶ月未満しか内服していないKB-B群に分け比較検討した。

統計処理：結果は平均±標準誤差 (mean±S.E.) 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、1年以上和漢薬治療を継続している161例で、男性45例、女性116例、平均67.6±0.7歳であった。合併症は、高血圧症95例、糖尿病17例、高脂血症44例、虚血性心疾患10例であった。

1) 和漢薬治療群3年経過患者と地域脳検診3年経過健常高齢者群との比較

和漢薬治療群で3年経過した30症例は男性6例、女性24例で平均年齢65.9±1.5歳であった。また、地域脳検診における健常高齢者は33例(うち無症候性脳梗塞患者6例を含む、男性16例、女性17例)で平均年齢69.0±0.6歳であり、両群においてHDS-R、Apathy scale、SDSについて比較検討した。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1A)：和漢薬治療群において開始時27.2±0.5点、3年後28.0±0.3点(p<0.1)であった。健常高齢者群は開始時27.2±0.4点、3年後28.0±0.3点(p<0.1)と両群とも開始時に比べ改善傾向を示したが、両群間で有意差を認めなかった。

Apathy Scale(図1B)：和漢薬治療群におい

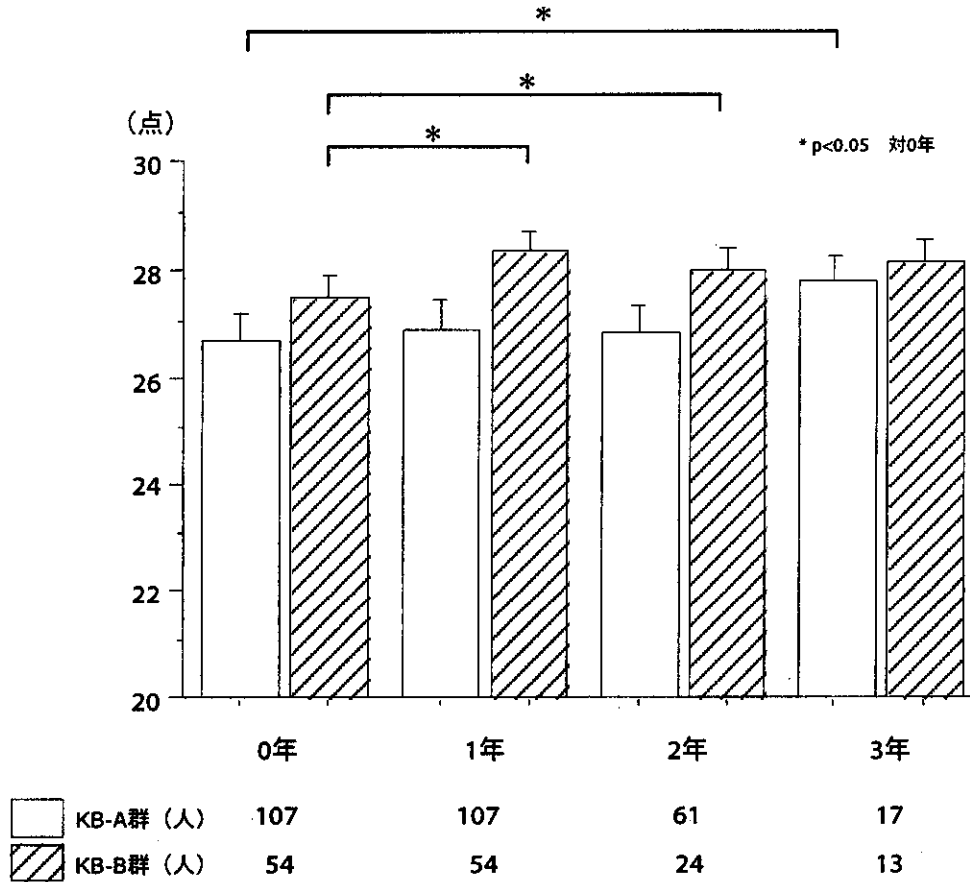


図2 改訂長谷川式簡易知能評価スケールのKB-A群とKB-B群の比較

て開始時11.7±1.2点、3年後11.7±1.1点であった。健常高齢者群は開始時11.7±0.8点、3年後12.7±1.0点と両群間、両群内において差を認めなかった。

Self-Rating Depression Scale (図1 C) : SDSは、群間の比較で、開始時和漢薬群38.7±1.9点、健常高齢者群31.0±1.1点で和漢薬群が有意に高い値を示した。しかし、3年後の経過では、和漢薬治療群34.9±1.4点、健常高齢者群35.8±1.5点と和漢薬群は開始時に比べ有意に改善し、脳検診群に比較しても有意に改善した (p<0.01)。

2) 和漢薬治療群において桂枝茯苓丸エキス製剤1日量7.5gを1年間当たり平均6ヶ月以上内服 (KB-A) 群と6ヶ月未満内服 (KB-B) 群の比較

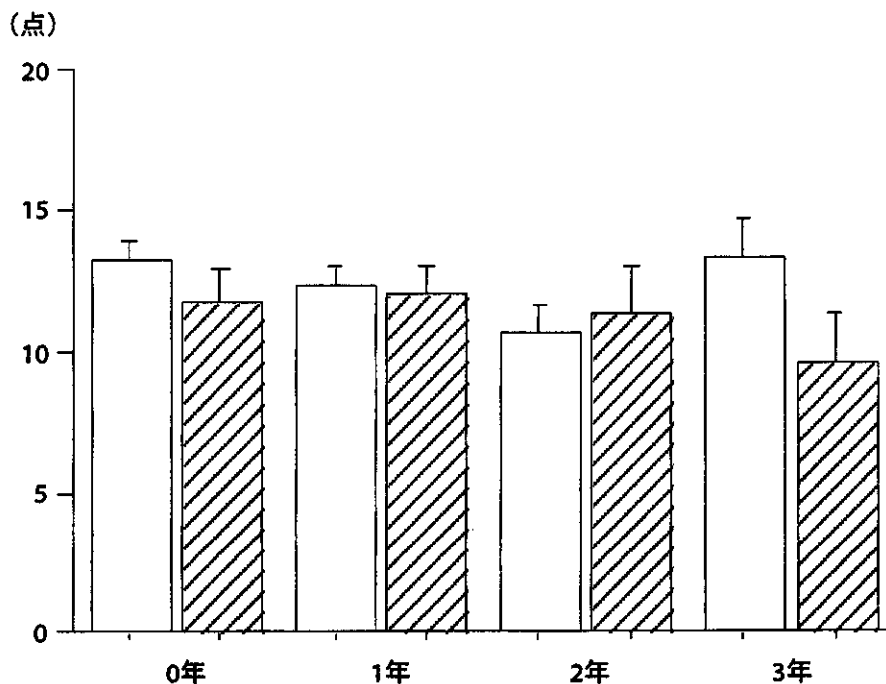
KB-A群は107症例 (1年経過107例、2年経過61例、3年経過17例)、男性28例、女性79例、平均年齢67.0±0.8歳で、桂枝茯苓丸エキス製剤を平均11.2±0.2ヶ月/年内服していた。KB-B群は54例 (1年経過54例、2年経過24例、3年経過13例)、男性17例、女性37例、平均年齢68.9±1.0歳で、桂枝茯苓丸エキス製剤を平均1.6±0.3ヶ月/年のみ内服し、主に他の漢方剤で治療を受けていた。

改訂長谷川式簡易知能評価スケール (図2) : KB-A群は、開始時26.7±0.5点、1年後26.9±0.5点、2年後26.8±0.6点、3年後27.8±0.5点 (p<0.05 vs. 開始時) であった。KB-B群は、開始時27.5±0.5点、1年後28.4±0.3点 (p<0.05 vs. 開始時)、2年後28.0±0.5点 (p<0.05 vs. 開始時)、3年後28.2±0.4点であったが、両群間に差は認められなかった。

Apathy Scale (図3) : KB-A群は、開始時13.2±0.7点、1年後12.3±0.8点、2年後10.8±0.9点、3年後13.4±1.4点であった。KB-B群は、開始時11.8±1.1点、1年後12.1±1.0点、2年後11.4±1.6点、3年後9.6±1.8点で両群内、両群間で差を認めなかった。

Self-Rating Depression Scale (図4) : KB-A群が、開始時39.9±0.9点、1年後38.7±0.9点、2年後37.2±1.3点 (p<0.05 vs. 開始時)、3年後33.8±1.8点 (p<0.05 vs. 開始時) であった。KB-B群は、開始時37.2±1.5点、1年後36.7±1.3点、2年後37.5±2.1点、3年後36.5±2.1点であったが、両群間に差は認められなかった。

自覚症状：自覚症状全般改善度は1年後におい



□	KB-A群 (人)	107	107	61	17
▨	KB-B群 (人)	54	54	24	13

図3 Apathy Scale (やる気スコア) のKB-A群とKB-B群の比較

て、KB-A群は、軽度改善15例(14%)、不変81例(76%)、悪化11例(10%)、KB-B群は、軽度改善7例(13%)、不変38例(80%)、悪化4例(7%)で、両群間に差を認めなかった。

各項目別では、KB-A群における有症状症例数は、頭重感59例(55%)、頭痛57例(53%)、めまい感45例(50%)、肩こり84例(79%)、のぼせ感44例(41%)、耳鳴り53例(50%)、四肢のしびれ54例(50%)、四肢の冷え67例(63%)、全身倦怠感74例(69%)、食欲不振22例(21%)であった。KB-B群における有症状症例数は、頭重感33例(61%)、頭痛30例(56%)、めまい感21例(39%)、肩こり45例(83%)、のぼせ感31例(57%)、耳鳴り23例(43%)、四肢のしびれ31例(57%)、四肢の冷え40例(74%)、全身倦怠感38例(70%)、食欲不振6例(11%)で、各項目において両群間に差を認めなかった。

有症状者で、1年間の経過後、軽度以上の改善を認めた症例は、KB-A群で頭重感22例(有症状者の37%)、頭痛24例(42%)、めまい感22例(49%)、肩こり23例(27%)、のぼせ感21例(48%)、耳鳴り14例(26%)、四肢のしびれ22例(41%)、四肢の冷え26例(39%)、全身倦怠感20例(27%)、食欲不振8例(36%)であった。

KB-B群では頭重感15例(有症状者の45%)、頭痛15例(50%)、めまい感5例(24%)、肩こり13例(42%)、のぼせ感11例(35%)、耳鳴り6例(26%)、四肢のしびれ9例(29%)、四肢の冷え10例(25%)、全身倦怠感10例(26%)、食欲不振4例(67%)で、めまいの項目においてKB-A群がKB-B群に比較して優れている傾向( $p < 0.1$ )を認めたが、他の各項目では両群間に差を認めなかった。

血圧：和漢薬治療群全体では、収縮期血圧は開始時 $136.6 \pm 1.7$ 、1年後 $134.3 \pm 1.3$ 、2年後 $136.7 \pm 1.8$ 、3年後 $142.1 \pm 2.6$ mmHgであった。拡張期血圧は開始時 $75.8 \pm 1.4$ 、1年後 $78.4 \pm 0.9$ 、2年後 $77.6 \pm 1.4$ 、3年後 $92.3 \pm 4.5$ mmHgであった。いずれも開始時に比較し、有意な変化を認めなかった。KB-A群では、収縮期血圧は開始時 $136.7 \pm 1.8$ 、1年後 $133.8 \pm 1.6$ 、2年後 $135.1 \pm 2.5$ 、3年後 $135.1 \pm 5.5$ mmHgであった。拡張期血圧は開始時 $78.7 \pm 1.2$ 、1年後 $78.4 \pm 1.0$ 、2年後 $78.4 \pm 1.9$ 、3年後 $74.4 \pm 3.8$ mmHgであった。KB-B群では、収縮期血圧は開始時 $136.5 \pm 3.6$ 、1年後 $135.7 \pm 2.6$ 、2年後 $132.8 \pm 4.9$ 、3年後 $142.3 \pm 3.1$ mmHgであった。拡張期血圧は開始時 $73.4 \pm 2.0$ 、1年後 $79.6 \pm 1.8$ 、2年後 $75.9 \pm 4.9$ 、3年後 $79.0 \pm 3.0$ mmHgで、両群間に差

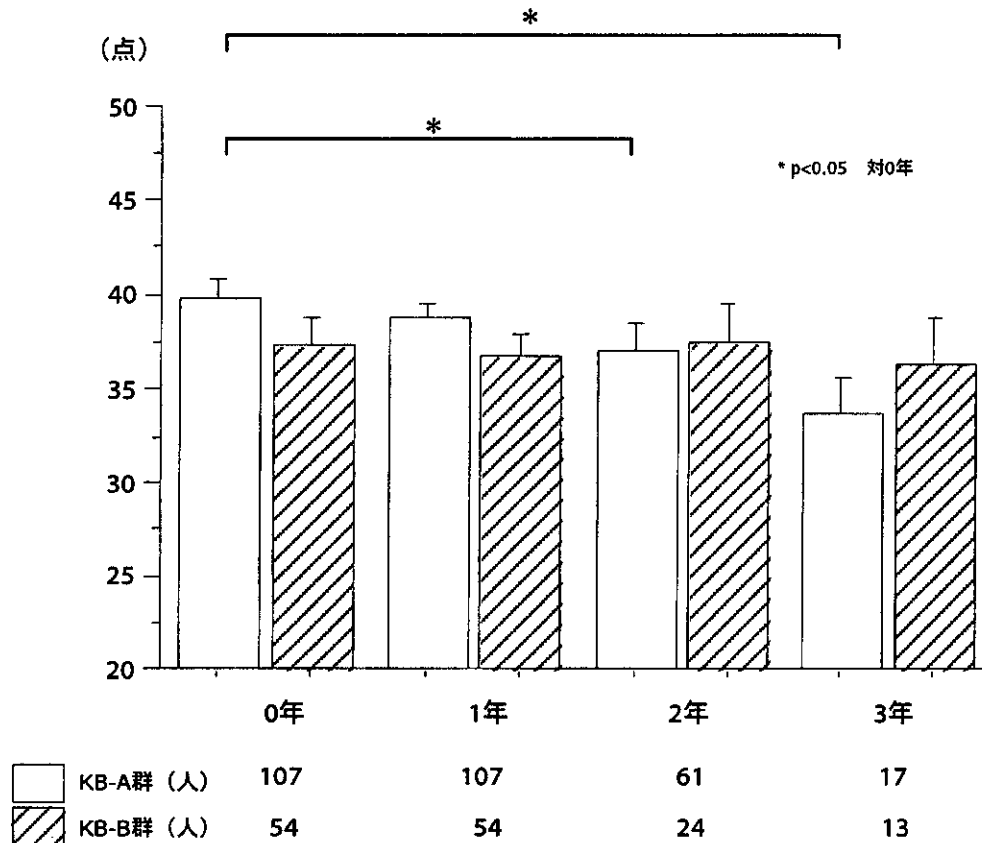


図4 Self-Rating Depression Scale (うつ状態スコア) のKB-A群とKB-B群の比較

を認めなかった。

#### D. 考察

無症候性脳梗塞は、脳血管性痴呆や脳卒中の大発作の危険因子として近年注目されている。また、その臨床病態として、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、症例の集積途中であるが、無症候性脳梗塞患者に対する桂枝茯苓丸を主体とした和漢薬の長期効果を検討した。検討方法として、和漢薬治療3年経過群と地域脳検診受診者である健常高齢者との比較を行い、さらに、昨年度の結果を考慮し、和漢薬群の中でも代表的な駆瘀血剤である桂枝茯苓丸エキス製剤を長期使用した群と主に他の治療方剤を用いた群で比較検討を行った。

認知機能に関して、20点以下を痴呆の疑い有りとして判定する改訂長谷川式簡易知能評価スケールは、和漢薬治療群と健常脳検診群において開始時に差はなく、3年経過後も両群間で差を認めなかった。これまでも無症候性脳梗塞と認知機能の関連の有無について多くの報告がある。それらを総合すると、関連の有無に関する報告の不一致の原因とし

て、対象者の年齢、無症候性脳梗塞病変の程度、認知機能検査の種類などがあげられている。より高齢者で関連が生じやすいとの報告や脳室周囲の高信号域の程度が重要とする報告がある。このことを考慮すると、引き続き経過観察をすることが重要と考えられた。

各種の情緒障害に関して、意欲の低下の指標としてApathy Scale、うつ状態の指標としてSDSを検討した。16点以上を無気力と判定するApathy Scaleに関しては、和漢薬治療群と健常脳検診群において開始時に差はなく、両群間でほぼ同様の経過で3年経過後も両群間で差を認めなかった。本スケールは、変性疾患や脳卒中後に低下が認められ、うつ状態とは独立した症候で前頭葉の機能・血流量の低下と関連することが報告されている。しかし、今回対象とした無症候性脳梗塞のような軽微な病変では健常高齢者と比較して明らかな差が認められなかった。40点以上をうつ状態と判定するSDSに関しては、これまでも無症候性脳梗塞患者で高い値を示すことが報告されている。実際今回の検討でも、和漢薬治療群は健常高齢者群に比べ、有意にスコアが高かった。しかし、3年間の経過後、健常高齢者群は有意に悪化したにもか

かわらず、和漢薬治療群は有意な改善を示し、両群間で差が認められた。とくに和漢薬群の中でもKB-A群において、開始時に比べ有意に改善がみられたことから、SDSの改善した一因に桂枝茯苓丸の有効性が示唆される。脳血流量の低下とうつ状態の発症に関する報告も多くみられることから、桂枝茯苓丸の血流改善作用との関連が示唆される結果であると思われる。

自覚症状に関しては、無症候性脳梗塞の30%程度みられる頭重感、めまいなどの非特異的の症状を有する症例が約50%の症例で認められた。KB-A群とKB-B群の比較では、自覚症状全般改善度で両群間で治療前後で差はなく、項目別では「めまい」においてKB-A群でKB-Bに比べ改善傾向が認められた。随証治療による漢方方剤の処方選択法を考慮すると自覚症状の改善に大きな差はみられないものと考えられた。

血圧に関しては、和漢薬治療群全体で、治療開始時と1、2、3年経過症例間で有意は変化はなく、KB-A群とKB-B群の両群間でも差は認められなかった。

## E. 結論

無症候性脳梗塞の臨床病態として、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。今回の検討では、和漢薬治療は、健常高齢者群との比較でうつ状態を有意に改善した。また、和漢薬治療は、無症候性脳梗塞に認められる認知機能の低下やうつ状態の改善においても有用であった。特にうつ状態の改善に桂枝茯苓丸の有効性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Goto H., Yang Q., Kita T., Hikiami H., Shimada Y. and Terasawa K.: Effects of Choto-san on microcirculation, serum nitric oxide and lipid peroxides in patients with asymptomatic cerebral infarction. *Am. J. Chin. Med.* 29: 83-89, 2001.

2) Shimada Y., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Sakakibara I., Sasaki H. and Terasawa K.: Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am. J. Chin. Med.* 29: 173-180, 2001.

3) Kasahara Y., Goto H., Shimada Y., Sekiya N., Yang Q. and Terasawa K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan (Gui-Shi-Fu-Ling-Wan) on endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Trad. Med.* 18: 113-117, 2001.

### 2. 学会発表

1) Shimada Y., Goto, H., Kogure, T., Sakai, S., Mantani, N., Sekiya, N. and Terasawa K.: Protective effect of extract prepared from the Bark of *Cinnamomum Cassia* Blume on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. The 11th International Congress of Oriental Medicine, 2001, Oct., Seoul, Korea.

2) 嶋田豊, 横山浩一, 後藤博三, 榎原巖, 酒井伸也, 萬谷直樹, 関矢信康, 寺澤捷年: 培養ラット小脳顆粒細胞におけるNO-donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

3) 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回東洋医学会総会, 2001, 6月, 札幌.

4) 笠原裕司, 後藤博三, 嶋田豊, 関矢信康, 楊喬, 寺澤捷年: 自然発症高血圧ラット摘出血管のラジカル誘発収縮に対する桂枝茯苓丸の収縮抑制効果. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

## 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釣藤鈎フェノール成分の保護作用

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

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鈎フェノール成分の保護作用を検討した。Epicatechin, catechin, procyanidin B-1及びprocyanidin B-2は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。これらの釣藤鈎フェノール成分は、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。

釣藤散は、頭痛、めまい、耳鳴り、肩こりなどを有する比較的高齢者に対して使用される漢方方剤であるが、近年、寺澤らによるプラセボを用いた二重盲検試験によって脳血管性痴呆に対する有効性が報告されている。釣藤散は11種類の生薬から構成されるが、そのなかでも釣藤鈎が最も重要なものである。我々は培養小脳顆粒細胞を用いた実験で、釣藤鈎エキスが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ことを報告した。さらに我々は、釣藤鈎のアルカロイド成分が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ことを報告している。釣藤鈎にはアルカロイド成分の他に、フェノール成分も含まれていることが知られている。今回の実験では、釣藤鈎からフェノール成分を単離抽出し、それらのグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用を検討した。

### B. 研究方法

図1に釣藤鈎のHPLC所見を、図2に釣藤鈎から単離抽出したepicatechin, catechin, procyanidin B-1, procyanidin B-2, hyperin, caffeic acidの化学構造式を示した。これらの釣藤鈎フェノール成分はDMSOに100 mMの濃度で溶解した。

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。

Vehicleとして $\text{Mg}^{2+}$ -free Locke's solutionを用い、

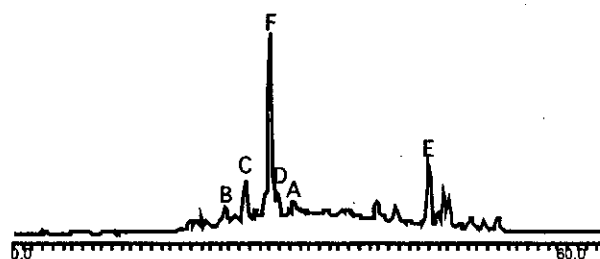


図1 釣藤鈎エキスのHPLC所見

A: epicatechin, B: catechin, C: procyanidin B-1,  
D: procyanidin B-2, E: hyperin, F: caffeic acid.

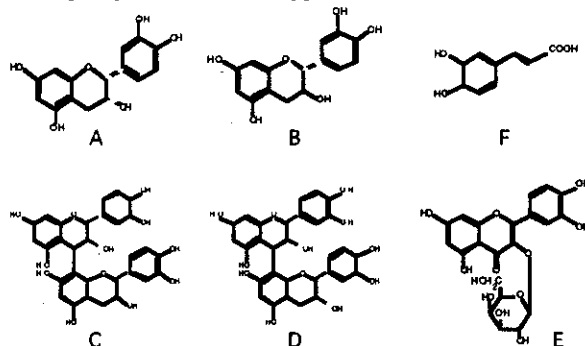


図2 釣藤鈎フェノール成分の化学構造式

A: epicatechin, B: catechin, C: procyanidin B-1,  
D: procyanidin B-2, E: hyperin, F: caffeic acid.

それに glutamate (100  $\mu\text{M}$ ) を溶解したものを control とした。これに、NMDA 受容体の antagonist である AP5 (1 mM) または各釣藤鈎フェノール成分 (3～300  $\mu\text{M}$ ) を加えた溶液を準備した。これらの溶液はすべて 1% の DMSO を含むように調整された。培養小脳顆粒細胞をこれらの溶液中に 5%  $\text{CO}_2$ 、37℃ で 1 時間 incubate した。Cell viability の指標には MTT 法を用いた。即ち、500  $\mu\text{g/ml}$  の MTT を添加し 37℃ で 30 分 incubate した後、0.04 N の HCl を含んだ isopropanol で細胞を溶解し、吸光度計で 570 nm の吸光度を測定し、vehicle に対するパーセントで細胞生存率を評価した。



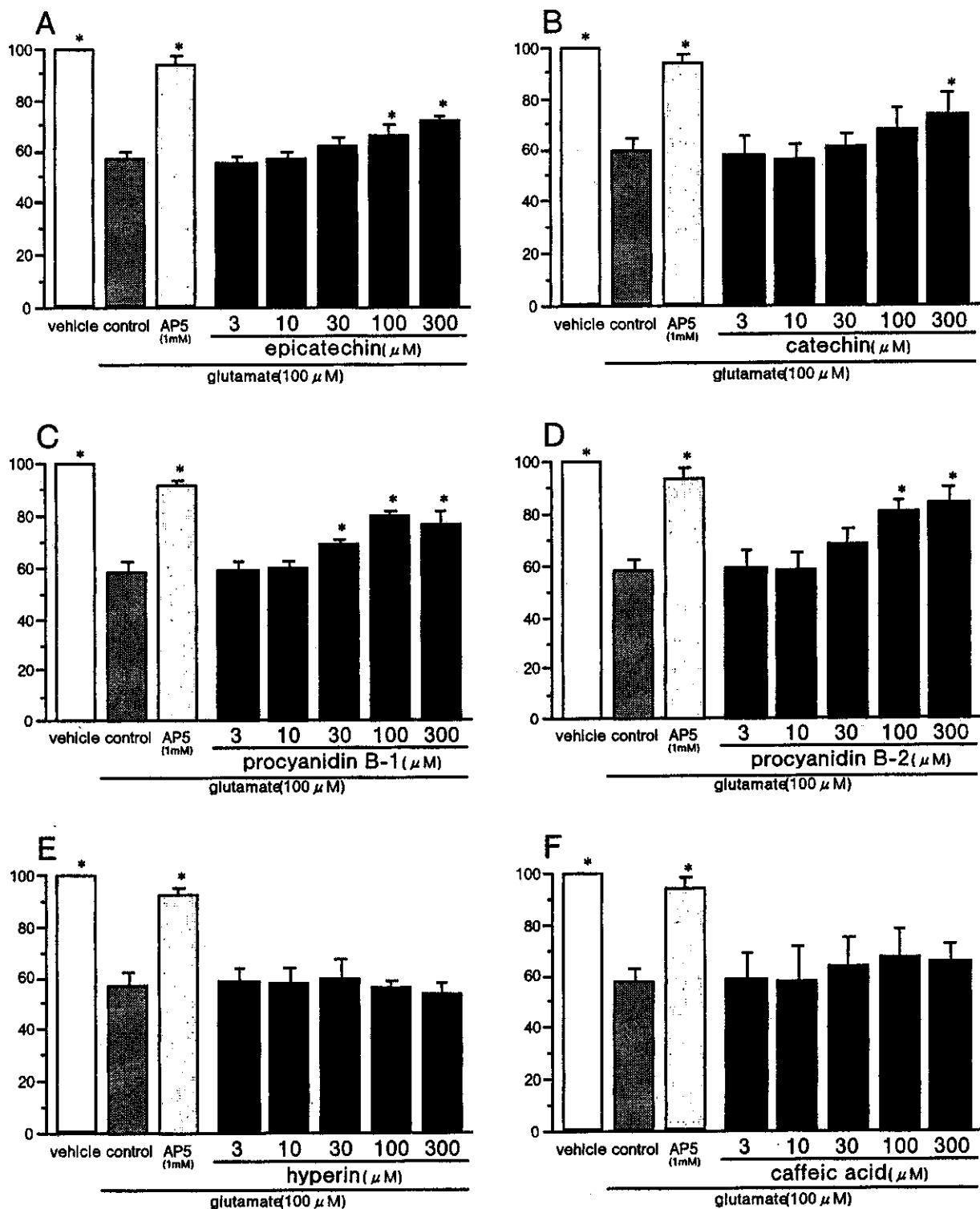


図3 釣藤鈎フェノール成分のグルタミン酸誘導神経細胞死保護作用 (MTT法)  
 A: epicatechin, B: catechin, C: procyanidin B-1, D: procyanidin B-2, E: hyperin, F: caffeic acid.

また、培養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 で1時間 incubate した。さらに、細胞を1NのNaOHで溶解し、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 に対する倍数でカルシウムの細胞

内流入を評価した。

1回の実験で各群につき6穴を用い、その平均をその群の値とした。実験は4回行ない、平均±標準偏差で値を表示した。統計学的処理として、Kruskal-Wallis test と Bonferroni t-test を用いた。P < 0.05 を有意水準とした。

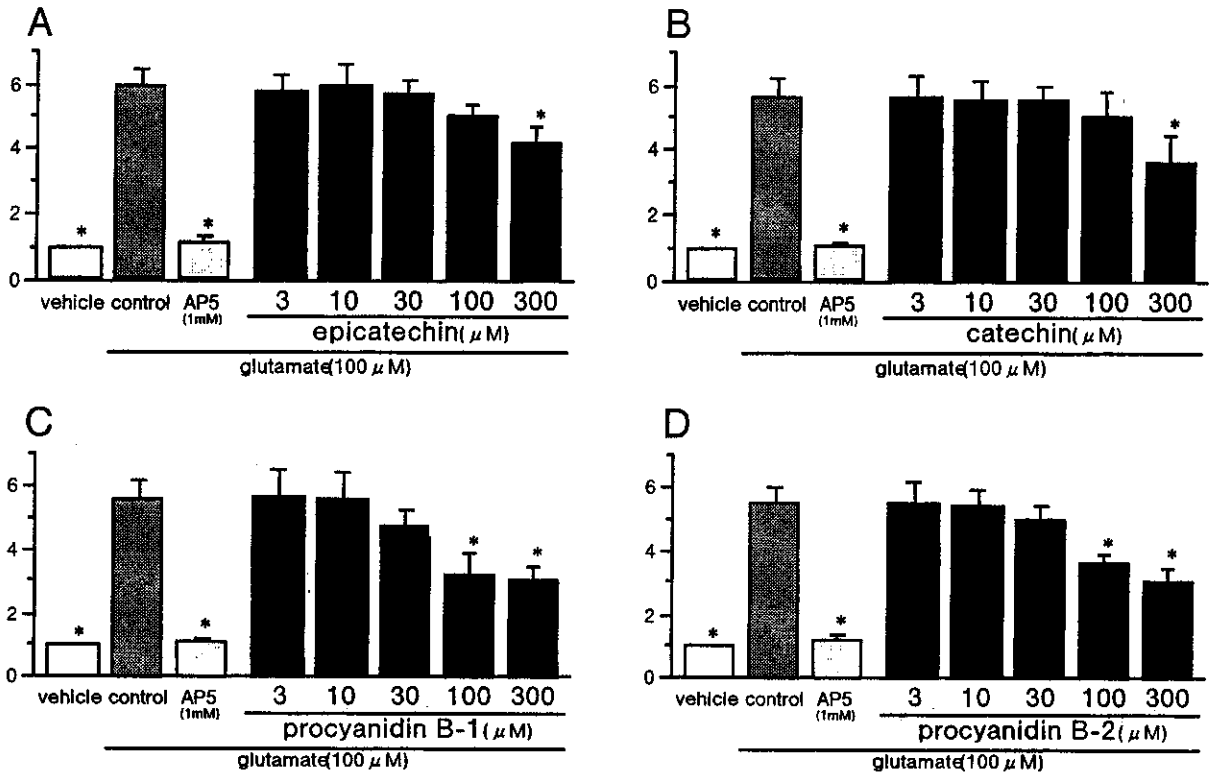


図4 釣藤鈎フェノール成分のグルタミン酸誘導<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>細胞内流入抑制作用  
A: epicatechin, B: catechin, C: procyanidin B-1, D: procyanidin B-2.

### C. 研究結果

MTT法による細胞生存率の成績を図3に示した。今回の実験では、培養小脳顆粒細胞に glutamate (100 μM) を1時間添加すると、MTT法による細胞生存率は約55%に低下した。これに、NMDA受容体の拮抗剤であるAP5 (1 mM) 添加すると、細胞生存率は約95%となった。グルタミン酸誘導神経細胞死を、epicatechinは100 μM以上の濃度で、catechinは300 μMで、procyanidin B-1は30 μM以上の濃度で、procyanidin B-2は100 μM以上の濃度で各々有意に抑制した。Hyperinとcaffeic acidにはどの濃度においても保護作用はみられなかった。

<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>を用いたカルシウムの細胞内流入の成績を図4に示した。培養小脳顆粒細胞に glutamate (100 μM) を1時間添加することにより、<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入は約5.5倍増加した。これにAP5 (1 mM) 添加すると、<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入は約1.2倍にまで低下した。Epicatechin及びcatechinは300 μMで、procyanidin B-1及びprocyanidin B-2は100 μM以上の濃度で<sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入を、各々有意に抑制した。

### 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りを果たしている。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、それがひきかとなり、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にした。さらに我々は、釣藤鈎に含まれるオキシインドール系アルカロイドのisorhynchophylline、isocorynoxine、rhynchophylline、及びインドール系アルカロイドのhirsuteine、hirsutineが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

して抑制することを報告した。

釣藤鈎にはアルカロイド成分の他に、フェノール成分も含まれていることが知られているため、今回は釣藤鈎からフェノール成分を抽出し、それらのグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用を検討した。その結果、釣藤鈎のフェノール成分であるepicatechin、catechin、procyanidin B-1及びprocyanidin B-2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 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入を有意に阻害した。

これまでと今回の成績を総合すると、釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死抑制作用の活性には、アルカロイド成分のみならず、epicatechin、catechin、procyanidin B-1及びprocyanidin B-2のフェノール成分も関与していることが明らかとなった。

## 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、釣藤鈎のフェノール成分であるepicatechin、catechin、procyanidin B-1及びprocyanidin B-2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釣藤鈎の有効性の作用機序の一端を説明し得ると考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Goto H., Yang Q., Kita T., Hikiami H., Shimada Y. and Terasawa K.: Effects of Choto-san on microcirculation, serum nitric oxide and lipid peroxides in patients with asymptomatic cerebral infarction. *Am. J. Chin. Med.* 29: 83-89, 2001.

2) Shimada Y., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Sakakibara I., Sasaki H. and Terasawa K.: Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am. J. Chin. Med.* 29: 173-180, 2001.

3) Kasahara Y., Goto H., Shimada Y., Sekiya N., Yang Q. and Terasawa K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan (Gui-Shi-Fu-Ling-Wan) on endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J. Trad. Med.* 18: 113-117, 2001.

### 2. 学会発表

1) Shimada, Y., Goto, H., Kogure, T., Sakai, S.,

Mantani, N., Sekiya, N. and Terasawa K.: Protective effect of extract prepared from the Bark of *Cinnamomum Cassia Blume* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. The 11th International Congress of Oriental Medicine, 2001, Oct., Seoul, Korea.

2) 嶋田豊, 横山浩一, 後藤博三, 榊原厳, 酒井伸也, 萬谷直樹, 関矢信康, 寺澤捷年: 培養ラット小脳顆粒細胞におけるNO-donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

3) 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回東洋医学会総会, 2001, 6月, 札幌.

4) 笠原裕司, 後藤博三, 嶋田豊, 関矢信康, 楊喬, 寺澤捷年: 自然発症高血圧ラット摘出血管のラジカル誘発収縮に対する桂枝茯苓丸の収縮抑制効果. 第18回和漢医薬学会大会, 2001, 8月, 富山.

## 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

## 脳卒中後の認知障害に対する釣藤散の効果 - 事象関連電位による検討 -

分担研究者 小林祥泰 島根医科大学第三内科学教授

脳血管障害後の認知機能障害に対する釣藤散の効果、事象関連電位P3の変化を指標として検討した。脳卒中発症後、軽度の認知機能障害を来した7名の患者に釣藤散7.5g/日を12週間投与し、その前後で事象関連電位P3（標的刺激に対するtarget P3および新奇刺激に対するnovelty P3）を高解像度脳波記録装置により記録した。同時にMini Mental State Examination（MMSE）、語想起検査を評価した。釣藤散投与によりMMSEは有意に増加し、語想起数も増加傾向を示した。Target P3はその潜時が薬剤投与後有意に短縮し、振幅も増加傾向を示した。標的識別の正解率も有意に上昇した。一方novelty P3の潜時は変化しなかったが、振幅が有意に増加し、その頭皮上分布がより前方に移動した。以上のことから、釣藤散は心理行動指標に加え電気生理学な指標においても脳血管障害後の認知機能障害を改善させることが明らかとなった。

### A. 研究目的

脳血管性痴呆の治療は、我が国における高齢化社会にとって重要な課題である。漢方薬の中でもイチョウ葉のように記憶機能の改善作用が報告されている薬剤もあるが、釣藤散は脳血管性痴呆に対する薬物治療で有効性が確認された唯一の漢方薬である。しかしそれが脳の神経活動をどのように改善するのかがまだ不明な点が多い。

事象関連電位P300（以下P3）は注意、記憶、判断などの認知機能を反映する電気生理学的指標とされ臨床的にも用いられている。痴呆や加齢に伴いその振幅が低下したり、潜時が延長することが報告されている。P3には少なくとも二つの種類が知られており、随意的な標的刺激的識別により出現するtarget P3と課題に依存せず新奇な刺激に対して出現するnovelty P3がある。それぞれ異なった認知機能を反映しており、痴呆性疾患でもその種類により障害のパターンが異なっている。今回、釣藤散投与前後の二つのP3の変化をみることで、本薬剤の脳機能に及ぼす影響について検討した。

### B. 研究方法

島根医科大学第三内科の外来患者の中で、少なくとも一回以上脳卒中発作の既往があり、その後より何らかの認知機能障害を来した7例を対象とした。全例に研究目的を説明し、文書によるインフォームドコンセントを得た。患者の年齢は

52-85歳（平均69歳）である。脳卒中発症後6ヶ月から3年経過しており症状は安定している。脳の器質的病変はMRIでその存在を全例において確認した。

薬剤投与は釣藤散7.5g/日（食間）を12週間行った。その投与前後で以下の検査を行った。神経心理検査はMini Mental State Examination（MMSE）と語想起検査を行い、情動機能はZungの抑うつ度尺度（SDS）で評価した。事象関連電位は、聴覚刺激による新奇刺激を混えたオッドボール課題を用いた。具体的には1,000Hzのtone burstを標準刺激（65%）、2,000Hzのtone burstを標的的刺激（20%）、様々な環境音を新奇刺激（15%）とし、ランダムな順序で両耳同時提示を行った。刺激の提示時間は100msecで、刺激間隔は1~1.3秒とした。被験者は標的刺激に対して右手でボタン押しを行った。脳波記録には128チャンネルの高解像度脳波記録装置を用いた。0.1~50Hzのフィルターを用い、250Hz/秒でサンプリングを行った。アーチファクトを含む施行を除外して、刺激に同期した平均加算を行った。

統計解析では、target P3とnovelty P3をそれぞれ個々に検討した。いずれも300~600msecの潜時中の最大の陽性電位と定義し、その最大振幅と潜時を計測した。またそれぞれの電位の頭皮上分布をspline法により求めた。薬剤投与前後のP3計測値および行動指標の比較には分散分析を用いた。有意水準は危険率5%未満とした。