

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 嶋田 豊

平成15（2003）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
鳴田 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 …… 9
鳴田 豊
2. NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用 …… 17
鳴田 豊
3. 脳血管障害患者の高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究 …… 22
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 …… 24
三瀧忠道
5. 自然発症高血圧ラット摘出胸部大動脈のフリーラジカル誘発収縮反応に対する …… 27
桂皮エキスおよびケイヒアルデヒドの血管収縮抑制効果
後藤博三
6. 脳卒中易発症自然発症高血圧ラットの血液レオロジー因子及び
血管機能に対する釣藤散の効果 …… 31
長坂和彦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 34

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 36

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

多施設において1年以上桂枝茯苓丸を主とする和漢薬治療を行った無症候性脳梗塞患者190例を対象に、精神症状（知的機能、やる気、うつ状態）、自覚症状等に与える和漢薬の効果を検討したところ、精神症状では特にうつ状態（Self-Rating Depression Scale：SDS）が主に桂枝茯苓丸による和漢薬治療を3年間継続していた群で健常高齢者群の経過に比べて有意に改善した。無症候性脳梗塞患者において桂枝茯苓丸を主体とした和漢薬治療が有用である可能性が示唆された。さらに、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検討によって、桂枝茯苓丸の血栓形成改善作用、桂皮の血管収縮抑制作用、釣藤散の血液レオロジー改善作用、血管内皮機能保護作用、釣藤散の認知機能障害改善作用、釣藤鈎のNO donor誘導神経細胞死に対する保護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ており、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年間の研究期間の最終年度にあたるが、我々は昨年度までの研究によって、無症候性脳梗塞患者における桂枝茯苓丸の有効性、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、桂皮のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用、無症候性脳梗塞患者における釣藤散の過酸化脂質及びコレステロール低下作用、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、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した。

本年度も引き続き研究を行ったが、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
- 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 -

(嶋田、小林、三瀧、後藤、長坂)

無症候性脳梗塞患者の精神症状（認知機能、やる気、うつ状態）、自覚症状、血圧等に及ぼす桂枝茯苓丸を主とする和漢薬長期治療の効果を検討した。精神症状に関しては、地域脳検診で経過観察している健常高齢者と比較した。

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用 (嶋田)

中枢神経系において過剰なnitric oxide (NO) の産生は神経障害の原因となることが知られている。また、我々は、培養神経細胞を用いた実験で、グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用を報告した。今回の研究では、NO供給体 (NO donor) を用いて、NOラジカルによって誘導される神経細胞死に対する釣藤鈎及びそのフェノール画分、アルカロイド画分の保護作用をin vitroの実験で検討した。

b. 脳血管障害患者の高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究 (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、事象関連電位P3の変化を指標として検討した。

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)

Sonoclot Analyzer (Sienco社) は、短時間にかつベットサイドで血液凝固、血小板機能、線溶系を包括的にかつ測定する血液凝固機能検査機器である。このSonoclot Analyzerを用いて駆瘀血剤の効果を客観的かつ迅速に行うことが可能となる。そこで今回は、桂枝茯苓丸の血液凝固線溶系に対する長期投与の影響についてSonoclot Analyzerで検討した。

d. 自然発症高血圧ラット摘出胸部大動脈のフリーラジカル誘発収縮反応に対する桂皮エキスおよびケイヒアルデヒドの血管収縮抑制効果 (後藤)

後藤らは、自然発症高血圧ラット (SHR) における血管内皮障害に対する桂枝茯苓丸の内皮保護作用、及びxanthine/xanthine oxidase (X/XO) による血管収縮反応に対する桂枝茯苓丸の抑制作用を報告した。X/XO誘発血管収縮反応は、動脈硬化形成時の障害血管モデルと考えられ、血管内皮でのフリーラジカル産生増加と、それに伴う収縮因子の一つであるthromboxane A2 (TXA2) が関与

していることが、報告されている。そこで今回は、桂枝茯苓丸の5つの構成生薬のうち特に強い作用がみられた桂皮について、摘出血管におけるX/XO誘発収縮に及ぼす影響と、収縮時のTXA2産生に対する影響について検討した。

e. 脳卒中易発症自然発症高血圧ラットの血液レオロジー因子及び血管機能に対する釣藤散の効果 (長坂)

釣藤散は、二重盲検試験によって脳血管性痴呆に対する釣藤散の有用性が報告されている。また、無症候性脳梗塞症例を対象とした研究で、釣藤散の眼球結膜微小循環及び血液レオロジー因子改善作用を報告されている。今回は、脳卒中易発症自然発症高血圧ラット (SHR-SP) を用いて、釣藤散の血液レオロジー因子、血管内皮機能に及ぼす効果を検討した。

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。

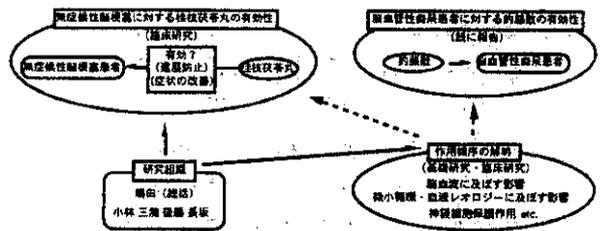


図1 研究の目的と分担

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 - 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 - (嶋田、小林、三瀧、後藤、長坂)

多施設において1年以上桂枝茯苓丸を主とする和漢薬治療を行った無症候性脳梗塞患者190例を対象に、精神症状、自覚症状等に与える和漢薬の効果を検討した。精神症状の評価には、改定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) を用いた。和漢薬治療群は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、3年経過患者については、地域脳検診で経過を観察している健常高齢者群とHDS-R、

Apathy Scale、SDSを比較検討した。また、KB-A群とKB-B群においてはHDS-R、Apathy scale、SDSに加え、自覚症状、血圧を1年毎に比較検討した。

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用（嶋田）

培養小脳顆粒細胞にNO donorであるSNPまたはSIN-1を一定時間添加し、それと同時に釣藤鈎エキス、釣藤鈎の画分（水溶出部、フェノール画分、アルカロイド画分）を添加し、MTT法によってそれらのNO donor誘導神経細胞死に対する保護作用を検討した。

b. 脳血管障害患者の高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究（小林）

脳卒中発症後、認知機能障害を来した10例を対象に釣藤散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、Zungの抑うつ尺度（SDS）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ない瘀血病態患者6例を対象とした。桂枝茯苓丸を12週間投与し、前、4週後、8週後、12週後にSonoclot Analyzerを用いてActivated clotting time（ACT）、Clot Rate（CR）、Time to Peak（TP）、Peak Angle（PA）、Signal on Peak（SP）を測定した。また、プロトロンビン時間、フィブリノーゲン値、プラスミノーゲン値についても測定した。

d. 自然発症高血圧ラット摘出胸部大動脈のフリーラジカル誘発収縮反応に対する桂皮エキスおよびケイヒアルデヒドの血管収縮抑制効果（後藤）

SHRラットの胸部大動脈を使用しマグヌス法により、桂皮エキス及びケイヒアルデヒドのX/XO誘発血管収縮、phospholipase A2（PLA2）誘発血管収縮、thromboxane B2（TXB2）産生（TXA2は不安定で急速に加水分解しTXB2になるため）に対する作用を検討した。

e. 脳卒中易発症自然発症高血圧ラットの血液レオロジー因子及び血管機能に対する釣藤散の効果（長坂）

SHR-SPラットを蒸留水を与えたコントロール群と0.3%釣藤散エキスを溶解した水（450 mg/kg/day）を与えた釣藤散群の2群に分けた。血液は、投与前と投与8週後の屠殺時に採取し、血中NO₂⁻/NO₃⁻、血液粘度、赤血球変形能を測定した。体重と血圧（tail-cuff法）は2週毎に測定した。血管弛緩反応はマグヌス法を用いて測定した。

（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、新谷、長坂）

1年以上和漢薬治療を継続している190例が対象となった。和漢薬治療3年経過群（KB-A群、KB-B群）と地域脳検診3年経過健常高齢者群の比較では、SDSにおいて、KB-A群は開始時39.2±1.5点、3年後36.4±1.3点、KB-B群は開始時37.0±1.7点、3年後37.8±1.8点、健常高齢者群は開始時32.5±1.1点、3年後35.7±1.2点であり、3年経過後、KB-A群は開始時に比べ有意に改善し（ $p<0.05$ ）、3群間の比較でもKB-A群は健常高齢者群に対して有意な改善を認めた（ $p<0.01$ （図2））。KB-A群とKB-B群の年毎の経過では、1年後のKB-B群のHDS-R、2年後のKB-A群のApathy Scale、2年後と3年後のKB-A群のSDSが開始時に比べて有意に改善した。自覚症状の各項目では、頭重感と頭痛で開始時に比べてKB-A、B群ともに改善傾向がみられた。血圧に関しては、1年後の収縮期血圧がKB-A群がKB-B群に比べて有意に低かった。

2. 脳血管障害に対する漢方薬の有効性の作用機序

a. NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用（嶋田）

MTT法による細胞生存率では、SNP（30 μM）またはSIN-1（300 μM）添加によって、6時間以

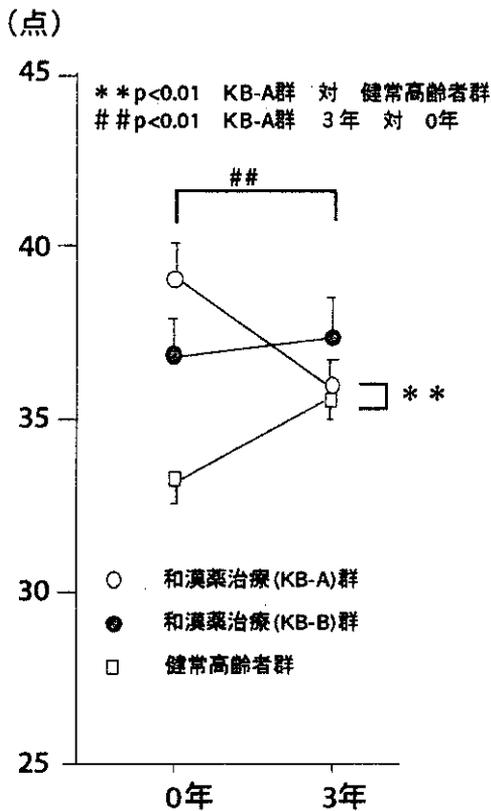


図2 和漢薬治療群 (KB-A群、KB-B群) と健常高齢者群とのSelf-rating Depression Scale (うつ状態スコア) の3年後の比較

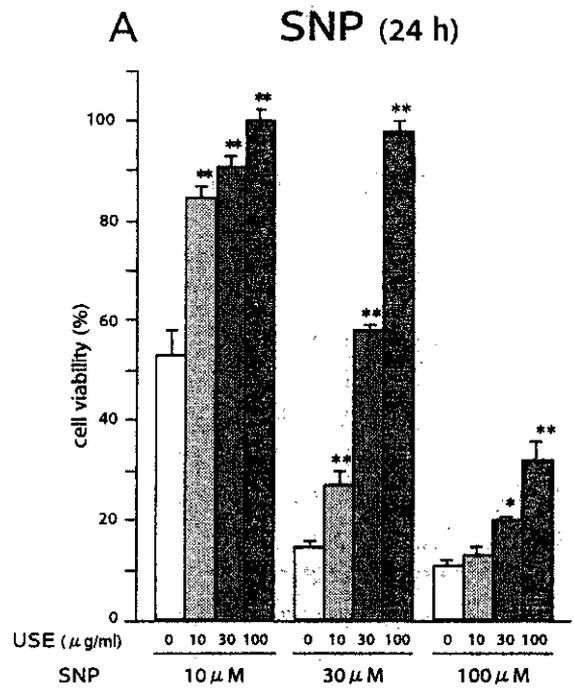
降細胞生存率は低下した。このNO donor誘導神経細胞死を釣藤鈎エキスは容量依存的に抑制した (図3)。さらに、釣藤鈎の画分の検討では、フェノール画分とアルカロイド画分にNO donor誘導神経細胞死に対する抑制作用がみられた。

b. 脳血管障害患者の高次機能に対する漢方薬の効果に関する研究 (小林)

MMSEスコアと語想起数はともに、投与前に比べて有意に増加をした。SDSスコアは変化がなかった。事象関連電位記録中の標的刺激に対する正答率は薬剤投与後有意に増加し、反応時間は短縮傾向を示した。Target P3は薬剤投与により振幅が増加傾向を示し、その潜時は有意に短縮した。Novelty P3は、その潜時に有意の変化はなかったが、振幅が有意に増加した。それぞれの頭皮上分布を見た所、target P3は頭頂後頭部に最大電位を有し薬剤投与によりその分布に変化はなかったが、novelty P3は前頭頭頂部に最大電位を有し薬剤投与により電位分布が前方に移動した。

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)

ACTは、投与前に比べて投与4週後に有意 ($p < 0.05$) に延長した。投与8週後、投与後12週



B SIN-1 (24 h)

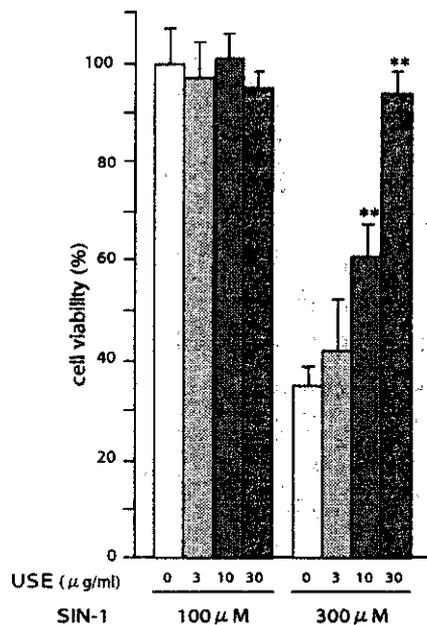


図3 SNP及びSIN-1誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスの保護作用の経時的変化
細胞生存率はMTT法によって評価した。
mean ± SD, n=4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
compared with control at each point.

後も有意な延長は持続した (図4)。その他のACT、CR、TP、PA、SPについては有意な変化はなかった。プラスミノゲン値は、投与前に比べて投与4週後に有意な上昇を示し、8週後、12週後も有意な上昇は持続した。プロトロンビン時間、フィブリノーゲン値には有意な変化はなかった。

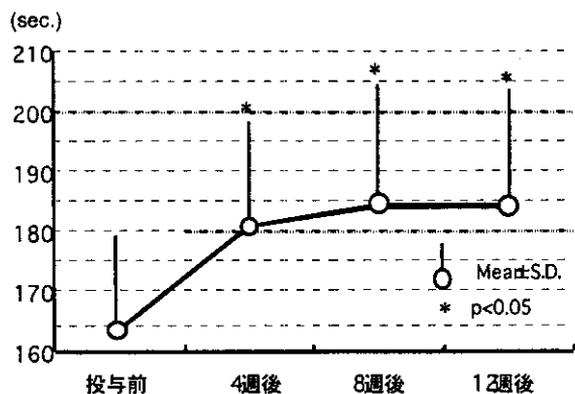


図4 Activated clotting time (ACT) の経時的変化

d. 自然発症高血圧ラット摘出胸部大動脈のフリーラジカル誘発収縮反応に対する桂皮エキスおよびケイヒアルデヒドの血管収縮抑制効果 (後藤)

SHRの摘出大動脈におけるX/XOによる血管収縮反応は、桂皮エキス及びケイヒアルデヒドによって濃度依存性に有意に抑制された (図5)。また、X/XOによる血管収縮反応30分後のマグヌス槽内リンガー液中のTXB2濃度は、桂皮エキス及びケイヒアルデヒドによって有意に増加が抑制された。同じく、PLA2による血管収縮反応はケイヒアルデヒドで有意に抑制され、マグヌス槽内リンガー液のTXB2濃度も有意に増加が抑制された。

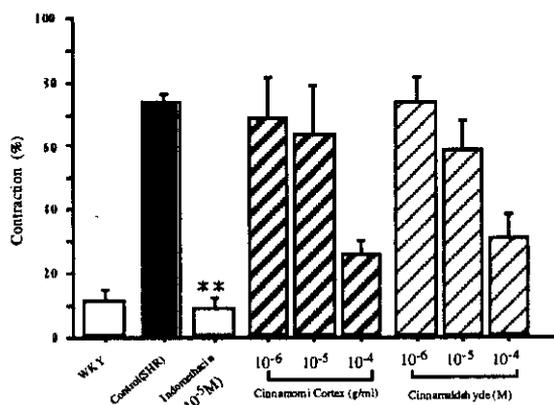


図5 SHRのX/XO誘発血管収縮反応に対する桂皮エキス (CCE)、ケイヒアルデヒド (CA) の抑制効果

内皮保存血管にI-NAMEを添加し、60mM KClによる最大収縮に対する収縮率で表示。xanthine : 10^{-4} M ; xanthine oxidase : 10 mU/ml. mean \pm SE, n=6~10.

*p<0.05, **p<0.01 compared with SHR control.

e. 脳卒中易発症自然発症高血圧ラットの血

液レオロジー因子及び血管機能に対する釣藤散の効果 (長坂)

8週後の収縮期血圧と平均血圧に関しては、釣藤散群はコントロール群に比べて有意に低かった。また、8週後の血清NO₂/NO₃は釣藤散群の方が高い傾向がみられ、血清過酸化脂質に関しては釣藤散群の方がコントロール群に比べて有意に低かった。コントロール群と釣藤散群の間に、全血粘度及び血漿粘度ともに差はなかったが、赤血球変形能は釣藤散群がコントロール群に比べて有意に改善した。Achによる内皮依存性血管弛緩反応は、釣藤散群がコントロール群に比べて有意に大きかった (図6)。SNPによる内皮非依存性血管弛緩反応は、両群間に差はなかった。8週までに、コントロール群のうち2匹が麻痺を生じ、それらの脳には脳出血の所見が見られた。釣藤散群は1匹も麻痺や脳出血の所見は見られなかった。

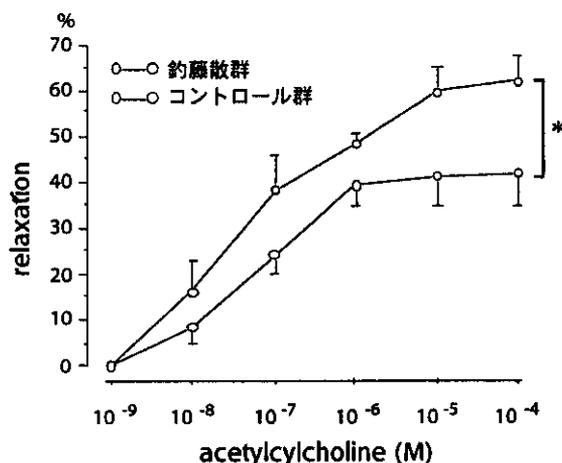


図6 Achによる内皮依存性血管弛緩反応 mean \pm SE, n=8, *p<0.05, compared with control.

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。

研究期間の初年度にあたる平成12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候などが報告されている。平成12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。

昨年度（平成13年度）は、無症候性脳梗塞患者に対する桂枝茯苓丸を主とした和漢薬を長期間投与の精神症状、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、無症候性脳梗塞に随伴する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。

本年後（平成14年度）は、桂枝茯苓丸を主とした和漢薬治療をさらに継続して症例を集積し、多施設において1年以上桂枝茯苓丸を主とする和漢薬治療を行った無症候性脳梗塞患者190例を対象に、精神症状（知的機能、やる気、うつ状態）、自覚症状、血圧等に与える和漢薬の効果を検討した。精神症状に関しては、地域脳検診で経過観察している健常高齢者と比較した。その結果、和漢薬治療により精神症状が改善し、中でもうつ状態（SDS）は主に桂枝茯苓丸による和漢薬治療を3年間継続していた群で健常高齢者群の経過に比べて有意に改善した。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、桂枝茯苓丸の微小循環改善作用も明らかとなっていることから、桂枝茯苓丸を主とする和漢薬治療の脳血流改善作用がうつ状態の改善に寄与した可能性が考えられる。また桂枝茯苓丸を主とした和漢薬治療の年毎の経過では、知的機能（HDS-R）及びやる気（Apathy Scale）でも開始時に比べて改善がみられる評価時点があった。自覚症状の各項目でも頭重感と頭痛で開始時に比べて改善傾向がみられた。また、桂枝茯苓丸が高血圧を改善する可能性を示す成績が得られた。以上より、無症候性脳梗塞患者において桂枝茯苓丸を主体とした和漢薬治療が有用である可能性が示唆された。

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、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、脳血管障害後の脳高次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、昨年度よりさらに症例数を追加して検討した。その結果、MMSEスコアと語想起数とともに有意に増加した。また、target P3の潜時は薬剤投与後有意に短縮し、反応時間も短縮した。一方、novelty P3の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、釣藤散は脳血管障害後の認知機能障害を改善させることが示された。

三瀧は、漢方医学的病態である瘀血病態が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おり、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が知られていることより、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長期の影響についてソノクロットを用いて検討した。その結果、桂枝茯苓丸は凝固因子の活性を抑え、かつ線溶系を活性化することが示唆された。即ち、桂枝茯苓丸は、長期間血栓形成傾向を改善させる効果があることが明らかとなった。

後藤は、本年度の分担研究において、SHRの摘出輪状大動脈における、桂皮エキス及びケイヒアルデヒドのX/XO誘発収縮に及ぼす影響と、収縮時のTXA₂産生に対する影響について検討した。動脈硬化などによる障害血管において、フリーラジカルの産生が亢進し、TXA₂産生が増加し、血管収縮を生じることが報告されている。今回の研究により、桂皮エキス及びケイヒアルデヒドはX/XOによる血管収縮反応を抑制することが明らかとなった。同時に、これらはTXB₂増加も抑制していた。さらに、ケイヒアルデヒドによりPLA₂誘発血管収縮反応も抑制されたことから、ケイヒアルデヒドがPLA₂のアラキドン酸遊離作用を阻害することによりTXA₂産生を抑制している可能性が示唆された。TXA₂は強力な血管収縮物質であり、高血圧と密接に関連していることから、桂皮及びその成分であるケイヒアルデヒドはTXA₂の産生を抑制してSHRにおける降圧作用発現や血管内皮機能保護作用に関与している可能性が示唆された。

長坂は、脳卒中易発症自然発症高血圧ラット

(SHR-SP) を用いて、釣藤散の血液レオロジー因子、血管内皮機能に及ぼす効果を検討した。SHR-SPは、高血圧と脳卒中のモデル動物として知られており、脳卒中を生ずる原因の一つとしては、高血圧と脳循環障害による血管壊死による血管内皮細胞の機能障害が考えられている。今回の研究では、釣藤散の血圧上昇抑制作用、赤血球変形能改善作用が明らかとなった。また、釣藤散の血管内皮機能とNO産生に及ぼす影響も検討したところ、釣藤散投与によって、血清NO₂/NO₃は増加傾向を認め、血清過酸化脂質は有意に低下した。加えて、SHR-SPの摘出胸部大動脈の内皮依存性血管弛緩反応に対する釣藤散経口投与の効果を検討したところ、釣藤散の内皮依存性血管弛緩反応に対する保護作用が明らかとなった。以上の成績は、SHR-SPに対して釣藤散の長期投与が脳卒中発症に対して予防効果がある可能性を示しているが、ヒトにおいても高血圧と加齢が多発性脳梗塞の危険因子であることが示されていることより、釣藤散が脳血管障害の予防に対して有用な薬剤である可能性が考えられる。

嶋田は、本年度の分担研究において、培養ラット小脳顆粒細胞を用いて、NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤散エキス及びそのフェノール画分、アルカロイド画分の保護作用を検討した。脳虚血の際には神経細胞のシナプス前部より多量のグルタミン酸が放出され、これが神経細胞のシナプス後部のNMDA受容体等のグルタミン酸受容体を過剰に刺激し、電位依存性チャンネル、さらにはグルタミン酸受容体のカルシウムチャンネルを通して多量のカルシウムイオンが細胞内流入し、nNOSが活性化され多量のNO[•]が発生する。また、脳の虚血再灌流の後期においては、ある種のサイトカインの活性化を含む様々な刺激により、グリア細胞内のiNOSの発現を強力に誘導し、これが多量のNO[•]の発生へとつながる。これらの過程で発生したNO[•]は神経細胞を傷害し死に導くことが知られている。以前、嶋田らは釣藤散エキス及びそのフェノール成分とアルカロイド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ているが、今回の研究により、グルタミン酸誘導神経細胞死のみならず、NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤散の保護作用が明らかとなった。

以上のように、本年度を含めた過去3年間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多くの根拠を臨床的及び基礎的に明らかにし得たと考える。

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精神症状、特にうつ状態に対する有効性が示された。また、瘀血病態患者における桂枝茯苓丸の血栓形成改善作用が示された。さらに、基礎的研究によって、桂皮の血管収縮抑制作用、釣藤散の血液レオロジー改善作用、血管内皮機能保護作用、釣藤散のNO donor誘導神経細胞死に対する保護作用等が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimada Y., Yokoyama K., Goto H., Sakakibara I., Sekiya N., Mantani N., Sakai S. and Terasawa K.: Protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* 19: 15-20, 2002.

2) Goto H., Shimada Y., Mitsuma T., Shintani T., Nagasaka K., Goto S., Shibahara N. and Terasawa K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan on asymptomatic cerebral infarction for short term. *J. Trad. Med.* 19: 46-50, 2002.

3) Sekiya N., Goto H., Shimada Y. and Terasawa K.: Inhibitory effects of Keishi-bukuryo-gan on free radical induced lysis of rat red blood cells. *Phytother. Res.* 16: 373-376, 2002.

4) Sekiya N., Goto H., Tazawa K., Oida S., Shimada Y. and Terasawa K.: Keishi-bukuryo-gan prevents the endothelium dependent relaxation of thoracic aorta in cholesterol-fed rabbit by limiting superoxide generation. *Phytother. Res.* 16: 524-528, 2002.

5) Kasahara Y., Goto H., Shimada Y., Sekiya N., Yang Q. and Terasawa K.: Inhibitory effects of Cinnamomi cortex and cinnamaldehyde on oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction in isolated aorta of spontaneously hypertensive rats. *J. Trad. Med.* 19: 51-57, 2002.

6) Yang Q., Goto H., Shimada Y., Kita T., Shibahara N. and Terasawa K.: Effects of Choto-san on hemorheological factors and vascular function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine* 9: 93-98, 2002.

2. 学会発表

1) 横山浩一, 嶋田豊, 堀悦郎, 関矢信康, 後藤博三, 西条寿夫, 寺澤捷年: 釣藤鈎の一過性脳虚血モデルにおける神経細胞保護作用の検討. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

2) 後藤博三, 嶋田豊, 関矢信康, 笠原裕司, 楊喬, 柴原直利, 喜多敏明, 寺澤捷年: 糖尿モデル(KBN/Kob)ラットにおける桂枝茯苓丸の血管保護作用. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

3) 嶋田豊, 横山浩一, 後藤博三, 関矢信康, 引網宏彰, 酒井伸也, 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桂枝茯苓丸及びその構成生薬の保護作用. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

4) 後藤博三, 柴原直利, 喜多敏明, 嶋田豊, 寺澤捷年, 小林祥泰, 松井龍吉, 三瀦忠道, 新谷卓弘, 長坂和彦: 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. 第53回日本東洋医学会学術総会, 2002, 5月, 名古屋.

5) 後藤博三, 柴原直利, 喜多敏明, 嶋田豊, 関矢信康, 寺澤捷年: 生薬・釣藤鈎の血管弛緩作用機序と自然発症高血圧ラット(SHR)に対する効果に関する検討. 第23回グアニジノ化合物研究会, 2002, 9月, 富山.

6) 山口修平, 松原美和, 小林祥泰: 脳血管障害後の認知機能障害に対する釣藤散の効果. 第28回日本脳卒中学会総会, 2003, 3月, 東京.

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講座

多施設において1年以上桂枝茯苓丸を主とする和漢薬治療を行った無症候性脳梗塞患者190例を対象に、精神症状（知的機能、やる気、うつ状態）、自覚症状等に与える和漢薬の効果を検討した。精神症状に関しては、地域脳検診で経過観察している健常高齢者と比較した。その結果、和漢薬治療により精神症状が改善し、中でもうつ状態（Self-Rating Depression Scale：SDS）は主に桂枝茯苓丸による和漢薬治療を3年間継続していた群で健常高齢者群の経過に比べて有意に改善した。また、桂枝茯苓丸が高血圧を改善する可能性を示す成績が得られた。以上より、無症候性脳梗塞患者において桂枝茯苓丸を主体とした和漢薬治療が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の改善作用、血小板凝集抑制作用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。このことから、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施行し、無症候性脳梗塞患者に随伴する認知機能の低下、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2001年5月の4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。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行い承諾を得た。

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3年間にわたって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項目を評価した。自覚症状は、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10項目について1年毎に、正常、極軽度、軽度、中等度、重度の5段階で評価した。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、収縮期血圧と拡張期血圧を測定した。

これらの対象患者について桂枝茯苓丸の無症候性脳梗塞への効果を検討するため、本研究の平成

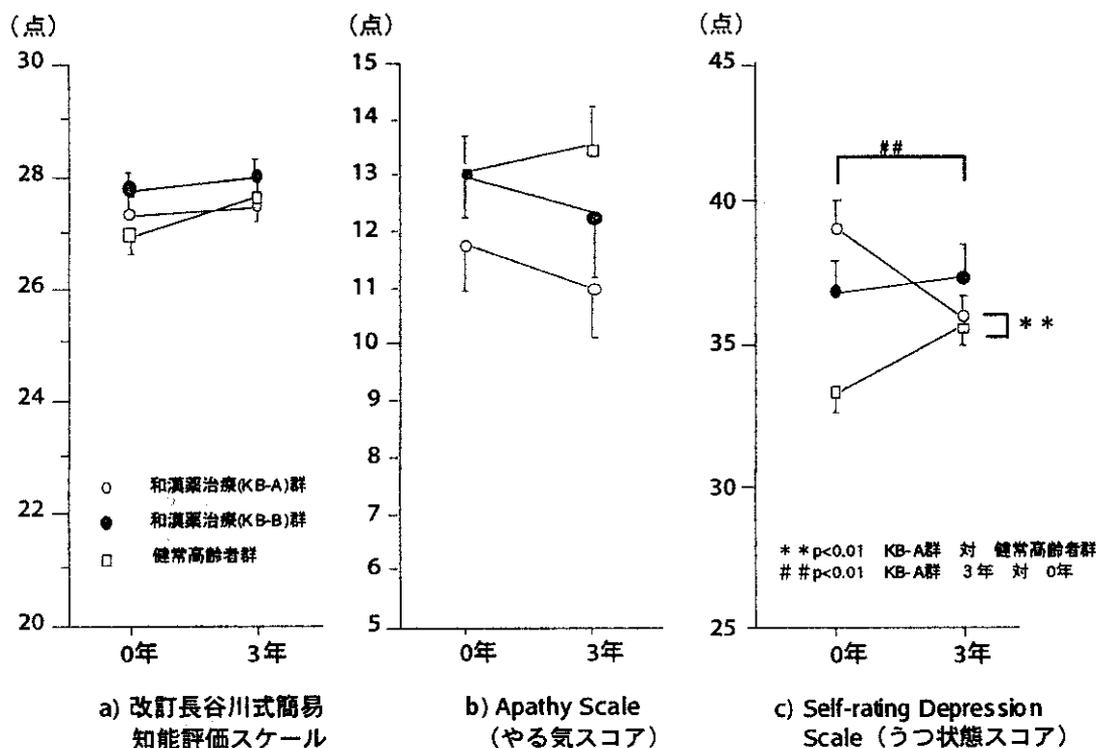


図1 和漢薬治療群 (KB-A群、KB-B群) と健常高齢者群との各スコアの比較

12年度に施行した「無症候性脳梗塞に対する桂枝茯苓丸の短期効果の検討」の結果を考慮し、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、1) 3年経過患者について、島根医科大学第三内科で実施している地域脳検診で経過を観察している脳卒中中等の疾患がない健常高齢者群とHDS-R、Apathy Scale、SDSを比較検討した。2) KB-A群とKB-B群においてはHDS-R、Apathy scale、SDSに加え、自覚症状、血圧を1年毎に比較検討した。

統計処理：結果は平均±標準偏差 (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。危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

(倫理面の配慮) 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を生ずる可能性は少ない。仮に投与中に副作用を生じた際には、直ちに投与を中止し適切な処置を行う。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

対象患者は、1年以上和漢薬治療を継続している190例 (男性54例、女性136例、平均67.3±0.6歳) であった。合併症は、高血圧症62例、糖尿病11例、高脂血症35例、虚血性心疾患4例であった。

1) 和漢薬治療3年経過群 (KB-A群、KB-B群) と地域脳検診3年経過健常高齢者群の比較

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ヶ月以上内服したKB-A群3年経過患者は、48例 (男性9例、女性39例、平均年齢68.3±0.9歳) であった。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ヶ月未満内服のKB-B群3年経過患者は、26例 (男性9例、女性17例、平均年齢67.6±1.4歳) であった。地域脳検診における健常高齢者は43例 (男性21例、女性22例、平均年齢70.7±0.7歳) であり、3群間の年齢に差をみられなかった。なお、健常高齢者群内でMRI上無症候性脳梗塞患者12例を認めたが、HDS-R、Apathy scale、SDSにおいて無症候性脳梗塞を有さない健常高齢者とスコアの差を認めなかった。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 a) : 20点以下を痴呆の疑いありとする改訂長谷川式簡易知能評価スケールにおいて、KB-A群は開始時27.1±0.4点、3年後27.2±0.3点であった。KB-B

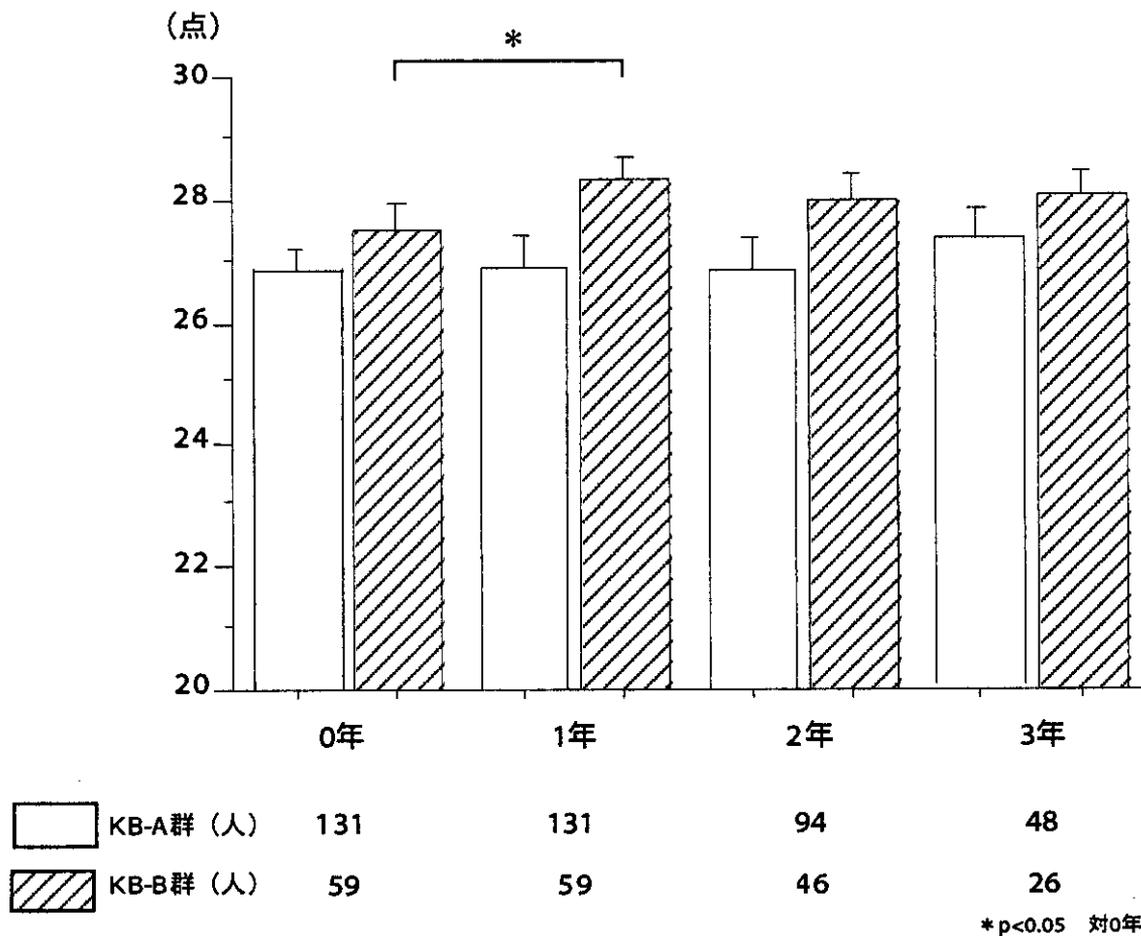


図2 改訂長谷川式簡易知能評価スケールのKB-A群とKB-B群の比較

群は開始時27.8±0.5点、3年後28.0±0.5点であった。健常高齢者群は開始時26.9±0.5点、3年後27.5±0.4点で、3群間に有意差を認めなかった。

Apathy Scale (図1 b) : 16点以上を無気力と判定するApathy Scaleにおいて、KB-A群は開始時11.7±1.0点、3年後10.9±1.0点であった。KB-B群は開始時13.0±1.6点、3年後12.3±1.5点であった。健常高齢者群は開始時13.0±0.8点、3年後13.4±0.9点で、3群間に有意差を認めなかった。

Self-Rating Depression Scale (図1 c) : 40点以上をうつ状態と判定するSelf-Rating Depression Scale (SDS) において、KB-A群は開始時39.2±1.5点、3年後36.4±1.3点であった。KB-B群は開始時37.0±1.7点、3年後37.8±1.8点であった。健常高齢者群は開始時32.5±1.1点、3年後35.7±1.2点であった。開始時においてKB-A群は健常高齢者群に比べ有意に高値を示した (p<0.01)。3年経過後、KB-A群は開始時に比べ有意に改善し (p<0.05)、3群間の比較でもKB-A群は健常高齢者群に対して有意な改善を認めた (p<0.01)。

2) KB-A群とKB-B群の比較

KB-A群は131症例 (男性37例、女性94例、平均年齢67.6±0.7歳、1年経過131例、2年経過94例、3年経過48例) で桂枝茯苓丸エキス製剤を平均11.1±0.2ヶ月/年内服用していた。KB-B群は59例 (男性17例、女性42例、平均年齢68.2±0.9歳、1年経過59例、2年経過46例、3年経過26例) で桂枝茯苓丸エキス製剤を平均2.7±0.2ヶ月/年のみ内服し、主に他の漢方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26.8±0.4点、1年後26.9±0.4点、2年後26.8±0.4点、3年後27.2±0.4点 (p<0.1 vs. 開始時) であった。KB-B群は、開始時27.5±0.4点、1年後28.2±0.3点 (p<0.05 vs. 開始時)、2年後28.0±0.4点、3年後28.0±0.5点であり、1年後で開始時に比べて有意に改善した。また、両群間に差は認めなかった。

Apathy Scale (図3) : KB-A群は、開始時12.5±0.6点、1年後11.8±0.6点 (p<0.1 vs. 開始時)、2年後11.2±0.7点 (p<0.05 vs. 開始時)、3年後10.9±1.0点であり、2年後で開始時に比べて有意に改善した。KB-B群は、開始時13.0±0.9点、1

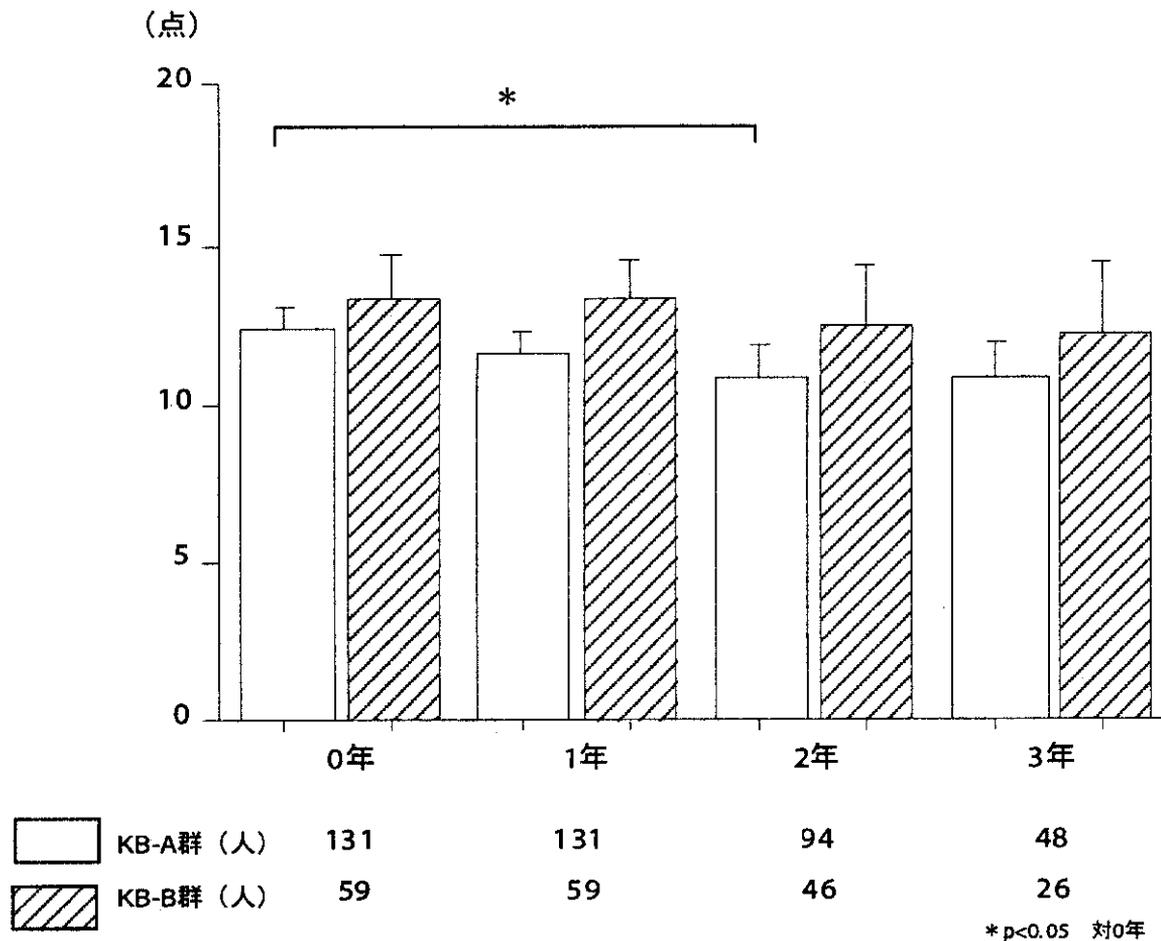


図3 Apathy Scale (やる気スコア) のKB-A群とKB-B群の比較

年後13.0±0.9点、2年後12.3±1.3点、3年後12.3±1.5点で開始時に比べて変化はなかった。また、両群間に差を認めなかった。

Self-Rating Depression Scale (図4) : KB-A群が、開始時39.3±0.8点、1年後38.1±0.8点 (p<0.1 vs. 開始時)、2年後38.0±1.0点 (p<0.1 vs. 開始時)、3年後36.4±1.3点 (p<0.05 vs. 開始時) で3年後で開始時に比べて有意に改善した。KB-B群は、開始時37.4±1.3点、1年後37.5±1.3点、2年後38.0±1.6点、3年後37.8±1.8点であった。また、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年後においてはKB-A群は、中等度改善1例(1%)、軽度改善14例(11%)、不変108例(82%)、悪化8例(6%)で、KB-B群は、軽度改善7例(12%)、不変51例(86%)、悪化1例(2%)であった。2年後においてはKB-A群は、軽度改善13例(14%)、不変72例(77%)、悪化9例(9%)で、KB-B群は、軽度改善7例(15%)、不変35例(76%)、悪化4例(9%)であった。3年後ではKB-A群は、軽度改善10例(21%)、不変33例

(69%)、悪化5例(10%)で、KB-B群は、軽度改善4例(15%)、不変17例(65%)、悪化5例(19%)でいずれも両群間に差を認めなかった。

各項目別では、KB-A群での有症状症例数は、頭重感70例(53%)、頭痛71例(54%)、めまい感49例(37%)、肩こり100例(76%)、のぼせ感55例(42%)、耳鳴り60例(46%)、四肢のしびれ64例(49%)、四肢の冷え83例(63%)、全身倦怠感87例(66%)、食欲不振22例(17%)であった。KB-B群における有症状症例数は、頭重感34例(58%)、頭痛34例(58%)、めまい感29例(49%)、肩こり50例(85%)、のぼせ感33例(56%)、耳鳴り32例(54%)、四肢のしびれ34例(58%)、四肢の冷え40例(68%)、全身倦怠感46例(78%)、食欲不振8例(14%)であった。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26例(有症状者の37%)、頭痛28例(39%)、めまい感22例(45%)、肩こり23例(23%)、のぼせ感21例(38%)、耳鳴り12例(20%)、四肢のしびれ23例(36%)、四肢の冷え29例(35%)、全身倦怠感23例(26%)、

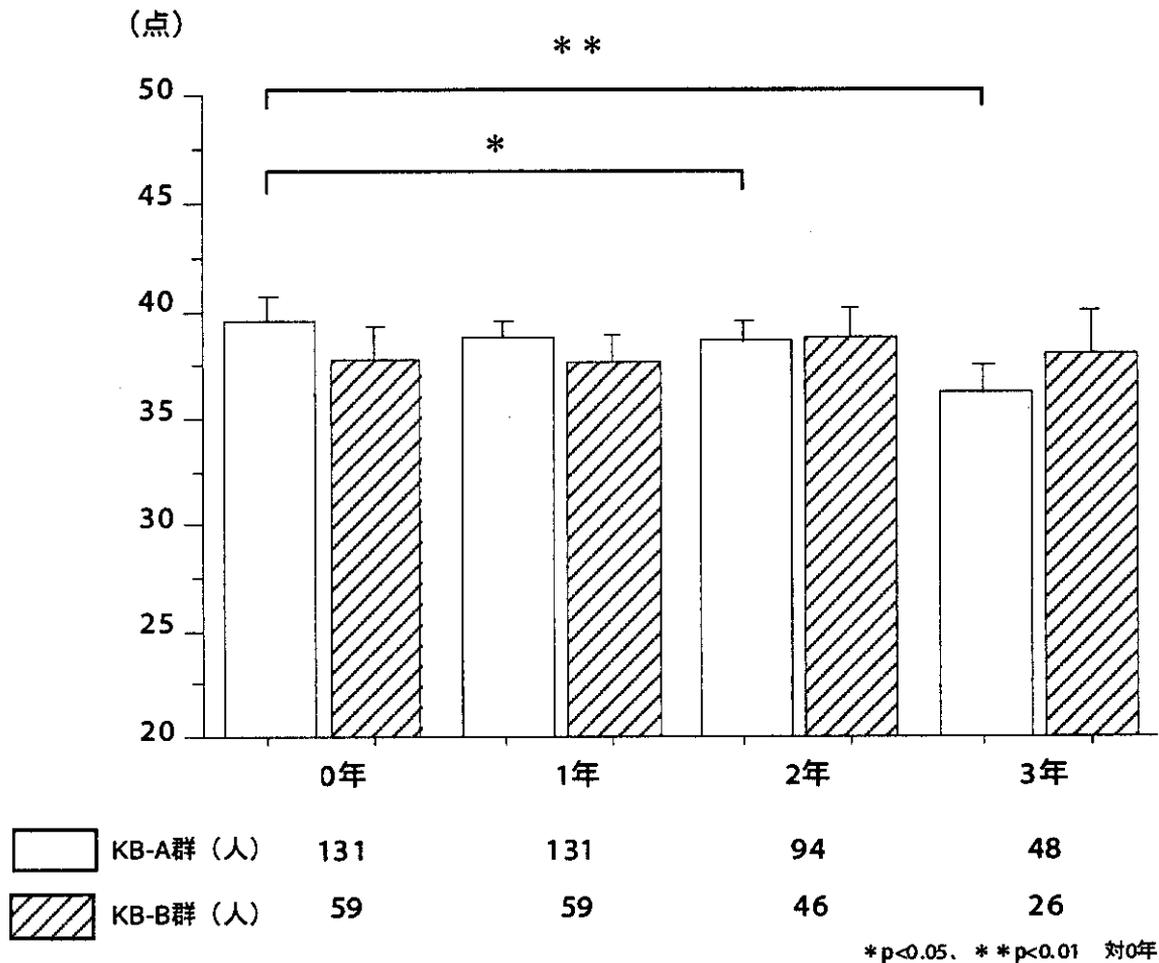


図4 Self-rating Depression Scale (うつ状態スコア) のKB-A群とKB-B群の比較

食欲不振10例(45%)であった。KB-B群では頭重感11例(有症状者の32%)、頭痛14例(41%)、めまい感7例(24%)、肩こり14例(28%)、のぼせ感12例(36%)、耳鳴り8例(25%)、四肢のしびれ9例(26%)、四肢の冷え7例(18%)、全身倦怠感10例(22%)、食欲不振2例(25%)であった。いずれの項目も両群間に差を認めなかったが、開始時に比べると頭重感と頭痛でKB-A、B群ともに改善傾向がみられた。

血圧：和漢薬治療群全体では、収縮期血圧は開始時137.9±1.8、1年後135.9±1.7、2年後136.5±1.7、3年後136.9±1.8mmHgであった。拡張期血圧は開始時78.4±0.8、1年後78.8±0.8、2年後78.9±0.9、3年後79.1±1.1mmHgで治療前後で差を認めなかった。また、KB-A群、KB-B群の比較でも収縮期・拡張期血圧ともに差を認めなかった。

収縮期血圧140mmHg以上の高血圧傾向を呈した症例のみを対象としてKB-A群とKB-B群の血圧の変化を見てみると、KB-A群では開始時151.4±1.4、1年後137.2±1.9、2年後138.4±2.1、3年後

140.6±3.4mmHgで、KB-B群は開始時154.4±2.0、1年後149.0±2.9、2年後142.6±5.3、3年後144.0±4.0mmHgであり、1年後においてKB-A群はKB-B群に比べ有意に収縮期血圧が低かった(p<0.05)。拡張期血圧は、KB-A群では開始時86.5±0.7、1年後81.0±1.4、2年後82.0±1.2、3年後83.4±2.0mmHgで、KB-B群は開始時88.6±1.3、1年後87.5±1.4、2年後85.0±1.3、3年後85.1±1.8mmHgであり、1年後でKB-A群はKB-B群に比べ拡張期血圧が低い傾向を認めた(p<0.1)(図4)。

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。しかし、抗凝固療法や抗血小板療法は、脳出血を誘発する可能性があり、血圧のコントロール以外に有効な

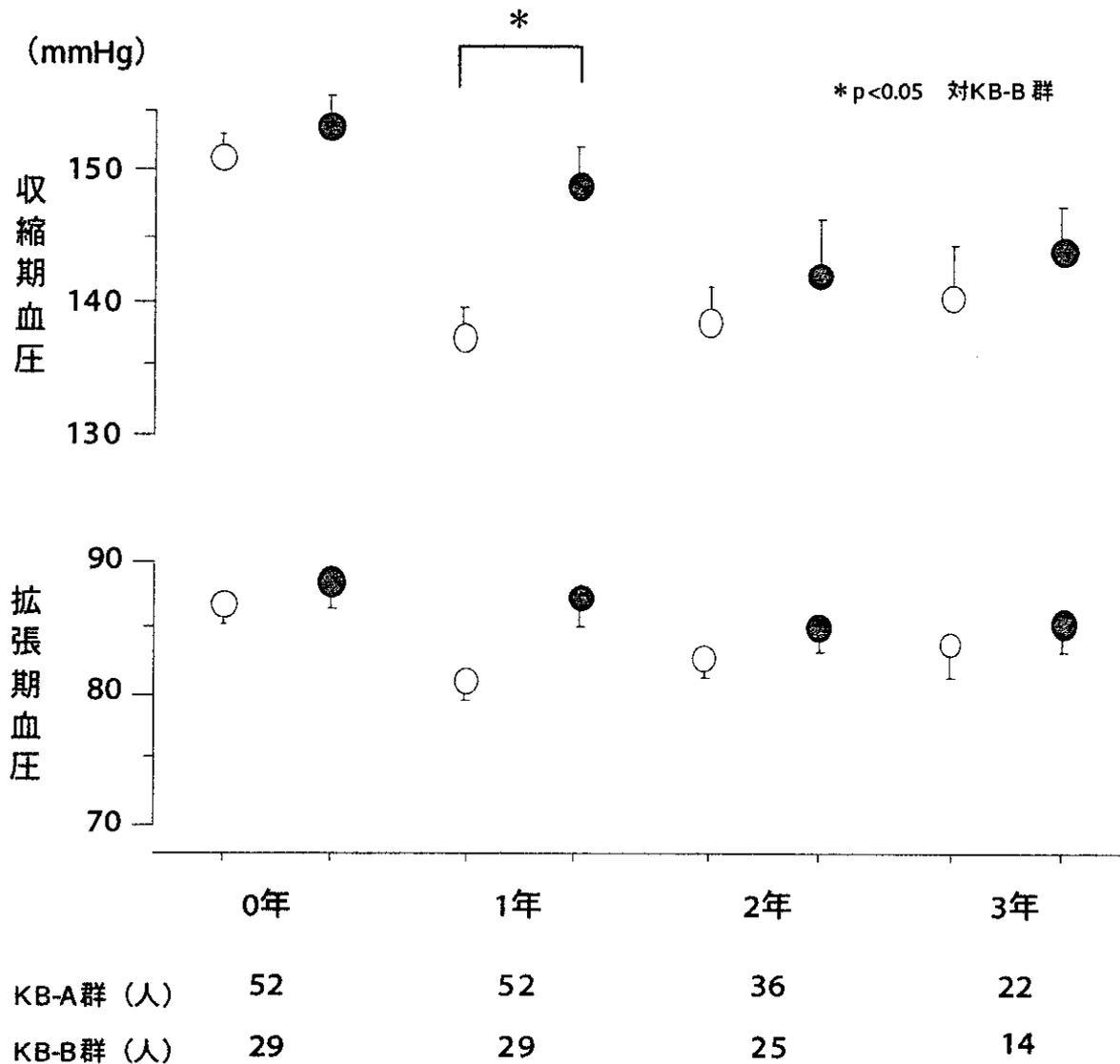


図4 収縮期血圧140mmHg以上の症例におけるKB-A群とKB-B群の血圧の経過

予防手段がないのが現状である。そこで、本研究初年度研究結果において桂枝茯苓丸の短期投与が無症候性脳梗塞患者の精神症状の改善、自覚症状、血圧に好影響を与えたことから、今回、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、和漢薬治療の中でも、短期投与による検討において有用性の認められた桂枝茯苓丸エキス製剤を長期使用した群と主に他の漢方方剤を用いた群、さらに対照として地域脳検診受診者である健常高齢者との3群の3年経過前後の比較を行い無症候性脳梗塞に対する和漢薬の長期効果を検討した。さらに、桂枝茯苓丸長期使用群と主に他の漢方方剤を用いた群については、1年毎の治療効果を比較検討することで、和漢薬の中でも代表的な駆血薬（血流改善薬）である桂枝

茯苓丸の効果を検討した。

その結果、認知機能に関して、20点以下を痴呆の疑い有り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2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3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2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3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。一方、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2群とも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関わらず、桂枝茯苓丸を主に内服した和漢薬治療群では有意な改善を示し、健常高齢者群に比べても群間で差が認められた。他の漢方方剤で主に治療した群ではこの差が認められなかったことから、桂枝茯苓丸に抗うつ作用を有する可能性が示唆される。この点に関して第一に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。第二には、桂枝茯苓丸を主に内服した群の前値が高いことから、精神症状とくにうつ傾向にある無症候性脳梗塞患者に対して、より有効性が高い可能性がある。この点に関しては、今後、精神科疾患などによるうつ状態に対する桂枝茯苓丸の効果の検討も要すと考えられる。

自覚症状に関しては、一般に無症候性脳梗塞の30%程度に随伴する頭重感、頭痛、めまいなどの非特異的症状を有する症例が約50%の症例で認められた。桂枝茯苓丸の内服の有無による比較では、自覚症状全般改善度で両群間で治療前後で差はなかったが、項目別で、「頭重感」と「頭痛」において和漢薬治療群全体で開始時に比べ改善傾向が認められた。この点においては、自覚症状を主目標に選択する和漢薬治療は無症候性脳梗塞患者のQOL改善に好影響を与えていると考えられた。

血圧に関して、収縮期血圧140mmHg以上の高血圧傾向を呈した症例のみの検討では、主に桂枝茯苓丸を内服していたKB-A群と主に他の和漢薬を内服したKB-B群を比較すると、1年後においてKB-A群はKB-B群に比較して群間で有意に収縮期血圧の低下を認めた。これらの症例の中には途中から降圧剤が追加された症例が含まれており、降圧剤が追加された症例はKB-A群とKB-B群では

ほぼ同数であったとはいえ、厳密なことはいえないが今回の結果から桂枝茯苓丸に軽度の降圧作用がある可能性があると考えられた。ちなみに、基礎研究で桂枝茯苓丸が自然発症高血圧ラットの降圧、血液レオロジー因子改善、抗酸化、血管内皮機能改善作用などを有することが報告されており、初年度の我々の短期投与による検討でも桂枝茯苓丸の内服により降圧作用を認められている。降圧をはかることは脳血管障害の発症のリスクを下げることが知られており、桂枝茯苓丸はこのことに寄与する可能性があると考えられる。

ちなみに、今回の検討では、3年経過後の時点でのMRI上のラクナの再発は、健常高齢者43例中3例、KB-A群48例中3例、KB-B群26例中1例で、3群間に差はみられなかった。これに関しては、3年間という観察期間が不十分であった可能性があり、今後も症例の蓄積と長期経過観察を行う必要があると考えられた。

以上、今回の検討によって、無症候性脳梗塞に対して和漢薬治療は精神症状、自覚症状の改善に有用である可能性が示唆された。特に主に桂枝茯苓丸にて和漢薬治療を行った症例において、うつ状態の改善がみられた。

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、和漢薬治療は精神症状、自覚症状の改善に有用である可能性が示唆された。特に主に桂枝茯苓丸にて和漢薬治療を行った症例において、うつ状態や高血圧に対する有効性が示され、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治療の有用性が本研究により明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimada Y., Yokoyama K., Goto H., Sakakibara I., Sekiya N., Mantani N., Sakai S. and Terasawa K.: Protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* against nitric oxide donor-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* 19: 15-20, 2002.

2) Goto H., Shimada Y., Mitsuma T., Shintani

T., Nagasaka K., Goto S., Shibahara N. and Terasawa K.: Effect of Keishi-bukuryo-gan on asymptomatic cerebral infarction. J. Trad. Med. 19: 46-50, 2002.

3) Sekiya N., Goto H., Shimada Y. and Terasawa K.: Inhibitory effects of Keishi-bukuryo-gan on free radical induced lysis of rat red blood cells. Phytoter. Res. 16: 373-376, 2002.

4) Sekiya N., Goto H., Tazawa K., Oida S., Shimada Y. and Terasawa K.: Keishi-bukuryo-gan prevents the endothelium dependent relaxation of thoracic aorta in cholesterol-fed rabbit by limiting superoxide generation. Phytoter. Res. 16: 524-528, 2002.

5) Kasahara Y., Goto H., Shimada Y., Sekiya N., Yang Q. and Terasawa K.: Inhibitory effects of Cinnamomi cortex and cinnamaldehyde on oxygen-derived free radical-induced vasocontraction in isolated aorta of spontaneously hypertensive rats. J. Trad. Med. 19: 51-57, 2002.

6) Yang Q., Goto H., Shimada Y., Kita T., Shibahara N. and Terasawa K.: Effects of Choto-san on hemorheological factors and vascular function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Phytomedicine 9: 93-98, 2002.

2. 学会発表

1) 横山浩一, 嶋田豊, 堀悦郎, 関矢信康, 後藤博三, 西条寿夫, 寺澤捷年: 釣藤鈎の一過性脳虚血モデルにおける神経細胞保護作用の検討. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

2) 後藤博三, 嶋田豊, 関矢信康, 笠原裕司, 楊喬, 柴原直利, 喜多敏明, 寺澤捷年: 糖尿モデル (KBN/Kob) ラットにおける桂枝茯苓丸の血管保護作用. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

3) 嶋田豊, 横山浩一, 後藤博三, 関矢信康, 引網宏彰, 酒井伸也, 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桂枝茯苓丸及びその構成生薬の保護作用. 第19回和漢医薬学会大会, 2002, 8月, 千葉.

4) 後藤博三, 柴原直利, 喜多敏明, 嶋田豊, 寺澤捷年, 小林祥泰, 松井龍吉, 三瀨忠道, 新谷卓弘, 長坂和彦: 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. 第53回日本東洋医学会学術総会, 2002, 5月, 名古屋.

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用

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、NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスの保護作用を検討した。NO donorにはSNPとSIN-1を用い、細胞生存率の評価にはMTT法を用いた。釣藤鈎エキスはSNP及びSIN-1添加による神経細胞死を有意に抑制した。釣藤鈎のフェノール画分とアルカロイド画分もSNP及びSIN-1添加による神経細胞死を有意に抑制した。以上より、釣藤鈎エキスはNO donorによって誘導される神経細胞死に対して保護作用を有し、その活性は釣藤鈎のフェノール画分及びアルカロイド画分にあることが示唆された。

A. 研究目的

Nitric oxide (NO) は中枢神経系において伝達分子として重要な役割りを果たしている。しかしながら、過剰のNOの産生は神経障害にも関与する。このNOの神経毒性は、虚血性障害を含む多彩な神経疾患に共通に関与することが知られている。脳虚血の際には、多量のグルタミン酸 (glutamate) が神経細胞のシナプス前部から放出され、グルタミン酸受容体、特にNMDA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、最終的には神経細胞を死に導くことが知られている。この過程において、神経型NO合成酵素 (nNOS) が活性化され、多量のNOラジカル (NO^{\cdot}) が生ずる。また、脳の虚血再灌流後にはある種のサイトカインがグリア細胞を刺激し、カルシウム非依存性の誘導型NO合成酵素 (iNOS) の活性化を介して多量の NO^{\cdot} が生ずる。さらに、アラキドン酸の放出等によってスーパーオキシドアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) が産生される。 NO^{\cdot} は $\text{O}_2^{\cdot-}$ と反応し、パーオキシナイトライト (ONOO^-) を生じ、これが強い神経毒性を持つことが知られている。培養神経細胞を用いた実験によって、様々なNO供給体 (NO donor) の添加により神経細胞死が誘導されることが報告されている。Sodium nitroprusside (SNP) は NO^{\cdot} を発生し、これが内因性の $\text{O}_2^{\cdot-}$ と反応することにより、また3-morpholiniosydnonimine (SIN-1) はこれ自身が NO^{\cdot} と $\text{O}_2^{\cdot-}$ を発生することにより、 ONOO^- 、さらにはヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) を生ずる。

釣藤鈎は、漢方方剤・釣藤散の主要な構成生薬である。釣藤散は11種類の生薬から成っているが、

古くから日本や中国では、頭痛、めまい、耳鳴り、肩こり等を目標に用いられてきた。我々は最近、封筒法及び二重盲検法による臨床試験によって、脳血管性痴呆に対する釣藤散の有用性を明らかにした。また、培養小脳顆粒細胞を用いた実験によって、釣藤散の水製エキス、及びそのフェノール成分、アルカロイド成分がグルタミン酸誘導神経細胞死に対して保護作用を有することを明らかにした。しかしながら、NOが関与する神経細胞障害に対する釣藤鈎の効果は不明であった。そこで、今回は、培養小脳顆粒細胞を用いて、NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎、及びそのフェノール画分、アルカロイド画分の保護作用について検討した。

B. 研究方法

釣藤鈎は、中国広西省産の物を用いた。釣藤鈎 (1 kg) を熱水 (5 l) で2時間煎じ、水製エキスを得た (収率 11.5%)。これを水及びメタノールによりクロマトグラフィー処理し、水溶出部 (収率 5.8%)、フェノール画分 (収率 2.9%)、アルカロイド画分 (収率 0.2%) を得た。

8日齢のWistar系ラットから、常法に従い小脳顆粒細胞を35mm culture dishに 6×10^5 cells/ml (2 ml/dish) の密度で初代培養した。培養8~9日目に実験を行った。

釣藤散エキス及び画分はLocke's solutionに目的濃度の100倍に溶解し、培養細胞の培地に1/100量 (20 μM) 添加した。無処置対象 (untreated control) とNO donorのみを処理した対象 (control) には、同量のLocke's solutionのみを添加した。10

分後に、目的濃度の100倍にLocke's solutionで溶解したSNPまたはSIN-1を培地に1/100量 (20 μ M) 添加した。Untreated controlには同量のLocke's solutionのみを添加した。5%CO₂インキュベーター中に、37°Cで一定時間インキュベートした後、培地にMTT (500 μ g/ml) を添加し、さらに30分インキュベートした後、細胞をisopropanolで溶解し、吸光度計で吸光度 (570 nm) を測定した。Untreated controlの平均に対する比率で細胞生存率を算出した。

実験は4回行い、平均 \pm SDで数値を示した。統計学的処理にはKruskal-Wallis test及びBonferroni's testを用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

C. 研究結果

まず、培養小脳顆粒細胞におけるNO donor誘導神経細胞死の実験系の確立と釣藤鈎エキスの保護作用を調べる目的で、NO donorの24時間添加に対する釣藤鈎エキスの保護作用を検討した。SNPの添加によって、用量依存的に細胞生存率は低下した (10 μ M, 53%; 30 μ M, 15%; 100 μ M, 11%) (図1 A)。SIN-1 (300 μ M) 添加によっても細胞生存率は低下した (35%) (図1 B)。釣藤鈎エキスは用量依存的に、SNP (10, 30 μ M) 添加によって誘導される神経細胞死を、10, 30, 100 μ Mの濃度で有意に抑制し、同じくSNP (100 μ M) 添加によって生ずる神経細胞死を、30及び100 μ Mの濃度で有意に抑制した (図1 A)。さらに、釣藤鈎エキスは用量依存的に、SIN-1 (300 μ M) 添加によって誘導される神経細胞死を、10及び30 μ Mの濃度で有意に抑制した (図1 B)。

次に、NO donor誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスの保護作用を経時的に検討した。先に得られた成績をもとに、SNP (30 μ M) とSIN-1 (300 μ M) の濃度を決定した。SNPまたはSIN-1の3時間添加は細胞生存率に影響を及ぼさなかったが (SNP, 90%; SIN-1, 99%)、その後、細胞生存率は低下した (SNP 6時間, 44%; 12時間, 33%; 24時間, 24%; SIN-1 6時間, 61%; 12時間, 33%; 24時間, 29%) (図2 A B)。釣藤鈎エキス (10, 30, 100 μ M) 添加は、6, 12, 24時間後においてSNP誘導神経細胞死を有意に抑制した (図2 A)。さらに、釣藤鈎エキス (10, 30 μ M) 添加は、6, 12, 24時間後においてSIN-1誘導神経細胞死を有意に抑制した (図2 B)。

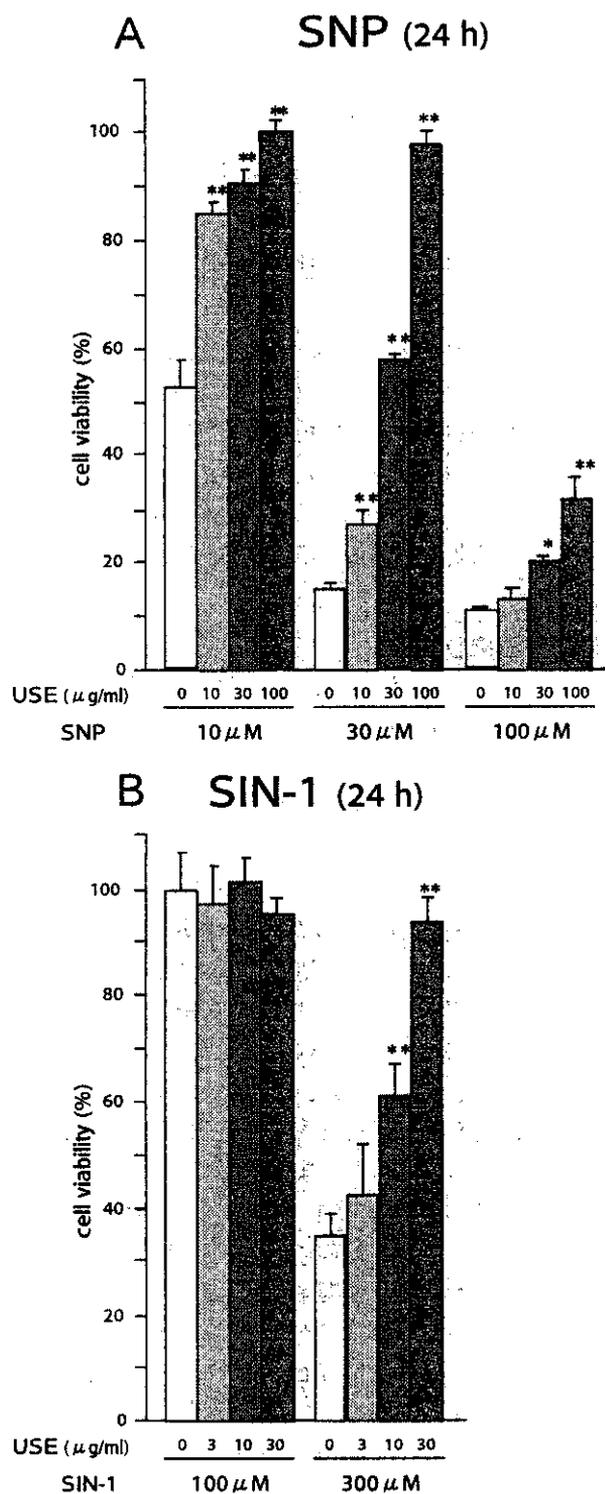


図1 SNP及びSIN-1誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスの保護作用

SNP及びSIN-1添加24時間後の細胞生存率をMTT法によって評価した。

mean \pm SD, n=4 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.