

動物モデルにおける活血化瘀剤—‘冠元顆粒’ の脳卒中発症予防作用に関する研究

高明,^{a,b)} 池田 克巳,^{a)} 野口 孝則,^{a)} 森 和,^{b)} 家森 幸男^{a)}

^{a)}京都大学大学院人間・環境学研究科 WHO循環器疾患国際共同研究センター

^{b)}埼玉東洋医療専門学校

Studies on preventive effect of ‘Kangenkaryu’, Chinese herbal medicine, on stroke in SHR-SP

Ming GAO,^{*a,b)} Katsumi IKEDA,^{a)} Takanori NOGUCHI,^{a)} Kazu MORI,^{b)} Yukio YAMORI^{a)}

^{a)}Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto WHO Collaborating Center for Research on Primary Prevention of Cardiovascular Diseases, Yoshida-nihonmatsu, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

^{b)}Saitama College of Oriental Medicine, 1-21-7 Yoshikawa, Saitama 342-0041, Japan.

(Received August 6, 2001. Accepted November 1, 2001.)

Abstract

The preventive effect of Chinese herbal medicine (Kangenkaryu, KN) on hypertension and stroke was examined using stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP). KN (Iskra Industry Co. Ltd., Tokyo, Japan) was produced as granule preparation in Pharmacological Industry of Huaxi Medical University (Chengdu, China). The dose for adult daily is 9.0 g. The composition is as followings: Salvia Root 4.500 g, Peony Root 2.250 g, Safflower 2.2250 g, Cnidium Rhizome 2.250 g, Saussurea Root 1.125 g, Cyperus Rhizome 1.125 g. The animals at 5 weeks of age were separated into three groups: a plain laboratory diet (PL) group (control), groups receiving the PL diet substituted with 3.3%(KN-H group) or 0.33%(KN-L group) of KN. Blood pressure, body weight, survival rate and incidence of stroke after oral administration of the KN were investigated. On the 30th days of experiment, urine were collected during 24 hours and NO₂/NO₃ were determined. Cerebral blood flow were measured by laser doppler perfusion imager (PIM II).

Systolic blood pressure was significantly attenuated in the SHR-SP fed with 3.3% and 0.33% KN groups compared to control (14th, 21st, day: 3.3% KN-H versus control, $P<0.05$, 28th day: KN-H versus control, $P<0.01$, and KN-L versus control, $P<0.05$). Amount of NO₂/NO₃ in the urine were significantly increased in the KN-H group compared with control group ($P<0.05$). The mean cerebral blood flow values in the control group was significantly lower than the KN-H group. 120th day feeding with the 3.3% KN significantly retarded the increase of stroke and death rate.

These results indicate that ingestion of Chinese herbal medicine, KN, attenuated the elevation of blood pressure and the development of cerebral ischemia, suggesting that KN treatments might be beneficial for the prevention of hypertension and the development of stroke, and increasing their survival rate.

Key words Chinese herbal medicine, hypertension, Kangenkaryu, stroke, stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

*To whom correspondence should be addressed. e-mail : gao@saitama-toyo.ac.jp

緒 言

日本人の死因の約40%は心、脳血管疾患（脳卒中、心筋梗塞）によるものである。その脳卒中のリクスファクターは高血圧であるが高血圧が長期にわたって持続すると脳、心臓、腎臓、眼底などの重要臓器に虚血性的変化を起し、これが臓器の機能障害へと進展する。¹⁾したがって、血圧をコントロールする必要がある。最近では、降圧剤の進歩により高血圧の薬物治療は容易になり簡単に血圧を下降させることが可能となっている。現在、高血圧疾患に対する治療法として、Ca拮抗薬、 β 受容体作動薬、アンギオテンシン転換酵素阻害薬を用いる方法が効果的で広範に利用されている。しかし、降圧治療は一時的なものではなく、生涯に及ぶものであるからこれらの薬物による長期治療での副作用の発現は患者にとって薬物治療を拒否する原因ともなることも事実である。²⁾このため、体質改善を重視し、副作用が少ないと言われている漢方製剤に対する関心も高まっている。

一方、中国においても、血液および血管の病変が関与している疾患の罹患率の増加傾向が見られ、日本同様その治療および予防についての研究が積極的に行われてきている。とくに、西洋医学と中医学（中国伝統医学）の結合による多くの薬理および臨床試験などを通じて血液および血管の病変によるあらゆる疾患には血瘀³⁻⁵⁾の病態の関与があり、活血化瘀に基づく処方に応用が有効であることが証明されてきた。‘冠元顆粒’（以下、KN）はこのようなことから開発された生薬製剤である。

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット（SHR-SP）は若齢期より遺伝的に高血圧症を発症し、ほぼ例外なく、脳血管障害を起して死亡する。現在このSHR-SPを用いて、広く脳卒中、⁶⁾脳血管性痴呆⁷⁾および高血圧の管理、治療、薬物の高血圧性二次病変の予防に対する有効性などの研究がなされている。⁸⁾

われわれは生薬の丹参を主薬とする水製エキス漢方製剤である冠元顆粒の投与による血圧上昇抑制及び脳血管障害の予防・治療作用を、SHR-SPを用いて検討した。

材料と方法

(1) 被験薬と試験飼料製作

被験薬の冠元顆粒はイスクラ産業（株）が提供した華西医科大学製薬工場（中国・四川省）において製造されている顆粒剤で、本剤成人の1日量9.0g中、下記の成分、分量より作製したエキス4.5gを含有する。

丹参 4.500 g

Table I Composition of SP diet

Component	Content (%)
Moisture	7.0
Total protein	20.5
Total fat	5.0
Total fiber	3.2
Ash	5.0
Non-nitrogen soluble compound	59.3
Minerals	
Calcium	0.74
Magnesium	0.21
Potassium	0.75
Sodium	0.40

赤芍	2.250 g
紅花	2.250 g
川芎	2.250 g
木香	1.125 g
香附子	1.125 g

動物に自由摂取させるため以下の2種飼料を作製した。船橋農場（株）製の配合飼料（SP）を基本に冠元顆粒を3.3%、0.33%（重量）添加し実験飼料を調製した。SPの組成をTable Iに示した。

(2) 実験動物と投与方法

4週齢雄性SHR-SP/IzmラットをSHR等疾患モデル動物利用研究会（京都）より導入後、室温22±1℃、湿度60±10%、照明時間12時間（6:00-12:00）に設定した飼育室で1週間の予備飼育期間を設け、この間に粉末SP飼料と水道水を自由に摂取させ、体重増加が順調、一般状態に異常の認められなかった動物46匹を実験に用いて冠元顆粒の高濃度投与群（3.3%の冠元顆粒を含有する飼料投与群、以下KN-H群）、低濃度投与群（0.33%の冠元顆粒を含有する飼料投与群、以下KN-L群）とコントロール群（SP基本飼料投与群、以下Cont群）に3群に分けた（それぞれn=12）。また、ラットの脳血流量を調べるため、KN-H群とCont群の飼育条件に従ってBKN-H群とBCont群に5匹ずつ分けた。群分けは投与当日に測定した血圧及び体重をもとに各群の血圧、体重が差のないように行なった。

動物実験の取扱いに関しては、日本生理学会の定める「生理学領域における動物実験に関する基本指針」ならびに「京都大学大学院 人間・環境学研究科動物実験に関する指針」に従った。

(3) 体重と血圧測定

投与前、後週1回体重と血圧を測定した。実験動物を38℃の加温器中で10分間加温させ、順応した後、無麻酔下でtail-cuff法により自動血圧測定装置（UR-1000 ウェダ製作所）を用いて収縮期血圧を測定した。各ラッ

トの血圧測定は連続3度安定した測定値の平均値を記録した。血圧測定の際、拡張期と心拍数を同様に記録した。血圧の測定は一定の温度・湿度の部屋で午後2時から5時までに行なうこととした。

(4) 血液・尿検査

実験餌投与後4週目の時点で24時間絶食させ、翌日エーテル麻酔し、頸動脈から1.0ml採血を行なった。尿は絶食する前に代謝ケージでラットを飼育し採尿を行なった。採集された24時間尿中の一酸化窒素(NO)代謝産物であるNO₂/NO₃の排泄量と血中濃度をグリース法(NO₂/NO₃ Assay Kit-C, 同仁化学研究所)にて測定した。

(5) 脳血流の観察

実験餌投与後の28日目、BKN-H群とBCont群各5匹ラットにレーザー・ドップラー法を用いて基礎状態における脳血流量の連続的測定と2次元的測定を行なった。測定方法としては麻酔下においてラット頭皮を切開し、頭蓋骨を露出させ、レーザー・ドップラー血流画像装置PIM II(リスカ社, スウェーデン)を用いてラットの脳血流量を測定した。

(6) 脳卒中発症と生存状況

実験餌投与後120日目までの脳卒中の発症率と生存状況

を観察し分析した。死亡したラットを当日解剖し、脳卒中病変の有無を病理検査した。

(7) 統計学処理

実験データは平均値±標準誤差で表した。各投与群間の比較はANOVA及びFishev's PLSD(Statview 5.0, SAS Inc USA)により有意差検定を行った。生存率の比較はKablan-Meier法を用いた。P<0.05を統計学的に有意とした。

結 果

1. 体重の変化

Table IIは3群間の体重の変化を示している。実験開始前、後4週間までの3群ラットの体重は順調に増加し、KN-H、KN-LとCont群はほぼ同様の値を示し、成長に対する影響は認められなかった。投与5週目から脳卒中発症と死亡例が出現したため、体重集計は行わなかった。

2. 収縮期血圧に対する影響

Fig. 1は収縮期血圧の推移を示している。収縮期血圧はいずれの群においても投与4週目まで上昇したが、投与2週目からCont群に比べ冠元顆粒投与群の血圧上昇

Table II Effects of KN-H, KN-L and Control on body weight change in SHR-SP

Groups	Number of rats	Body Weight (g)				
		weeks of administration				
		0	1	2	3	4
KN-H	12	121.3±2.2	170.5±2.0	190.2±1.4	207.0±1.6	213.6±1.7
KN-L	12	127.0±3.1	171.8±4.0	193.9±2.8	205.0±3.2	216.3±4.0
Cont	12	125.5±3.6	167.8±3.5	195.2±2.8	209.8±3.9	216.1±3.7

Each value shows mean ± S.E.

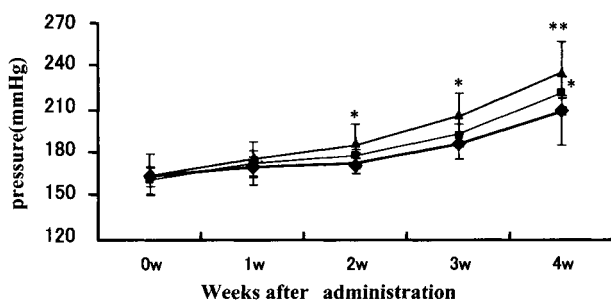


Fig. 1 Effect of diets containing 3.3% (◆) or 0.33% (■) KN on the development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Significant difference from plain laboratory diets (Control) group (▲). *p<0.05, **p<0.01. N=12 rats in each groups.

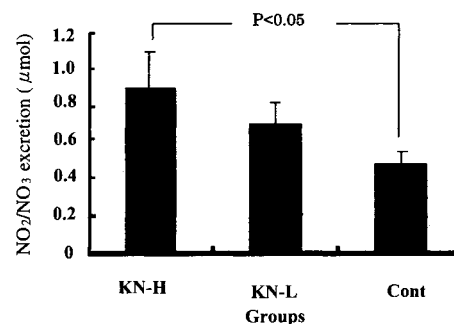


Fig. 2 Effect of 4 week feeding of diets containing 3.3% (KN-H) or 0.33% (KN-L) KN and plain laboratory diets (Control) on 24 h urinary NO₂/NO₃ in SHR-SP. Urine was collected on the 4th week of the experiment. Significant differences from control group. N=12 rats in each groups.

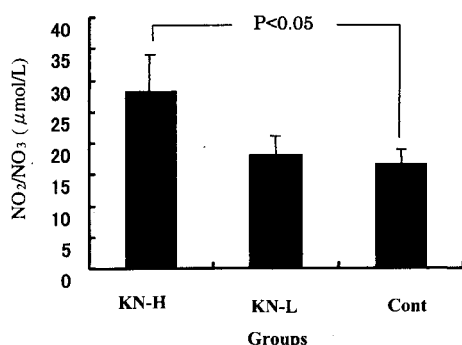


Fig. 3 Effect of 4 week feeding of diets containing 3.3% (KN-H) or 0.33% (KN-L) KN and plain laboratory diets (Control) on plasma levels of NO₂/NO₃ in SHR-SP. Significant differences from control group. N=12 rats in each groups.

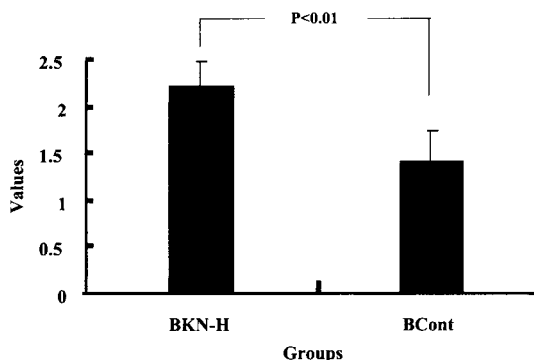


Fig. 4 Effect of 4 week feeding diets containing 3.3% (KN-H) BKN and plain laboratory diets (BControl) on cerebral blood flow values in SHR-SP. N=5 rats in each groups.

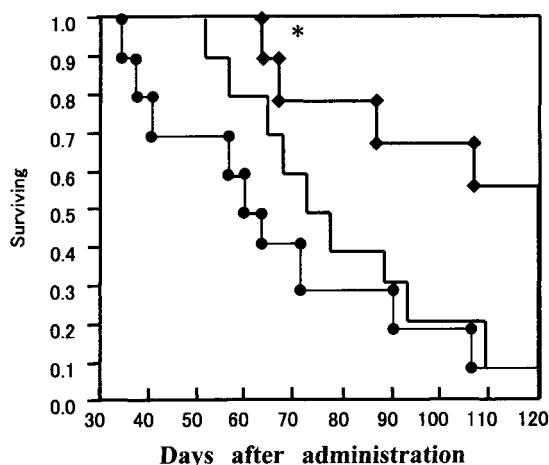


Fig. 5 Effects of feeding of the 3.3% (◆) or 0.33% (○) KN diets on the survival rate.* Significant difference from control group (●) (P<0.05).

抑制効果を示した。KN-H 群では、Cont 群と比較して投与後 2, 3, 4 週目において血圧は有意な低値を示した。(それぞれ $P<0.05$, 0.05 , 0.01 , 4 週目において、KN-H 群の平均血圧 214.3 ± 2.4 mmHg, KN-L 群 222.4 ± 1.7 mmHg, Cont 群 232.2 ± 4.5 mmHg)。KN-L 群では Cont 群と比較しても投与後 4 週目の血圧は有意な低値を示した ($P<0.05$)。

3. 24 時間尿中 NO の代謝産物 NO₂/NO₃ の排泄量と血中濃度の比較

Fig. 2 に各実験動物群の 24 時間尿中 NO₂/NO₃ 排泄量測定結果の比較を示す。KN-H 群 (0.862 ± 0.127 μmol) は Cont 群と比較して統計的に有意な高値を示した。KN-L 群 (0.703 ± 0.117 μmol) も Cont 群 (0.437 ± 0.0569 μmol) より高い傾向が認められた。

Fig. 3 は 3 群実験動物血中 NO₂/NO₃ 濃度の比較を示

す。KN-H 群は Cont 群に比べ有意な高値を示した ($P<0.05$)。

4. 脳血流量測定の結果

Fig. 4 にレーザードップラー法を用いて脳血流における連続的測定と二次元的測定を行った結果を示す。基礎状態において脳血流量を反映する values 値は BKN-H 群が BCont 群より有意な高値を示した ($P<0.01$)。BKN-H 群ラットの脳血流状況は BCont 群ラットと比して改善されたことが明らかになった。

5. 脳卒中予防と延命効果

投与 120 日まで、行動神経症状 (過敏性、痛覚過敏性、四肢のマヒなど) の観察から脳卒中症状を示していた個体数はそれぞれ KN-H 群 6 例、KN-L と Cont 群は全体の 12 例であった。高濃度の冠元顆粒投与により脳卒中発症を抑制する傾向が示された。

死亡した個体についての解剖肉眼的所見は Cont 群と KN-L 群の全例に大脳皮質下と大脳基底核に梗塞巣とその周囲のびまん性脳浮腫及び出血巣を認めたのに対し、KN-H 群では 3 例に脳の異常が認められなかった。

投与 120 日までの生存固体数の推移を Fig. 5 に示す。KN-H 群には 4 例死亡したのに対し、KN-L 群 9 例、Cont 群 9 例の死亡例が認められた。KN-H 群は延命効果が確認できた ($P<0.05$)。

考 察

循環器疾患のモデル動物である SHR-SP は若齢期より急激な高血圧を発症し、加齢に伴いほぼ全例脳卒中を発症する。今回我々はこの SHR-SP を用いて、丹参などの漢方生薬から組成された冠元顆粒を自由摂食させることによる血圧上昇抑制、脳血流量改善、脳卒中の発症率の低下及び延命効果を確認した。3.3% 及び 0.33% 濃

度の冠元顆粒投与によって血圧上昇は有意に抑制され、冠元顆粒の血圧上昇抑制作用が明らかとなった。特に高濃度の3.3%群は投与後の2週目から、高血圧発症初期の急激な血圧上昇の抑制作用が現れ、この作用は4週目で著明であったが、低濃度の0.33%群も4週目に血圧上昇抑制作用が認められた。

冠元顆粒及びその主成分「丹参」の薬理作用は、1. フリーラジカールスカベンジャーとしての脂質過酸化反応の抑制,⁹⁾ 2. 血小板凝集と放出機能を抑制, 3. トロンボキサン A₂ (TXA₂) の生成を抑制, 血漿中の中性脂肪レベルを抑制,¹⁰⁾ 4. プロスタサイクリン (PGI₂) の分泌を促進, 5. 赤血球の変形能を改善, 血液粘稠度を低下,¹¹⁾ 6. 血中のエンドセリン (ET) レベルを低下, 7. グルコースの取りこみ促進し, 老年記憶障害動物における脳機能改善,¹²⁾ 8. 血中スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を高め, 酸化ストレスを軽減¹²⁾ などが報告されている。

本研究の結果では SHR-SP ラットにおいて漢方製剤の冠元顆粒が NO 増加作用をもつことが新たに示唆された。血管内皮から分泌された NO は中膜平滑筋に作用し血管を弛緩させるのみならず、内腔側では血小板凝集や単球の内皮付着抑制作用、血管壁内では平滑筋の遊走、増殖抑制、低比重リポタンパク (LDL) の酸化抑制作用、ナトリウム再吸収抑制作用などをもつことが知られている。^{13,14)} SHR-SP における冠元顆粒投与による血圧上昇抑制は増加した NO の関与が推測される。

冠元顆粒の脳卒中予防とそれによる死亡率の低下は血圧上昇抑制によるところが大きいと考えられるが、管谷ら¹²⁾ はレーザードップラー血流計で、脳のプレグマより3mm後方、3mm右方の点にて血流量を測定した結果、冠元顆粒投与により、記憶障害と健常実験動物モデル共に有意な脳血流量上昇を報告している。そのメカニズムに関しては冠元顆粒は血液粘度低下作用、直接的な血管拡張作用と脳血流を制御する神経系（前脳基底部アセチルコリン神経）の活動の上昇を考察している。¹²⁾ われわれの結果は管谷らと一致した上、2次元レベルで脳血流量増加作用を明らかにした。今回の脳血流増加は直接的な脳血管拡張作用以外に脳代謝・機能改善の結果としての脳血流増加の可能性も推測される。

以上の実験結果から、本研究は冠元顆粒の SHR-SP における血圧上昇を抑え、脳血流量を増加させ、脳卒中の発症率を低下させることによって延命効果が認められた。

これらの作用機序については NO 代謝との関係が本研究から明らかにされた。今後、冠元顆粒の降圧、脳血流改善、脳卒中予防作用のメカニズムについてさらに検討が必要であると考えられる。

結 論

SHR-SP に対して漢方製剤の冠元顆粒配合飼料を摂食させ、循環器疾患の予防効果を試験し、以下の結果を得た。

- 1) 冠元顆粒は血圧上昇抑制作用を有することが明らかとなった。
- 2) 冠元顆粒は脳血流量を改善させることが証明出来た。
- 3) 冠元顆粒は脳卒中の発症を抑制し、脳血管障害による死亡を防ぐという延命効果を示した。
- 4) 冠元顆粒は NO 産生代謝に影響を与えることが示唆された。

*〒342-0041 埼玉県吉川市保 1-21-7

埼玉東洋医療専門学校 高 明

References

- 1) Murakami, T., Ogawa, H., Hayashi, M., Yoshizumi, H.: Effect of Euglena with Enriched Docosahexaenoic Acid on Blood Pressure, Stroke Lesion and Life-Span in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*. **48** (3), 209-215, 1995.
- 2) Eguchi, F., Watanabe, Y., Zhang, J.: Inhibitory effects of water extract from *Agaricus blazei* fruiting bodies (Cj-01) on Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Trad. Med.* **16**, 201-207, 1999.
- 3) Ariti, S.: About Blood Stasis Syndrome. *Clinical Journal of Chinese Medicine* **3** (4) 9-16, 1982.
- 4) Miyagawa, M.: About Blood Stasis Syndrome of Traditional Chinese Medicine. *Clinical Journal of Chinese Medicine* **3** (4), 17-26, 1982.
- 5) Anaka, M.: Blood Stasis Syndrome in China. *Clinical Journal of Chinese Medicine* **3** (4), 21-35, 1982.
- 6) Yamori, Y., Nagaoka, A. and Okamoto, K.: Importance of genetic factors in hypertensive cerebrovascular lesions: an evidence obtained by successive selective breeding of stroke-prone and resistant SHR. *Jpn. Circ. J.*, **38**, 1095-1100, 1974.
- 7) Yamori, Y., Horie, R., Nara, Y., Tagami, S., Kihara, M., Mano, M., Isho, H.: Prevention of Cardiovascular Diseases: An Approach to Active Long Life. 163, 1987, Elsevier (Amsterdam).
- 8) Matsui, Y., Nagase, T., Tomioka, M., Shimizu, M., Takahashi, T., Takahashi, K.: Inhibitory effects in dependent and concomitant administration of product consisting of a crude drug including hysanthes leaf, Japanese valerian, Sophora flower, and others and *shichimotsu-koka-to* product on blood pressure rise in Stroke-prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP). *Pharmacometrics*, **57** (1/2), 31-38, 1999.
- 9) Li, L.N.: About New Pharmacological Action of Tang-Shen. *Chinese Health Newspaper*, **5** (21), 1-2, 1991.
- 10) Chen, K.J.: Clinical Study on Integrated Traditional and Western Medicine In Coronary Heart Disease. *Japan-Chinese Medicine*, **9** (3), 9-12, 1995.

- 11) Li, CZ. : Study on Mechanism of Thrombus of depressant action by Radix Salviae Miltiorrhizae. *Journal of Shanghai First Medical University*. **6** (3), 145-147, 1979.
- 12) Sugaya, K.: Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Edited by I. Hanin *et al.* Plenum Press, New York, pp. 411-419, 1995.
- 13) Nathan, C., Xie, Q.-W.: Nitric Oxide Synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, **78**, 915-918, 1994.
- 14) Sheila, G., Alix, M. C., Terence, B., Richard, M. J. P., Salvador, M. : Control of Regional Blood Flow by Endothelium-Derived Nitric Oxide. *Hypertension*. **15**, 486-492, 1990.