

釣藤散, 釣藤鈎及びそのアルカロイド成分の脳虚血 予防作用: マウス水迷路学習行動を指標として

張 紹輝,^{a)} 村上 孝寿,^{a)} 東田 道久,^{a)} 松本 欣三,^{a)} 榊原 巖^{b)}
高山 廣光,^{c)} 相見 則郎,^{c)} 渡辺 裕司^{*a)}

^{a)}富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験部門

^{b)}(株) ツムラ・漢方生薬研究所

^{c)}千葉大学薬学部

Protective effect of Choto-san, Chotoko and its alkaloids on experimental vascular dementia in mice: Elucidation using Morris water maze test

Shaohui ZHANG,^{a)} Yukihiisa MURAKAMI,^{a)} Michihisa TOHDA,^{a)} Kinzo MATSUMOTO,^{a)}
Iwao SAKAKIBARA,^{b)} Hiromitsu TAKAYAMA,^{c)} Norio AIMI^{c)} and Hiroshi WATANABE^{*a)}

^{a)}Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
2630 Sugitani, Toyama, 930-0194, Japan.

^{b)}Tsumura Central Research Laboratories, 3586 Yoshiwara, Amimachi, Ibaraki, 300-1192, Japan.

^{c)}Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Chiba 263-8522, Japan.

(Received November 8, 2001. Accepted January 15, 2002.)

Abstract

It has been reported that Choto-san has an effect on treatment of vascular dementia in clinical tests. In the present study, we investigated the effect of Choto-san and its main constituent Chotoko (*Uncariae uncis cum ramulus*) on the spatial cognitive impairment induced by transient cerebral ischemia in mice in the Morris water maze performance. The spatial cognitive deficiency caused by transient cerebral ischemia in mice exhibited an increase of escape latency and a reduction of swimming time in the platform quadrant. Choto-san (750-6000 mg/kg, p.o.) and Chotoko (75-600 mg/kg, p.o.) administered one hour before the operation shortened the escape latency and increased the swimming time in the platform quadrant, showing a protective effect on the impairment induced by transient cerebral ischemia. Furthermore, we also studied the efficacy of alkaloid fraction, indole alkaloid (geissoschizine methylether) and oxindole alkaloid (rhynchophylline) of Chotoko. The alkaloid fraction (10 mg/kg, p.o.) of Chotoko and rhynchophylline (10 mg/kg, p.o.) significantly improved the spatial cognitive impairment induced by transient cerebral ischemia in the Morris water maze, while the protective effect of geissoschizine methylether was weak. These results suggested that Choto-san and Chotoko have a protective effect on transient cerebral ischemia-induced spatial cognitive impairment. The beneficial effect of Chotoko is partly attributed to the oxindole alkaloid rhynchophylline.

Key words Choto-san, Chotoko, Aqueous Extract, Alkaloid fraction, Geissoschizine methylether, Rhynchophylline, Transient cerebral ischemia, Spatial cognitive impairment, Protective effect.

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: hwatanab@ms.toyama-mpu.ac.jp

緒 言

高齢者社会と共に、脳血管性痴呆は深刻な社会問題になってきた。近年、脳血管性痴呆に対して漢方方剤が臨床的に適用され、有用性が報告されるようになった。釣藤散は『普濟本事方』に記載され、石膏、釣藤鈎、菊花、陳皮、人參、麥門冬、防風、茯苓、半夏、甘草、生姜の11種類の生薬から構成され、肝の邪氣が盛んなことによって生じる頭痛、めまい、肩こり、神経症などの症状の治療に適用されている。最近、脳血管性痴呆患者に対して釣藤散が有効であることが二重盲検法の臨床試験で報告されている。^{1,2)} それ以降、釣藤散及びその主薬である釣藤鈎が注目を浴びるようになってきた。そこで、釣藤散の脳血管性痴呆に対する有用性を実験的に裏付けるため、両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通処置した(2VO)マウスにみられる水迷路における空間学習行動障害に対する釣藤散及びその構成生薬釣藤鈎水エキスの作用について検討した。また、釣藤鈎に含まれているインドール及びオキシインドール型アルカロイド成分には脳保護作用が見出されており、^{30,31)} 2VO処置により生ずる空間学習行動障害に対する釣藤鈎のアルカロイド分画、オキシインドール型アルカロイドの rhynchophylline 及びインドール型アルカロイドの geissoschizine methylether の作用についても検討した。また、Tacrine は 2VO 処置による空間学習行動障害に対して予防作用を有することが報告されており、²¹⁾ 今回の実験では、本実験系を評価する上での対照薬として Tacrine を用いた。

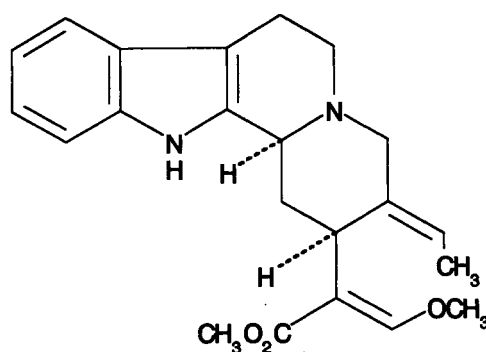
実験材料と方法

(1) 使用動物：ICR 系雄性マウス（7 週齢；日本エスエルシー（株）（静岡））は 1 ケージに 9-10 匹を入れ、12 時間の明暗周期、恒温（25 ± 1℃）恒湿（55 ± 5%）で飼育し、約 1 週間飼育室の飼育環境に慣らした。

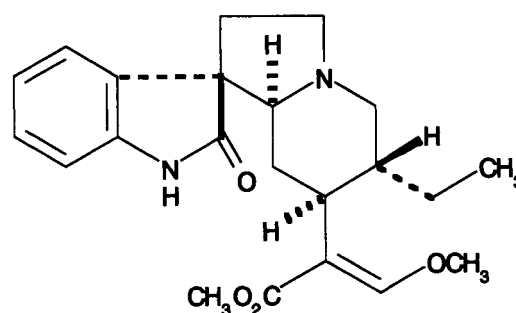
(2) 生薬の調製：釣藤散【石膏 (*Cypsum fibrosum*) 5 g、釣藤鈎 (*Uncariae uncis cum ramulus*) 3 g、菊花 (*Chrysanthemi flos*) 3 g、陳皮 (*Aurantii nobilis pericarpium*) 3 g、人參 (*Ginseng radix*) 3 g、麥門冬 (*Ophiopogonis tuber*) 3 g、防風 (*Saposhnikovia radix*) 3 g、茯苓 (*Hoelen poria*) 3 g、半夏 (*Pinelliae tuber*) 3 g、甘草 (*Glycyrrhizae radix*) 1 g、生姜 (*Zingiberis rhizoma*) 1 g】、釣藤散より釣藤鈎を除いた他の構成生薬の混合物及び釣藤鈎をそれぞれ 10 倍の蒸留水中で、100℃、1 時間加熱抽出し、棉栓で濾過し

た。濾液は液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。抽出率は釣藤散が 27.2%，釣藤鈎なしの釣藤散が 28.6%，釣藤鈎が 13.9%であった。釣藤鈎のアルカロイド分画、インドール型アルカロイド geissoschizine methylether 及びオキシインドール型アルカロイド rhynchophylline は分離、精製したものを使用した。^{3,4)} geissoschizine methylether 及び rhynchophylline の抽出率はそれぞれ 0.0072% 及び 0.012% であった。Geissoschizine methylether 及び rhynchophylline の構造式を Fig. 1 に示す。

(3) 両側総頸動脈の結紮と再開通 (2VO)：Urethane (1.5 g/kg、東京化成、東京) 麻酔下で、マウス (8 週齢) の頸部を切開し、切開口より左右の総頸動脈を注意深く露出し、両動脈を同時に絹製縫合糸で結紮した。また、マウスの尾部の先端より 1 cm を切断し、0.3 ml を瀉血した。結紮 20 分後に、結紮を解放して血流を再開した。両側総頸動脈を結紮後再開通したマウスを 2VO 群とし



Geissoschizine methyl ether



Rhynchophylline

Fig. 1 Chemical structure of geissoschizine methylether and rhynchophylline.

た。また、結紮及び瀉血は行わずに同様の手術を施したマウスを sham 群とした。

(4) 実験装置：直径 70 cm、高さ 28 cm の円形プールを用いた。プールに高さ 13 cm まで水（水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ）をいれた。プールは 4 象限に分け、第 IV 象限に直径 5 cm の円形プラットフォームを固定した。

(5) 空間的学習課題 (Morris water maze)：2VO 処置の 2 日後から、プラットフォームを水面上 1 cm (visible) に設置し、手掛り訓練試行を行い、その翌日からプラットフォームを水面下 1 cm に設置し、獲得訓練試行を行った。60 秒間の訓練試行では、マウスを壁に向けてプールの中へ静かに入れ、プラットフォームに逃避するまでの潜時 (Escape latency) を記録した。1 日 4 試行を 1 Block とし、連続 5 日間行った。その後、探索試行 (probe trial) を行い、プラットフォームをプールから取り除き、マウスをプールに 60 秒間入れ、プラットフォームの存在した第 IV 象限における遊泳時間 (Swimming time in the platform quadrant) を測定した。全ての試行を終了の翌日、プラットフォームを水面上 1 cm (visible) に設置した手掛り訓練試行を再度行った。

(6) 薬物処置：釣藤散、釣藤散より釣藤鈎を除いた他の生薬の混合物、釣藤鈎の水エキスは水に懸濁し、釣藤鈎のアルカロイド分画、アルカロイドの geissoschizine methylether 及び rhynchophylline は CMC で懸濁した

後、それぞれ 2VO 処置の 1 時間前に経口投与した。Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine HCl; Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は生理食塩水に溶解し、2VO 処置の 1 時間前に腹腔内投与した。薬物はマウス 100 グラム体重当たり 1 ml の容量で投与した。

(7) 統計処理：Escape latency は Two-way repeated measure ANOVA で群間の比較を行い、Swimming time in the platform quadrant は Mann-Whitney's U-test で群間の比較を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

1) 一過性脳虚血マウスの水迷路学習行動障害とそれに対する釣藤散水エキスの影響

2VO 処置したマウスでは、水迷路においてプラットフォームに達するまでの潜時は獲得訓練試行 2 及び 3 日目に多少短縮したが、4 及び 5 日目にはそれ以上の短縮は認められず、sham 群に比べると有意に長かった。プラットフォームを除去して行った探索試行では、プラットフォームのあった第 IV 象限における遊泳時間は sham 群よりも有意に短かった (Fig. 2)。

釣藤散水エキス (375–6000 mg/kg, p.o.) を 2VO 処置の 1 時間前に投与しておくと、1500 mg/kg 以上の投与群では獲得訓練試行 3 日目から潜時は sham 対照群と

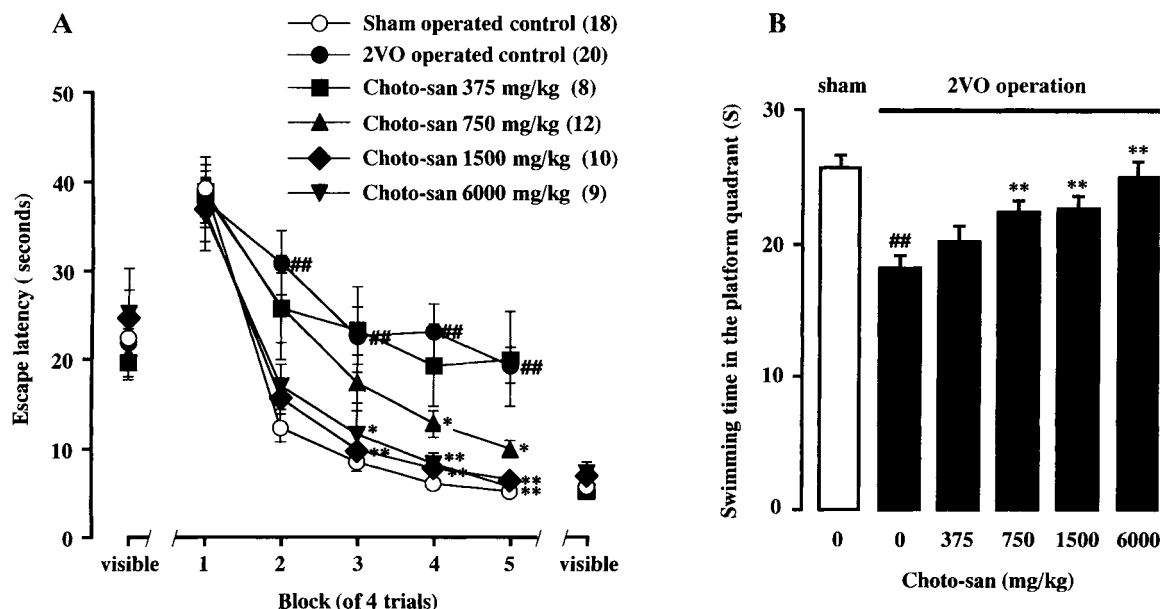


Fig. 2 Effect of Choto-san on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Choto-san was administered 60 minutes before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

同程度まで短縮した。また、750 mg/kg の投与群でも 4 日目から潜時は 2VO 対照群に比べて有意に低下した。探索試行においては、プラットフォームを除去した第IV象限における遊泳時間は 750 mg/kg 以上の投与群で 2VO 対照群に比べ有意に長かった (Fig. 2)。

2) 水迷路学習行動障害に対する釣藤鈎の影響

釣藤散から釣藤鈎を除去した方剤の水エキス (337.5-1350 mg/kg, p.o.) は、前処置した場合、最高用量の 1350 mg/kg 投与群で獲得訓練試行 3 日目から潜時が有意に短縮した。しかし、それ以下の用量群の潜時は 2VO 対照群と比べて有意な差は認められなかった。また、プラットフォームを除去した探索試行では、第IV象限における遊泳時間も 1350 mg/kg 投与群のみが 2VO 対照群より有意に長かった (Fig. 3)。これらの作用は釣藤散水エキスに比べると弱かった。

釣藤鈎水エキス (37.5-600 mg/kg, p.o.) の前処置の場合、75 mg/kg 以上の投与群で獲得訓練試行における潜時が有意に短縮した。また、探索試行では、プラットフォームの無い第IV象限における遊泳時間は 150 mg/kg 以上の投与群において有意に延長した (Fig. 4)。

3) 水迷路学習行動障害に対する釣藤鈎アルカロイド分画, geissoschizine methylether 及び rhynchophylline の影響

釣藤鈎のメタノールエキスから調製したアルカロイド分画 (1 及び 10 mg/kg, p.o.) は 10 mg/kg 投与群において獲得訓練試行 4 及び 5 日目における潜時の有意な短縮と、探索試行のプラットフォーム無しの第IV象限における遊泳時間の有意な延長を生じた (Fig. 5)。アルカロイド成分の一つ geissoschizine methylether (1 及び 10 mg/kg, p.o.) の投与は獲得訓練試行における潜時の短縮は生じたが、探索試行の第IV象限における遊泳時間には有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。もう一つのアルカロイド成分である rhynchophylline (1 及び 10 mg/kg, p.o.) は獲得訓練試行における潜時の有意な短縮と、探索試行のプラットフォーム無しの第IV象限における遊泳時間の有意な延長を生じた (Fig. 7)。

標準薬として使用した Tacrine (1 及び 2.5 mg/kg, i.p.) は高用量投与群で獲得訓練試行における潜時の短縮と、探索試行のプラットフォーム無しの第IV象限における遊泳時間の有意な延長を生じた (Fig. 8)。

本実験では、全ての薬物効果を検討する際に、プラットフォームを水面上に見えるように設置して試行を行ったが、いずれの群間にも差は認められず、マウスの遊泳能力に対して 2VO 処置の影響は無いと考えられた。

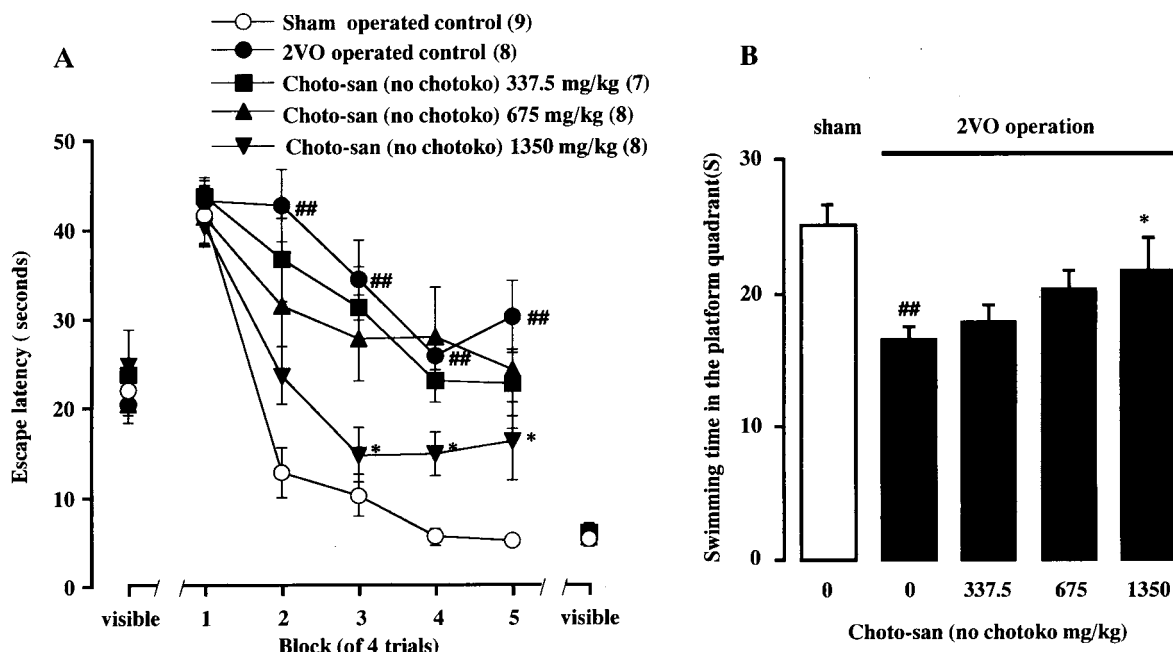


Fig. 3 Effect of Choto-san (without chotoko) on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Choto-san (without chotoko) was administered 60 min before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. * $P < 0.05$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

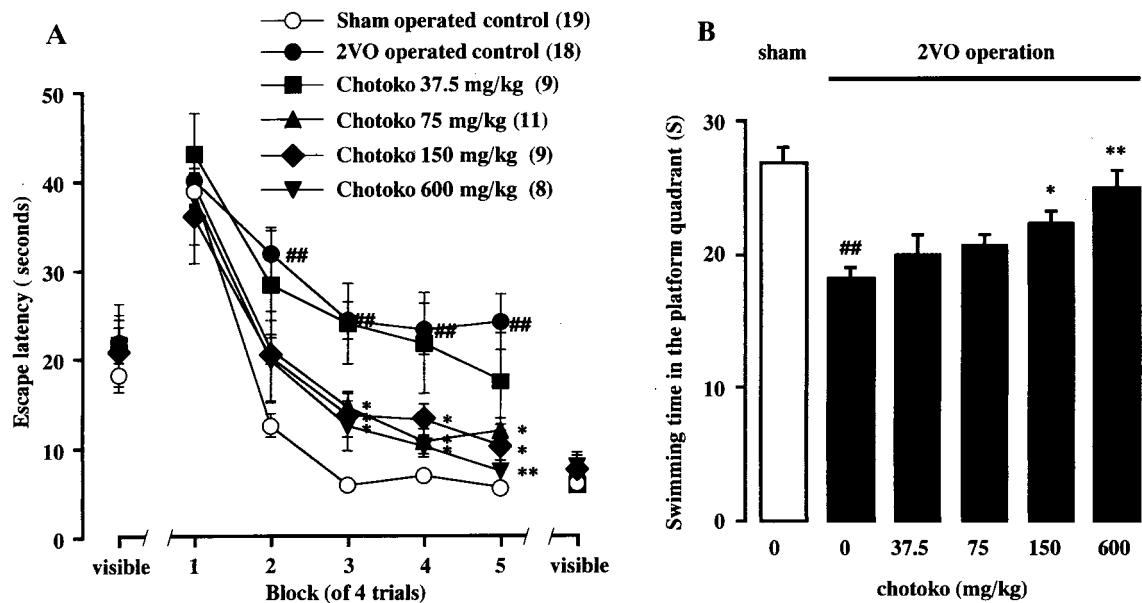


Fig. 4 Effect of Chotoko on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Chotoko was administered 60 minutes before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

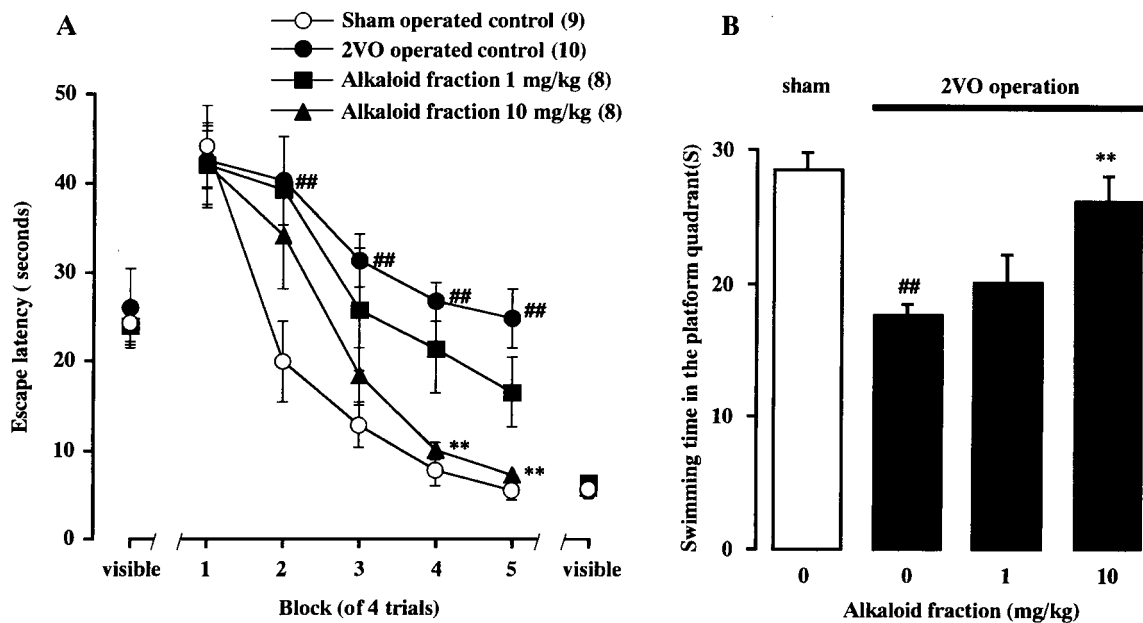


Fig. 5. Effect of Alkaloid fraction of Chotoko on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Alkaloid fraction was administered 60 min before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

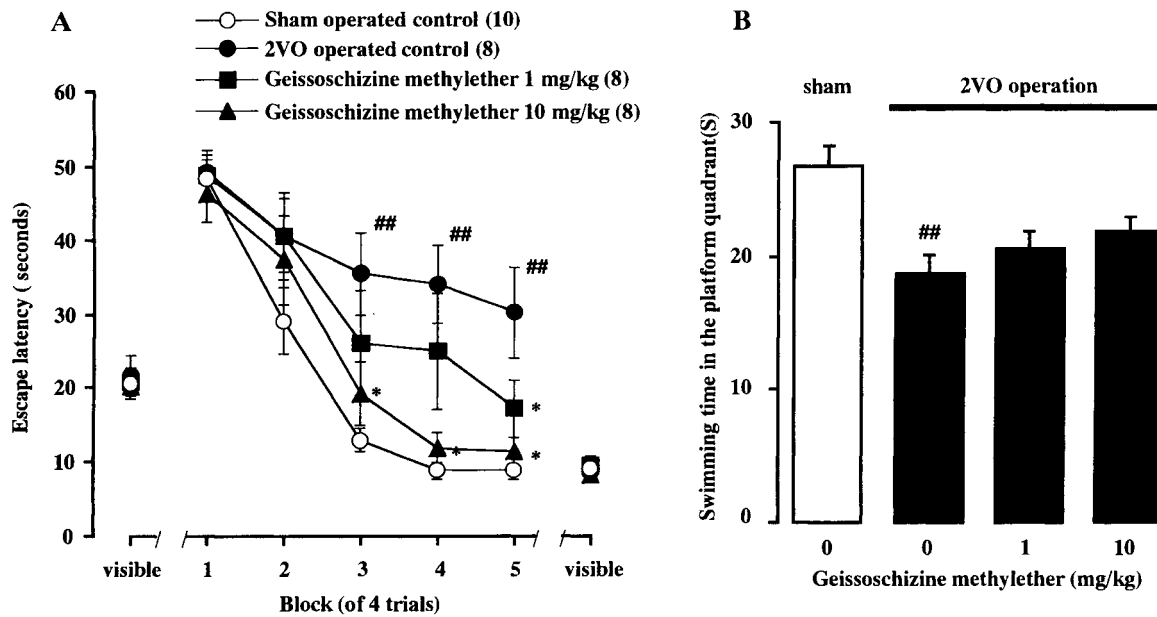


Fig. 6. Effect of geissoschizine methylether on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Geissoschizine methylether was administered 60 min before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group, * $P < 0.05$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

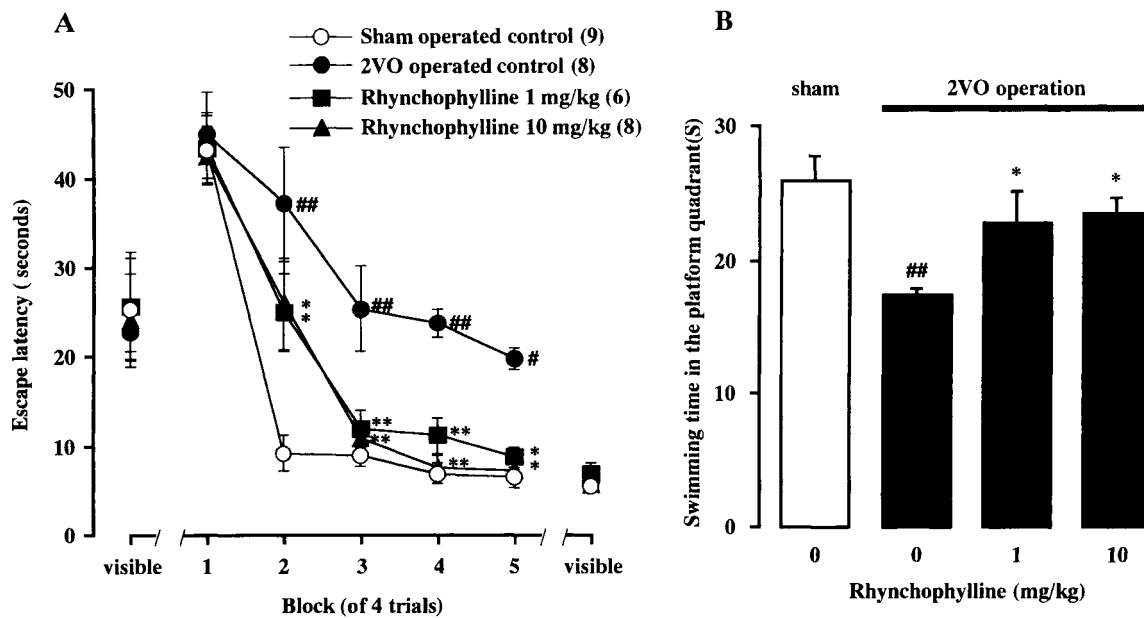


Fig. 7 Effect of rhynchophylline on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Rhynchophylline was administered 60 min before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

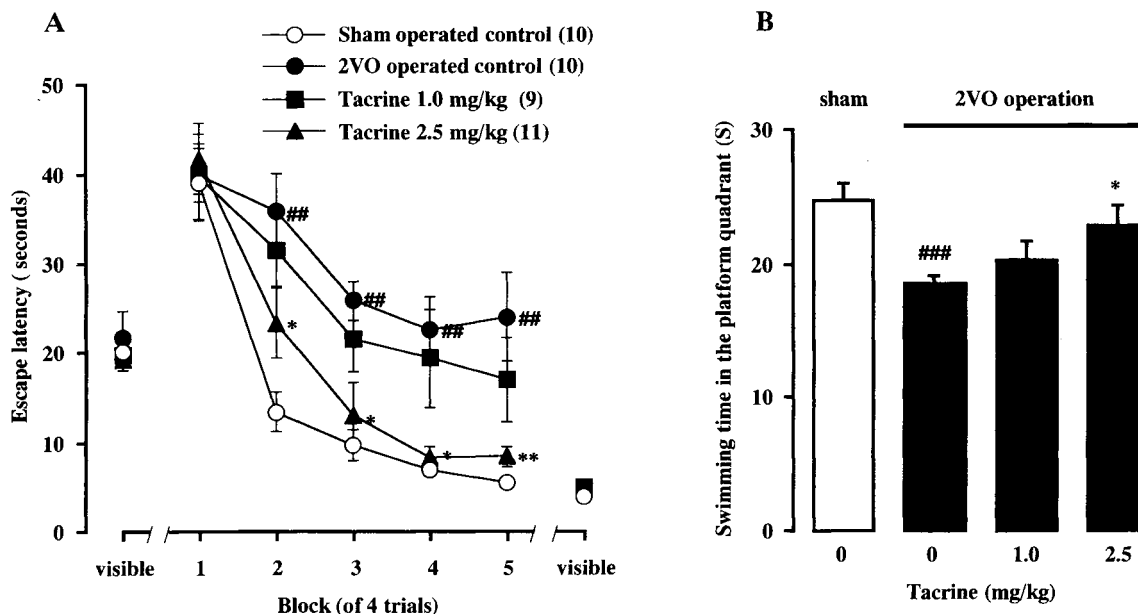


Fig. 8 Effect of tacrine on transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance in ICR mice. A) Tacrine was injected 60 minutes before 2VO. Two days after 2VO, the trial test was performed. Each point represents the mean escape latency with S.E.M. B) During the probe trial, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform quadrant was recorded. Each column represents the mean swimming time in the platform quadrant with S.E.M. ## $P < 0.01$ vs. sham group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. transient cerebral ischemia group alone.

考 察

釣藤散を前処置すると、一過性の脳虚血によって起こるマウスの水迷路学習障害は、予防されることが明らかとなった。この結果は岩崎ら⁵⁾の知見を支持する。また、本研究では、釣藤散構成生薬釣藤鈎及びその有効成分についても検討した。本実験では、用いた釣藤散の用量は「中薬薬理研究方法学」⁶⁾の記載に基づいて計算すると、医療用釣藤散製剤の0.75-12倍であった。釣藤鈎は釣藤散重量の約1/10を占めたため、釣藤鈎は釣藤散1/10の投与量で用いた。

ヒトや動物の脳では血流が一過性の虚血により遮断されると、酸素とグルコースの供給が絶たれるために、神経細胞やグリア細胞は一時的あるいは永久的な障害を受け、学習や記憶の障害を起こす。⁷⁻⁹⁾虚血性脳血管障害をもつヒトでは赤血球集合能亢進、赤血球や白血球変形能の低下が認められるが、¹⁰⁾それらは釣藤散の投与により抑制されることから、釣藤散は脳内の微小血管における血流速度や血流量を増加させ、¹¹⁾虚血性の脳血管障害を改善すると考えられている。

一方、中枢コリン神経系は学習や記憶の機能と密接に関係しており、¹²⁻¹⁵⁾コリンエステラーゼ阻害作用を有するTacrineはスコポラミンで誘発されるラットの空間学

習行動障害を予防し、^{16,17)}前脳虚血により海馬の障害をおこしたラットの受動的回避行動障害や前脳基底部を破壊したラットに見られる空間学習障害を改善すること^{18,19)}が報告されている。一過性の脳虚血処置後に観察されるマウスの空間学習障害はTacrineの前投与により予防された。Tacrineが低酸素の状態でもマウスの生存する時間を有意に延長したことから、²⁰⁾一過性の虚血による学習や記憶の障害を改善したと考えられる。マウス脳内のアセチルコリンの含量は一過性の脳虚血により低下することが既に報告されているが、²¹⁾その低下を防止すると学習行動の障害が予防されるかどうかはまだ明らかにされていない。釣藤散が虚血による脳内アセチルコリン含量の低下にどのような影響を与えるかはまだ検討しておらず、今後の課題である。

興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸は学習記憶に重要な役割を果たしていると考えられているが、一過性の脳虚血状態ではグルタミン酸が神経終末から過剰に遊離され、シナプス後膜ではグルタミン作動性のイオンチャネルや膜電位依存性イオンチャネルが開くために、細胞外から Ca^{2+} が流入すると共に細胞内小胞体から Ca^{2+} の流出が起こる。その結果、細胞内の Ca^{2+} 濃度が著しく上昇し、細胞死に誘導されると考えられている。^{22,23)}培養した小脳顆粒細胞にみられるグルタミン酸による細胞死は釣藤散の適用により抑制される傾向にあ

り, 主たる構成生薬である釣藤鈎に抑制作用が認められた。²⁴⁾ この報告では釣藤散や釣藤鈎は, 脳虚血によるグルタミン酸の過剰な遊離を抑制する可能性が考えられている。一方, 釣藤散ならびに釣藤鈎は Δ^9 -tetrahydrocannabinolで誘発した空間学習障害を改善したことから,²⁵⁾ 釣藤散及び釣藤鈎はセロトニン神経系にも関与することも考えられる。

今回の研究結果では, 釣藤散から釣藤鈎を除いた方剤エキスにも脳虚血に対する予防効果が認められた。この結果から, 他の生薬が予防作用を有することが示唆された。釣藤散の構成生薬の一つ人参は脳虚血による学習行動障害に対して予防作用を有することから,²⁶⁾ 人参が釣藤散の効果に寄与する可能性が考えられた。しかし, 釣藤散より釣藤鈎を除くと, 予防作用が著しく減弱したことから, 釣藤散の効果の主な部分は釣藤鈎の作用に由来すると考えられる。一過性の脳虚血と再開通により活性酸素やフリーラジカルが産生され, そのために神経細胞死が起こることが報告されている。^{27, 28)} 釣藤鈎には強い抗酸化作用やフリーラジカル除去作用のあることが報告されており,²⁹⁾ 一過性脳虚血によって起こる空間学習障害を予防する釣藤鈎の作用はそれらが担っている可能性もある。

釣藤鈎には rhynchophylline や isorhynchophylline などのオキシインドール型アルカロイドと, geissoschizine methylether, hirsutine, hirsuteine などのインドール型アルカロイドが含有されているが, 釣藤鈎アルカロイド分画は今回の研究で一過性の脳虚血によって起こる空間学習障害を抑制した。同分画から得られた geissoschizine methylether と rhynchophylline も共に学習障害を予防した。Rhynchophylline はグルタミン酸で誘発される細胞死を抑制し,³⁰⁾ ニコチン受容体遮断作用をもつ mecamylamine の投与によって起こる受動的回避学習障害を抑制したという報告がある。³¹⁾ Rhynchophylline の作用に関しては, それらの作用機序に的を絞った研究が必要である。Geissoschizine methylether が脳虚血に影響するかどうかの報告はなされておらず, 今回初めて脳虚血による空間学習障害を予防することを示した。しかし, geissoschizine methylether はプールからプラットフォームを除去した試行においては明確な予防作用を示さなかった。Geissoschizine methylether はセロトニン受容体阻害作用を有することが報告されており,^{32, 33)} 脳虚血予防作用に寄与すると考えられる。5-HT_{2C} 受容体ノックマウスは, 獲得試行においては, プラットフォームに逃避するまでの潜時が短くなるもの, プラットフォームなしの試行では, プラットフォームが存在した象限における遊泳時間は対照群に比べ短いことが報告されてい

る。³⁴⁾ 今回の実験でも, 類似した結果が得られたため, geissoschizine methylether はセロトニン 5-HT_{2C} 受容体を部分的に遮断する可能性が考えられ, rhynchophylline とは作用態度が異なることが推定された。

以上, 釣藤散及びその主薬である釣藤鈎, 釣藤鈎に含まれるアルカロイド成分はいずれも一過性の脳虚血処置によって起こるマウスの空間学習障害を予防した。

謝 辞

本研究は文部科学省地域先端研究および文部科学省科学研究費 (No.13470512) によって行われたものである。また, 実験者の援助をしていただいた (財) 日中医学協会及び (財) 平和中島財団に深謝致します。

*〒930-0194 富山市杉谷 2630

富山医科薬科大学和漢薬研究所 渡辺裕司

References

- 1) Shimada, Y., Terasawa, K., Yamamoto, T., Maruyama, I., Saito, Y., Kanaki, E., Takaori, S.: A well-controlled study of Choto-san and placebo in the treatment of vascular dementia. *J. Trad. Med.* **11**, 246-255, 1994.
- 2) Terasawa, K., Shimada, Y., Kita, T., Yamamoto, T., Tosa, H., Tanaka, N., Saito, Y., Kanaki, E., Goto, S., Mizushima, N., Fujioka, M., Takase, S., Seki, H., Kimura, I., Ogawa, T., Nakamura, S., Araki, G., Maruyama, I., Maruyama, Y., Takaori, S.: Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo controlled study. *Phytomedicine*. **4**, 15-22, 1997.
- 3) Sakakibara, I., Terabayashi, S., Kubo, M., Higuchi, M., Komatsu, Y., Okada, M., Taki, K., Kamei, J.: Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants. *Phytomedicine*. **6** (No. 3), 163-168, 1999.
- 4) Yamanaka, E., Kimizuka, Y., Aimi, N., Sasaki, S., Haginiwa, J.: Studies of plants containing indole alkaloid. IX. Quantitative analysis on the tertiary alkaloid in various parts of *Uncaria rhynchophylla* Miq. *Yakugaku Zasshi*. **103** (No.10), 1028-1033, 1983.
- 5) Iwasaki, K., Okami, Y., Ueki, S., Fujiwara, M.: Oren-gedoku-to and Choto-san improve the disruption of spatial cognition in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*. **8**, 476-477, 1991.
- 6) Chen, Q. (ed) Methodology in pharmacological study of Chinese traditional medicine. People's Medical Publishing House, page 33, 1994.
- 7) Gorelick, P.B.: Status of risk factors for dementia associated with stroke. *Stroke*. **28**, 459-463, 1997.
- 8) Nyenhuis, D.L., Gorelick, P.B.: Vascular dementia: a contemporary review of epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. *J. American Geriatrics Society*. **46**, 1437-1448, 1998.
- 9) Tatemichi, T.K., Desmond, D.W., Paik, M., Figueroa, M., Gropen, T.I., Stern, Y., Sano, M., Remien, R., Williams, J.B., Mohr, J.P.: Clinical determinants of dementia related to stroke. *Annals of Neurology*. **33**, 568-575, 1990.

- 10) Honda, E.: Hemorheology in cerebral infarction. *Nippon Biorheology Gakkaishi*. **10**, 23-36, 1996. (in Japanese)
- 11) Yang, Q., Kita, T., Hikiami, H., Shimada, Y., Itoh, T., Terasawa, K.: Effects of Choto-san on microcirculation of the bulbar conjunctiva and hemorheological factors in the patients with asymptomatic cerebral infarction. *J. Trad. Med.* **15**, 412-413, 1998.
- 12) Coyle, J.T., Price, D.L., Delong, M.R.: Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*. **219**, 1184-1190, 1983.
- 13) Davis, P., Maloney, A.J.: Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. **2**, 1403, 1976.
- 14) Drachman, D.A., Leavitt, J.: Human memory and cholinergic system: A relationship to aging? *Arch Neurol*. **30** (No.2), 113-121, 1974.
- 15) Drachman, D.A.: Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology*. **27** (No.8), 783-790, 1977.
- 16) Jackson, J.J., Soliman, M.R.I.: Effect of Tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. *Life Sciences* **58** (No.1), 47-54, 1996.
- 17) Akazawa, K., Matsumoto, K., Shimizu, M., Ichiki, H., Maruno, M., Watanabe, H.: Effects of paeoniflorin and paeoniflorin-related glycosides on scopolamine-induced disruption of radial maze performance in rats. *J. Trad. Med.* **13**, 243-247, 1996.
- 18) Nabeshima, T., Maruyama, E., Katoh, A., Kameyama, T.: The effect of tacrine (THA) on cycloheximide- and basal forebrain lesion-induced memory deficit in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **57** (No. 3), 311-319, 1991.
- 19) Ni, J.W., Ohta, H., Matsumoto, K., Watanabe, H.: The beneficial effect of Hakushijin (Biota) and Hakushijin-gan on experimental spatial cognitive deficits in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*. **10**, 118-125, 1993.
- 20) Ono, S., Kitamura, K., Maekawa, M., Hirata, K., Ano, M., Ukai, W., Yamafuji, T., Narita, H.: Protective effect of R(-)-1-(Benzo[b]thiophen-5-yl)-2-[2-(N,N-diethylamino)ethoxy]ethanol Hydrochloride (T-588), a novel cerebral activator, against experiment cerebral anoxia. *Jpn. J. Pharmacol.* **62**, 81-86, 1993.
- 21) Xu, J., Murakami, Y., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H., Zhang, S., Yu, Q., Shen, J.: Protective effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. *J. Ethnopharmacol.* **73** (No.3), 405-413, 2000.
- 22) Meldrum, B., Garthwaite, J.: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **11** (No. 9), 379-387, 1990.
- 23) Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., Diemer, N.H.: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochemistry*. **43** (No.5), 1369-1374, 1984.
- 24) Shimada, Y., Hashiba, M., Goto, H., Kogure, T., Shibahara, N., Itoh, T., Terasawa, K.: Protective effect of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced acute neuronal death in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Trad. Med.* **15**, 241-244, 1998.
- 25) Egashira, N., Iwasaki, K., Ueki, S., Kurauchi, K., Fujiwara, M.: Choto-san and Yoku-kan-san-ka-chimpi-hange improve the disruption of spatial cognition in rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **10**, 190-194, 1993.
- 26) Xuejiang, W., Magara, T., Konishi, T.: Prevention and repair of cerebral ischemia-reperfusion injury by Chinese herbal medicine, shengmai san, in rats. *Free Radical Research*. **31** (No. 5), 449-455, 1999.
- 27) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Oda, T., Niinobe, M., Hata, R., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., Maeda, H., Mikoshiba, K., Kamada, T.: Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience* **35**, 551-558, 1990.
- 28) Nakagomi, T., Sakai, T., Kirino, T., Tamura, A., Noguchi, M., Saito, I., Takakura, K.: Effect of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Stroke* **20**, 925-929, 1989.
- 29) Liu, J., Mori, A.: Pretreatment with Tenma and chotoko extracts on striatal monoamines and lipid peroxides in iron-induced acute epileptic rats. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*. **9**, 202-208, 1992.
- 30) Shimada, Y., Goto, H., Itoh, T., Sakakibara, I., Kubo, M., Sasaki, H., Terasawa, T.: Evaluation of the protective effects of Alkaloid isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 715-722, 1999.
- 31) Abdel-Fattah Mohamed, A.F., Matsumoto, K., Tabata, K., Takayama, H., Kitajima, M., Aimi, N., Watanabe, H.: Effects of *Uncaria tomentosa* Total Alkaloid and its Components on Experimental Amnesia in Mice: Elucidation Using the Passive Avoidance Test. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 1553-1561, 2000.
- 32) Kanatani, H., Kohda, H., Yamasaki, K., Hotta, I., Nakata, Y., Segawa, T., Yamanaka, E., Aimi, N., Sakai, S.: The active principles of the branchlet and hook of *Uncaria sinensis* Oliv. examined with a 5-hydroxytryptamine receptor binding assay. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 401-404, 1985.
- 33) Yamawaki, N.: Effect of Choto-san and Yokukan-san on central serotonin receptor. *Kanpo igaku*. **10** (No. 9), 20-25, 1986.
- 34) Tecott, L.H., Logue, S.F., Wehner, J.M., Kauer, J.A.: Perturbed dentate gyrus function in serotonin 5-HT_{2C} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 15026-15031, 1998.