

赤血球変形能に対する桂枝茯苓丸の作用

織田真智子, 阿部 博子*, 有地 滋

近畿大学 東洋医学研究所

Effects of Keishibukuryo-gan on erythrocyte deformability

Machiko SAKAGUCHI, Hiroko ABE* and Shigeru ARICHI

The Research Institute of Oriental Medicine

Kinki University

(Received July 19, 1984)

Abstract

The action of Keishibukuryo-gan on erythrocyte deformability in young and aged rats was studied. In addition, the effects on changes of erythrocyte deformability caused by a high cholesterol diet were also examined.

Keishibukuryo-gan caused the increase of erythrocyte deformability in both young and aged rats. High cholesterol diet did not affect the deformability of erythrocyte in young rats but caused the decrease in aged rats. Keishibukuryo-gan inhibited the decrease of deformability in aged rats fed on a high cholesterol diet. Moreover, administrations of Keishibukuryo-gan resulted in the decrease in hypotonic hemolysis and the slight decrease of surface negative charge in rat erythrocytes but did not affect ATP level and lipid composition of membranes.

Keywords Aging, Erythrocyte deformability, Cholesterol, Heat-induced hemolysis, Hypotonic hemolysis, Keishibukuryo-gan

Abbreviation Keishibukuryo-gan (Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan); 桂枝茯苓丸

緒 言

1960年代, 血液の流動性を理論的に扱う科学としてヘモレオロジーの分野が確立され, 血液循環の病態生理も次第に明らかにされつつある。ことに毛細血管を場とした微小循環の研究は, 近年著しく発展して来ている。

毛細血管を場としての微小循環は血液—組織間のガス交換, 物質交換を直接支配し, 血液循環の最も本質的な部分を構成している。この微小循環における血液の流動性を支配する血液側の因子としては, ヘマトクリット値, 赤血球の変形能, マクログロブリンやフィブリノーゲンなどの血漿蛋白組成などいくつかのものが考えられるが, この中でもヘマトク

リット値や赤血球変形能が支配的な重要因子であるとされている¹⁾。ことに赤血球の直径より極めて細い毛細血管を血液が通過するためには赤血球の生理的変形が不可欠であり, 赤血球の変形する能力は微小循環を基本的に支配すると考えられる。

赤血球変形能の低下は血液疾患での異常赤血球や各種慢性疾患患者の赤血球で認められるのみならず, 加齢によっても明らかな低下²⁾を示し, 老化における興味ある現象^{3,4)}の一つとして重視されつつある。

一方, 漢方には, 不安, 不眠などの精神神経症状, 月経不順, 更年期障害, 皮膚の荒れ, 舌の暗紫色化, 下腹部圧痛や抵抗など臨床的に様々な症状を示す“瘀血証”と呼ばれる病態があり, この“瘀血”症状に対して, 桃核承気湯, 桂枝茯苓丸, 八味

* 〒589 大阪府南河内郡狭山町西山380
380, Nishiyama, Sayama-cho, Minamikawachi-gun,
Osaka, 589, Japan

丸などの漢方薬、いわゆる“駆瘀血剤”が処方される。この“瘀血”が西洋医学的にどのような病態であるかについては、十分に明らかにされていないが、その背景因子の一つに末梢循環障害のあることが推測される。

本研究では、駆瘀血剤の一つである桂枝茯苓丸の赤血球変形能に対する作用を、若年ラット、老令ラットを用いて検討すると共に、高コレステロール食による赤血球変形能、表層荷電、ATPレベルなど赤血球諸性質の変化や、これらの変化に対する桂枝茯苓丸の作用を検討した。

材料と方法

実験動物と飼料：Wistar系雄性ラット、6週令（体重約120g：若年ラットと略）と30週令（体重約400g：老令ラットと略）を各々以下の4群に分け、1群12匹として実験を行った。第1群：通常粉末飼料（CE2，日本クレア製）投与群，第2群：通常粉末飼料と桂枝茯苓丸投与群，第3群：高コレステロール飼料（普通粉末飼料に2%コレステロール添加）投与群，第4群：高コレステロール飼料と桂枝茯苓丸投与群として、各飼料を6週間自由摂取させた。

桂枝茯苓丸は桂枝（広南）、茯苓（中国）、牡丹皮（大和）、桃仁（中国）、芍薬（大和）の各生薬の粉末を等量ずつ混合し、粉末飼料中に5%の割合で添加した。

血清脂質の測定：軽エーテル麻酔下で、頸静脈より採血した血液から血清を分離し、酵素法（和光純薬工業株式会社製、測定用キット使用）により、血清中の総コレステロール、遊離コレステロール、トリグリセライド、リン脂質を測定した。

赤血球数と平均赤血球容積の測定：東亜医用電子株式会社製、Sysmex Microcell Counter CC-150を用いて、血球数、ヘマトクリット値、平均赤血球容積(MCV)を測定した。

赤血球変形能の測定：Nagasawa^{5,6)}によるcapillary tube centrifugal methodの変法を用いた。

採血直後の全血30 μ lをEagle Medium (pH7.2) 10 ml中に混和する。100 μ lのmicro pipettes (Drummond Scientific Company)の最下層に1%グルタルアルデヒド液を置き、中間層にリン酸緩衝液を、最上層に赤血球浮遊液を重層してヘマトクリット用遠心器で約20秒遠心する。最下層に集まったグルタルアルデヒドで固定された赤血球を位相差顕微鏡、あるいは走査電子顕微鏡で観察し、その長径を計測

して変形能とした。

低張溶血率⁷⁾、熱溶血率の測定：生理食塩水で洗浄した赤血球を56mMのNaClを含む10mMリン酸緩衝液中で10分（室温）インキュベートし、遠沈後上清の吸光度（540nm）から全溶血に対する百分率を算出し、溶血率とした。熱溶血率は洗浄赤血球を等張緩衝液に浮遊させ、54.5℃、20分インキュベートし、遠心後その上清の吸光度を測定した。

赤血球素層荷電の測定：Particle Micro Electrophoresis Apparatus Mark II (Rank Brothers社製)によって赤血球の電気泳動速度を測定し、表層荷電の算出を行った。泳動用メディウムとしてはZeiller and Hannig Medium⁸⁾を改良したもの(15mM triaminomethane, 10mM glucose, 4mM Pottassium acetate, 240mM glycine, 30mM sucrose, pH7.2, osmotic pressure 308mOs/kg, Specific conductance 0.122Mho/M at 25°)を用い、両極間電流200 μ A、電圧40Vの条件で測定した。

赤血球膜脂質：柴田らの方法⁹⁾に従い、イソプロパノール、クロロホルムで赤血球膜脂質を抽出し、酵素法（和光純薬株式会社測定用キット使用）でコレステロール、リン脂質を定量した。

赤血球ATP含量の測定：採血後、すみやかに氷令下で洗浄した赤血球のATP含量を、ペーリンガー・マンハイム社製測定用キットを用いて測定した。

結 果

(1) 飼料摂取量および体重増加率

若年ラット、老令ラット共に、通常飼料に比べて高コレステロール食群で摂取量の増加傾向を示したが有意の差はなく、また桂枝茯苓丸の投与による飼料摂取量の変化は認められなかった。老令ラットでは、実験開始2週間後は各群共に摂取量の低下を示したが3週間からは20g/日/匹前後の安定した値を示し、各群間での著明な差は認められなかった。

若年ラットでは実験終了時の体重が開始時の約2倍に増加したが、各群間で体重増加率に差は認められなかった。老令ラットでは実験期間中の体重増減がなく、また各群の間でも差は認められなかった。

(2) 血清及び血液学的一般所見

血清脂質：若年ラットでは、血清中の総コレステロール、遊離コレステロール、リン脂質値共に、対照群に対して高コレステロール群で有意の増加を示した。しかし、トリグリセライド値の有意な増加は認められなかった。対照老令ラットの血清総コレス

テロール、遊離コレステロール値は若年ラットに比べて有意に高値を示しており、コレステロールの負荷によってそれらの値はさらに著明な増加を示した。また、トリグリセライド値も有意に増加を示したが、リン脂質の増加は認められなかった。桂枝茯

苓丸は、トリグリセライド値上昇をやや抑制する傾向を示したが、総コレステロール値、遊離コレステロール値に対しては、いずれの群においても有意の作用を示さなかった (Table I)。

Table I Effects of cholesterol or Keishibukuryo-gan on serum lipids

	Total cholesterol (mg/dl)	Free cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)
Young rat				
Control diet	50.1±2.2	8.4±0.6	131.0±8.3	134.1±7.5
Control diet with Keishibukuryo-gan	49.5±2.2	8.1±0.5	122.3±7.3	133.6±9.1
High cholesterol diet	65.2±3.1***	10.7±0.7**	146.8±11.7	177.3±14.4**
High cholesterol diet with keishibukuryo-gan	66.5±3.5***	10.8±0.7**	122.5±6.2	163.8±16.0
Aged rat				
Control diet	84.2±7.0	16.3±1.6	150.2±9.5	135.0±6.7
Control diet with Keishibukuryo-gan	77.7±4.5	14.6±1.1	139.1±6.5	135.0±5.6
High cholesterol diet	119.1±7.2**	21.0±1.5*	253.4±15.8***	153.1±8.2
High cholesterol diet with Keishibukuryo-gan	117.0±10.7**	19.4±1.8	225.0±16.4***	148.0±8.7

All values present the mean ± S.E.

* P < 0.05, ** P < 0.025, *** P < 0.001 : Significant difference from control

Table II Hematologic data

	RBC (×10 ⁴ /mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Ht (%)	MCV (μ ³)
Young rat				
Control diet	709±13	14.9±0.2	35.8±0.8	50.0±0.5
Control diet with Keishibukuryo-gan	726±18	15.4±0.1	36.3±0.8	49.8±0.2
High cholesterol diet	713±12	15.4±0.1	36.0±0.6	49.8±0.2
High cholesterol diet with keishibukuryo-gan	715±14	15.3±0.1	36.3±0.6	50.3±0.3
Aged rat				
Control diet	812±11	15.9±0.1	40.5±0.6	49.4±0.5
Control diet with Keishibukuryo-gan	770±14	15.1±0.1	38.2±0.8	49.1±1.0
High cholesterol diet	785±10	16.0±0.1	38.4±0.6	48.4±0.3
High cholesterol diet with Keishibukuryo-gan	767±15	16.0±0.1	37.4±0.9	48.3±0.3

All values present the mean ± S.E.

血液学的所見：若年ラットでは赤血球数，平均赤血球容積，ヘモグロビン値，ヘマトクリット値いずれにおいても各群間に有意の差は認められなかった。老令ラットでは，高コレステロール食群で赤血球数の減少傾向が見られたが，有意の差はなく，平均赤血球容積，ヘモグロビン値，ヘマトクリット値でも各群で差は認められなかった (Table II)。

(3) 赤血球の諸性質

赤血球変形能：老令ラットの赤血球変形能はコレステロール負荷によって低下傾向を示すが，若年ラットでは変化は認められなかった。桂枝茯苓丸は若年および老令ラットのいずれにおいても赤血球変形能の増加をもたらした，また老令ラットの高コレステロール食による変形能低下を有意に抑制した。

低張溶血率：低張液に対する赤血球の抵抗性は，若年ラットより老令ラットで低下するが，コレステロールの負荷によって若年および老令ラットのいずれにおいても抵抗性はむしろ増大した。桂枝茯苓丸の投与はいずれのラットにおいても低張液に対する抵抗性を強化する傾向を示し，特に若年ラットの普通食投与群で有意の作用が認められた。

熱溶血率：熱溶血率では若年ラットと老令ラットの間に差は認められないが，コレステロールの負荷によっていずれのラットでも熱溶血率はやや増加傾向を示した。しかし，桂枝茯苓丸は熱溶血率に対して全く変化をもたらさなかった。

赤血球表層膜荷電：老令ラットの赤血球泳動速度は，若年ラットに比べて著しく速く，赤血球表層の負荷電量の加齢に伴う増加が認められた。老令ラッ

トに高コレステロール食を投与すると，表層荷電はさらに増加するが，若年ラットでは特に変化は見られなかった。桂枝茯苓丸の投与は若年，老令いずれのラットでも赤血球表層荷電の減少をもたらした，老令高コレステロール食群のラット赤血球表層荷電の

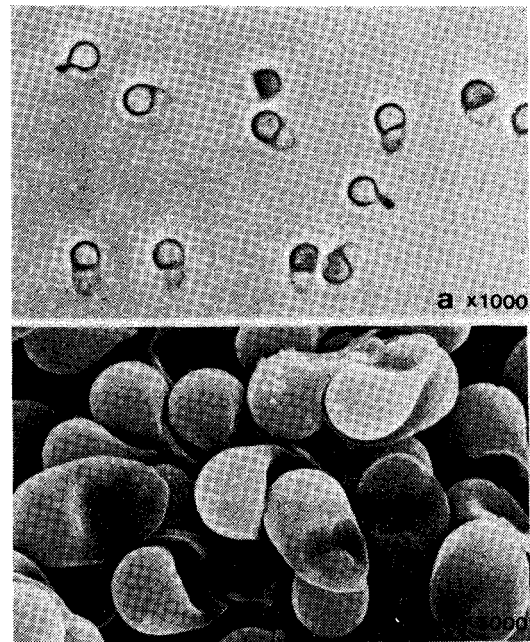


Fig. 1 (a) The phase contrast micrograph of deformed erythrocyte

(b) The scanning electronmicrograph of deformed erythrocyte

Table III Effects of cholesterol or Keishibukuryo-gan on deformability, fragility, surface charge, ATP level and membrane lipids of erythrocytes

	Deformability (μ)	Hypotonic hemolysis (%)	Heat-induced hemolysis (%)	Electrophoretic mobility (μ m/sec/V/cm)	ATP (μ mole/ 10^{10} RBC)	RBC membrane	
						Cholesterol (mg/ 10^{10} RBC)	Phospholipid (mg/ 10^{10} RBC)
<i>Young rat</i>							
Control diet	6.96 ± 0.04	42.8 ± 1.9	45.9 ± 2.9	2.21 ± 0.02	0.67 ± 0.03	1.09 ± 0.02	1.57 ± 0.02
Control diet with Keishibukuryo-gan	$7.18 \pm 0.08^{**}$	$37.6 \pm 1.5^{*}$	47.2 ± 2.5	2.18 ± 0.02	0.66 ± 0.02	1.11 ± 0.02	1.59 ± 0.02
High cholesterol diet	6.91 ± 0.08	$33.7 \pm 2.4^{**}$	52.7 ± 2.6	2.20 ± 0.02	0.68 ± 0.02	1.11 ± 0.01	1.62 ± 0.02
High cholesterol diet with Keishibukuryo-gan	7.13 ± 0.09	$29.5 \pm 2.6^{***}$	54.4 ± 2.7	2.16 ± 0.02	0.70 ± 0.02	1.02 ± 0.09	1.60 ± 0.02
<i>Aged rat</i>							
Control diet	6.90 ± 0.05	47.0 ± 2.2	45.3 ± 3.3	2.38 ± 0.01	0.47 ± 0.03	1.06 ± 0.03	1.49 ± 0.03
Control diet with Keishi- bukuryo-gan	$7.06 \pm 0.04^{*}$	41.7 ± 2.2	48.4 ± 3.0	2.36 ± 0.02	0.48 ± 0.01	1.08 ± 0.01	1.49 ± 0.02
High cholesterol diet	6.79 ± 0.05	44.0 ± 2.4	52.6 ± 3.1	2.42 ± 0.02	0.53 ± 0.02	$1.15 \pm 0.02^{*}$	1.55 ± 0.01
High cholesterol diet with Keishibukuryo-gan	$7.03 \pm 0.05^{\dagger}$	$39.6 \pm 1.7^{**}$	$55.2 \pm 2.3^{**}$	2.38 ± 0.02	0.58 ± 0.03	$1.14 \pm 0.01^{**}$	1.57 ± 0.02

*P < 0.05, **P < 0.025, ***P < 0.001 : Significant difference from control

$\dagger$ P < 0.005 : Significant difference for high cholesterol diet

上昇を抑制した。

赤血球膜脂質組成：老令ラットではコレステロールの負荷によって赤血球膜のコレステロール含量の有意な増加が認められたが、若年ラットではコレステロール負荷による影響は見られなかった。リン脂質含量は若年ラットに比べて老令ラットで一般に低下の傾向が認められたが、コレステロール食による影響は見い出されなかった。また桂枝茯苓丸は若年、老令いずれのラットでもこれらの脂質組成に有意の作用を示さなかった (Table III)。

赤血球ATP含量：老令ラットの赤血球では若年ラットに比べてATP含量の著明な低下を示した。また老令ラットの高コレステロール食群のATP含量では、普通食群ラット赤血球に比べて増加の傾向を示し、桂枝茯苓丸の投与によってさらに増加するが、有意差は認められなかった。若年ラットでは高コレステロール食、桂枝茯苓丸いずれも赤血球ATP含量に変化をもたらさなかった。

考 察

漢方における瘀血証は、自律神経系、内分泌系、代謝系、免疫系などに関連した極めて広汎な症状を総括した症候群であり¹⁰⁾、その病態を単一の角度から把握することは困難であるが、その重要な背景因子として末梢循環障害の存在が考えられる。従って、駆瘀血剤に末梢循環を改善する作用のある可能性が強く示唆され、駆瘀血剤の末梢循環に対する作用の解明は薬理学的にも、また臨床的にも極めて興味深い問題である。

駆瘀血剤の一つとして本研究で用いた桂枝茯苓丸は若年ラット、老令ラットの赤血球変形能をいずれも増加させると共に、老令ラットにコレステロールを負荷した場合の赤血球変形能の低下を抑制する。従来、生体膜のコレステロールとリン脂質の比、C/P比が膜流動性と密接な関連性を示すことが知られている^{11,12)}。本研究での若年、老令ラット赤血球の脂質含量を見ると、コレステロール含量は若年、老令ラット間に差は認められないが、老令ラット赤血球のリン脂質はやや低下の傾向を示しており、赤血球膜の流動性が加齢によって低下している可能性が示唆される。しかし、膜流動性の変化と変形能との関連性については否定的な考えもあり、また桂枝茯苓丸が脂質組成に全く作用しないという事実も、赤血球変形能には脂質組成以外の要因がより大きな役割を果たしていることを示唆している。

赤血球変形能を低下させる他の重要な因子とし

て、赤血球のATPレベルの低下が報告¹³⁾されており、本研究における若年ラットと老令ラットの赤血球の比較でも、変形能の低下と共にATPレベルの低下が認められている。現在、微小循環改善薬として臨床的に使用されているPentoxifyllinは*in vitro*, *in vivo*いずれにおいても赤血球ATPレベルを上昇させ、赤血球変形能を改善することが知られている¹⁴⁾。桂枝茯苓丸は赤血球ATPレベルに対して有意の作用を示しておらず、桂枝茯苓丸による赤血球変形能の改善はPentoxifyllinとは明らかに異なるメカニズムによると推測される。しかし、その作用機作の詳細は赤血球変形能増減のメカニズムと同様に、まだ推測の域を脱していない。本研究で得られた赤血球表層荷電の変化が変形能の変化と対応しているという結果や、近年、細胞中のマイクロフィラメントや微小管などアクチン系物質が細胞の各種機能や構築の維持に重要であるという報告¹⁵⁾を考慮すると、赤血球の変形能やそれに対する桂枝茯苓丸の作用もまた、この様な観点から詳細に検討される必要があるように思われる。

謝辞：本研究に御助力頂きました津村順天堂に感謝致します。

文 献

- 1) Charm, S.E. and Kurland, G.S.: Viscosity in Clinical Medicine. In "Blood Flow and Microcirculation (Ed. by S.E.Charm and G.S. Kurland), John Wiley and sons, New York, pp. 189-238, 1974
- 2) Abe, H., Orita, M. and Arichi, S.: Erythrocyte deformability in ageing. *Mech. Ageing Dev.*, in press.
- 3) Choy, Y.M., Wong, S. L. and Lee, C. Y.: Changes in surface carbohydrates of erythrocytes during *in vivo* ageing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 410-415, 1979
- 4) Detraglia, M., Cook, F.B., Stasiw, D.H. and Cerny, L.C.: Erythrocyte fragility in ageing. *Biochem. Biophys. Acta* **345**, 213-219, 1974
- 5) Nagasawa, T., Sarashi, A. and Kojima, S.: A capillary tube centrifugal method for the measurement of cellular deformability. *Osaka City Med. J.* **26**, 1-6, 1980
- 6) Nagasawa, T.: Deformation of transforming red cells in various pH solutions. *Experientia* **37**, 977-978, 1981
- 7) Seeman, P. and Weinstein, I.: I. Erythrocyte membrane stabilization by tranquilizers and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1737-1752, 1966
- 8) Zeiller, K. and Hannig, K.: Evidence for specific organ distributions of lymphoid cells. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. chem.* **352**, 1162-1167, 1971
- 9) 柴田 進, 武元良整, 柴田和子: Iatrosanの赤血球膜脂質

- 分析への応用. *Clinical Laboratory* 21, 837-844, 1980
- 10) 大塚恭男: 東洋医学における証とは一特に瘀血を中心として一. 治療学 10, suppl. 8-12, 1983
- 11) Shattil, S.J. and Cooper, R.A.: Membrane microviscosity and human platelet function. *Biochemistry* 15, 4832-4837, 1976
- 12) Cooper, R.A., Durocher, J.R. and Leslie, M.H.: Decreased fluidity of red cell membrane lipids in Abetalipoproteinemia. *J.Clin. Invest.* 60, 115-121, 1977
- 13) Nakao, M., Nakao, T. and Yamazoe, S.: Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells. *Nature* 187, 945-946, 1960
- 14) Stefanovich, V.: Beeinflussung des ATP-Gehaltes der Erythrozyten durch pentoxifyllin, *Med. Welt* 26, 1882-1884, 1975
- 15) 垣内史朗: カルモデュリンと細胞骨格. 生化学 53, 1267-1289, 1981