

氏名	杉本 晃
生年月日	
本籍	愛知県
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博甲第393号
学位授与の日付	平成13年3月22日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	釣藤散の循環調節に関する薬理学的研究
論文審査委員(主査)	横井 毅 (薬学部・教授)
論文審査委員(副査)	太田 富久 (薬学部・教授) 御影 雅幸 (薬学部・教授) 米田 幸雄 (薬学部・教授) 宮本 謙一 (医病院・教授)

## 学位論文要旨

*Choto-san* is a *Kampo* medicine used to treat chronic headache, a heavy feeling in the head or dizziness associated with hypertension, in relatively elderly patients. To clarify the mechanism of the beneficial effect of *Choto-san* in cerebral circulation in hypertensive patients, the influence of *Choto-san* on cerebral blood flow (CBF) during hemorrhagic hypotension was evaluated in 10- to 11-month-old spontaneously hypertensive rats. The lower limit of CBF autoregulation, defined as the mean arterial blood pressure at which CBF decreased by 10% of the baseline value, was dose-dependently lowered when *Choto-san* (0.5 – 2.0 g/kg per day, p.o.) was administered for 14 consecutive days. *Uncariae Ramulus et Uncus* (150 mg/kg per day, p.o.), one of the crude drug components of *Choto-san*, showed an effect equivalent to that of *Choto-san*. The action of *Choto-san* (2.0 g/kg per day, p.o.) or *Uncariae Ramulus et Uncus* on the autoregulatory response of cerebral vessels was eliminated by treatment with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (10 mg/kg, i.v.), an inhibitor of nitric oxide synthase. These results suggested that the activation of nitric oxide synthase by *Uncariae Ramulus et Uncus* contributed to at least part of the improvement in the cerebral circulation caused by *Choto-san*. Next, to clarify the components of *Choto-san* which relax the smooth muscle of the vessel, and which activate nitric oxide synthase, the influence of the components of *Choto-san* was evaluated on isolated rat aorta. Only *Uncariae Ramulus et Uncus* and *Ginseng radix* in the crude drug component showed the relaxation effect. In the evaluation of 100% MeOH eluate of *Uncariae Ramulus et Uncus*, 50% MeOH and 100% MeOH eluates showed the relaxation effect. N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA), an inhibitor of nitric oxide synthase, eliminated the effect of 50% MeOH eluate, only decreased that of 100% MeOH eluate, however. In the alkaloids containing *Uncariae Ramulus et Uncus*, geissoschizine

methylether (GM) showed relaxation effect stronger than other alkaloids. The effect of GM decreased by L-NNA treatment. These results suggested that the component in the 50% MeOH eluate and GM involve the relaxation effect of *Uncariae Ramulus et Uncus* via nitric oxide synthesis

脳は多くの臓器の中で最も重要な器官であり、また多くのエネルギー供給を必要とする。言い換えればエネルギー供給の途絶に対して非常に脆弱である。そのため、脳の灌流血圧が変化しても一定の範囲では脳血流量は変化せず一定に維持される独特の機序が存在する。この脳血流自動調節能は慢性的高血圧状態では、その閾値が狭くなっている。すなわち脳血流は血圧の低下など体循環の変化の影響を受けやすくなっていることが知られており、高血圧に伴う種々の随伴症状の一部には脳血流自動調節能の低下が関係しているとも考えられている。漢方処方のひとつである釣藤散は高血圧に伴う慢性的な頭痛、頭重感やめまいの治療に用いられている。そこで、本研究では、慢性高血圧状態で低下した脳血流自動調節能に及ぼす釣藤散の作用とその機序について自然発症性高血圧ラット (SHR) の脱血モデルを用いて検討し、次にその作用本体である成分を調査する目的で、摘出血管を用いて検討した。

#### 1. 脳血流自動調節能に対する釣藤散の作用

Halothane 麻酔下で動物 (SHR) の大腿動脈からカテーテルで動脈血を抜くこと (hemorrhagic hypotension) によって平均動脈血圧を 10 mmHg 毎に段階的に低下させ、レーザードップラー測定法で、頭頂部皮質局所脳血流量を測定し、血流量が base line から 10%低下した時の平均動脈血圧、脳血流自動調節能下限値 (lower limit of cerebral blood flow autoregulation, LLCA) を比較した。釣藤散は用量依存的に LLCA を低下させ、釣藤散 2.0 g/kg を 14 日間経口投与した群では、対照群と比べて脳血流自動調節能下限値が有意に低下していた。すなわち、釣藤散は脳血流自動調節能を亢進させる作用があることが分かった。釣藤散の特徴的な構成生薬のひとつである釣藤鈎を釣藤散の 2.0 g/kg 相当量 (150 mg/kg) にて 14 日間経口投与すると同程度の LLCA の低下が見られたことから、釣藤散のこの作用は構成生薬である釣藤鈎に由来していることが分かった。さらに釣藤散、釣藤鈎のこの作用は一酸化窒素 (NO) 合成阻害薬である  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を hemorrhagic hypotension の 15-20 分前に投与することで拮抗され、NO 前駆物質である L-arginine を L-NAME と併用することにより部分的に回復したことから NO 合成系を介していることが示唆された。次に実際に NO が脳血流自動調節能に関与しているのかどうかを調べるために NO 供与体である sodium nitroprusside を hemorrhagic hypotension の 10 分前から  $20 \mu\text{l/kg/min}$  の速度で静脈内に持続投与したところ、やはり LLCA の低下が見られた。以上の事実は NO が脳血流自動調節能に関与しており、釣藤散および

釣藤鈎は NO を介して脳血流自動調節能を改善するがその作用は、血管の構造的変化を釣藤散および釣藤鈎が抑制した結果ではないことを示唆している。次に NO が正常動物の脳血流自動調節能に関与しているかについて検討した。L-NAME (10 mg/kg, i.v.) は WKY の LLCA には影響を及ぼさなかったことより L-NAME の LLCA に対する作用は SHR と WKY で異なることが明らかになった。この結果は、対象となる動物の状態によって脳動脈の autoregulatory response に果たす NO の役割が変化することを示唆している。高血圧状態では NO の産生が減少するという報告もあり、SHR の LLCA に対する NO の役割の増大は、釣藤散が経験的に高血圧患者に対して多く用いられてきたことと関係があると考えられたが、その機序は現在のところ不明である。

## 2. 釣藤散構成生薬の摘出血管に対する作用の検討

以上の研究で、釣藤散の NO を介した脳血流自動調節能改善作用が明らかになったので、釣藤散に含まれる構成生薬の作用およびその構成生薬に含まれる成分の血管弛緩作用について検討した。まず、釣藤散の構成生薬である、釣藤鈎、防風、陳皮、甘草、麦門冬、生姜、半夏、茯苓、菊花、人参のノルエピネフリン (NE) 誘発血管収縮に対する作用を検討したところ、釣藤鈎、生姜のみが弛緩作用を示した。釣藤鈎は釣藤散の脳血流自動調節能改善作用で主要な役割を担っている構成生薬であることが上記研究で確認されたので、釣藤鈎の血管弛緩作用についてさらに検討した。釣藤鈎は NE 誘発収縮に対して弛緩作用を示し、その作用が血管内皮由来の NO を介していることが確認された。そこで、釣藤鈎のこの作用が釣藤鈎中に含まれるどのような成分に由来しているのか、また  $Ca^{2+}$ 拮抗作用についても検討した。釣藤鈎水抽出エキスをアルカロイドを含む 100%MeOH 画分、タンニン類を含む 50%MeOH 画分、糖類などを含む水画分に分画し、NE 収縮に対する作用を調べたところ、100%MeOH 画分、50%MeOH 画分にのみ弛緩作用が見られた。NO 合成阻害薬である  $N^G$ -nitro-L-arginine (L-NNA) は 50%MeOH 画分の弛緩作用に対して拮抗作用を示し、100%MeOH 画分の弛緩作用に対しては抑制作用を示した。この事実は 50%MeOH 画分の弛緩作用と 100%MeOH 画分の弛緩作用の一部が NO を介していることを示唆している。次に高  $K^+$ -Krebs 溶液によりそれらの  $Ca^{2+}$  influx に与える影響を検討したところ、50%MeOH 画分の弛緩作用には  $Ca^{2+}$  influx が関係しているが、100%MeOH 画分のそれには  $Ca^{2+}$  influx が関係していることが分かった。50%MeOH 画分の何種類かのタンニン類について弛緩作用を検討したが、今回検討したものには弛緩作用が見られず、成分の特定には至らなかった。そこで 100%MeOH 画分に含まれるアルカロイドに関してその弛緩作用を検討したところ、geissoschizine methylether (GM) が hirsutine など他のアルカロイドに比べて約 10 倍の弛緩作用を示すことが分かった。この GM と  $Ca^{2+}$ 拮抗作用を持つことが知られている hirsutine の弛

緩作用の作用機序について比較検討した。L-NNA と高  $K^+$ -Krebs 溶液を用いた研究で、hirsutine の弛緩作用は  $Ca^{2+}$  influx の抑制によっており、NO の関与は少ないのに比べて、GM の弛緩作用は NO を介した作用が強いことが示唆された。以上の結果より釣藤散の構成生薬である釣藤鈎は NO を介した血管弛緩作用を示し、釣藤鈎の作用にはその 50%MeOH 画分に含まれる成分とインドールアルカロイドの 1 種である GM が関与している可能性が示唆された。

### 3. 結 論

本研究では釣藤散の脳血流改善作用に関して以下の知見を得た。

釣藤散が持続的高血圧状態において弱くなった脳血流自動調節能を改善することを明らかにし、その構成生薬である釣藤鈎の釣藤散含有相当量に同等の作用があることから釣藤散の脳血流量自動調節能改善作用は釣藤鈎に由来していると考えられた。

釣藤散、釣藤鈎の脳血流量自動調節能改善作用が NO 合成阻害薬である L-NAME で阻害されたことから、それらの作用は NO を介して発現していることが分かった。

さらに、釣藤散の作用が L-NAME 1 回投与で阻害されたことから、釣藤散が血管平滑筋の増殖等構造的変化を抑制した結果ではないこと、NO 供与体である sodium nitroprusside が急性効果として血圧-脳血流関係を左方に移動させたことで NO が血管平滑筋の構造変化を伴うことなく脳血流自動調節能を改善しうるということが証明された。

次に釣藤散の血管系に対する作用を検討する目的で、各構成生薬の抽出血管に対する作用を検討し、釣藤鈎と生姜に弛緩作用があることを確認した。さらに釣藤散の特徴的構成生薬である釣藤鈎の NO を介した血管弛緩作用が釣藤鈎中のどのような成分に由来しているのかを検討する目的で 100%MeOH、50%MeOH、水画分の弛緩作用を検討した結果、50%MeOH 画分は NO を介した弛緩作用が、100%MeOH 画分には NO と  $Ca^{2+}$  を介した弛緩作用があり、さらに 100%MeOH 画分に含まれるアルカロイド類のなかで GM が NO を介した弛緩作用を示すことを発見し、釣藤鈎の NO を介した薬理作用の本体の一部を特定することができた。

## 学位論文審査結果の要旨

釣藤散は釣藤鈎、陳皮、半夏、麦門冬、茯苓、人參、防風、菊花、石膏、甘草、生姜の11種類の生薬から構成される漢方処方であり、高血圧症の随伴症状としての頭痛、頭重感、頭暈感、めまいに用いられる。これらの症状は、体循環血圧の低下に対して脳血流量を一定に保とうとする脳血流自動調節能が持続的高血圧状態では低下しているため、脳血流が灌流圧の変化の影響を受けやすくなっていることと関係していると考えられている。

申請者は、高血圧症病態での脳循環自動調節能の異常に着目して釣藤散の作用を検討し、また、有効成分の検討を行い、以下の事を明らかにした。

- 1) 釣藤散を自然発症高血圧ラット (SHR) に2週間連投することにより血圧-血流曲線は低血圧側にシフトしたことから、釣藤散には脳血流自動調節能を改善する作用のあることを確認した。そして、その作用はNO合成阻害薬であるN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester hydrochloride (L-NAME) で拮抗され、このL-NAMEの作用はNO供与体のL-arginineによってblockされたことなどから、釣藤散はNOを介してSHRの脳血流自動調節能を回復していることが示唆された。
- 2) 次に摘出血管を用いて釣藤散の構成生薬のノルエピネフリン誘発血管収縮に対する作用を検討した結果、釣藤鈎と生姜に弛緩作用が見られた。そして、釣藤鈎でもSHRの脳血流自動調節能の回復作用を示すことを明らかにした。
- 3) さらに釣藤鈎に含まれるアルカロイドについて、摘出血管に対する作用を検討したところ、血管弛緩作用がすでに報告されているhirsutine, isorhynchophyllineなどに加えてgeissoschzine methyletherが新たにNOを介した血管弛緩作用を示すことが明らかとなり、その作用は他のアルカロイドと比べて10倍以上も強力であることが分かった。

以上、本研究は、釣藤散の薬理作用が脳血流自動調節能の改善によるものであることを明らかにした。さらに、その作用機序および有効成分を明らかにした。このような漢方薬の効果の根拠を示す研究は、臨床医学的にも高く評価できるとともに今後の医薬品開発に対しても有用な知見を与えている。よって、本論文は博士(薬学)論文に値するものと判定された。