

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590649

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームにおける和漢薬の血管内皮機能保護作用に関する研究

研究課題名（英文）Protective effect of Kampo medicine on vascular endothelial function in patients with metabolic syndrome

研究代表者

嶋田 豊（SHIMADA YUTAKA）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：80251891

研究成果の概要（和文）：クロスオーバーデザインによる比較臨床試験により、漢方薬・桂枝茯苓丸がメタボリックシンドローム関連因子を有する患者の血管内皮機能を改善することを明らかにした。即ち、すべての検査を施行した49例の解析において、4週間の桂枝茯苓丸投与期間後、Endo-PAT2000で評価した血管内皮機能の指標（L_RHI）は有意に増加し、血清の非エステル化脂肪酸（NEFA）、酸化ストレスのマーカー（MDA）及び可溶性血管細胞接着分子-1（sVCAM-1）は有意に低下した。また、投与期間のL_RHI及び血清NEFA、MDAの変化は、コントロール期間における変化との間に有意差を認めた。

研究成果の概要（英文）：We clarified the improvement effect of keishibukuryogan, a traditional Japanese (Kampo) formula, on endothelial function in patients with metabolic syndrome-related factors by controlled clinical trial with cross-over design. In 49 patients who completed all the tests, the index for the evaluation of endothelial function (L_RHI) assessed by Endo-PAT2000 increased significantly, and the serum non-esterified fatty acid (NEFA), malondialdehyde (MDA) and soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) decreased significantly after 4 weeks of KBG-treatment period, and the changes of L_RHI, NEFA and MDA in the treatment period were significantly different from those in the control period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学

1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームが広く国民にも知られてきた。メタボリックシンドロームは1999年に世界保健機関（WHO）が提唱し、我が国でも2005年に診断基準が示され

た。即ち、腹囲が基準値を超え、さらに血中脂質、血圧、血糖のうち2つ以上が基準を満たす場合にメタボリックシンドロームと診断され、1つでも基準項目を満たせば予備軍とされる。

治療、予防の基本は、食事療法、運動療法による体重コントロール、禁煙及び過度のアルコール摂取制限などであるが、必要に応じて脂質異常、糖尿病、高血圧に対する薬物治療が施される。

一方、漢方医学では昔から「未病」(みびょう)という概念がある。これは、病気が発症する前の段階から病気が発症しないように、あるいは病気になってもそれが進行しないように、初期の徴候を見逃さずに、的確に食養生を含めた治療を行うことにより、重大な事態に至らないようにすることの重要性を説いている。このようなことから、生活習慣病などの予防を漢方(和漢薬)治療に期待することが少なからずあるが、その臨床的科学的根拠(エビデンス)は十分でないのが現状である。

2. 研究の目的

日本では食生活の欧米化により肥満やメタボリックシンドロームが増加している。また、高血圧、脂質異常症、高血糖といった従来のリスクファクターは血管内皮機能と関連するが、血管内皮機能障害自体も心血管イベントの発症の独立したリスクファクターであることが報告されている。血管内皮機能障害は可逆的であり、その改善により動脈硬化の進展を予防することが可能である。

臨床において、血管の駆血開放後におこる拡張反応(FMD; flow-mediated dilatation)が血管内皮機能の測定に用いられる。最近開発された非侵襲的な反応性充血による末梢動脈の圧測定(RH-PAT; reactive hyperemia peripheral arterial tonometry)は、FMDに比べて簡便な測定法であり、検者に依存する技術の必要性が少なく、交感神経系の活動の影響も少ない。

桂枝茯苓丸は日本の伝統薬(漢方薬)であり、動脈硬化の進展予防を目的にも使用される。近年我々は、コレステロール負荷ウサギや自然発症糖尿病ラットの血管内皮機能に対する桂枝茯苓丸の保護作用を報告した。さらに我々は、コレステロール負荷ウサギにおいて桂枝茯苓丸が実際に動脈硬化の進展を予防することを報告した。しかしヒトに対して、臨床的に桂枝茯苓丸が動脈硬化の進展を予防するか否かについて検討はなされておらず、また行うにしても、長期的な臨床試験は実施するのが容易ではない。そこで我々は、メタボリックシンドローム関連因子を有する患者を対象として桂枝茯苓丸の血管内皮機能に及ぼす効果をクロスオーバーデザインによる比較臨床試験によって評価することを計画した。

3. 研究の方法

(1) 患者

日本におけるメタボリックシンドロームの診断基準を用いた。即ち、①ウエスト周囲：男性 85cm 以上、女性 90cm 以上に加えて以下の3項目のうち2つ以上を満たすものとした。②中性脂肪 150mg/dl、またはHDLコレステロール 40mg/dl 未満、③収縮期血圧 130mmHg 以上、または拡張期血圧 85mmHg 以上、④空腹時血糖 110mg/dl 以上。患者は、2008年6月から2011年8月までに富山大学附属病院和漢診療科診療科を受診した40~80歳の患者で、前述の診断基準の項目を1つ以上有するものを対象とした。重大な肝・腎疾患、感染症、悪性腫瘍、脳卒中や心筋梗塞の既往、その他、本研究の実施を妨げる可能性があると考えられる疾患を有する患者はエントリーから除外した。

(2) 桂枝茯苓丸

桂枝茯苓丸は、桂皮、芍薬、牡丹皮、桃仁、茯苓の5種類の生薬から構成される。これらの生薬を熱した蜂蜜に混合し、2gの丸薬を作成した(桂皮 0.2g、芍薬 0.2g、牡丹皮 0.2g、桃仁 0.2g、茯苓 0.2g、蜂蜜 1.0g)。

(3) 研究デザイン

本臨床試験は、4週間の桂枝茯苓丸投与期間と4週間のコントロール期間からなるクロスオーバーデザインによる比較臨床試験である。患者はランダムにA群(期間I:桂枝茯苓丸投与、期間II:コントロール)またはB群(期間I:コントロール、期間II:桂枝茯苓丸投与)に分けられた。FMD法を用いた研究によると、血流によって生ずる血管拡張は、季節や気温の影響を受け、それは夏に最も高く冬に最も低い。従って、期間Iと期間IIを同じ季節とし、2つの期間の間隔を約1年とした。患者は最大で4回評価された(試験1:期間Iの開始時、試験2:期間Iの終了時、試験3:期間IIの開始時、試験4:期間IIの終了時)。桂枝茯苓丸(6g/日)は食後1日3回、A群では期間I、B群では期間IIに通常処方されている薬に追加して投与された。これらの併用薬剤は、期間Iと期間IIの少なくとも3ヶ月前から、ならびに期間中は変更しないこととした(図1)。桂枝茯苓丸は独特の匂いと味があるため、適切なプラセボを作成することが不可能であることより、本臨床試験をオープンラベル試験とした。

本臨床試験は富山大学倫理委員会の承認を得た。1975年のヘルシンキ宣言に基づく書面によるインフォームドコンセントをすべての患者から得た。

(4) RH-PAT

血管内皮機能は Endo-PAT2000 (Itamar Medical, Caesarea, Israel) によって評価した。RH-PAT の原理は既に報告されている。簡潔に説明すると、血圧カフを片方の腕に巻き、もう一方の腕をコントロールとした。PATプローベを両上肢の1つの指(第2指または

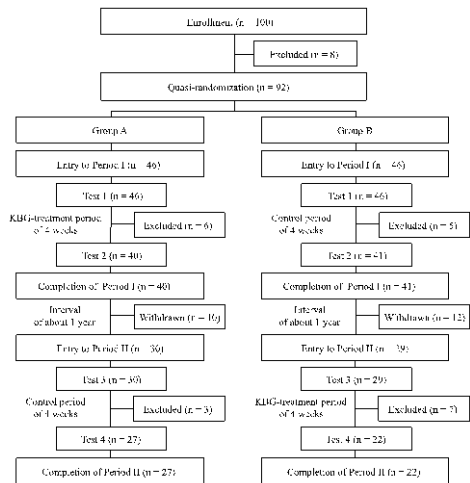


図1 患者登録のフローチャート

第3指、左右同じ指)に装着し、5分間、安定させるための時間を設けた後、収縮期圧の60mmHg以上、または200mmHg以上のいずれかまでカフ圧を5分間上げ、その後、圧を下げて反応性充血を誘導し、両側のPATシグナルを記録した(図2)。これらの過程において、被検者は安静を指示され、室温は21~24℃に保たれた。RH-PAT データは、Endo-PAT2000ソフトウェア(バージョン3.1.2)を積んだコンピューターで自動的に解析した。RH-PAT index は反応性充血の程度を反映し、カフ開放1.5分後から1分間の平均振幅(充血した指:A、コントロールの指:C)の比率をカフ加圧前の期間の2.5分間の平均振幅(ベースライン、充血した指:B、コントロールの指:D)で割ることにより算出した。反応性充血指数(reactive hyperthermia index; RHI)は次の式から得られる。

$RHI = (A/B)/(C/D) \times \text{ベースライン補正係数}$

最近、RHIの自然対数(L_RHI)がRHIの代わりによく使用されているため、本研究でもこれを用いた。

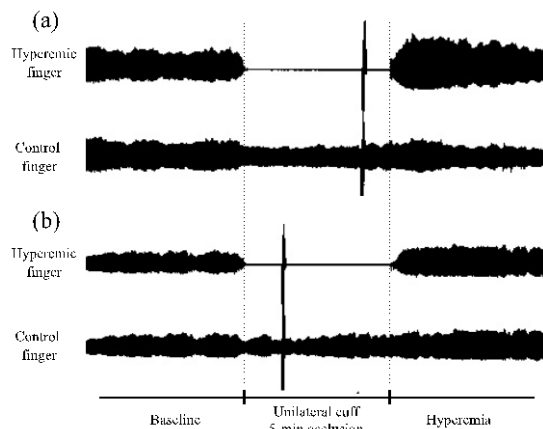


図2 PH-PATシグナルの代表例
(a) 正常例 (b) 低反応例

(5) 身体所見と生化学データ

RH-PAT検査の直前に、患者は5分間仰臥位安静の後、身長(HT)、体重(BW)、ウエスト周囲、収縮期血圧、拡張期血圧を測定された。Body mass index (BMI)も算出した[BMI = BW(kg)/HT(m)²]。

一晩絶食の後、RH-PAT検査を行った直後に血液を肘静脈から採取し、その一部の血清を直ちに-80度で凍結保存した。中性脂肪、HDLコレステロール、LDLコレステロール、空腹時血糖(FPG)、インスリン、クレアチニン、高感度CRPなどのルーチンの臨床検査は、病院において標準的な臨床検査法により測定した。インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)も算出した[HOMA-IR = IRI(μU/mL) × FPG(mg/dL)/405]。非エステル型脂肪酸(NEFA)、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド(MDA)、可溶性血管細胞接着分子1(sVCAM-1)は、我々の実験室でキットを用いて測定した。

(6) 統計解析

データは、平均±標準誤差で示した。患者背景の統計解析には、Wilcoxon testまたはPearson's chi-square testを用いた。0週と4週のデータの差はWilcoxon matched pairs signed-ranks testを用いて解析した。桂枝茯苓丸投与期間とコントロール期間における値の変化の比較は、MANOVA testを用いて行った。P<0.05を統計学的有意とした。

4. 研究成果

(1) 患者

100例の患者が登録されたが、そのうち8例が除外され(登録基準不適応6例、同意撤回2例)、92例が最終的にA群(n=46)とB群(n=46)に準ランダム化され、期間Iに導入された(図1)。

A群では、試験1の後、6例が除外され[桂枝茯苓丸服用拒否3例、副作用出現1例(舌痛)、併用薬変更1例、試験前飲食1例]、4週間の桂枝茯苓丸投与期間の後、残りの40例が試験2を受け期間Iを終了した。期間Iと期間IIの間の約1年のインターバルの間に10例が脱落した(参加拒否7例、他疾患発症2例、通院中断1例)。残りの30例が期間IIに導入され試験3を受けた。その後、3例が除外され(感染症併発1例、併用薬変更2例)4週間のコントロール期間の後、残る27例が試験4を受け、期間IIを終了した。

B群では、試験1の後、5例が除外され(参加拒否3例、感染症併発1例、試験前飲食1例)、4週間のコントロール期間の後、残りの41例が試験2を受け期間Iを終了した。期間Iと期間IIの間のインターバルの間に12例が脱落した(参加拒否7例、他疾患発症1例、通院中断4例)。残りの29例が期間IIに導入され試験3を受けた。その後、7例が除外され[副作用出現2例(下痢、口苦)、併用薬変

更4例、試験前飲食1例]、4週間の桂枝茯苓丸投与期間の後、残る22例が試験4を受け、期間IIを終了した。

(2) 患者背景

A群とB群の間に、男性のウェスト周囲[A群 91.5 ± 3.1 cm (n=11), B群 83.0 ± 1.6 cm (n=9), $P = 0.0435$]以外の項目に有意差はみられなかった。

(3) 桂枝茯苓丸の効果

すべての試験を終えた患者49例(A群27例、B群22例)における解析では、L_RHIは桂枝茯苓丸投与期間で有意に増加したが(0週 0.58 ± 0.03 , 4週 0.70 ± 0.04 , $P = 0.0003$)、コントロール期間では変化がなく(0週 0.64 ± 0.04 , 4週 0.60 ± 0.03 , $P = 0.7279$)、また、桂枝茯苓丸投与期間4週間の変化とコントロール期間4週間の変化の間に有意差を認めた($P = 0.0034$)。さらに、桂枝茯苓丸投与期間において、NEFA(0週 532.9 ± 32.9 μ Eq/L, 4週 450.9 ± 26.0 μ Eq/L, $P = 0.0024$)、MDA(0週 11.8 ± 1.1 nmol/mL, 4週 9.5 ± 1.0 nmol/mL, $P < 0.0001$)、sVCAM-1(0週 723.1 ± 43.4 ng/mL, 4週 677.7 ± 40.9 ng/mL, $P = 0.0126$)は有意に低下し、NEFA($P = 0.0113$)とMDA($P = 0.0424$)については桂枝茯苓丸投与期間4週間の変化とコントロール期間4週間の変化の間に有意差を認めた。

A群のみの解析では、L_RHIは桂枝茯苓丸投与期間で有意に増加したが(0週 0.58 ± 0.04 , 4週 0.70 ± 0.05 , $P = 0.0231$)、コントロール期間では変化がなく(0週 0.65 ± 0.05 , 4週 0.55 ± 0.04 , $P = 0.1834$)、また桂枝茯苓丸投与期間4週間の変化とコントロール期間4週間の変化の間に有意差を認めた($P = 0.0085$)。さらに、桂枝茯苓丸投与期間において、NEFAは有意に低下し(0週 527.8 ± 49.1 μ Eq/L, 4週 445.4 ± 33.9 μ Eq/L, $P = 0.0306$)、桂枝茯苓丸投与期間4週間の変化とコントロール期間4週間の変化の間に有意差を認めた($P = 0.0004$)。桂枝茯苓丸投与期間において、MDA(0週 10.2 ± 1.5 nmol/mL, 4週 8.7 ± 1.4 nmol/mL, $P = 0.0007$)とsVCAM-1(0週 769.5 ± 72.6 , 4週 708.2 ± 66.3 , $P = 0.0121$)は有意に低下した。

B群のみの解析では、L_RHIは桂枝茯苓丸投与期間で有意に増加した(0週 0.56 ± 0.05 , 4週 0.70 ± 0.05 , $P = 0.0074$)。さらに、桂枝茯苓丸投与期間において、NEFA(0週 539.1 ± 42.8 μ Eq/L, 4週 457.7 ± 41.0 μ Eq/L, $P = 0.0312$)とMDA(0週 13.7 ± 1.7 nmol/mL, 4週 10.5 ± 1.4 nmol/mL, $P < 0.0001$)は有意に低下し、MDAについては桂枝茯苓丸投与期間4週間の変化とコントロール期間4週間の変化の間に有意差を認めた($P = 0.0464$)。

(4) 考察

糖尿病、高血圧、脂質異常症などの心血管疾患のリスクファクターは、しばしば同一人

に重なってみられ、心血管イベントの発症を相乗的に増加する。メタボリックシンドロームの概念は、それらの高リスクな病態を統合しようとする世界的な動きから生じたもので、日本でも2005年にメタボリックシンドロームの臨床診断基準が提唱された。血管内皮機能障害は、メタボリックシンドロームの患者にしばしばみられ、動脈硬化の主たる病因と認識されている。即ち、メタボリックシンドロームは心血管イベントの独立したリスクファクターであり、血管内皮機能障害と重なると、リスクはさらに上昇する。

様々な血管内皮機能を評価する方法が開発され、外来での検査も可能となった。FMDやPATを用いた血管内皮機能の評価は動脈硬化の初期病変を検出するのに有用である。PATシグナルを用いたRHIは血管内皮機能の指標として用いられる。上肢における血管内皮機能は冠循環と関連し、RHI低値は冠動脈の血管内皮機能障害患者の検出に有用である。即ち、PATは将来の心血管イベントを予測する有用な非侵襲的な検査と考えられる。Endo-PAT2000の測定でRHI ≤ 1.67 ($L_RHI \leq 0.51$)の場合に血管内皮機能障害とされ、虚血性心疾患のリスクがあると判断され、これがカットオフ値と認識されている。RHIとメタボリックシンドローム関連因子との関連性が報告されているが、血管内皮機能の特徴はその可逆性にあり、新しい治療のターゲットとなり得る。治療に対する敏感な反応性に基づいて、RHIを用いた血管内皮機能に及ぼす薬剤やサプリメントの効果に関する研究が報告されている。

今回の研究において、メタボリックシンドローム関連因子を有する患者の血管内皮機能をクロスオーバーデザインによる比較臨床試験にてRHIを用いて評価したところ、桂枝茯苓丸が血管内皮機能を改善する効果を有することを明らかにした。即ち、L_RHIは桂枝茯苓丸投与期間に有意に上昇したが、コントロール期間には変化がなかった。RHI低値の患者は経過観察期間において心血管イベントの発症率が高いことが報告されており、障害された血管内皮機能の改善は動脈硬化の進展予防にとって重要である。従って、桂枝茯苓丸は血管内皮機能障害や動脈硬化の進展予防に有用である可能性がある。今回の臨床試験に登録された患者はすべて明らかな動脈硬化の所見はなかったが、血管内皮機能障害($L_RHI \leq 0.51$)が37.0%(34/92)にみられた。ほとんどの従来の動脈硬化検査法は進行した状態を評価している。血管内皮機能障害は動脈硬化の初期にも認められるので、桂枝茯苓丸による血管内皮機能障害への介入は、動脈硬化の進行、ならびに心血管イベントの予防に有効であることが期待される。

既に我々は、陳旧性多発脳梗塞患者において、赤血球集合能や赤血球変形能を評価し、桂枝茯苓丸が微小循環を改善することを報告した。また我々は、動物実験によって、桂枝茯苓丸がコレステロール負荷ウサギや自然発症糖尿病ラットの血管内皮機能障害に対して保護作用があること、さらには粥状硬化形成抑制作用を有することを報告している。桂枝茯苓丸は、桂皮、芍薬、牡丹皮、桃仁、茯苓の5つの生薬から構成されるが、我々は、桂皮や芍薬のポリフェノールに内皮依存性血管弛緩作用があること、また、桂皮に含まれるシンナムアルデヒドも内皮依存性血管弛緩作用を有することを報告している。桂枝茯苓丸と構成生薬のこれらの効果が、桂枝茯苓丸による血管内皮機能の改善効果に寄与していると考えられる。

NEFAの上昇は、メタボリックシンドロームや血管内皮機能障害と関連することが報告されており、それは心血管イベントの独立した予測因子である。我々は以前、桂枝茯苓丸がコレステロール負荷ウサギにおいて血清NEFAを低下させることを報告したが、今回の臨床研究でもNEFAは低下した。従って、桂枝茯苓丸は実際にNEFAを低下させる効果があると考えられる。

今回の研究ではMDAも低下したが、酸化ストレスは血管内皮機能を障害し動脈硬化の進展を促進することが報告されている。酸化ストレスが高いと血管内皮機能障害が悪化し一酸化窒素が低下する。抗酸化活性を有する薬物は血管内皮機能障害に対して保護作用を有するが、メタボリックシンドロームの診断基準のそれぞれの因子は個々に酸化ストレスや血管内皮機能障害と関連することが報告されている。我々は桂枝茯苓丸の抗酸化作用を報告しているが、この作用が血管内皮機能障害や動脈硬化の予防にとって好ましい効果を発揮すると考えられる。

我々は、関節リウマチ患者を対象とした研究で桂枝茯苓丸が血漿中のsVCAM-1を低下することを報告している。VCAM-1は障害を受けた血管内皮に発現し、酸化ストレスやサイトカイン等の様々な因子によって調節され、動脈硬化や心血管イベントの進展のリスクファクターであると考えられている。今回の研究では、sVCAM-1はA群において桂枝茯苓丸投与期間で低下した。桂枝茯苓丸の抗酸化作用がVCAM-1の低下を導いたものと推測される。

以上、今回のメタボリックシンドローム関連因子を有する患者を対象としたクロスオーバーデザインを用いた比較臨床試験により、桂枝茯苓丸は抗酸化作用を介して血管内皮障害を改善し、動脈硬化の進展を予防する効果を有する可能性が示唆された。PATによる血管内皮障害の早期の評価と桂枝茯苓丸

による早期の治療が動脈硬化の予防に寄与するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Yutaka Nagata, Hirozo Goto, Hiroaki Hikiami, Tatsuya Nogami, Makoto Fujimoto, Naotoshi Shibahara, Yutaka Shimada. Effect of keishibukuryogan on endothelial function in patients with at least one component of the diagnostic criteria for metabolic syndrome: a controlled clinical trial with cross-over design. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 査読有, Volume 2012, Article ID 359282, 10 pages. (doi:10.1155/2012/359282)

[学会発表] (計1件)

① 永田 豊, 後藤博三, 井上博喜, 野上達也, 藤本 誠, 引網宏彰, 柴原直利, 長坂和彦, 嶋田 豊: メタボリックシンドローム関連因子を有する患者の血管内皮機能に及ぼす桂枝茯苓丸の効果: 比較臨床試験. 第29回和漢医薬学会学術大会, 2012, 9, 1-2, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 豊 (SHIMADA YUTAKA)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 80251891

(2) 連携研究者

引網 宏彰 (HIKIAMI HIROAKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号: 70345586

藤本 誠 (FUJIMOTO MAKOTO)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号: 30377337

後藤 博三 (GOTO HIROZO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号: 40313598

(2010-2011年度のみ)