

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590880

研究課題名(和文) 活性型血小板を介した糖尿病性細小血管症の進展抑制効果を有する生薬の探索

研究課題名(英文) Exploratory Research for crude drugs having activated platelet-mediated inhibiting effect on diabetic microangiopathy

研究代表者

柴原 直利 (Shibahara, Naotoshi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：10272907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性細小血管症発症・進展抑制効果を有する生薬を探索することを目的に、その発症・進展の過程で鍵となる活性型血小板及びマイクロパーティクル(PDMP)に対する駆才血薬の効果を検討した。Streptozotocin誘発糖尿病ラットに牛膝・丹参・紅花エキスを連日7日間胃内に強制投与し、FACS及びELISAにより活性型血小板・PDMPを測定した。活性型血小板に対する効果は認めなかったが、糖尿病誘発により増加した活PDMPは牛膝、紅花及び丹参エキスにより有意に低下した。このことから、牛膝、紅花及び丹参はPDMP抑制を介し、糖尿病性細小血管症発症を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the inhibiting effects of crude drugs (anti-blood stasis drug) on activated platelets and/or platelet-derived microparticles (PDMP), which assume key roles on the onset and development of diabetic microangiopathy. The extracts of Achyranthis Radix, Danshen Root, and Carthami Flos were orally administered to streptozotocin-induced diabetes rats for day after day forcibly. After seven days, activated platelets and PDMP were measured by FACS and ELISA. Although the extracts of three crude drugs have no effect on activated platelets, elevated PDMP, induced by hyperglycemia, were decreased by these extracts. The result of the inhibiting effect on PDMP suggested that the extracts of Achyranthis Radix, Danshen Root, and Carthami Flos might be useful on the inhibition of the onset and development of diabetic microangiopathy.

研究分野：漢方医学

キーワード：生薬 糖尿病性細小血管症 血小板マイクロパーティクル 活性型血小板 牛膝 紅花 丹参

1. 研究開始当初の背景

近年,その増加が問題視されている生活習慣病は,癌や脳血管障害,心臓疾患などの生活習慣が原因で発症しやすいとされる疾患の総称である。かつては「成人病」と呼ばれていたが,近年ではこれらの発症及び進展に生活習慣が関わる事が明らかとなったことから,1996年に公衆衛生審議会が導入した概念が生活習慣病である。特に糖尿病はその患者数が増加の一途を辿り,医療機関で治療を受けている糖尿病患者は国内で約247万人,実際の患者数は約750万と推定され,今後はさらに増大するものと考えられている。糖尿病の三大合併症として,糖尿病性腎症,糖尿病性網膜症,糖尿病性神経障害が挙げられ,糖尿病性腎症に起因する人工透析患者数,糖尿病性網膜症に起因する視力障害患者数が増加しており,その医療費の増大も社会問題となっている。これらの合併症の一因として動脈硬化の進展に伴う細小血管症が関与するとされており,糖尿病性細小血管症の進展を抑制する治療法の開発が急務である。

糖尿病性細小血管症の治療,あるいは予防法の開発においてはその評価が問題となるが,近年,糖尿病における血管障害(=動脈硬化)の進展は活性型血小板と関連があり,糖尿病性細小血管症ではPセレクチンやCD62, PAC-1,血小板由来マイクロパーティクル(PDMP)の上昇がみられると報告され,血管障害進展を評価する指標としてこれらの活性型血小板測定が先進医療として既に用いられている。

一方,糖尿病は古来より存在していた疾患であり,古典医学書にもその病態を「消渴」などとして治療の記載が散見される。近年ではその合併症に対しても漢方薬が幅広く用いられるようになり,八味地黄丸や牛車腎気丸,桂枝茯苓丸,白虎加人参湯,十全大補湯といった漢方薬による治験報告もみられている。漢方医学的には「血の滞り」である「瘀血」を改善する漢方薬(駆瘀血剤)として頻用される桂枝茯苓丸については臨床・基礎研究がなされ,血液レオロジー改善作用や抗動脈硬化作用,血管内皮機保護作用を有することが明らかとなっている。また,糖尿病モデルを用いた検討においても,桂枝茯苓丸は糖尿病性腎症進展抑制効果や動脈硬化進展抑制効果を有することが明らかとなっている。これらの研究結果は動脈硬化や糖尿病性細小血管症が漢方医学における瘀血病態と密接に関連することを示しており,瘀血病態を改善する生薬が抗動脈硬化作用,あるいは糖尿病性細小血管症進展抑制作用を有する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

駆瘀血効果を有する生薬について,糖尿病に起因する糖尿病性細小血管症の発症・進展の過程で鍵となる活性型血小板及びマイクロパーティクルに及ぼす効果を基礎的に検

討し,糖尿病性細小血管症発症・進展抑制効果を有する生薬を探索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

今回の実験にはstreptozotocin(STZ)誘発糖尿病モデルラット(Wistar/ST雄性8週齢,150~200g,日本SLC株式会社),正常Wistar/ST雄性ラット(8週齢,250~270g,日本SLC株式会社)を購入して用いた。ラットは1ケージ4匹で1週間予備飼育した後,研究に用いた。飼育環境は12時間明暗サイクル(午前7時~午後7時)の恒温(23~25℃)にコントロールされた動物実験室内において自由飲水,自由摂食で飼育した。飼料には固形飼料(ラボMRストック:日本農産工業株式会社)を用いた。なお,本研究は富山大学動物実験委員会の承認のもと,指針に基づいて行なった。

(2) 被験薬剤

牛膝(*Achyranthes fauriei* Leveille'et Vaniot),丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge),紅花(*Carthamus tinctorius* L)の各生薬は,栃本天海堂(株)より購入し,各生薬100gに対し500mlの蒸留水を加え,30分間煎じた後に煎液をガーゼで濾した。濾した煎液を凍結乾燥機(FREEZE DRYER: IWAKI)により乾燥させ生薬エキスを作製した。

(3) 糖尿病モデルラットの作製と薬剤投与

(1) STZ誘発糖尿病モデルラット

糖尿病モデルラットとして,STZ(和光純薬工業株式会社)をpH 4.6クエン酸緩衝液に溶解し,60mg/kgの濃度となるように調整したものを7週齢のラットに腹腔内投与し,投与1週間後に空腹時血糖値が300mg/dlに達したものを実験に供した。

(2) 薬剤投与

薬剤投与期間は1週間とし,生薬群には牛膝・丹参・紅花の各生薬エキス末(2g/kg/day)を1mlの水道水に溶解したものを,糖尿病Control群及びSham群には水道水1ml, Sarpogrelate群にはsarpogrelate塩酸塩(100mg/kg)を1mlの生理食塩水に溶解したものを胃内に7日間連日強制投与した。

(3) 血糖値の測定

血糖値は測定日より12時間の絶食とし,22G注射針(TERUMO)を用いて尾静脈より採血した。採取した静脈血をONE TOUCHウルトラビュー(Johnson & Johnson)にて測定し,血糖値を求めた。

(4) 血液サンプル

35日目にラットに50mg/kg pentobarbital sodium(関東化学工業株式会社)を0.1ml/100gBWで腹腔内投与し,麻酔下にて22Gテルモ翼付静注針・ベノジェクトホルダーD・ベノ

ジェクト ルアーアダプターS(TERUMO)を用いて下大静脈より血液を採取した。

血液の採取においては、最初の数mlを廃棄した後に、BDバキュティナ採血管(ACD Solution A入り)により処置し、遠心分離機(KUBOTA8700:久保田商事株式会社)により、室温1000rpmで10分間遠心し、上清から多血小板血漿(platelet rich plasma:PRP)をピペットで採取した。次に、PRPを3000rpmで20分間遠心し、乏血小板血漿(platelet poor plasma:PPP)を得て、PRPとPPPサンプルを4の低温室と-80の超低温槽に分けて保存した。冷蔵保存のサンプルは24時間以内にBD FACS Canto™ フローサイトメーター(FACS)により解析した。

その他のサンプルは測定まで-80にて保存した。

(5) 活性型血小板及びPDMPの測定

下大静脈より採取した血液より得られたPRP及びPPPを用い、活性型血小板及びPDMPを測定した。測定にはFACS及び、ジムロテストPDMP ELISAキット(蛋白精製工業)を用いた。

1) フローサイトメトリー計測用試料作製

血液採血後に室温で1000rpm, 10分間と、3000rpmで20分間の遠心処理を行い、血球が沈殿した上清の血漿をPP製マイクロチューブに移し、計測用試料とした。遠心操作により得られた血漿は4で保存し、24時間以内に測定した。

2) 試料の免疫染色

遠心処理で得られた血漿50µlに対して、CD62;RPE(serotec Ab),抗CD61;FITC(serotec Ab)抗体を各2.5µl加え、15分間室温暗所で反応させ、1%パラホルムアルデヒド溶液(1% Flow Fix Paraformaldehyde Fixative Kit: POL)1mlを各チューブに加えて染色・固定された細胞を2~8の暗所に30分間放置し、フローサイトメトリーで計測した。また、非特異的な染色の確認を行うため、各試料において無染色のcontrol sampleを作成した。

3) ゲーティング

FACSによる計測にはビーズ(0.5µm・1.0µm・3.0µm, Small Beads Calibration Kit: POL)を用い、PDMPの出現範囲を0.5µm以上、1.0µm以下、活性型血小板の出現範囲を3.0µm以上の範囲として出現領域のゲーティングを行った。方法としては、ドットプロット及びヒストグラムの画面を展開し、基準となる0.5µm・1.0µm・3.0µmのビーズを流してその出現位置を確認した。それをもとに0.5µm以上、1.0µm以下のゲート(PDMP領域)と3.0µm以上のゲート(活性型血小板領域)を作成した。次にFITCとPEのドットプロット及びヒストグラムの画面を展開し、無染色のnegative sampleを流してFITCとPEの陰性領域を確認した後、positive sampleを流してnegative sampleと比較して特異性を確認した。0.5µm以上、1.0µm以下のFITC陽性領域をPDMP出現範囲、3.0µm以上でPE陽性領域を

活性型血小板出現範囲とした。

4) ELISA測定

-80にて保存しておいたPPPサンプルを解凍し、ジムロテスト PDMP ELISA キット(蛋白精製工業)を用いてPDMP濃度を測定した。

(6) 大動脈におけるeNOS及びiNOSのウェスタンブロットング解析

Protease inhibitor(complete,Mini,Roche Germany)を加えたLysis Buffer (137mM NaCl, 20mM Tris-HCl(pH 7.5), 1%NP-40, 10% Glycerol, 1mM PMSF)中で採取した大動脈をホモジネートし、遠心(5500rpm, 10分, 4)後、上清を採取した。蛋白質濃度はProtein Assay 試薬(BIO-RAD社)を用いて測定し、5×Dye及び蒸留水を加えて調製した後、5分間煮沸したものを試料とした。ゲル濃度を12%として200V, 50分間のSDS(Sodium dodecylsulfate)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後、直ちにPVDF(polyvinylidene difluoride)メンブレンに転写した。ブロットング終了後、PVDFメンブレンを5%スキムミルクブロッキング溶液にて室温、1時間ブロッキング後、1次抗体として抗eNOS抗体および抗iNOS抗体を加えて4一晩反応させた。さらに、二次抗体としてHRP標識抗IgG抗体を加え、室温で1時間反応後洗浄した。抗原の検出にはECL Plus Western blotting detection reagent(GE Healthcare)を用いて蛍光発光させ、シグナル(バンド)を画像解析した。なお、測定値は-actinで補正した。

(7) 統計学的解析

得られた数値より、各群における平均値及び標準偏差を算出し、全ての統計解析にはJMP 7を使用した。体重・血糖値の薬剤投与前後における群内の比較には「対応のあるペアの変数」で検定を行い、Control群との比較にはDunnnettの検定を行った。活性型血小板及びPDMPの検出率においてもDunnnettの検定を行った。また、有意水準は全てP < 0.05とした。

4. 研究成果

(1) 体重及び空腹時血糖値

体重は、糖尿病群はSham群に対して有意に体重が低値を示し、薬剤投与前後における有意な差は認めなかった。

空腹時血糖値は、Sham群に対して糖尿病群は有意に空腹時血糖値が上昇し、薬剤投与後ではSarpogrelate群がControl群に比較して有意な低下を示した。

(2) 薬剤投与期間中の平均食餌摂取量

平均食餌摂取量では、Sarpogrelate群(78.0±11.1g)は他群(Sham群:134.0±2.3g, Control群:129.0±3.9g, 牛膝群:138.8±12.5g, 丹参群:139.8±7.4g, 紅花群:128.4±3.6g)と比較して有意に食餌摂取量が少な

かった。

(3) フローサイトメトリーによる活性型血小板測定

FACSによる活性型血小板の検出率は、Sham群が $12.6 \pm 3.4\%$ であったのに対し、Control群は $24.4 \pm 3.2\%$ と有意に上昇していた。薬剤投与群では、牛膝群 $25.2 \pm 4.5\%$ 、丹参群 $27.7 \pm 5.5\%$ 、紅花群 $32.6 \pm 5.9\%$ 、Sarpogrelate群 $22.3 \pm 10.2\%$ であり、Control群との間に有意な差は認めなかった(図1)。

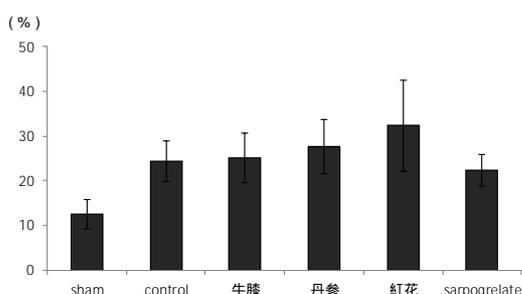


図1

(4) フローサイトメトリーによるPDMP測定

FACSによるPDMPの検出率は、Sham群が $3.1 \pm 1.1\%$ であったのに対し、Control群は $8.8 \pm 3.5\%$ と有意に上昇していた。薬剤投与群では、牛膝群 $3.3 \pm 0.8\%$ 、丹参群 $3.4 \pm 0.8\%$ 、紅花群 $5.7 \pm 3.0\%$ 、Sarpogrelate群 $6.6 \pm 2.1\%$ であり、Control群と比較して、牛膝群・丹参群で有意に低下していた(図2)。

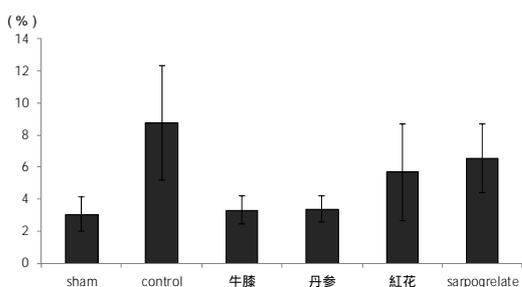


図2

(5) ELISAによるPDMP濃度測定

ELISAによるPDMP濃度は、Sham群 $13.3 \times 10^{-3} \pm 4.1 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ に対し、Control群は $18.9 \times 10^{-3} \pm 2.3 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ と有意ではないが増加していた。薬剤投与群では、牛膝群 $17.9 \times 10^{-3} \pm 3.7 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ 、丹参群 $12.5 \times 10^{-3} \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ 、紅花群 $8.8 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ 、Sarpogrelate群 $11.9 \times 10^{-3} \pm 3.2 \times 10^{-3} \text{U/ml}$ であり、丹参群、紅花群、Sarpogrelate群は、Control群に比較して有意に低下していた(図3)。

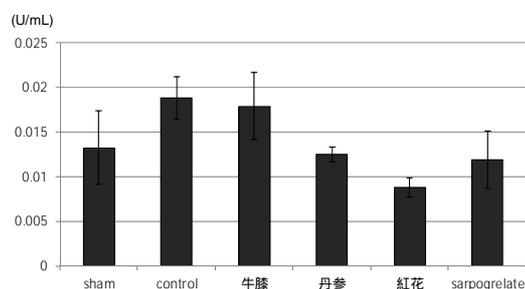


図3

(6) ウェスタンブロッティング解析による大動脈のeNOS及びiNOS発現

糖尿病群はSham群に比較してeNOS及びiNOS発現がともに増加を示した。しかし、糖尿病誘発により増加したeNOS及びiNOSは、牛膝・丹参・紅花のすべての生薬エキス、及びSarpogrelate投与による有意な変化を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

木村真梨, 三島怜, 条美智子, 野上達也, 藤本誠, 引網宏彰, 嶋田豊, 柴原直利: 糖尿病モデルにおける活性型血小板・血小板マイクロパーティクルに対する駆瘀血薬の効果. 第31回和漢医薬学会大会, 平成26年8月30~31日, 千葉.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴原 直利 (SHIBAHARA Naotoshi)

富山大学和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号: 10272907