

平成 21 年 5 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18790434
 研究課題名 (和文) 更年期障害に用いられる漢方薬がエストロゲン減少に起因する脂質代謝異常に及ぼす影響
 研究課題名 (英文) Effect of Kampo medicines used in the treatment of menopausal symptoms on lipid metabolism abnormality caused by loss of estrogen.
 研究代表者
 坂梨 まゆ子 (SAKANASHI MAYUKO)
 国立大学法人琉球大学・医学部・助教
 研究者番号：80363662

研究成果の概要：エストロゲン量が減少した閉経後の女性では、血中の脂質が増加して血管に沈着し、動脈硬化を起こしたり、狭心症や心筋梗塞を発症したりする。本研究では、更年期障害に使用される三黄瀉心湯を、更年期モデルラットに経口投与し、脂質代謝や心臓の虚血再灌流傷害（狭心症や心筋梗塞のような状態）に及ぼす影響を調査した。その結果、三黄瀉心湯投与ラットでは、水投与ラットに比べて血中脂質量が減少し、虚血再灌流心機能障害の改善が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	600,000	0	600,000
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	1,900,000	180,000	2,080,000

研究分野：循環器薬理学

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：心血管・血液，生薬・天然物薬理学，東洋医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の背景

更年期以降の女性は、様々な疾患を発症する。種々の不定愁訴を伴う更年期障害、動脈硬化や狭心症、心筋梗塞などの危険因

子となる高脂血症、骨粗鬆症などが、その例としてあげられる。これらの疾患は、いずれも女性ホルモンであるエストロゲンの低下を主因とすることから、治療には、エストロゲン製剤を用いたホルモン補充

療法 (Hormone Replacement Therapy: HRT) がしばしば行われてきた。しかしながら近年、HRT の重篤な副作用 (乳がん、血栓症、冠動脈性疾患など) に関する報告が相次ぎ、HRT 以外の薬物療法の有用性が見直されてきている。現在、HRT 以外の薬物療法では、更年期障害に対する漢方薬や向精神薬、高脂血症に対するスタチン系薬剤、そして骨粗鬆症に対するビスフォスフォネート剤の使用頻度が増加傾向にある。これらの薬剤は、各症状に対して奏功するが、複数の疾患を併発し多剤併用する必要が生じた場合、薬剤によって服用のタイミングや回数、服用方法が大きく異なり、服薬における患者の負担が大きくなるという問題が生じている。

この問題を解決するために、研究代表者は、漢方薬の特性に着目した。漢方薬は、複数の生薬からなる多成分系の薬剤であり、一つの方剤が幅広い薬効を持つ。また、漢方医学には、異病同治という概念があり、全く異なる病気でも、同じ証 (自他覚症状から得られた相互に関連する症候) であれば、一つの方剤で同時に治療することが可能であると考えられている。以上の点から、研究代表者は、更年期障害の症状緩和に対して処方された方剤が、エストロゲン減少という同じ原因により発症した高脂血症などの他の進行期疾患にも奏功するのではないかとの推測をもとに、本研究を計画した。

(2) 関連する研究動向および当該研究の位置づけ

高脂血症が起こると、増加した LDL コレステロールが酸化ストレスにより酸化され、動脈壁に沈着し動脈硬化を引き起こすことが知られている。また、冠動脈で動脈

硬化が進行すると、狭心症や心筋梗塞などの致死性の虚血性心疾患を発症する。そこで本研究では、高脂血症や虚血性心疾患の症状改善が期待される生薬、またはその成分を検索した上で、実験に使用する方剤を決定することとした。

Yamamoto らは、ニンジン、サイコ、カンゾウなどが脂質代謝異常を改善することを報告した。また、2004年にKongらは、オウレンやキハダに含まれるベルベリンが、スタチン系薬剤とは異なる作用機序で高脂血症改善作用を示すことを報告した。一方、2002年にShaoらは、オウゴンに含まれるバイカレインが、心筋細胞の酸化ストレスを減衰させることを報告した。さらに1998年Yimらは、ダイオウに含まれるエモジンが、虚血再灌流傷害心筋で乳酸脱水素酵素の逸脱を抑制することを、2005年Zhangらは、エモジンがフリーラジカルスカベンジ作用を有することを、それぞれ報告している。

2. 研究の目的

本研究は、更年期障害を適応とする漢方薬のうち、オウレン、オウゴン、ダイオウを構成生薬とする三黄瀉心湯が、エストロゲン低下に起因する脂質代謝系ならびに心血管系の傷害に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。実験では、更年期モデルとして卵巣摘出ラットを作成し、三黄瀉心湯を投与後、血中脂質量を測定し、脂質代謝異常に及ぼす影響を評価した。また、摘出心臓を用いて虚血再灌流時の心機能を測定し、三黄瀉心湯による心機能障害の改善作用を評価した。さらに、心筋のエネルギー代謝および脂質過酸化の状態を薬理学的手法により検討し、三黄瀉心湯による作用メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 手術および薬物投与

雌性 Wistar ラット 8 週齢 (九動) は、1 週間予備飼育した後、ペントバルビタール麻酔下 (40 mg/ kg, i. p.) に、両側卵巣を全摘出 (OVX) あるいは偽手術 (Sham) を施した。術後 1 週目に、両群をさらにランダムに 2 群に分け、対照群は溶媒である水を、漢方薬投与群は、三黄瀉心湯 (ツムラ) 懸濁液 750 mg/ kg/ day を 4 週間強制経口投与した。

(2) Langendorff 灌流心臓を用いた実験

エーテル麻酔下に採血を行い、ヘパリン 1,000 IU/ kg の静注後、心臓と胸部大動脈を摘出した。摘出標本は、Langendorff 法に従い、37°C の酸素飽和化 Krebs-Henseleit 液にて 100 cm H₂O の定圧灌流を行った。心機能の指標として、冠灌流量 (CF)、左室発生圧 (LVDP = $LVP_{max} - LVEDP$)、左室拡張末期圧 (LVEDP)、左室圧一次微分最大値 ($LVdP/dt_{max}$) および 左室圧一次微分最小値 ($LVdP/dt_{min}$) を測定した。

40 分以上平衡化した心臓は、自己心拍数の 10% 増のレートでペーシングを施した。ペーシング開始から 15 分後、心臓標本を完全虚血状態とした。30 分間の虚血の後、60 分間の再灌流を行い、再灌流終了直後に左室壁を採取し、-80°C で保存し、後述の実験に使用した。

(3) エネルギー代謝物の測定

左室壁のアデノシン三リン酸 (ATP) を化学発光法、無機リン酸 (Pi) およびクレアチンリン酸 (CrP) を、Fiske-Subarrow 変法に従い測定した。

(4) 脂質過酸化の測定

脂質過酸化の指標として、左室壁のマロン

ジアルデヒド (MDA) 量を、Ohkawa 変法に従い測定した。

(5) 各種血清パラメータの測定

血清中の総コレステロール、中性脂肪、低比重リポタンパク (LDL) コレステロールおよびエストラジオール濃度は、エスアールエル社に測定を依頼した。

(6) 血漿中の窒素酸化物量の測定

血漿中の一酸化窒素代謝物 (NO_2+NO_3) 含有量については、HPLC-Griess reaction system (ENO-20型: エイコム) により測定を行った。

(7) 摘出大動脈標本を用いた実験

摘出胸部大動脈を用いて輪状標本を作製し、Magnus 装置に取り付け、カリウム拘縮下に等尺性張力変化を観察し、アセチルコリンおよびニトロプルシドナトリウムが惹起する弛緩に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 主な研究成果

① 三黄瀉心湯が摘出灌流心臓標本の心機能に及ぼす影響

三黄瀉心湯を経口投与した更年期障害モデルラットにおいて、Langendorff 摘出灌流心臓標本の心機能を測定したところ、虚血再灌流により誘発される左室機能障害の改善作用が認められた。再灌流後の左室心筋中の ATP 量は、水投与群に比して三黄瀉心湯群で高値を示した。また、再灌流後の左室心筋中の MDA 量は、水投与群に比して三黄瀉心湯群で低値を示した。このことは、左室心筋中の脂質過酸化が抑制されたことを意味する。以上の結果より、三黄瀉心湯による虚血再灌流傷害の改善作用には、抗酸化作用が関与していることが示唆された。

② 三黄瀉心湯が脂質代謝に及ぼす影響

更年期モデルラットに水を投与した場合、偽手術群に比して、体重の増加が認められた。しかし、三黄瀉心湯を経口投与した更年期モデルラットにおいては、水投与群に比して体重増加の抑制が認められた。各種血清パラメータを測定した結果、水を投与した場合、更年期モデルラットでは、偽手術群に比して、エストラジオール値の低下と、血中脂質濃度の上昇が認められた。しかし更年期モデルラットに三黄瀉心湯を投与すると、血中の中性脂肪、総コレステロールおよびLDL コレステロールは、いずれも水投与群に比して低値を示した。このことから三黄瀉心湯は、閉経後のエストロゲン低下に伴う脂質代謝異常を改善することが示唆された。エストロゲンは、脂質代謝を促進させる作用を有することが明らかにされており、偽手術群の血中脂質は、エストロゲンの作用によりコントロールされていると考えられる。しかし、三黄瀉心湯を投与した更年期モデルラットでは、血中のエストラジオールが低下したままでも関わらず、血中脂質値の低下が認められた。このことから、三黄瀉心湯による脂質代謝異常の改善作用は、エストロゲン様作用とは異なる機序が関与するものと推測された。

③ 三黄瀉心湯が血管系に及ぼす影響

三黄瀉心湯を経口投与した更年期モデルラットにおいて、血漿中の窒素酸化物含有量 ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ 量) を測定したところ、水投与群に比して高値を示した。血管内皮細胞は、一酸化窒素 (NO) を産生し、血管拡張作用を示すことが知られており、内皮が傷害されると NO 産生は低下する。実験の結果から、三黄瀉心湯は、内皮傷害の改善に寄与する可能性が示唆された。一方、更年期モデルラット

の摘出胸部大動脈標を用いて、アセチルコリンが惹起する内皮依存性の血管弛緩反応に及ぼす影響を検討したところ、三黄瀉心湯投与による弛緩反応の増強作用は認められなかった。ニトロプルシッドナトリウムが惹起する内皮非依存性の血管弛緩反応に及ぼす影響も併せて検討したが、同様に三黄瀉心湯投与による弛緩反応の増強作用は認められなかった。

④ まとめ

本研究により、三黄瀉心湯は血中の脂質関連物質の低下作用や、窒素酸化物量の産生増加作用により、動脈硬化や心筋梗塞のような冠動脈性疾患の発症を抑制する可能性が示唆された。また、三黄瀉心湯は、虚血性心疾患を発症した場合でも、虚血再灌流心機能障害の程度を抗酸化作用により軽減する可能性が併せて示唆された。

(2) 本研究の位置づけ

本研究では、経口投与した三黄瀉心湯が、更年期のエストロゲン低下に起因する脂質代謝異常ならびに心血管系の傷害を改善することを明らかにした。三黄瀉心湯を用いた研究は、これまでも国内外で行われている。しかし、他の研究は、三黄瀉心湯の成分を静脈内注射あるいは直接臓器に投与する方法をとっていたり、投与量が臨床使用量に比して大量であったりした。一方、本研究は、実際に更年期障害の治療に使用されている漢方エキス製剤を使用し、ヒトでの服用量を基に投与量を算出し、ヒトと同様に温水懸濁液の経口投与を行った。このように、研究代表者は、三黄瀉心湯の臨床使用条件を考慮した上で本研究を行い有用な結果が得られたという点において、価値のあるものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

① Mayuko Sakanashi, Effects of San' o-shashin-to, a Japanese Kampo Medicine, on Mechanical Changes in Perfused Ischemic Hearts of Ovariectomized Rat. The IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008年7月30日, Québec City (Canada)

② 坂梨まゆ子, 卵巣摘出ラットの虚血再灌流心機能障害および血清脂質値に対する三黄瀉心湯の効果. 第82回日本薬理学会年会 2009年3月17日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI MAYUKO)

国立大学法人琉球大学・医学部・助教

研究者番号 : 80363662

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者