

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07437

研究課題名(和文) 補腎剤の抗酸化機序の解明による、プロオキシダントを用いた酸化ストレス治療の開拓

研究課題名(英文) Analysis of antioxidative mechanism of "Hojin-zai", a traditional Kampo medicine, and its application to the new prooxidant therapy.

研究代表者

平山 暁 (Hirayama, Aki)

筑波技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：20323298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単独では抗酸化効果の弱い牛車腎気丸の生体保護機序を、代表的な駆お血剤である桂枝茯苓丸との対比による血流改善効果からライブイメージングにより解析し、漢方臨床における証の差の科学的解明を行った。  
桂枝茯苓丸は細動脈への効果が強く、速効性の血管径拡張効果が認められ、一酸化窒素(NO)依存性であった。一方、牛車腎気丸は、緩徐に発現する毛細血管領域での血流速度増強が主効果であり、NOをむしろ抑制した。これらの結果は、証に基づく古典的な漢方治療選択の背景に、標的血管の差異やNO依存性が存在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本漢方の実臨床では、証に基づく処方選択が為される。この経験則に基づく治療方針の有用性は幅広く認知されているが、現代薬理学的な証明は少ない。本研究結果は、牛車腎気丸および他の駆お血剤に関する経験的な随証治療に対し、現代科学的な論拠を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the bioprotective mechanism of goshajinkigan (GJG), a kampo prescript, in comparison with keishibukuryogan (KBG), a typical kampo anti-oketsu prescription. The analysis made by live-imagings of the murine and rat animal models. The main pharmacological target of GJG was the capillary vessels, while that of KBG was the arterioles. GJG enhanced the blood flow through the increase of capillary blood flow velocity and this effect was nitric oxide (NO) independent. In contrast, KBG induced vasodilation through NO dependent mechanism.

研究分野：内科学

キーワード：牛車腎気丸 桂枝茯苓丸 毛細血管 細動脈 血流速度 一酸化窒素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは現在多くの疾患でその重要病態であることが示され、抗酸化作用を持つ薬剤や物質による治療が広く試みられている。また漢方製剤においても抗酸化作用はその重要な薬理効果である。酸化ストレスは「酸化抗酸化平衡が酸化側に傾き生体に傷害性のある状態」と定義される(Sies H. 1985)。平衡が重要視される漢方治療概念に当てはめると、漢方製剤は、抗酸化能を補することにより酸化抗酸化平衡を均衡化させる、と理解される。

一方近年の大規模臨床試験やメタアナリシスでは、抗酸化治療の有用性を否定する報告が相継ぎ(Bjelakovic G, Cochrane Database Syst Rev 2012), 「アンチオキシダントパラドックス」と称される大きな問題となっている(Halliwell B, Br J Clin Pharm 2013)。反面、放射線ホルミシス効果のように、「弱いプロオキシダント」による生体の抗酸化物質の誘導が結果的に生体保護に働く現象も解明されてきている(Sies H, Antioxid Redox Signal 2017)。これを念頭にこれまでの報告を振り返ると、漢方製剤の抗酸化作用は麻黄や大黄などを含有する攻剤が中心であり、補剤には抗酸化作用の報告は少ない、という事実が見出される。申請者も独自に、*in vitro*において現在頻用される漢方製剤48種の、5種類の活性酸素種(ROS)に対する消去活性評価による総合的な抗酸化能評価を報告し、補腎剤を中心とする補剤にはほとんど活性酸素消去活性がないことを見出している。補剤が使用される老化や慢性疾患などは、酸化ストレスが亢進している状態であり、この病態では抗酸化活性の高い方剤が病態改善に繋がると捉えられてきた。しかし申請者が見出した事実は、上述の概念とは真逆である。更に補剤はROSの発生を増強する鉄や銅などの含有量が多い。

このような背景から、「漢方治療では、酸化ストレス病態が亢進している状況において、なぜ抗酸化作用の弱い方剤を用いるのか？」と云う問いが生まれる。さらにこれまでの臨床経験上、補剤がこのような病態に対し有効性が高く、かつ安全であることから、「補剤は、アンチオキシダントよりもプロオキシダントとしての作用により、生体保護効果をもたらしている」とする仮説が成立する。

さらに、新たな薬剤により「弱いプロオキシダント」による保護効果を証明するためには大規模臨床試験が必要であるが、酸化ストレスが多くの病態に関与していることが明らかな現状では、この試験遂行はほぼ不可能である。他方、漢方製剤は長い歴史の中で有効性と安全性が示されていることから、漢方製剤の機序を解明すれば、新たな臨床試験を経ずともプロオキシダントによる生体保護効果を明らかにすることが可能であり、アンチオキシダントパラドックスを克服しうる抗酸化治療の大きなブレイクスルーが期待できる。

## 2. 研究の目的

上記の問いおよび仮説に対し、本研究では、代表的な補腎剤である牛車腎気丸を中心に、抗酸化活性の弱い補剤がどのように生体保護効果を示すかについて、1)動物モデルにおけるライブイメージング、2)ヒト血清抗酸化プロファイル変動、により解明することにより、アンチオキシダントパラドックスを克服し、新たな抗酸化治療へのブレイクスルーとすることを目指した。則ち、これまでの漢方治療による酸化ストレス改善は、抗酸化能を有する製剤や成分の投与により、生体内抗酸化能の補充することによりもたらされると考えられており、これに基づき治療戦略が立てられてきた。これは漢方領域に限らず、薬品による抗酸化治療やサプリメント、食品などによる効果においても同様である。このような従来の固定概念を打破し、安全なプロオキシダントによる治療に繋げることを目指した。

## 3. 研究の方法

### 試薬、実験器具等

ライブイメージングは組織内倫理委員会の承認のもと株式会社タイムラプスビジョン(科学研究費補助金取扱規程機関番号92402)において行った。実験動物としてC57B/6マウスおよびWistarラットを用いた。Nikon Lxe (Nikon, 東京) 正立生体顕微鏡を用いImageJ ver.1.45s画像解析ソフト(フリーソフトウェア, National Institute of Health, ML, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>)により解析した。漢方製剤は受けた医療製剤用エキス顆粒を株式会社ツムラより提供を受け使用した。

### ライブイメージングによる漢方薬の血流への影響評価

C57B/6マウス皮下血管およびWistarラット腸間膜動脈領域を用い、麻酔下に実験を行った。マウスの腹側部皮膚剥離し、皮下血管をガラス製の固定板の上に展開した。次いで塩化ビニリデン薄膜で被い、水分の蒸発を防ぎつつ固定した。この状態を保ちつつ各漢方製剤を経食道的に留置したカテーテルより胃内に投与し観察を行った。ライブイメージングは、皮下血管の血流を薬剤投与前および、投与30分後から30分毎に投与120分後まで動画記録し、取得した画像をコンピュータ上で解析した。測定部位は動脈(血管径50 $\mu$ m以上)、細動脈(血管径50 $\mu$ m未満)および毛細血管(血管径10 $\mu$ m未満)の3部位とした。

ライブイメージング映像より下記のパラメータを測定した。血管内径は上記の測定部位を固

定し、時間経過ごとに画面上で計測した。赤血球血流速度は赤血球移動速度から解析した。固定のフレーム数を定め、このフレーム数経過前後において血管内を1つの赤血球が移動する距離を計測し、フレーム数経過に要した時間で除することにより算出した。血流量は、血管断面を正円と仮定し断面積を求め、血流速度を乗じることにより単位時間当たりの血流量を算出した。計測は1カ所において3回行い、平均値を赤血球血流速度とした。

#### ラット腸間膜動脈領域におけるNO蛍光イメージング

麻酔下にラット回腸を展開固定後、撮影部位を決定し、設定部位上流の血管にカテーテルを挿入して還流ルートを確認した。還流ルートを通じて蛍光指示薬(DAF2-DA/HPF/HYDROPEX)を投与し、局所還流した後共焦点レーザー顕微鏡撮影を行いバックグラウンドとした。蛍光消失後、蛍光指示薬を再度局所還流して同一部位において撮影を行い、蛍光光度を解析した。

#### 漢方製剤の投与による群分け

漢方製剤は牛車腎気丸を用い、対照薬として血流改善効果が既知の駆瘀血剤である桃核承気湯、当帰芍薬散、桂枝茯苓丸を用いた。各漢方製剤は90°Cにて湯溶し、室温に冷ましたあと、経食道的に留置したカテーテルより胃内に投与した。投与量は300 mg/kgとし、100 mg/mLの濃度において使用した。コントロール群は同じ処置を施し、同容量の生理食塩水を投与した。

#### 統計解析

統計解析はPrism6 for Mac OS X (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)により行った。各薬剤がもたらす効果は、投与前値に対する百分率として評価した。経過中の検討は繰り返し測定のある二元配置分散分析(Two-way repeated measures ANOVA)を用い、Dunnnett法による多重比較を行った。以降の結果は特記されたものを除き平均値±標準誤差で記している

#### ヒトにおける補剤のもたらす酸化ストレス変動と生体保護効果解析

当初計画では、ヒト血清における抗酸化プロファイル変動により補剤のもたらす酸化ストレス変動と生体保護効果を電子スピン共鳴法により解析する予定であり、倫理委員会承認など準備を進めていた。しかし新型コロナウイルス感染拡大により、解析に十分な参加者数が得られなかったため、この解析は断念した。

## 4. 研究成果

### 漢方薬による血管拡張・血流改善効果のライブイメージング

本モデルでは1)充分広い血管径にも関わらず著明に赤血球がうっ滞し血管内に赤血球を含まない血漿のみの無細胞層が形成されること、2)分岐部で赤血球同士の粘着による分岐側への血流が停滞すること、が認められた。

既報通り、桂枝茯苓丸は投与後30~120分にかけて細動脈径を拡張させ、無細胞層と分岐部における赤血球固着の消失をもたらした。一方牛車腎気丸も同様に無細胞層と赤血球固着を消失させるが、その効果発現は桂枝茯苓丸より遅く、投与後90~180分にかけて認められた。また主たる標的血管は毛細血管における血流速度の増加であり、細動脈径の変動は認められなかった(図1, 2)。

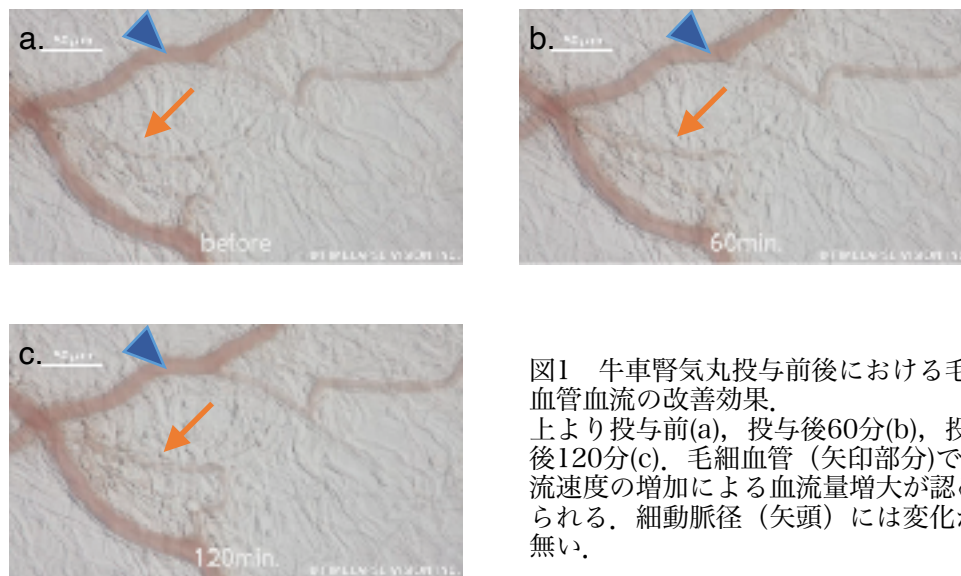
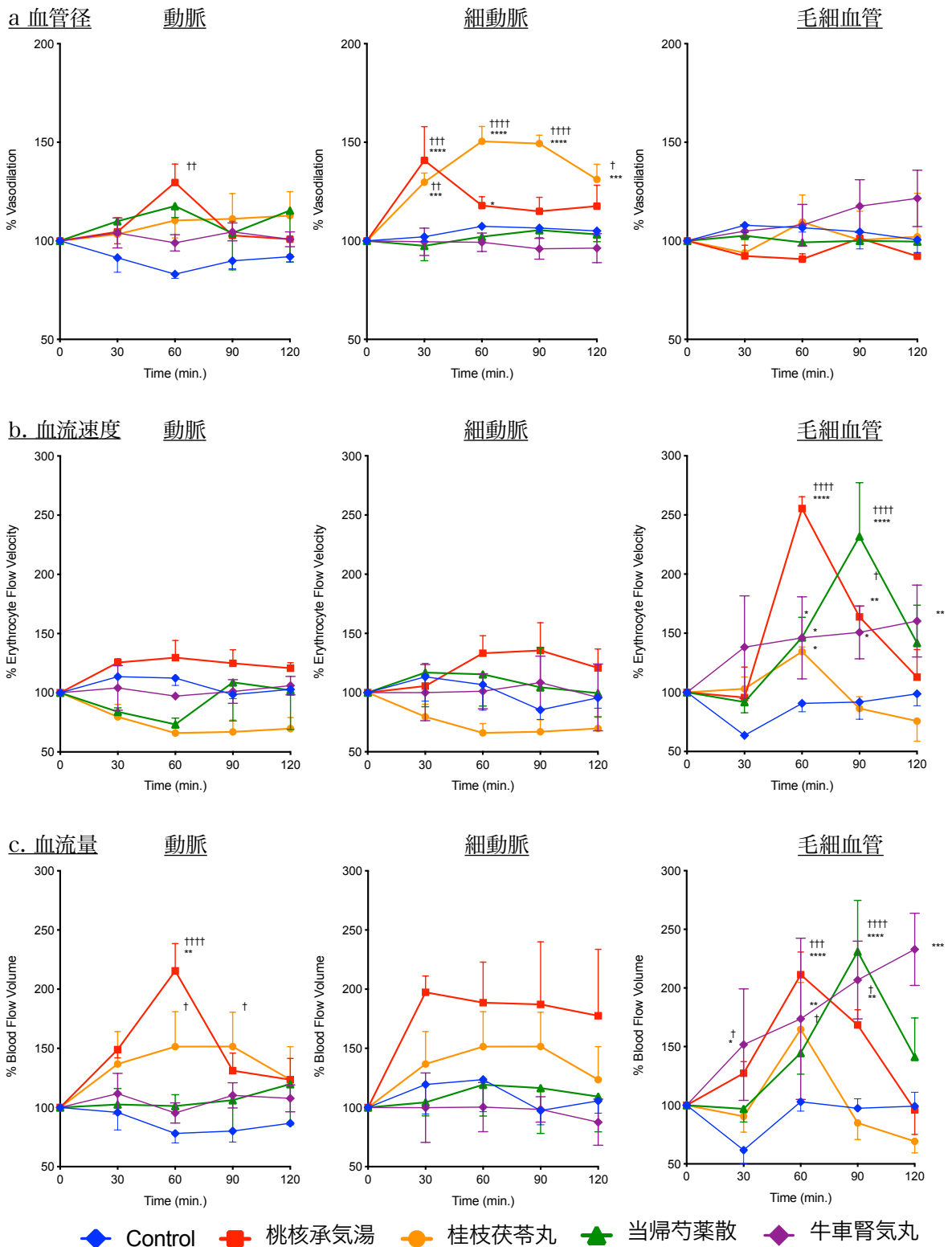


図1 牛車腎気丸投与前後における毛細血管血流の改善効果。

上より投与前(a)、投与後60分(b)、投与後120分(c)。毛細血管(矢印部分)で血流速度の増加による血流量増大が認められる。細動脈径(矢頭)には変化が無い。



P values. vs control: \* < .05, \*\* < .01, \*\*\* < .001, \*\*\*\* < .0001  
vs pre-administration: † < .05, †† < .01, ††† < .001, †††† < .0001

図2 牛車腎気丸および対照漢方薬による、血管径、血流速度、血流量への影響  
ライブイメージング映像より解析した、各漢方薬投与前および投与後120分間における効果を示す。上より血管径(a)、血流速度(b)、血流量(c)。を示す。a-cの各パネルは、左より順に動脈、細動脈、毛細血管、を示す。グラフ内の直線はコントロール(青)、桃核承気湯投与群(赤)、桂枝茯苓丸(橙)、当帰芍薬散(緑)、牛車腎気丸(紫)の各群を表す  
駆瘀血剤である桂枝茯苓丸や桃核承気湯は投与後比較的早期の、動脈・細動脈の血管径拡張効果(a)により血流量を増加させている(c)。一方牛車腎気丸は毛細血管の血流速度の増加(b)により、血流量増大をもたらし、その効果は駆瘀血剤に比べ緩徐である。

### ラット腸間膜動脈領域におけるライブイメージングならびにNO蛍光イメージング

我々は既報において桂枝茯苓丸が細動脈血管内皮細胞からNO分泌を促進し、血管径拡張公開に關与することを報告している(Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017, 3620130, 7. doi:10.1155/2017/3620130). 一方、牛車腎気丸は腸間膜動脈領域におけるNO蛍光発光を時間経過的に有意に減少させた。NO合成酵素阻害剤であるL-NMMAの投与は桂枝茯苓丸の蛍光発光を減少させたが、牛車腎気丸には影響を与えなかった。この結果は、駆瘀血剤に分類される桂枝茯苓丸と分類されない牛車腎気丸の経験的治療選択の背後にNO依存性が存在する可能性を示す。

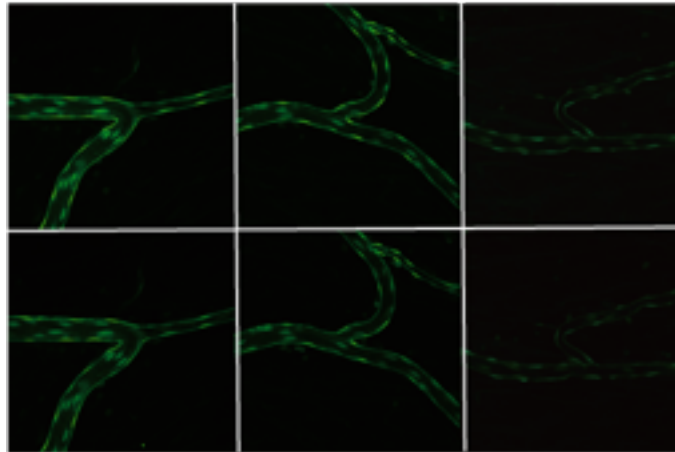


図3 牛車腎気丸投与による腸間膜動脈領域のNO蛍光発光への影響

上段パネルに牛車腎気丸投与前，下段に投与後60分におけるラット腸間膜動脈領域の蛍光画像を示す。各パネルは左より上流域，中流域，下流域を示す。牛車腎気丸投与はNO産生をむしろ減少させている，

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hirayama Aki, Akazaki Satomi, Nagano Yumiko, Ueda Atsushi, Chang-il Lee Masaichi, Aoyagi Kazumasa, Oowada Shigeru, Sato Keizo | 4. 巻<br>1           |
| 2. 論文標題<br>Hemodialysis raises oxidative stress through carbon-centered radicals despite improved biocompatibility                      | 5. 発行年<br>2021年     |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition  | 6. 最初と最後の頁<br>44-51 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3164/jcfn.20-141  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>HIRAYAMA Aki, TOMITA Tsutomu, YOKOTA Hiroo, KASAMAKI Yuji, MATSUZAKI Yasushi, AOYAGI Kazumasa  | 4. 巻<br>71         |
| 2. 論文標題<br>Evaluation of Various Anti- <i>oketsu</i> Kampo Formulae?Tokakujokito, Keishibukuryogan and Tokishakuyakusan?for Microcirculation by Live Imaging | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Kampo Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>8~17 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3937/kampomed.71.8   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-          |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Hirayama Aki, Wakusawa Keisuke, Fujioka Toru, Iwata Keiko, Usui Noriyoshi, Kurita Daisuke, Kamenno Yosuke, Wakuda Tomoyasu, Takagai Shu, Hirai Takaharu, Nara Takahiro, Ito Hiromu, Nagano Yumiko, Oowada Shigeru, Tsujii Masatsugu, Tsuchiya Kenji J., Matsuzaki Hideo | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>Simultaneous evaluation of antioxidative serum profiles facilitates the diagnostic screening of autism spectrum disorder in under-6-year-old children  | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>20602 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-77328-z   | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>平山 暁, 富田 勉, 横田 廣夫, 笠巻 祐二, 松崎 靖司, 青柳 一正.         | 4. 巻<br>71         |
| 2. 論文標題<br>ライブイメージングによる, 桃核承気湯, 桂枝茯苓丸, 当帰芍薬散の微小循環動態への特性評価 | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>日本東洋医学雑誌  | 6. 最初と最後の頁<br>8-17 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                             | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）                     | 国際共著<br>-          |

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Hirayama Aki, Tomita Tsutomu, Nishida Takashi, Nagano Yumiko   | 4. 巻<br>2022         |
| 2. 論文標題<br>Live-Imaging Analysis of Target Vessels and Nitric Oxide Production Associated with Gosha-Jinki-Gan and Keishi-Bukuryo-Gan: Two Herbal Preparations with Clinically Proven Blood Flow-Improving Effects but with Different Traditional Clinical Indicative Patterns | 5. 発行年<br>2022年      |
| 3. 雑誌名<br>Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine  | 6. 最初と最後の頁<br>1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1155/2022/3821345   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ono Takahiko, Hirayama Aki, Wada Kentaro, Wu Jianbo, Matsuda Hisashi   | 4. 巻<br>9               |
| 2. 論文標題<br>Significance of <sc>Kampo</sc> medicine in chronic kidney disease (<sc>CKD</sc>) and hypertension "1st International Symposium on Kampo Medicine" | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Traditional & Kampo Medicine   | 6. 最初と最後の頁<br>125 ~ 127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/tkm2.1327  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>平山 暁  | 4. 巻<br>36                |
| 2. 論文標題<br>特集 慢性腎臓病・透析患者の酸化ストレス-最新知見と治療展開 企画に当たって-酸化ストレスをめぐる最近の展開 | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>臨床透析  | 6. 最初と最後の頁<br>1493 ~ 1495 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.19020/cd.0000001523                | 査読の有無<br>無                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                            | 国際共著<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hirayama Aki, Nagano Yumiko, Oowada Shigeru, Matsuzaki Hideo         | 4. 巻<br>180             |
| 2. 論文標題<br>Time-sequential Changes in Antioxidant Profile during Aging Process | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Free Radical Biology and Medicine                                    | 6. 最初と最後の頁<br>s22 ~ s22 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.042                | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平山 暁、富田 勉、長野由美子、青柳 一正                             |
| 2. 発表標題<br>映像化解析による補腎剤と駆お血剤の血流改善効果の差異の描出-牛車腎気丸と桂枝茯苓丸 における検討- |
| 3. 学会等名<br>第71回日本東洋医学会学術総会                                   |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hirayama A, Nagano Y, Tomita T   |
| 2. 発表標題<br>Kamishoyosan ameliorates antioxidative profiles via an oxidative stress-related hormesis pathway.                  |
| 3. 学会等名<br>Japan-Korea Academical Symposium, The 71st Annual Meeting of the Japan Society for Oriental Medicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hirayama A.   |
| 2. 発表標題<br>Connotation of weak antioxidants/pro-oxidants in the traditional prescriptions of Kampo, Japanese traditional medicine. |
| 3. 学会等名<br>The 9th Joint Meeting of the Society of Free Radical Research Australasia and Japan (国際学会)                              |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平山 暁, 富田 勉, 青柳一正                            |
| 2. 発表標題<br>生体微小撮影による, 各種駆お血剤の微小循環における標的血管と血流増加機序の映像化解析 |
| 3. 学会等名<br>第70回日本東洋医学会総会                               |
| 4. 発表年<br>2019年  |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hirayama A.  |
| 2. 発表標題<br>Gut-Kidney Cross-Talk, Uremic Toxin, Oxidative Stress.   |
| 3. 学会等名<br>The 9th biennial meeting for the Society for Free Radical Research Asia (SFRR Asia 2019) (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平山 暁, 富田 勉, 青柳 一正.  |
| 2. 発表標題<br>毛細血管・赤血球の異常を再現したお血類似病態のライブイメージングと, 駆お血剤による血流動態及び NO 産生効果の動画解析 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本東洋医学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平山 暁, 富田 勉, 青柳 一正.               |
| 2. 発表標題<br>ライブイメージング技術の応用による駆お血剤薬理効果定量解析の試み |
| 3. 学会等名<br>第75回日本東洋医学会関東甲信越支部学術総会           |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>平山 暁                              |
| 2. 発表標題<br>ミニシンポジウム 「臨床現場でのESR応用」            |
| 3. 学会等名<br>第57回電子スピンサイエンス学会(SEST2018) (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

〔図書〕 計2件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>大倉 一郎、小澤 俊彦、河野 雅弘 編集                                       | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>化学同人   | 5. 総ページ数<br>336 |
| 3. 書名<br>抗酸化科学 担当部分「活性酸素およびフリーラジカル障害を抑制する医薬品」「活性酸素および活性酸素で引き起こされる病気」 |                 |

|                                      |                 |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>加藤士郎 編集                    | 4. 発行年<br>2019年 |
| 2. 出版社<br>中山書店                       | 5. 総ページ数<br>272 |
| 3. 書名<br>臨床力をアップする漢方 担当部分「腎臓疾患の漢方治療」 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 植田 敦志<br><br>(Atsushi Ueda)<br><br>(00708448) | 筑波大学・医学医療系・准教授<br><br><br><br>(12102) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|