

日本財団補助金による
2000年度日中医学学术交流促進事業

⑤. 在留中国人研究者研究助成

(20) 一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に対する釣藤散の
改善作用

一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に対する
釣藤散の改善作用

張紹輝

富山医科薬科大学
和漢薬研究所
生物試験部門

要旨

最近、二重盲検法の臨床試験では、脳血管性痴呆患者に対して釣藤散が有効であることが報告された。今回、我々は両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通（2VO）あるいは scopolamine を前処置したマウスにみられる学習障害に対する釣藤散及びその構成生薬釣藤鈎の作用について検討した。釣藤散及び釣藤鈎の水エキスは2VOまたは scopolamine により誘発した学習障害を改善した。また、両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通により誘発した空間学習障害に対して日本市場に流通している中国江西省産、貴州省産及び広西自治区の釣藤鈎のメタノールエキスの作用についても検討した。江西省産の釣藤鈎には改善作用は認められなかったが、貴州省産及び広西自治区の釣藤鈎のメタノールエキスは空間学習障害を改善した。

Key words: 釣藤散、釣藤鈎、水エキス、メタノールエキス、2VO、scopolamine、受動的回避学習障害、空間学習障害、

目的

釣藤散は『普濟本事方』に記載され、石膏 5g、菊花 3g、釣藤鈎 3g、陳皮 3g、人參 3g、麥門冬 3g、防風 3g、茯苓 3g、半夏 3g、甘草 1g、生姜 1g の 11 種類の生薬から構成される。肝の邪気が盛んなことによって生じる頭痛、めまい、肩こり、神経症などの症状の治療に用いられる。最近、二重盲検法の臨床試験では、脳血管性痴呆患者に対して釣藤散が有効であることが報告された (1, 2)。そこで、今回、両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通あるいはスコポラミンを前処置したマウスにみられる学習障害に対する釣藤散及びその構成生薬釣藤鈎の作用について検討した。また、日本市場に流通している江西省産、貴州産及び江西省の釣藤鈎の作用についても検討した。

実験材料と方法

使用動物

実験には ICR 系雄性マウス (7 週齢) を日本エスエルシー (株) (静岡) より購入し、約 1 週間、飼育室の飼育環境に慣らした。マウスは 1 ケージ当たり 9-10 匹を同居させ、12 時間の明暗周期、恒温 (25±1℃) 恒湿 (55±5%) で飼育した。

生薬の調製

釣藤散および釣藤鈎をそれぞれ 10 倍の蒸留水中で、100℃、1 時間加熱抽出し、棉栓で濾過した。濾液は液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。3 種類釣藤鈎のメタノールエキスはツムラ会社から提供された。

両側総頸動脈の結紮と再開通 (2VO)

Urethane (1.5 g/kg、東京化成、東京) 麻酔下で、マウスの頸部を切開し、切開口より左右の総頸動脈を注意深く露出し、両動脈を同時に絹製縫合糸で結紮した。また、マウスの尾部の先端より 1 cm を切開し、0.3 ml を瀉血した。結紮 20 分後に、結紮を解放して、血流を再開した。両側総頸動脈を結紮後再開通したマウスを 2VO 群とした。また、結紮及び瀉血は行わずに同様の手術を施したマウスを sham とした。釣藤散の水エキス、釣藤鈎の水及びメタノールエキス等は 2VO 処置の 1 時間前に経口投与した。2VO 処置の 2 日後に訓練試行、さらに 1 日後に保持試行を行った。

受動的回避学習課題 (Step-down)

装置 (30×25×25 cm) は床グリットとその一角に設置した円形プラットフォーム (直径 4.5 cm、高さ 4.5 cm) からなり、グリットは電気刺激を与えるための刺激装置に接続した。

訓練試行ではまずマウスを装置のプラットフォーム上に置き、最初の 3 分間は慣らし時間とした。続く 5 分間を訓練試行とし、マウスが床グリットに降りる毎に、プラットフォームに上がるまで連続的な電気ショック (0.4 mA) を与えた。訓練試行の 24 時間後に保持試行を行った。マウスをプラットフォームに置き、床におりるまでの潜時 (Step-down latency) を記録した。

Morris water maze

直径 70 cm、高さ 28 cm の円形プールに高さ 13 cm まで水 (水温 25±1℃) を入れた。プールは 4 象限に分けられ、直径 5 cm のプラットフォームは、そのうちの一つの象限の水面下 1 cm に固定した。60 秒の訓練試行では、マウスを壁に向け、プールの中へ静かに投入し、プラットフォームに逃避するまでの遊泳時間 (Escape latency) を記録した。1 日 4 試行 (1 Block とした)、合計 5 日間行った。マウスが水迷路学習を獲得したら、

プラットフォームをプールから取り出し、マウスを再度プールに60秒程度入れ、プラットフォームの存在した象限における遊泳時間 (Swimming time in the platform section) を測定した。本試行開始前および終了後に、プラットフォームを見える状態 (水面上1 cm) に設定して偽試行 (Probe trial 1, 2) を行った。

薬物処置

釣藤散の水エキス、釣藤鈎の水及びメタノールエキスはそれぞれ2VOの1時間前に経口投与した。Scopolamine hydrobromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は訓練試行の15分前に腹腔内投与した。Tacrine (9-smino-1,2,3,4-tetrahydroacridine HCl; Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は訓練試行または2VOの60分前に腹腔内投与した。

統計処理

受動的回避学習課題で得られた Step-down latency は Mann-Whitney's U-test で群間の比較を行った。Morris water maze で得られた Escape latency は Two-way repeated measure ANOVA で群間の比較を行い、Swimming time in the platform section は Mann-Whitney's U-test で群間の比較を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

1、2VO 及び Scopolamine 誘発の受動的回避学習障害に対する釣藤散及び釣藤鈎の作用

両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通したマウスにおいては Step-down latency が sham 群に比べ有意に減少した ($P < 0.01$)。釣藤散 (750-6000 mg/kg) を2VO処置の1時間前に経口投与しておく、Step-down latency の減少が抑制された (Fig. 1)。釣藤鈎 (75-600 mg/kg) も Step-down latency の減少を有意に改善した (Fig. 2)。一方、Scopolamine の投与により認められる Step-down latency の有意な減少は釣藤散 (750-6000 mg/kg) の前処置により抑制された (Fig. 3)。釣藤鈎 (150-600 mg/kg) も Scopolamine 誘発した Step-down latency の減少を改善した (Fig. 4)。標準薬 (2.5 mg/kg) は Scopolamine 誘発した Step-down latency の減少を有意に改善した (Fig. 5)。

2、2VO 誘発の学習障害に対する釣藤散及び釣藤鈎の水エキスの作用

2VO 処置したマウスにおいては Escape latency が sham 群に比べ有意に増加し、逆に Swimming time in the platform section は低値を示した。釣藤散 (750-6000 mg/kg) を2VO処置の1時間前に経口投与しておく、Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少共に抑制した (Fig. 6)。釣藤鈎 (75-600 mg/kg) も Escape latency の増加を有意に回復し、Swimming time in the platform section の減少を抑制した (Fig. 7)。

3、2VO 誘発の学習障害に対する釣藤鈎メタノールエキスの作用

2VO 処置したマウスにおいては Escape latency が sham 群に比べ有意に増加し、逆に Swimming time in the platform section は低値を示した。S-Type の釣藤鈎のメタノールエキス (60 mg/kg) 及び SR-Type の釣藤鈎のメタノールエキス (60 mg/kg) は Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少を共に抑制した (Fig. 8, 9)。R-Type の釣藤鈎のメタノールエキスの改善作用が認められなかった (Fig. 10)。標準薬 (2.5 mg/kg) は2VO誘発した Escape latency の増加と Swimming time in the platform section の減少を有意に改善した (Fig. 11)。

考察

偽試行1、2においては、マウスがプラットホームに上るまでの潜時においては、各群の間では、有意な差は認められなかったため、虚血一再開通手術または薬の前処置はマウスの自発運動に影響を及ぼさないと考えられた。Block 1においては、プラットホームを水面下1 cmに設定し、偽試行1のプラットホームが見える状態と比較すると、マウスはプラットホームに上るまでの潜時が有意に延長したため、プラットホームが完全に見えないと考えられた。

本実験では、虚血マウスにみられる学習障害に対する釣藤散の効果を検討した。虚血により、訓練試行においては、プラットホームに上る潜時が有意に増加された。6日目においては、プラットホームを設けた象限で水泳時間が減少された。釣藤散は虚血一再開通手術の1時間前に経口投与しておくこと、これらの障害を有意に抑制し、釣藤散及釣藤鈎水エキスが予防作用を有することが認められた。

一時的な脳虚血異常状態になると、酸素とグルコースの供給が絶たれるためエネルギー枯渇に陥った結果、脳機能は一時的あるいは永久的に障害を受け(3-5)、学習障害をおこす。虚血性脳血管障害では、赤血球集合能亢進、赤血球変形能低下、白血球変形能低下などが観察され、釣藤散の投与することにより、これらの現象が抑制され、血流速度や血流量が増加し、虚血性脳血管障害を改善すると考えられる(6)。一過性脳虚血の処置により、マウス脳内のアセチルコリンの含量は低下することが報告されており(7)、2VOマウスの学習行動障害に対する予防作用にはコリン神経系の役割が大きいと推測される。一方、中枢神経系においては、グルタミン酸は重要な神経伝達物質として学習記憶に重要な役割を果たしているが、一過性脳虚血の状態では、細胞外グルタミン酸濃度が著しく上昇し、シナプス後膜ニューロンでは、グルタミン作動性のイオンチャンネルや膜電位依存性イオンチャンネルが開閉し、細胞外からCa²⁺の流入と細胞内の小胞体からCa²⁺の流出が起こり、遅発性神経死に至ることが知られている(8,9,10)。このグルタミン酸誘導神経細胞死に対して、釣藤散は抑制する傾向がみられた。釣藤散の構成生薬のうち、釣藤鈎のみ、グルタミン酸によるカルシウムの細胞内への流入を有意に阻害し、この細胞死に対する保護作用が認められた(11)。また、釣藤鈎は抗酸化作用ならびにフリーラジカル除去作用を持ち(12)、学習障害を改善すると推測される。

日本市場で釣藤(*Uncaria rhynchophylla*)、華鈎藤(*U. sinensis*)、大葉鈎藤(*U. macrophylla*)3種類の釣藤鈎が流通しており、その薬効は含まれるアルカロイド成分の違いに関与していると報告された。これらの釣藤鈎は含有する成分を統計的に3種類のケモタイプ(S-Type, SR-Type R-Type)に分類された(13,14,15)。そこで、一過性脳虚血による学習障害に対するこの3種類釣藤鈎のメタノールエキス(トータルアルカロイド)の効果について検討した。S-Type, SR-Type 釣藤鈎のメタノールエキスには、一過性脳虚血による学習障害に対する釣藤散および釣藤鈎水エキスと同様に改善作用が認められたが、R-Typeのメタノールエキスには、改善効果は見られなかった。今後、一過性虚血による学習障害に対するS-Type, SR-Typeの釣藤鈎に含まれるインドール型又はオキシインドール型アルカロイドの効果についての検討、作用機序の解明が必要と考えられる。

Reference

- 1) Shimada Y., Terasawa K, et al.: A well-controlled study of Choto-san and placebo in the treatment of vascular dementia.

J. Traditional Medicine. 11: 246-255, 1994.

2) Terasawa K, et al.: Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo controlled study. *Phytomedicine*. 4: 15-22, 1997.

3) Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke. *Stroke*. 28: 459-463, 1997.

4) Nyenhuis DL., Gorelick PB. Vascular dementia: a contemporary review of epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. *Journal of the American Geriatrics Society*. 46: 1437-1448, 1998.

5) Tatemichi TK., Desmond DW., Paik M., Figueroa M., Gropen TI., Stern Y., Sano M., Remien R., Williams JB., Mohr JP. Clinical determinants of dementia related to stroke. *Annals of Neurology*. 33: 291-298, 1990.

6) Yang Q., Kita T., Hikiami H., Shimata Y., Itou T., Terasawa K.: Effects of Choto-san on microcirculation of the bulbar conjunctiva and hemorheological factors in the patients with asymptomatic cerebral infarction. *J. Traditional medicine*. 15: 412-413, 1998.

7) Xu J., Murakami Y., Matsumoto K., Tohda M., Watanabe H., Zhang s., Yu Q., Shen J.: Protective effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. *J. Ethnopharmacol*. 73 (3): 405-413, 2000.

8) Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci*. 11 (9): 379-87, 1990.

9) Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer NH.: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem*. 43 (5): 1369-74, 1984.

10) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol*. 19 (2): 105-11, 1986.

11) Shimada Y., Hashiba M., Goto H., Kogure T., Shibahara N., Itoh T., Terasawa K.: Protective effect of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced acute neuronal death in cultured rat cerebellar granule cells. *J. Traditional medicine*. 15: 241-244, 1998.

12) Liu J, et al.: Oretreatment with Tenma and chotoko extracts on striatal monoamines and lipid peroxides in iron-induced acute epileptic rats. *J. med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU*. 9: 202-208, 1992.

13) Sakakibara I., Takahashi H., Yuzurihara Y., Katoh T., Kubo M., Hayashi K., Ishige A., Amagaya S., Okada M., Maruno M.: Pharmacognostical and pharmacological evaluations of *Uncaria sinensis* (Rubiaceae). *Natural Medicines*. 51 (2): 79-83, 1997.

14) Sakakibara I., Takahashi H., Terabayashi S., Yuzurihara Y., Kubo M., Higuchi M., Ishige A., Komatsu Y., Maruno M., Okada M.: Chemical and pharmacological evaluations of Chinese crude drug "Gou-teng". *Natural Medicines* 52 (4):

353-359, 1998.

15) Sakakibara I., Terabayashi S., Kubo M., Higuchi M., Ishige A., Sasaki H., Okada M.: Evaluation of Gou-teng (Hook and stems of Uncariae plants) III. Hypotensive principle from *uncaria rhychophylla* and alteration of its content on extraction process. *Natural Medicines* 53 (6): 308-312, 1999.

Choto-san improves acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test

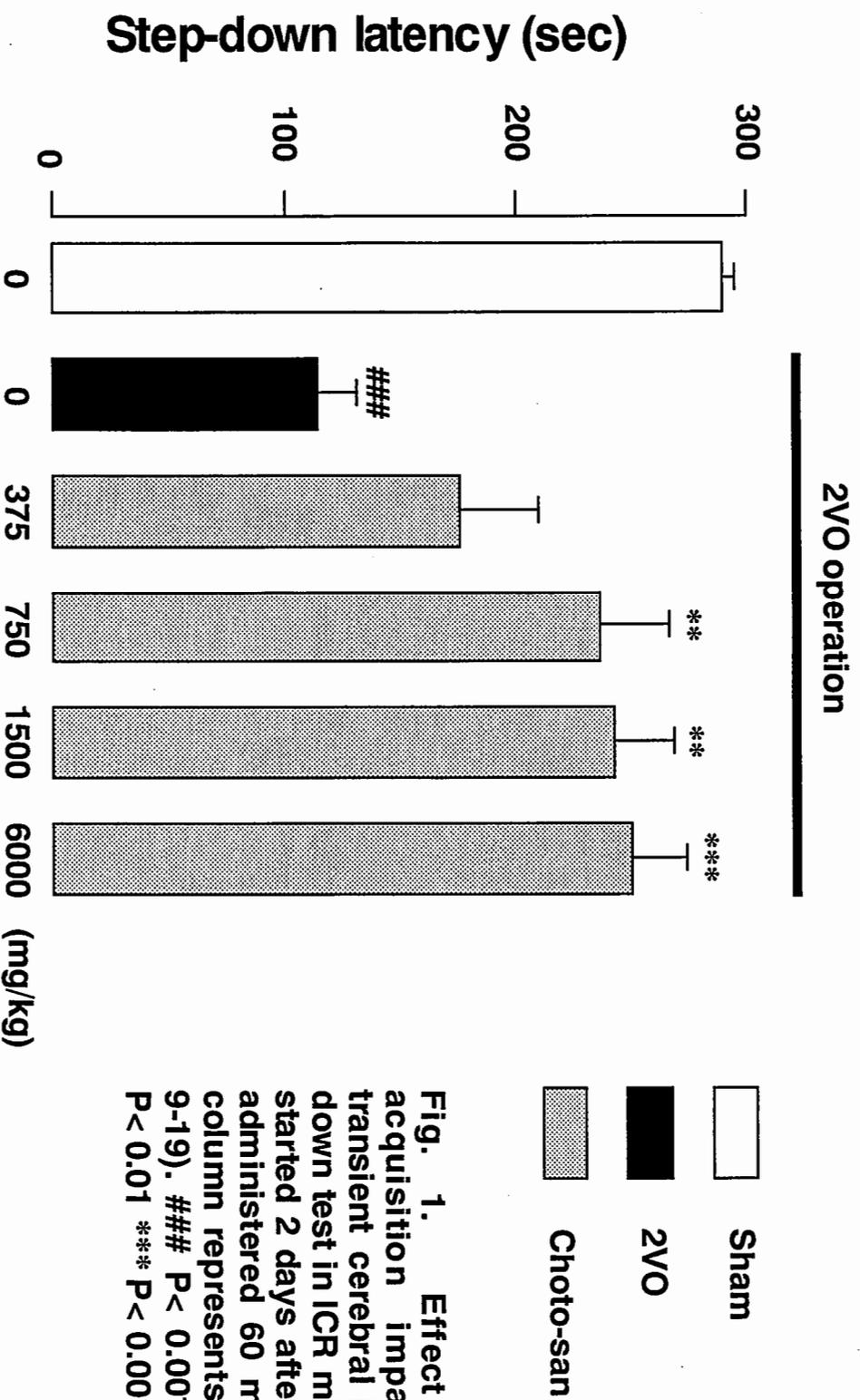


Fig. 1. Effect of Choto-san on acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test in ICR mice. Maze training was started 2 days after 2VO. Choto-san was administered 60 min before 2VO. Each column represents the mean+S.E.M. (n=9-19). ### P < 0.001 vs. sham group; ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs. 2VO alone.

Chotoko improves acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test

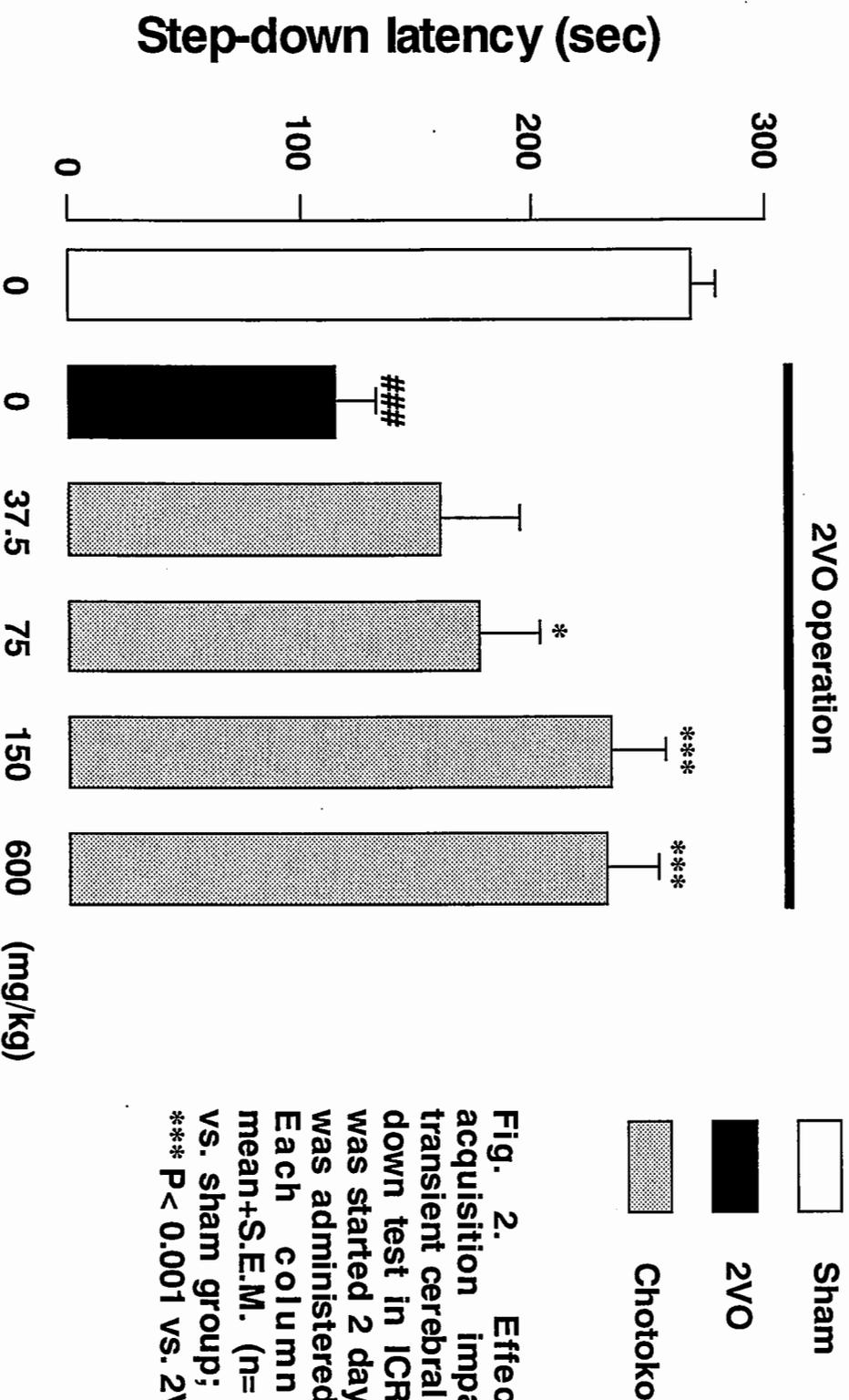


Fig. 2. Effect of Chotoko on acquisition impairment caused by transient cerebral ischemia in the step-down test in ICR mice. Maze training was started 2 days after 2VO. Chotoko was administered 60 min before 2VO. Each column represents the mean±S.E.M. (n= 9-20). ### P < 0.001 vs. sham group; * P < 0.05, *** P < 0.001 vs. 2VO alone.

Choto-san improves acquisition impairment caused by scopolamine in the step-down test

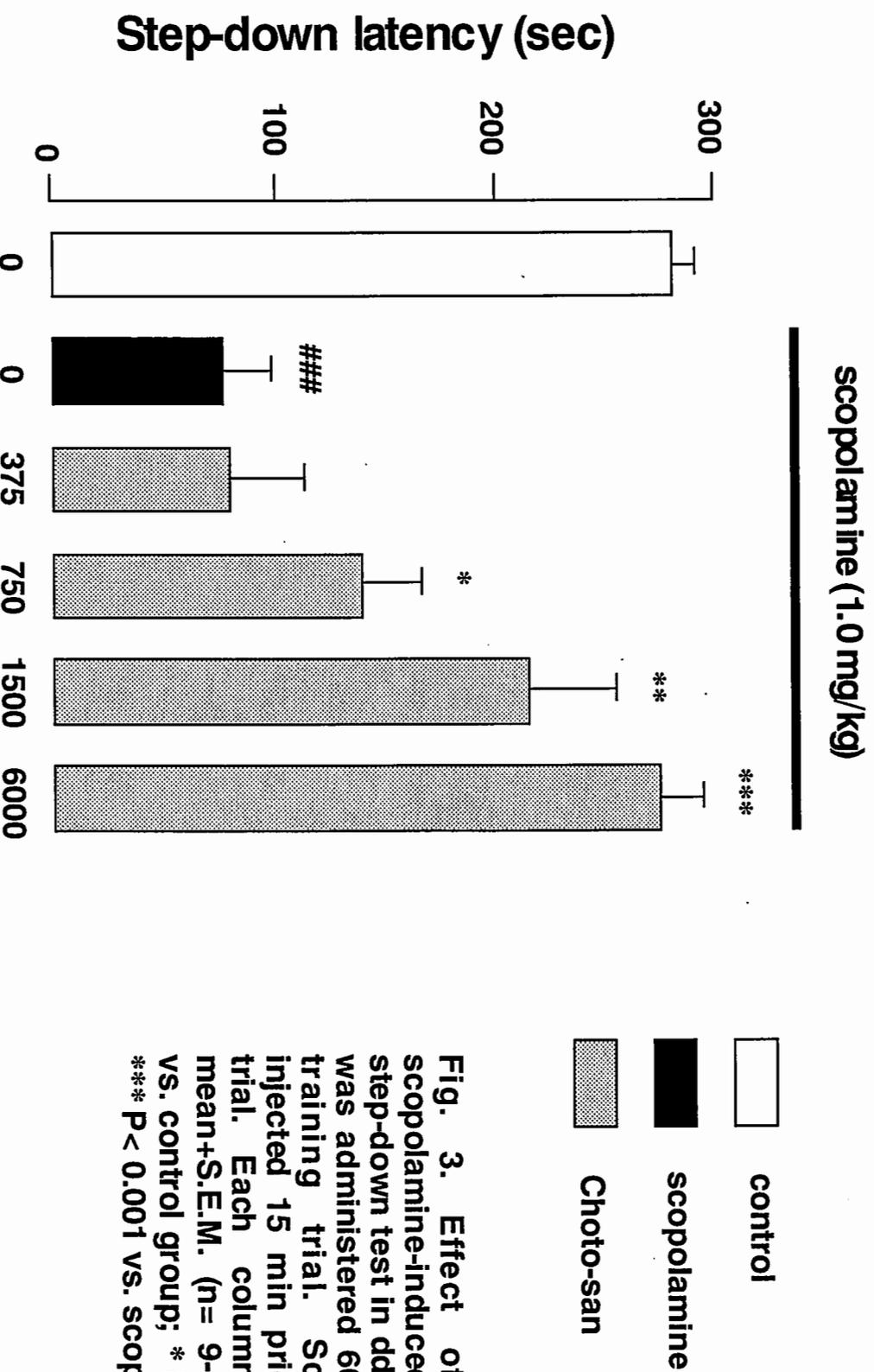


Fig. 3. Effect of Choto-san on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddY mice. Choto-san was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean±S.E.M. (n= 9-16). ### P < 0.001 vs. control group; * P < 0.05, ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs. scopolamine alone.

Chotoko improves acquisition in pairment caused by scopolamine in the step-down test

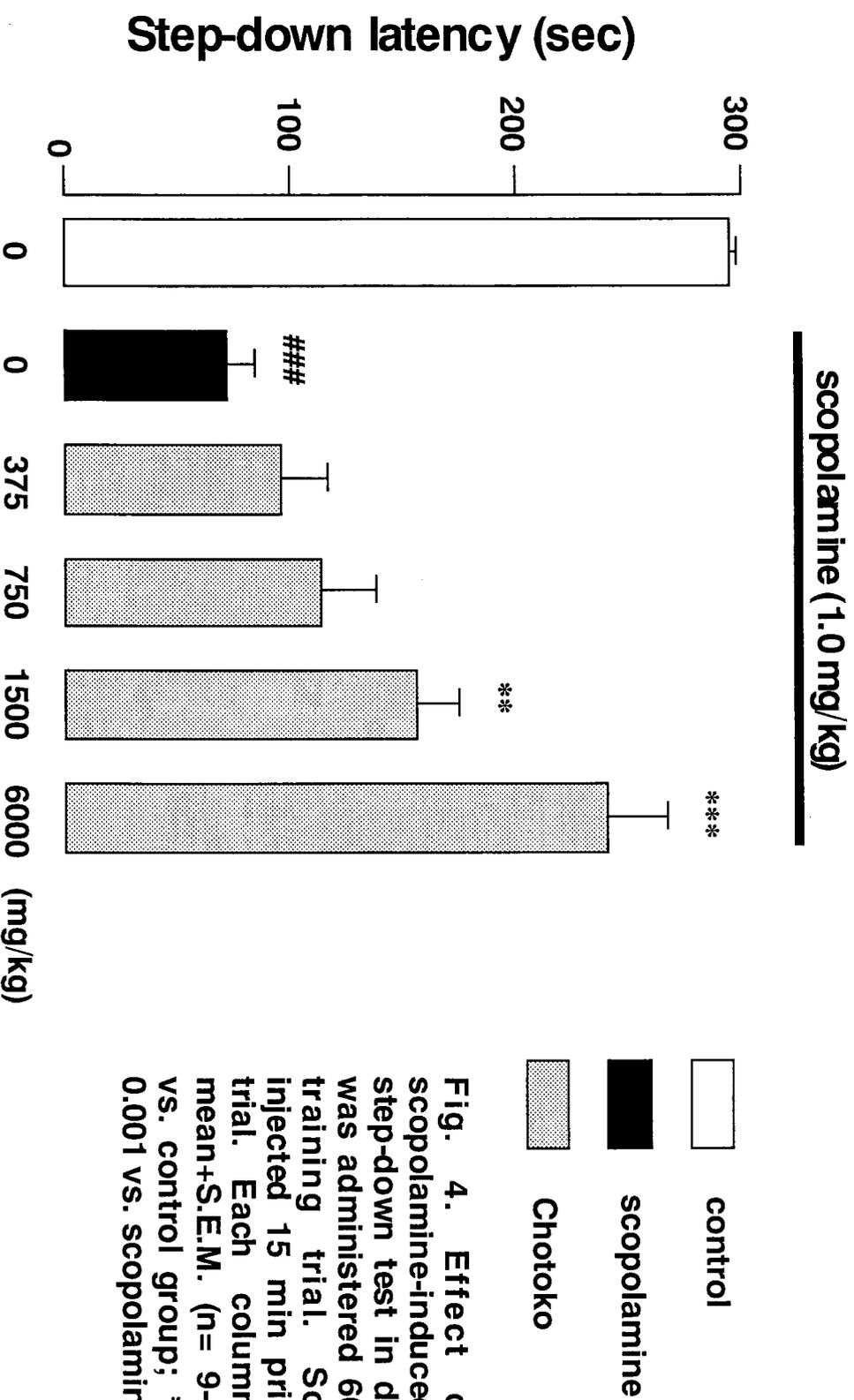


Fig. 4. Effect of Chotoko on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddy mice. Chotoko was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean+S.E.M. (n= 9-16). ### P < 0.001 vs. control group; ** P < 0.01 *** P < 0.001 vs. scopolamine alone.

Tacrine improves acquisition impairment caused by scopolamine in the step-down test

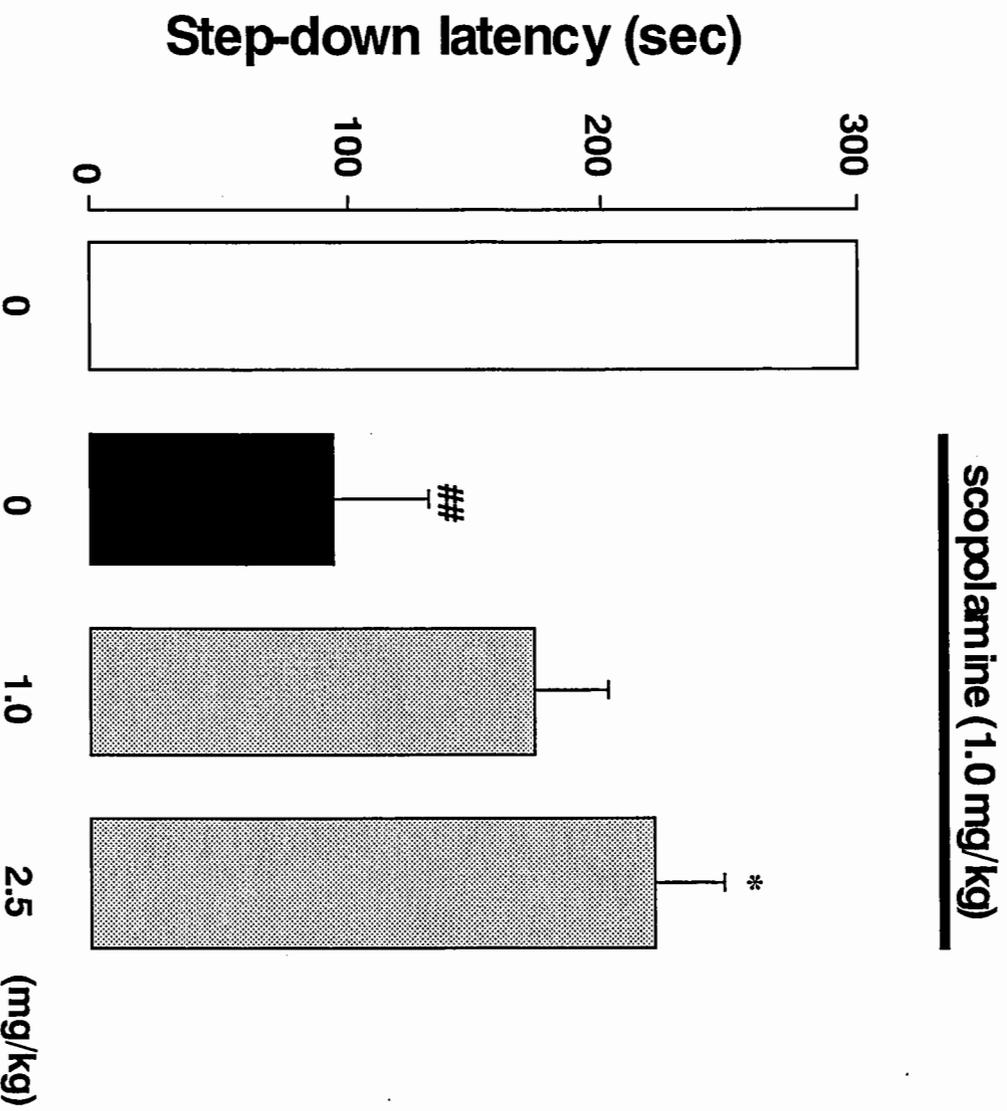


Fig. 5. Effect of Tacrine on scopolamine-induced amnesia in the step-down test in ddY mice. Tacrine was administered 60 min prior to the training trial. Scopolamine was injected 15 min prior to the training trial. Each column represents the mean±S.E.M. (n= 8-9). ## P< 0.001 vs. control group; * P< 0.05 vs. scopolamine alone.

Choto-san improve transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

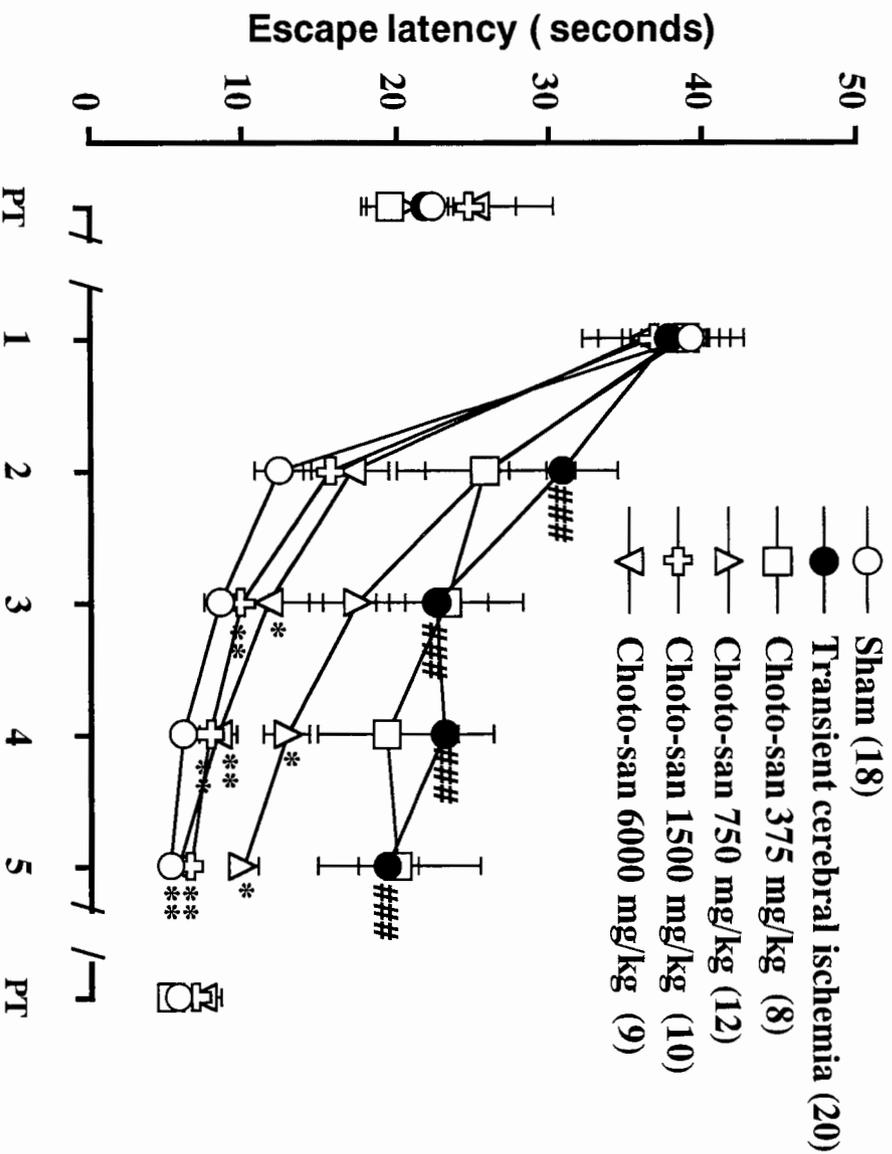
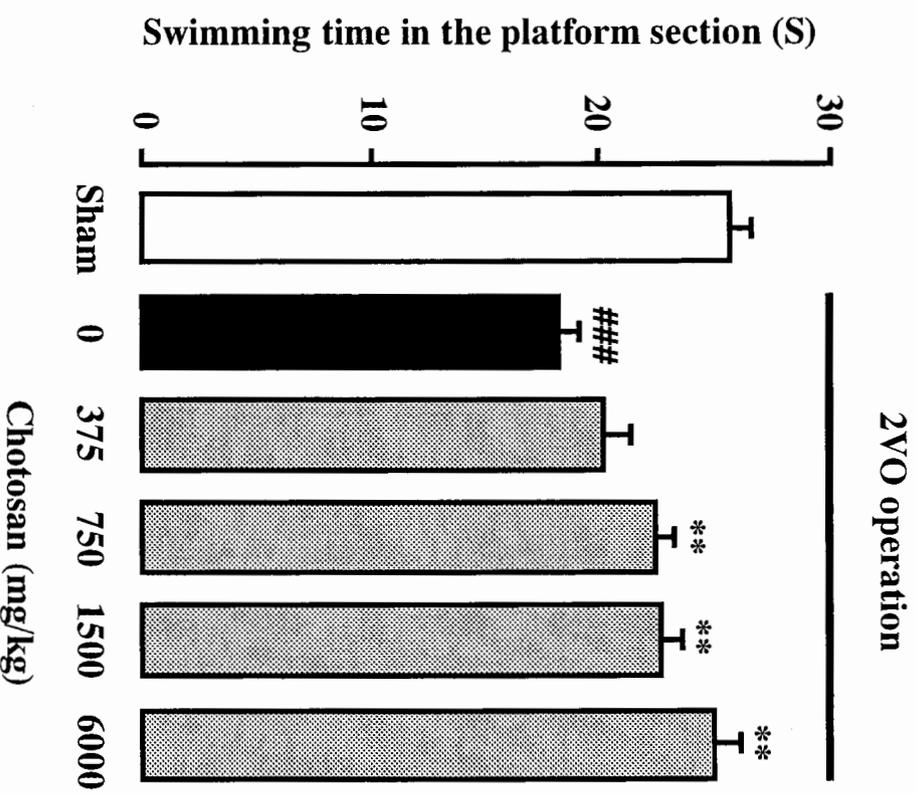


Fig. 6. Effect of Chotosan on transient cerebral ischemia-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotosan (0-6000 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of mice. #### P<0.01 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. transient cerebral ischemia.

Chotoko improves transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

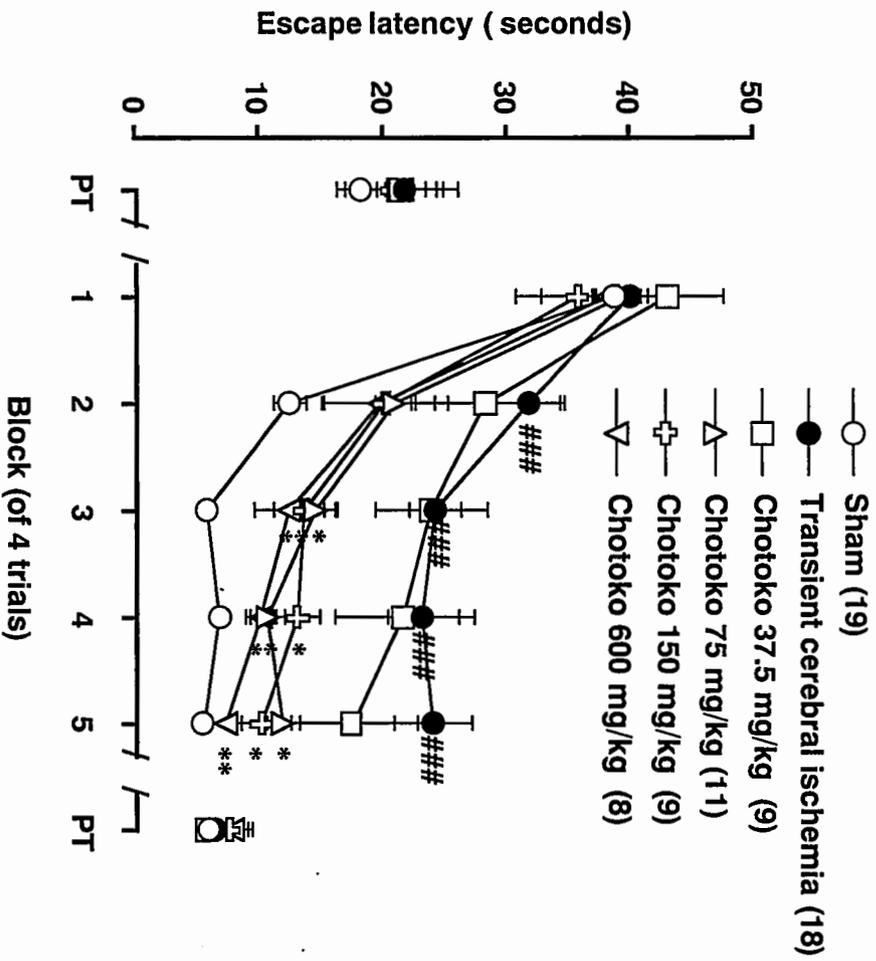
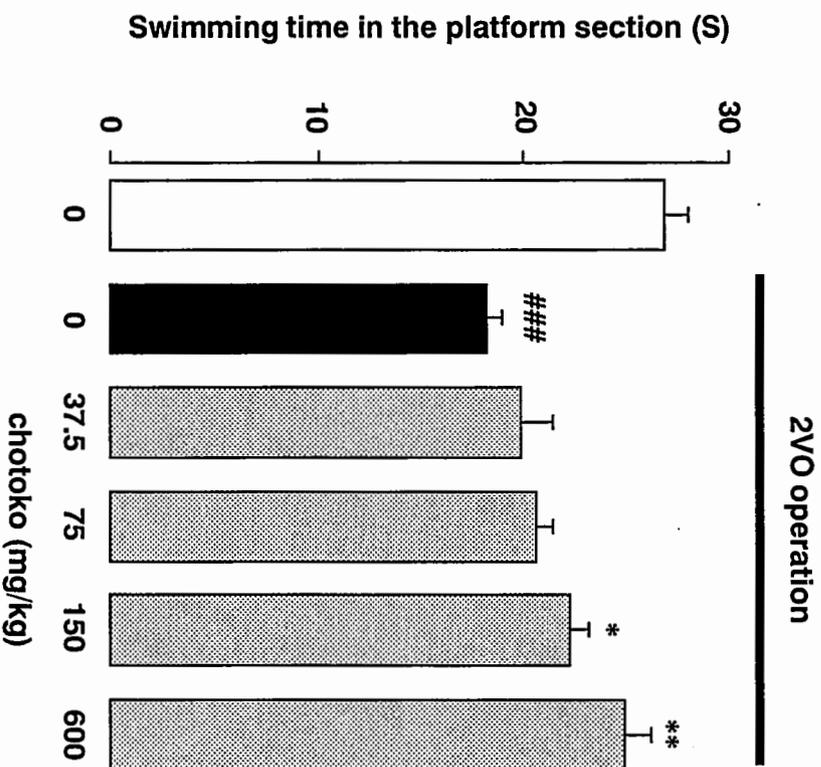


Fig. 7. Effect of Chotoko on transient cerebral ischemia (2VO)-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of mice. ### P<0.01 vs. sham group. * P<0.05, ** P<0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swim in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section was recorded. Each column represents the mean±S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P<0.05, ** P<0.01 vs. 2VO alone.

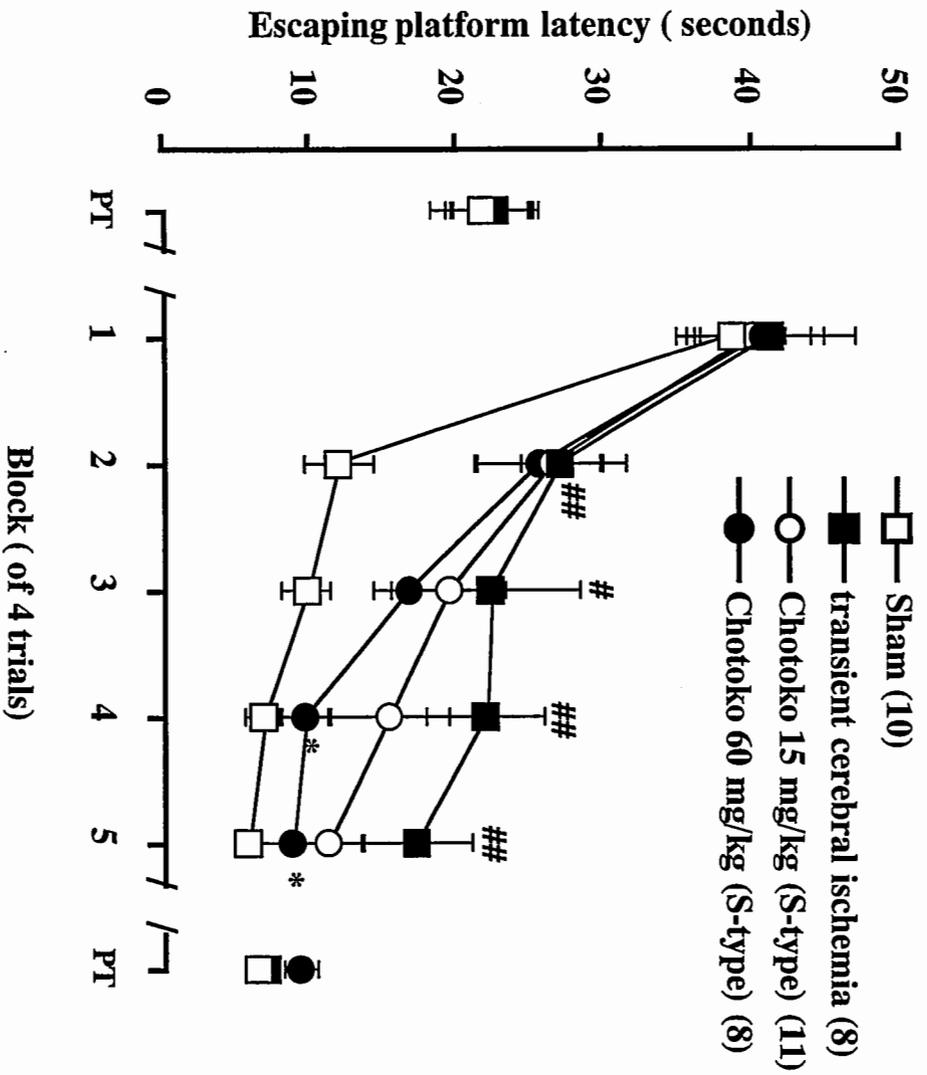
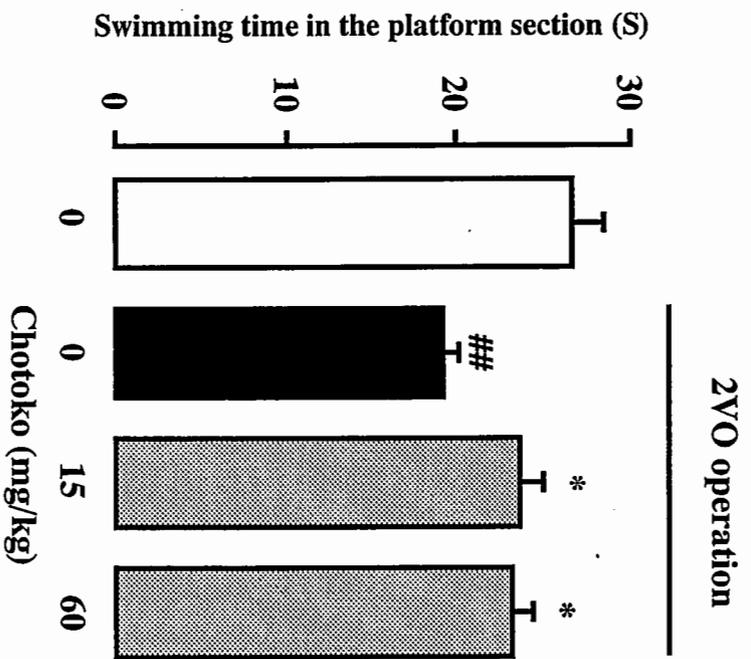


Fig. 8. Effect of Chotoko extract (S-Type) on transient cerebral ischemia-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 8-11 mice. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. sham group, * $P < 0.05$ vs. transient cerebral ischemia group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean + S. E. M. ## $P < 0.01$ vs. sham group, * $P < 0.05$ vs. 2VO group.

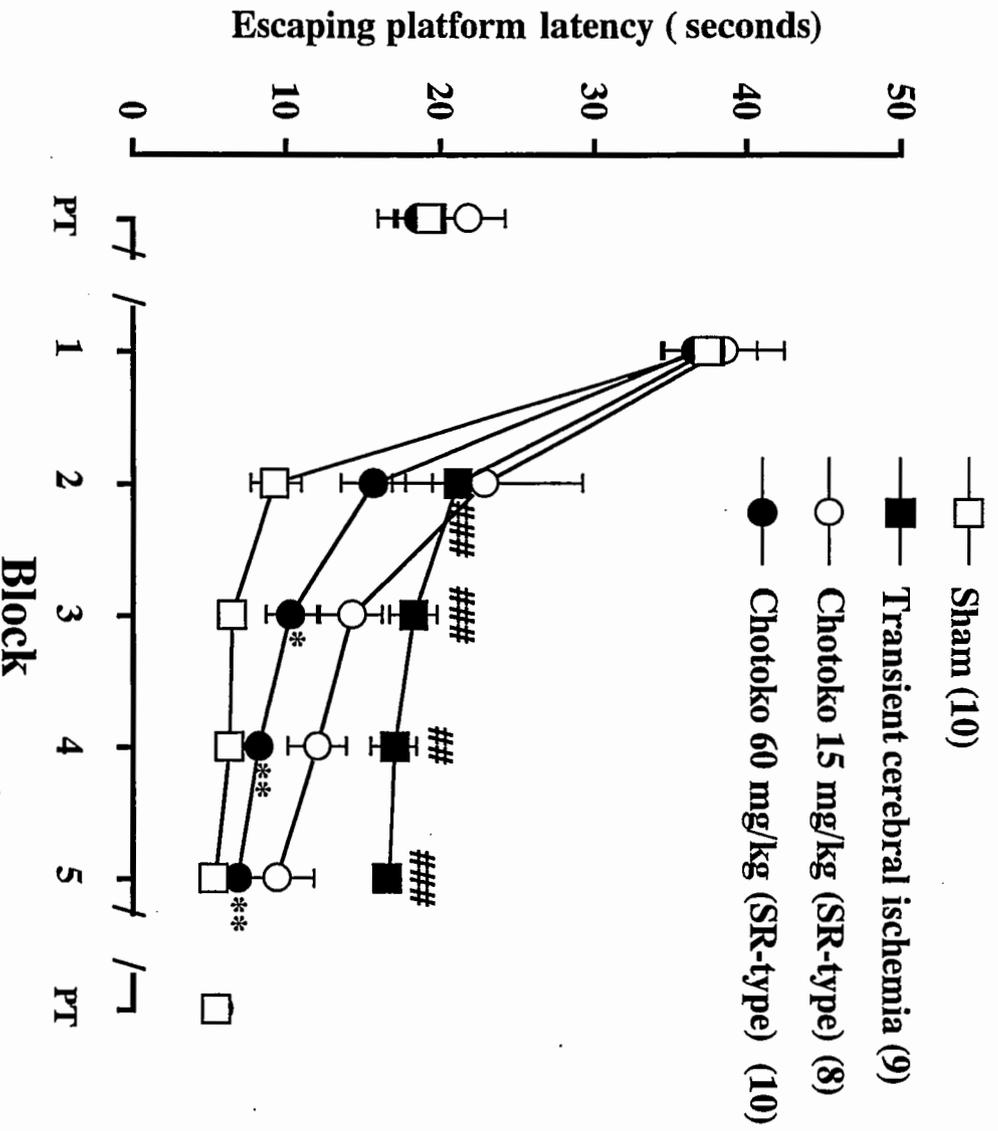
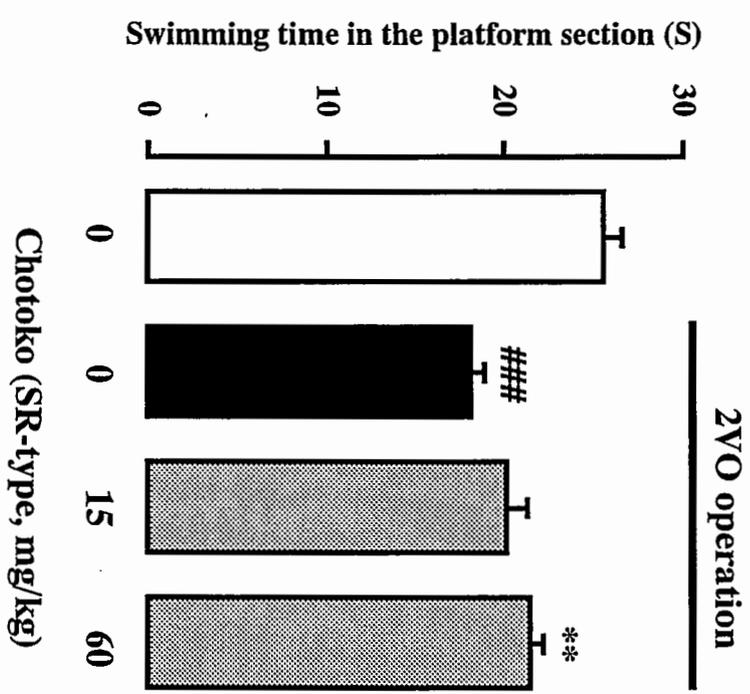


Fig. 9. Effect of Chotoko extract (SR-Type) on transient cerebral ischemia-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 8-10 mice. ## P<0.01, ### P<0.001 vs. sham group. ** P<0.01 vs. transient cerebral ischemia group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean + S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group, ** P<0.01 vs. transient cerebral ischemia group.

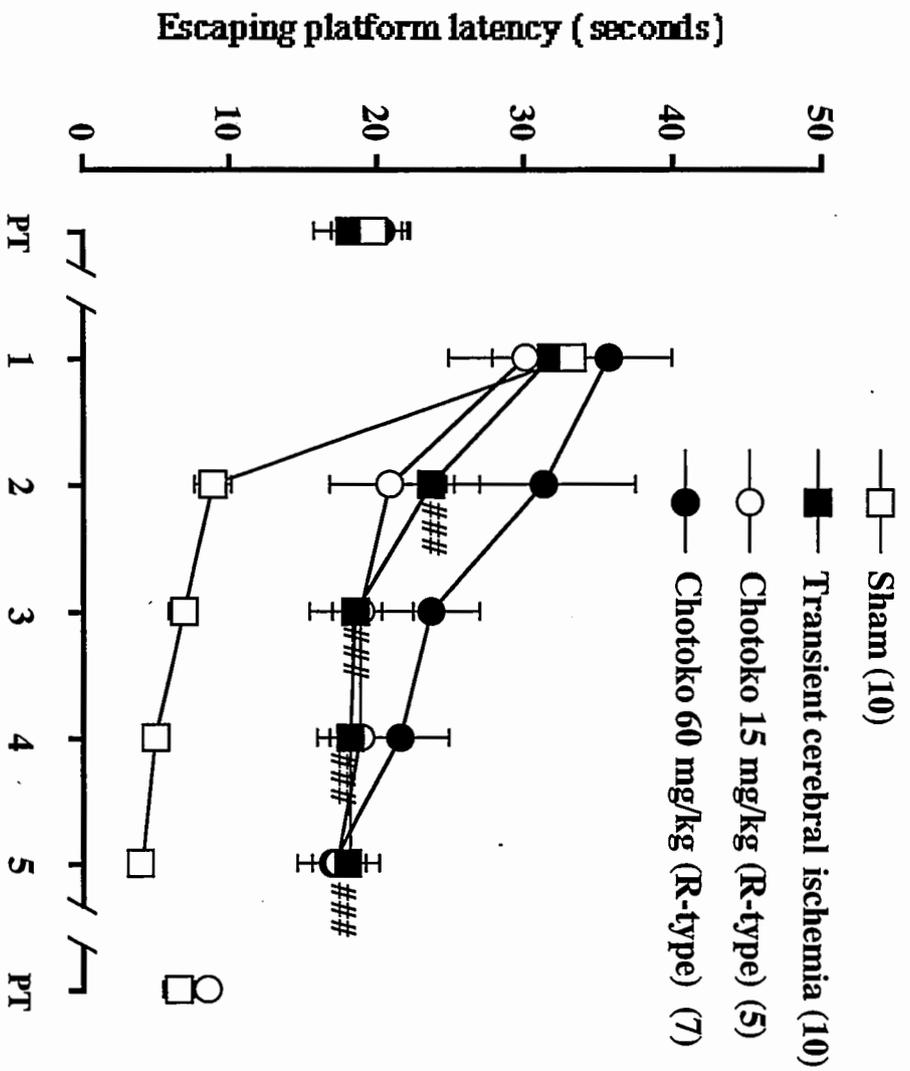
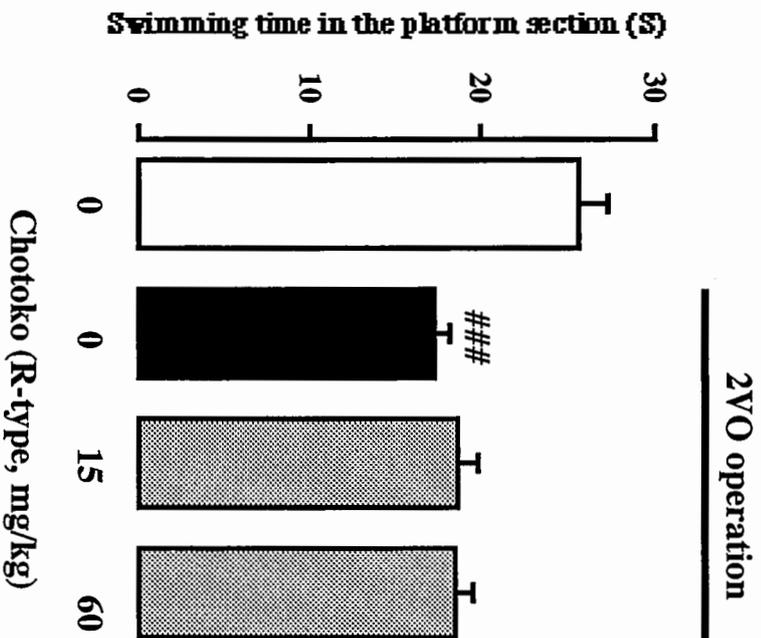


Fig. 10. Effect of Chotoko extract (R-Type) on transient cerebral ischemia-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Chotoko (0, 15, 60 mg/kg) was administered 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 5-10 mice. ### P<0.01 vs. sham group. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean+ S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group.

Tacrine improves transient cerebral ischemia-induced impairment of Morris water maze performance

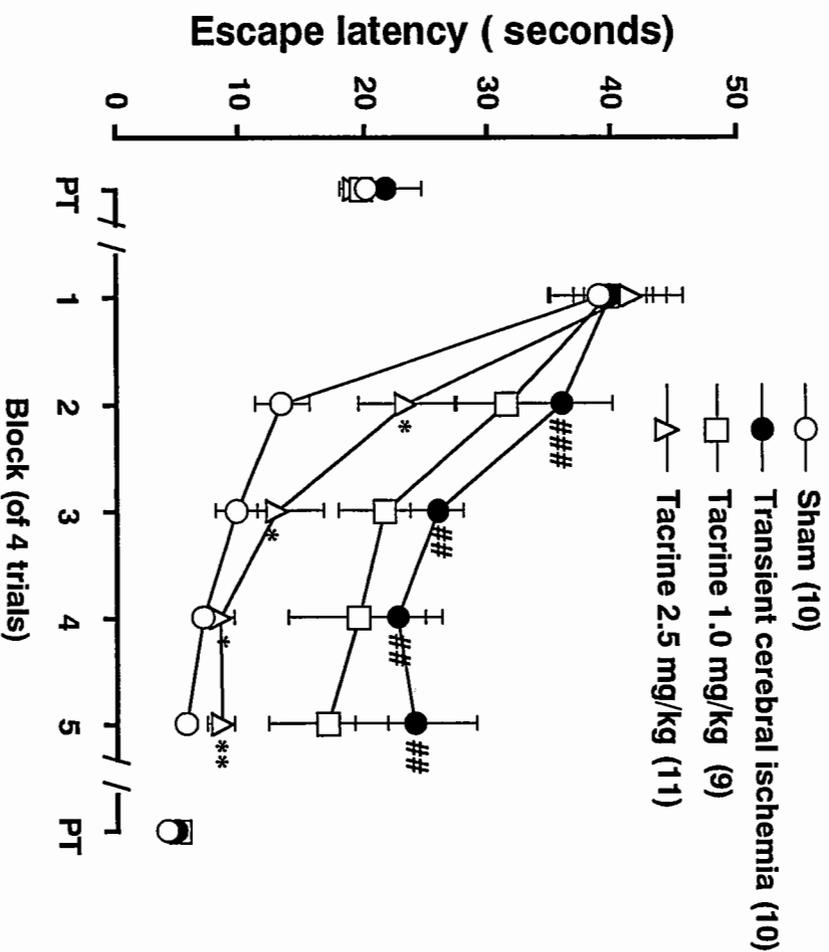
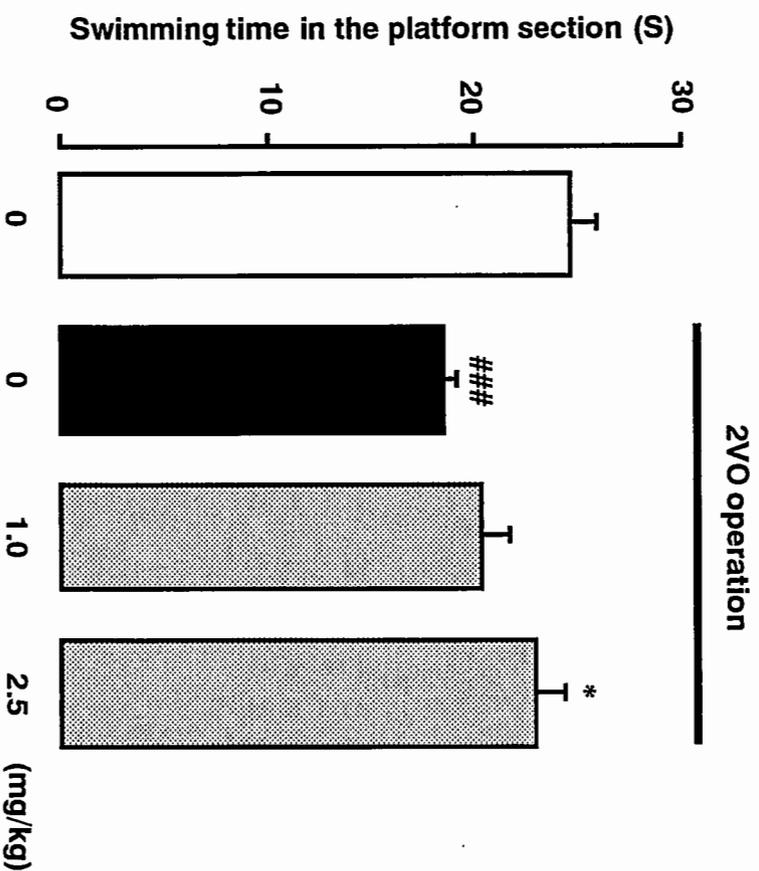


Fig. 11. Effect of Tacrine on transient cerebral ischemia (2VO)-induced impairment on Morris water maze performance in ICR mice. Tacrine was injected 60 minutes before the operation. 2 days after the operation, the trial test was performed. Each point represented the mean of 9-11 mice. ### P<0.01 vs. sham group. * P< 0.05, ** P< 0.01 vs. 2VO alone. PT: probe trial.



On the 6th days, the platform was removed. Mice were allowed to swimming in the water maze for 1 minute. The swimming time in the platform section were recorded. Each column represents the mean±S. E. M. ### P<0.001 vs. sham group. * P< 0.05 vs. 2VO alone.