

瘀血病態と赤血球変形能との関連性についての研究

富山医科薬科大学医学部和漢診療学講座

引 綱 法 彰



①

瘀血病態と赤血球変形能との関連性についての研究

富山医科薬科大学医学部和漢診療学講座

引網 宏彰

## 目次

	頁
緒言	1
第1部	
瘀血病態と赤血球集合能ならびに赤血球変形能との関連性	3
第2部	
瘀血病態における赤血球膜粘弾性の検討	10
第3部	
瘀血改善剤（桂枝茯苓丸）の赤血球変形能に対する影響	17
総括	23
文献	24
表および図	

## 緒 言

漢方医学的病態概念の一つである「瘀血」とは、柴崎<sup>1)</sup>により「スラスラと流通すべき血が、何らかの原因でつかえて、スムーズに流れなくなった状態(病状)」と定義されている。また、寺澤<sup>2)</sup>は「生体の物質的側面を支える血(けつ)の流通に障害をきたした病態」と定義している。即ち、瘀血病態とは何らかの循環障害に起因する一連の症候群であると経験的に認識されてきた。

この瘀血病態を現代科学的視点から解明するためには一定の診断基準が必要である。そこで寺澤らは科学技術庁研究班を組織し、瘀血診断基準<sup>3)</sup>を作成した。これに基づいて、我々はこれまでに瘀血病態における眼球結膜微小循環障害<sup>4)</sup>、血液粘度<sup>5)</sup>及び赤血球集合能<sup>6)</sup>などの血液レオロジー異常を明らかにしてきた。

さらに、脳脊髄血管障害患者に瘀血改善剤である桂枝茯苓丸を投与することにより、瘀血病態の改善とともに神経症状と眼球結膜微小循環の改善がみられることを報告した<sup>7)</sup>。さらに、眼球結膜微小循環の改善が血液粘度の低下<sup>7)</sup>及び赤血球集合能の正常化<sup>8)</sup>に基づくことを明らかにした。

近年、脳血管障害と血液レオロジー異常との関連性が注目されている<sup>9)10)</sup>。特に、その重要な因子の一つである赤血球変形能の低下は脳血管障害の発症に関与するとともに<sup>11)12)</sup>、発症後の意識障害の増悪や痴呆への進行に影響すると報告されている<sup>13)14)</sup>。



以上の観点から本研究では、多発性脳梗塞患者を対象に、血液レオロジーを規定する重要な因子である赤血球変形能と瘀血病態との関連性、さらには瘀血改善剤（桂枝茯苓丸）の赤血球変形能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。



## 第1部 瘀血病態と赤血球集合能ならびに赤血球変形能との関連性

血液粘度を規定する重要な因子として、赤血球集合能と赤血球変形能が知られている<sup>15)</sup>。先に当教室では、瘀血病態において血液粘度が上昇し、さらにその両者と赤血球集合能との間に相関がみられることを報告した<sup>6)</sup>。しかし、赤血球集合能は非瘀血病態に比べて、重度瘀血病態で有意に亢進していたが、軽度瘀血病態では差は認められなかった。このことから、軽度瘀血病態における血液粘度の上昇には他の要因が関与している可能性が考えられた。

そこで第1部では、瘀血病態と赤血球集合能ならびに赤血球変形能との関連性についての検討を試みた。

### 対象と方法

#### 1. 対象

富山医科薬科大学附属病院和漢診療部に通院中の患者で、頭部MRI検査で多発性脳梗塞と診断された男性患者35症例、平均年齢 $64.4 \pm 10.0$  ( $\pm S.D.$ ) 歳、を対象とした。このうち無症候のものは27例、何らかの症候を有するものが8例（パーキンソン症候群3例、左上肢知覚障害2例、右下肢知覚障害2例、左半側運動障害及び左下肢知覚障害1例）であった。症候性脳梗塞症例はいずれも発症より3ヶ月以上を経た慢性期の症例であった。合併症は高血圧症が



11例，糖尿病が12例，高脂血症が5例，虚血性心疾患が6例に認められた。

## 2. 方法

1) 多発性脳梗塞の診断：1.5tesla高磁場MRIにて，spin echo法 (TR/TE=500/15)のT1強調像で低信号，spin echo法 (TR/TE=2500/90)のT2強調像で高信号を示す多発性病巣の所見を認めるものを多発性脳梗塞と診断した。診断にあたり，梗塞巣に近似するが本質的に異なる所見とされるLeuko-araiosisを除外するために，Braffmanら<sup>16)</sup>やHeierら<sup>17)</sup>の提言に基づいて，①撮像に用いたすべてのpulse sequenceで髄液と等信号を呈する，②直径(長径)が4mm以下である，③左右対称性に出現している，の3条件全てを満たす所見は非梗塞性所見と判定した。

## 2) 瘀血病態の評価

対象患者の瘀血重症度は，科学技術庁研究班による瘀血診断基準<sup>3)</sup>(表. 1)に従って評価した。即ち，瘀血スコアが20点以下を非瘀血病態，21点以上40点未満を軽度瘀血病態，40点以上を重度瘀血病態と判定した。

## 3) 赤血球集合能

一晚絶食後の午前9時に，患者肘静脈よりEDTA-2Na添加の真空採血管(7ml)で血液を採取した。

採取した血液をErythro-aggregometer (SEFAM, Co., Ltd., Vandœuvre-Les-Nancy, France)を用いて，赤血球の集合とともに減衰する散乱光の減衰曲線から得られ



る10秒間の相対面積 (S10) を測定し, これを赤血球集合能の指標とした<sup>6)</sup>。(図. 1)

#### 4) 赤血球変形能

赤血球変形能は, 1985年血液学における国際標準化委員会 (ICSH) に設置された血液レオロジーに関する expert panel の作成したガイドライン<sup>18)</sup>に従い, Reidら<sup>19)</sup>の赤血球濾過法を用いて以下の方法で測定した。

採取した血液から十分に白血球と血小板を除いた洗浄赤血球を, Isotonic phosphate- buffered saline (PBS) でヘマトクリットを15%に調整し, 赤血球浮遊液を作成した。この赤血球浮遊液400 $\mu$ lをシリンジ内に注入した後, 一定の陰圧 (-10cmH<sub>2</sub>O) で吸引し, 細孔径5 $\mu$ mのporeを通過する時間を測定した(図. 2)。測定温度は25℃とした。8回測定した通過時間の平均を Erythrocyte deformability index (EDI) として, これを赤血球変形能の指標とした。

#### 5) 赤血球変形能の影響因子

赤血球変形能の影響因子である赤血球表面積/体積比の指標として平均赤血球容積 (MCV) を, また赤血球内部粘度の指標として平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC) を測定した<sup>18)</sup>。MCVとMCHCは赤血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリットより以下の式に従い算出した。

$$MCV = \text{ヘマトクリット} / \text{赤血球数} \times 10$$

$$MCHC = \text{ヘモグロビン} / \text{ヘマトクリット} \times 100$$

赤血球数, ヘモグロビンの測定は自動血球計数器



(Celltac MEK-4500 Nihon Kohden, Co., Ltd.) を使用し、ヘマトクリットはマイクロヘマトクリット管を用いて、高速遠心法により測定した。

#### 6) 推計学的解析

各要因の独立性の検定には  $\chi^2$  検定を用い、3群間の差の検定には Kruskal-Wallis 検定を、2群間の差の検定には Mann-Whitney 検定を用いた。数値はすべて平均  $\pm$  S.D. で示し、有意水準はいずれも  $P < 0.05$  とした。

## 結 果

#### 1) 各群間の臨床像の比較

対象は非療血群 (10例)、軽度療血群 (16例)、重度療血群 (9例) の3群に分類された。

3群間で、年齢、神経症候の有無、合併疾患に差は認められなかった (表. 2)。

また、ヘマトクリット、総蛋白、アルブミン、総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロール、空腹時血糖にも3群間に差は認められなかった (表. 3)。

#### 2) 赤血球集合能の群間比較

赤血球集合能の指標である S10 は、非療血群で  $23.5 \pm 2.4$ 、軽度療血群で  $25.6 \pm 2.9$ 、重度療血群で  $26.6 \pm 3.0$  を示し、重度療血群では非療血群に比べ、有意に高値であった ( $P < 0.05$ ) (図. 3a)。

#### 3) 赤血球変形能の群間比較

赤血球変形能の指標であるEDIは、非療血群で $11.4 \pm 1.7$  msec, 軽度療血群で $13.1 \pm 1.4$  msec, 重度療血群で $13.3 \pm 2.1$  msecを示した。

軽度療血群, 重度療血群はともに, 非療血群に比べて有意に高値であった ( $P < 0.05$ ) (図. 3b)。

#### 4) MCV及びMCHCの群間比較

赤血球表面積/体積比の指標としてのMCVは、非療血群 $93.4 \pm 4.5 \mu\text{m}^3$ , 軽度療血群 $94.7 \pm 2.9 \mu\text{m}^3$ , 重度療血群 $96.3 \pm 8.2 \mu\text{m}^3$ と差はみられなかった (図. 4a)。また赤血球内部粘度の指標であるMCHCも、非療血群 $33.4 \pm 1.2\%$ , 軽度療血群 $33.7 \pm 1.5\%$ , 重度療血群 $33.4 \pm 0.9\%$ と差はみられなかった (図. 4b)。

### 考 察

一般に血液粘度を規定する因子は、ずり速度、ヘマトクリット、赤血球集合能、赤血球変形能および血漿粘度とされている<sup>15)</sup>。先に我々は多発性脳梗塞患者を対象とした研究で、療血病態と血漿粘度は相関せず、ヘマトクリットの影響を除いた補正全血粘度を用いた検討では、高ずり速度の補正全血粘度は、非療血群に比べて軽度療血群, 重度療血群ともに高値であったのに対し、低ずり速度の補正全血粘度は重度療血群のみが高値を示したことを報告した<sup>6)</sup>。さらに、重度療血群では非療血群に比べ、赤血球集合能の有意な亢進を認めた<sup>6)</sup>。しかし、軽度療血群と非療血群と



の間には赤血球集合能の差が認められなかったことから、軽度瘀血群における血液粘度の上昇の要因は明らかではなかった。今回の研究においても、改めて瘀血病態と赤血球集合能との関係について検討したが、同様の結果であった。

そこで今回、瘀血病態と赤血球変形能との関連性について検討したところ、赤血球変形能が重度瘀血病態のみならず、軽度瘀血病態においても、非瘀血病態に比べて有意に低下していることが明らかとなった。

一般的に、低ずり速度下の血液粘度は赤血球集合能の影響を強く受け、高ずり速度下では赤血球変形能による影響が強いと言われている<sup>20)</sup>。

以上を総合すると、瘀血病態における血液粘度の上昇の要因としては、重度瘀血病態では赤血球集合能の亢進及び赤血球変形能の低下が関与しているのに対し、軽度瘀血病態では、赤血球変形能の低下が主たる要因であることが明らかとなった。

また、赤血球変形能に影響する因子として、赤血球表面積／体積比、赤血球内部粘度、赤血球膜粘弾性が示されている<sup>20)</sup>。本研究では赤血球表面積／体積比と赤血球内部粘度について検討したが、いずれも瘀血病態の重症度との間に相関がみられなかった。従って、これら以外の影響因子である赤血球膜粘弾性が瘀血病態での赤血球変形能低下と関連している可能性が示唆された。

## 小 括

1. 多発性脳梗塞35例を対象に瘀血重症度と、赤血球集合能ならびに赤血球変形能との関連性を検討した。
2. 赤血球集合能の亢進は重度瘀血病態でみられるのに対し、赤血球変形能の低下は軽度瘀血病態から認められることが明らかとなった。
3. 瘀血病態における赤血球変形能の低下は赤血球の表面積／体積比や赤血球内部粘度とは関連せず、それ以外の要因である赤血球膜粘弾性が関連している可能性が示唆された。



## 第 2 部 瘀血病態における赤血球膜粘弾性の検討

第 1 部では、瘀血病態では赤血球変形能の低下がみられること、さらにその影響因子として赤血球表面積／体積比や赤血球内部粘度以外の因子が関与する可能性が示された。

そこで第 2 部では、瘀血病態と赤血球変形能を規定するもう一つの因子である赤血球膜粘弾性との関連性について検討した。さらに、赤血球膜粘弾性に重要な影響を与えることが知られている赤血球 Adenosine triphosphate (ATP) 濃度、および赤血球 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) 濃度<sup>21)</sup>についての検討も行った。

### 対象と方法

#### 1. 対象

第 1 部で示したと同様の基準で多発性脳梗塞と診断された男性患者 25 症例、平均年齢  $64.4 \pm 10.7$  ( $\pm$ S.D.) 歳、を対象とした。

#### 2. 方法

##### 1) 瘀血病態の評価

科学技術庁研究班の瘀血診断基準<sup>3)</sup>に従って、各症例の瘀血スコアを算出した。

##### 2) 赤血球膜粘弾性

一晩絶食後の午前 9 時に、患者肘静脈より EDTA-2Na 添加の真空採血管 (7ml) とヘパリン添加真空採血管

(5 ml) で採血した。

Hochmuthらの方法<sup>22)</sup>に基づき, Parallel plate flow channel chamberを作成し, 以下に示す如く赤血球膜弾性係数を求め, これを赤血球膜粘弾性の指標とした。

### (1) 浮遊赤血球の精製

EDTA-2Na添加の真空採血管で採取した血液をPBSで3回洗浄し, 白血球と血小板を十分除去した後, PBSでヘマトクリット0.1%の浮遊赤血球を作成した。

### (2) Parallel plate flow channel chamberとビデオ顕微鏡システム

厚さ120  $\mu$ mのParallel plate flow channel chamber内にDC infusion pumpを用い, 一定流速(100 ml/hr)で浮遊赤血球を注入した。この時に赤血球が伸展する様子を倒立顕微鏡で観察し, CCDカメラ(MKC-385, Olympus Co., Ltd)で撮影した(図. 5)。

記録した画像をビデオテープレコーダー(AG-7355, Matsushita Electric Co., Ltd)で再生し, 赤血球が最大に伸展するまでの時間を計測し, 赤血球の長径を微小計測用タブレットメジャーユニット(KRYPYON-30, Flovel Co., Ltd)を使用して計測した。

### (3) shear stress( $\tau_s$ )

Hochmuthら<sup>22)</sup>によれば, 赤血球にかかるshear stress( $\tau_s$ )は以下の方法で計算される。

$$\tau_s = 6 \mu Q / Wh^2 \dots \dots (a)$$

$\mu$ ; fluid viscosity(0.01P),



W; channel width (0.95 cm),

h; thickness of the gasket (120  $\mu$ m),

Q; flow volume ( $Q = Vt$ ),

V; flow rate (100 ml/hr),

t; time

再生画像で赤血球が最大に伸展するまでの時間 (t) を計測し, 上記の式により shear stress ( $\tau_s$ ) を算出した。

#### (4) overall extension ratio ( $\lambda$ )

再生画像より赤血球の初期長 ( $L_0$ ) と shear stress ( $\tau_s$ ) により最大に伸張した時の赤血球の長径 (L) を求め, overall extension ratio ( $\lambda$ ) を以下の式により算出した。

$$\lambda = L / L_0 \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (b)$$

#### (5) 赤血球膜弾性係数 (E)

Hochmuthらの方法<sup>22)</sup>に従い, 赤血球膜の厚さが 0.01  $\mu$ m であるという仮定の下に, 以下の式を用いて赤血球膜弾性係数 (E) を求めた。

$$E = 50 \tau_s \lambda^2 L_0 / (\lambda - 1) \cdot \cdot \cdot \cdot (c)$$

再生画像より赤血球10個について, 弾性係数 (E) を求め, その平均値を赤血球膜粘弾性の指標とした。

### 3) 赤血球 ATP 濃度

赤血球 ATP の測定はホタル発光酵素<sup>23)</sup>を用いて行った。ヘパリン添加真空採血管で採取した血液 (4.5 ml) を 6,000  $\times$  g, 10分間遠心した後, Buffy coat を十分に除き, 氷冷した PBS で3回洗浄した。赤血球 1 ml に対して

1 N 過塩素酸 (PCA) 2 ml を加え, 0 °C の環境下で 5 分間 ATP を抽出した。さらに 0 °C, 10,000 × g, 10 分間遠心し, 得られた上清に 6 N の KOH を加え中和した。これに ATP に依存して発光するホタル発光酵素のルシフェラーゼを反応させ, 発光強度を化学発光測定システム (Luminescence reader, BLR-301, Aloka Co., Ltd) で計測し, ATP 標準試薬を用いて得られた検量線から, ATP 濃度を測定した。

#### 4) 赤血球 2,3-DPG の測定

ヘパリン添加真空採血管で採取した血液 (0.5 ml) を測定に使用した。これに 0.6 N の PCA を 2.5 ml 加えて除蛋白処理を行った。さらに 3,000 × g, 5 分間遠心し, 得られた上清から酵素比色法で測定した。

#### 5) 推計学的解析

2 変数間の相関関係は Spearman の順位相関係数により検討した。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 結 果

#### 1) 瘀血病態と赤血球膜粘弾性との関連性

瘀血スコアと赤血球膜弾性係数との間に, 有意な正の相関関係がみられた ( $r = 0.506$ ,  $p = 0.0131$ ) (図. 6)。

#### 2) 瘀血病態と赤血球 ATP 濃度との関連性

瘀血スコアと赤血球内 ATP 濃度との間には有意な負の相関関係が得られた ( $r = -0.467$ ,  $p = 0.0223$ ) (図.



7)。

### 3) 瘀血病態と2,3-DPGとの関連性

瘀血スコアと2,3-DPGとの間に相関は認めなかった ( $r=0.003$ ,  $p=0.9895$ ) (図. 8)。

## 考 察

赤血球変形能は、赤血球表面積/体積比、赤血球内部粘度、赤血球膜粘弾性の3つの因子に影響を受けるとされている<sup>20)</sup>。しかし第1部で示した如く、瘀血病態における赤血球変形能低下には前2者の影響は認められなかった。

そこで、瘀血スコアと赤血球膜弾性係数を検討したところ、両者の間に正の相関関係が得られた。従って、瘀血病態においてみられる赤血球変形能の低下には、赤血球膜粘弾性の低下が関与しているものと考えられた。

赤血球膜は、コレステロールとリン脂質からなる脂質二重層と、その内側に存在するspectrinやactinなどの網目状の細胞骨格タンパクによって構成されている<sup>20)</sup>。赤血球膜の粘弾性の低下には、これら膜構造の変化が関与していると考えられている。現在、赤血球膜粘弾性低下を規定するものとして以下の因子が知られている<sup>20)</sup>：

①膜流動性の低下：膜流動性は脂質二重層の脂質組成によって変化する。脂質組成はATP依存性のaminophospholipid translocaseを介して維持されることが考えられている<sup>24) 25)</sup>。

② 膜輸送能の異常：ATPの減少により膜輸送能が作動せず，細胞内 $Ca^{++}$ 濃度が上昇すると，骨格タンパク間結合に影響し膜粘弾性が低下する<sup>21)</sup>。

③ 細胞骨格タンパク間結合の変化：網目状に分布する骨格タンパクは，膜の力学的性質に重要な役割を果たしている<sup>26)</sup>。相互のタンパク間結合の強弱は，ATPの影響を受けるとされている<sup>21)27)</sup>。また，赤血球の酸素親和性において重要な酵素である2,3-DPGが増加した場合にも膜骨格の構築状態が変化すると考えられている<sup>21)</sup>。

以上のように，ATP及び2,3-DPGは種々の機序を介して赤血球膜粘弾性に影響を与えていると考えられている。今回の検討では，瘀血病態とATPとの間に有意の相関を認めしたが，2,3-DPGとの間には相関は得られなかった。従って，瘀血病態ではATPの減少によって，赤血球膜の脂質組成または骨格タンパク間結合が変化し，赤血球膜粘弾性が低下する可能性が示唆された。



## 小 括

1. 多発性脳梗塞25症例を対象に，瘀血病態と赤血球膜粘弾性ならびにその影響因子である赤血球ATP濃度，赤血球2,3-DPGとの関連性を検討した。
2. 瘀血スコアと赤血球膜粘弾性を示す膜弾性係数との間に正の相関関係が認められた。
3. 瘀血スコアと赤血球ATP濃度との間に負の相関関係が認められた。
4. 瘀血スコアと赤血球2,3-DPGの間には相関はみられなかった。
5. 瘀血病態における赤血球変形能低下には，赤血球ATPの減少に基づく赤血球膜粘弾性低下が関与している可能性が示唆された。

### 第3部 瘀血改善剤（桂枝茯苓丸）の赤血球変形能 に対する影響

第1部及び第2部の研究によって、瘀血病態では赤血球変形能の低下がみられ、さらに赤血球膜粘弾性、赤血球ATPがその影響因子として関与していることが示唆された。

一方、当教室ではこれまでに瘀血改善剤（桂枝茯苓丸）の血液粘度<sup>28)</sup>、赤血球集合能<sup>8)</sup>および眼球結膜微小循環<sup>29)</sup>改善作用について明らかにしてきた。そこで第3部では、桂枝茯苓丸の赤血球変形能に対する影響について検討した。

#### 対象と方法

##### 1. 対象

第1部で示したと同様の基準で多発性脳梗塞と診断された男性患者13症例、平均年齢 $64.8 \pm 11.8$  ( $\pm S.D.$ ) 歳、を対象とした。このうち無症候のものが12例、症候を有するものは1例（左上肢知覚障害1例）であった。症候性脳梗塞症例は発症より3ヶ月以上を経た慢性期の症例であった。合併症は高血圧症が6例、糖尿病が2例、高脂血症が4例、虚血性心疾患が2例に認められた。全例本人の承諾を得たうえで本試験を実施した。

##### 2. 方法



対象患者に桂枝茯苓丸6丸/日(分3, 毎食後)を4週間投与した。桂枝茯苓丸は富山医科薬科大学附属病院で調整された丸薬で, 一丸2gは1gの蜂蜜と5種の生薬粉末(桂枝0.2g, 茯苓0.2g, 芍薬0.2g, 牡丹皮0.2g, 桃仁0.2g)から成るものを用いた。桂枝茯苓丸投与開始4週間前から, 投与終了時までには他の併用薬剤は変更しなかった。

投与前と投与4週間後において, 瘀血スコア, 赤血球変形能, 赤血球膜弾性係数および赤血球ATP濃度を測定し, 各パラメーターの変化について検討した。各パラメーターの測定方法は第1部及び第2部の方法と同様である。

投与前と投与4週間後を比較して, 瘀血スコアの減少を認めた瘀血改善群と, 減少を認めなかった瘀血非改善群の2群に分類した。

推計学的解析: 各要因の独立性の検定にはFisherの直接確率法を用い, 独立した2群間の差の検定には, Mann-Whitney検定を用い, 対応のある2群間の差の検討にWilcoxonの符号付順位検定を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

## 結 果

### 1) 瘀血非改善群と瘀血改善群の臨床像

瘀血非改善群(非改善群)は6例, 瘀血改善群(改善群)は7例であった。平均年齢は非改善群 $62.2 \pm 9.5$ (平均

± S. D.) 歳で，改善群は  $67.9 \pm 8.4$  歳で 2 群間に差を認めなかった。瘀血スコアは非改善群が  $22.2 \pm 9.3$  点であるのに対し，改善群では  $38.5 \pm 7.7$  点と有意に高値であった ( $P < 0.01$ )。また，2 群間に神経症候の有無，及び合併症に差はみられなかった (表. 4)，さらに，血液生化学所見にも 2 群間に差は認めなかった (表. 5)。

## 2) 瘀血スコアの変化

全症例について瘀血スコアの変化を検討したところ，桂枝茯苓丸投与前が  $31.0 \pm 3.3$  (平均 ± S. E.) 点に対し，投与 4 週後では  $23.1 \pm 2.3$  点と有意な瘀血スコアの減少がみられた ( $P < 0.05$ )。改善群においては投与前  $38.5 \pm 2.9$  点から投与後  $23.0 \pm 3.7$  点へと瘀血スコアは有意に減少した ( $P < 0.05$ ) が，非改善群では投与前  $22.2 \pm 3.8$  点に対して投与後  $23.2 \pm 2.8$  点と変化を認めなかった。

## 3) 赤血球変形能の変化

全症例について赤血球変形能の変化を検討したところ，桂枝茯苓丸投与前  $13.1 \pm 0.5$  msec (平均 ± S. E.) に対し，投与後  $12.5 \pm 0.4$  msec と変化はみられなかった。非改善群においても投与前  $12.5 \pm 0.7$  msec，投与後  $13.6 \pm 0.6$  msec と変化は認めなかった。一方，改善群においては，投与前  $13.5 \pm 0.7$  msec に比べて，投与後  $12.3 \pm 0.7$  msec と有意な減少がみられた ( $P < 0.05$ ) (図. 9)。

## 4) 赤血球膜粘弾性の変化



全症例についてみると投与前  $6.3 \pm 0.4 \text{ dyn/cm}^2$  (平均  $\pm$  S.E.) に比べて, 投与後  $5.3 \pm 0.4 \text{ dyn/cm}^2$  と変化はみられなかった。また, 非改善群においても投与前  $6.3 \pm 0.6 \text{ dyn/cm}^2$  に比べて, 投与後  $6.0 \pm 0.8 \text{ dyn/cm}^2$  と膜弾性係数の変化は認めなかった。一方, 改善群では, 投与前  $6.7 \pm 0.7 \text{ dyn/cm}^2$  に対し, 投与後  $4.6 \pm 0.4 \text{ dyn/cm}^2$  と膜弾性係数は有意に減少した ( $P < 0.05$ ) (図. 10)。

#### 6) 赤血球 ATP の変化

全症例についてみると投与前  $4.2 \pm 0.6 \times 10^{-9} \text{ M}$  (平均  $\pm$  S.E.) に対し, 投与後  $4.7 \pm 0.7 \times 10^{-9} \text{ M}$  であり投与前後で変化はみられなかった。また, 非改善群においても投与前  $4.8 \pm 0.2$  に比し, 投与後  $3.5 \pm 0.9 \times 10^{-9} \text{ M}$  と有意な変化はなかった。しかし改善群では, 投与前  $3.8 \pm 0.6 \times 10^{-9} \text{ M}$  に対し, 投与後  $5.7 \pm 1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$  と ATP の有意な増加を認めた ( $P < 0.05$ ) (図. 11)。

### 考 察

桂枝茯苓丸は, 漢方医学において瘀血病態に対して頻用される漢方方剤である。我々は, 本方剤が脳脊髄血管障害患者の神経症状に対して有効であることを報告し<sup>7)</sup>, その薬理作用に関しては, 眼球結膜微小循環改善作用<sup>29)</sup>, 血液粘度の低下作用<sup>28)</sup>, 赤血球集合能改善作用<sup>8)</sup>, 血小板凝集能抑制作用<sup>28)</sup>について明らかにしてきた。

しかし血液レオロジー因子の中で，赤血球変形能について，桂枝茯苓丸の効果を検討した報告は，織田ら<sup>30)</sup>が桂枝茯苓丸をラットに投与し，赤血球変形能の改善を認めたとの報告があるのみである。本研究では，ヒトに対して桂枝茯苓丸を投与し，赤血球変形能に及ぼす影響を検討した。

今回の成績では，投与した全症例について検討すると，赤血球変形能，赤血球膜粘弾性および赤血球内ATP濃度のいずれにおいても投与前後で変化は認められなかった。しかし，瘀血スコアが改善した群と，非改善群に分類して各パラメーターの変化を検討したところ，非改善群ではいずれの因子においても変化はみられなかったのに対して，改善群では赤血球変形能および赤血球膜粘弾性が改善し，赤血球ATP濃度の増加が認められた。2群の臨床像の差は，改善群が非改善群に比べて，桂枝茯苓丸投与前の瘀血スコアが有意に高値を示していた点であった。

以上の成績より，桂枝茯苓丸の赤血球変形能改善効果は，瘀血病態の程度の比較的強い患者において得られやすいことが示唆された。さらにその背景には，赤血球膜粘弾性の改善と赤血球ATP濃度の増加が関与することが示唆された。



## 小 括

1. 多発性脳梗塞13症例に対し、桂枝茯苓丸を4週間投与し、赤血球変形能とその影響因子に対する影響を検討した。
2. 桂枝茯苓丸投与による瘀血病態の改善とともに、赤血球変形能の改善が認められた。
3. 赤血球変形能の改善に、赤血球膜粘弾性の改善と赤血球ATPの増加が関与することが示唆された。

## 総 括

1. 瘀血病態において，赤血球集合能の亢進は重度瘀血病態でのみみられるのに対し，赤血球変形能の低下は軽度瘀血病態から認められた。
2. 瘀血病態における赤血球変形能の低下は，赤血球膜粘弾性の低下が関与していることが示唆された。
3. 瘀血病態における赤血球膜粘弾性の低下は，赤血球ATP濃度の減少が要因として考えられた。
4. 桂枝茯苓丸による瘀血の改善は，赤血球変形能の改善を伴うことが明らかとなった。その機序として赤血球膜粘弾性の改善，赤血球ATPの増加が関与していることが示唆された。



## 文 献

- 1) 柴崎保三：瘀血に関する研究，漢方の臨床，16：21-28，1969.
- 2) 寺澤捷年：症例から学ぶ和漢診療学．医学書院，pp45-54，東京，1990.
- 3) 寺澤捷年，篠田裕之，今田屋章，土佐寛順，坂東みゆ紀，佐藤伸彦：瘀血証の症候解析と診断基準の提唱．日本東洋医学雑誌 34，1-17，1983.
- 4) Terasawa, K., Itoh, T., Morimoto, Y., Hiyama, Y., Tosa, H. : The characteristics of the microcirculation of bulbar conjunctiva in "Oketsu" syndrome . J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU 5 , 200-205, 1988.
- 5) Terasawa, K., Toriizuka, K., Tosa, H., Ueno, M., Hayashi, T., Shimizu, M. : Rheological studies on "Oketsu" syndrome I. The blood viscosity and diagnostic criteria. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU 3 , 98-104, 1986.
- 6) Kohta, K., Hiyama, Y., Terasawa, K., Hamazaki, T., Itoh, T., Tosa, H. : Hemorheological studies of "Oketsu" syndrome -Erythrocyte aggregation in "Oketsu" syndrome-. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU 9 , 221-228, 1992.
- 7) Tosa, H., Hiyama, Y., Itoh, T., Morimoto, Y., Terasawa, K. : Effects of Keishi-bukuryo-gan on patients with cerebro-spinal vascular disease . J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU 6 , 13-19, 1989.
- 8) Kohta, K., Hikiami, H., Shimada, Y., Matsuda, H., Hamazaki, T., Terasawa, K. : Effects of Keishi-bukuryo-gan on erythrocyte aggregability in patients with multiple old lacunar infarction. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU 10, 251-259, 1993.
- 9) Ernst, E., Matrai, A., Marshall, M. : Blood rheology in patients with transient ischemic attacks. Stroke 19, 634- 636, 1988.
- 10) Coull, B.M., Beamer, N., Garmo, P., Sexton, G., Nordt, F., Knox, R., Seaman, G.V.F. : Chronic blood hyperviscosity in subjects with acute stroke, transient ischemic attack, and risk factors for stroke. Stroke 22, 162-168, 1991.

- 11) Resch, K.L., Ernst, E., Matrai, A., Buhl, M., Schlosser, P., Paulsen, H.F. : Can rheologic variables be of prognostic relevance in arteriosclerotic diseases?. *Angiology*, 963-970, 1991.
- 12) 佐藤清人, 津田能康, 高橋 務, 宮本泰文, 松尾裕英 : 脳梗塞患者における急性期から慢性期にかけての血液レオロジー因子の変化に関する検討. *脳卒中* 15, 30-39, 1993.
- 13) 高橋洋一 : 脳血管障害患者における赤血球変形能の研究 II. 臨床的検討. *聖マリアンナ医大誌* 11, 60-73, 1983.
- 14) 本田英比古, 木下正信, 亀谷雅洋, 下條貞友, 宮原 正 : 多発性脳梗塞, 多発梗塞性痴呆の血液レオロジーに関する研究. *臨床神経* 26, 625-630, 1986.
- 15) 志賀 健 : 赤血球のレオロジー. *日本生理誌* 44, 187-198, 1982.
- 16) Braffman, B.H., Zimmerman, R.A., Trojanowski, J.Q., Gonatas, N.K., Hickey, W.F., Schlaepfer, W.W. : Brain MR: Pathologic correlation with gross and histopathology. 2. Hyperintense white-matter foci in the elderly. *Am. J. Roentgenol* 151, 559-566, 1988.
- 17) Heier, L.A., Bauer, C.J., Schwartz, L., Zimmerman, R.A., Morgello, S., Deck, M.D. : Large Virchow-Robin spaces:MR-clinical correlation. *Am. J. Neuroradiol* 10, 929-936, 1989.
- 18) 磯貝行秀 : 血液粘度および赤血球変形能測定のためのガイドライン. *日本バイオレオロジー学会誌* 2, 34-38, 1988.
- 19) Reid, H.L., Barnes, A.J., Lock, P.J., Dormandy, J.A., Dormandy, T.L. : A simple method for measuring erythrocyte deformability, *J. Clin. Pathol.* 29, 855-858, 1976.
- 20) Shiga, T., Maeda, N., Kon, K. : Erythrocyte Rheology. *Oncol./Hematol.* 10, 9-48, 1990.
- 21) 前田信治 : 赤血球の骨格構築とレオロジー. *病態生理* 8, 965-971, 1989.
- 22) Hochmuth, R.M., Mohandas, N., Blackshear Jr., P.L. : Measurement of the elastic modulus for red cell membrane using a fluid mechanical technique. *Biophys. J.* 13, 747-762, 1973.
- 23) 横山繁樹, 能勢善嗣 : ホタルの発光酵素を用いた赤血球ATPの定量法. *生化学* 39,



- 46-49, 1967.
- 24) Middlekoop, E., Van der Hoek, E.E., Bevera, E.M., Comfurius, P., Slotboom, A.J., Op den Kamp, J.A.F., Lubin, B.F., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B. : Involvement of ATP-dependent aminophospholipid translocation in maintaining phospholipid asymmetry in diamide-treated human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica* 981, 151-160, 1989.
- 25) Mosior, M., Mikolajczak, A., Gomulkiewicz, J. : The effect of ATP on the order and the mobility of lipids in the bovine erythrocyte membrane. *Biochimica et Biophysica* 1022, 361-364, 1990.
- 26) 前田信治 : 生体膜—血球細胞の立場から I. 赤血球系 6.血液のレオロジー. *臨床病理* 91, 82-91, 1991.
- 27) Backman, L. : Functional or futile phosphorus?. *Nature* 334, 653-654, 1988.
- 28) Tosa, H., Toriizuka, K., Terasawa, K. : The effect of Keishi-bukuryo-gan on blood viscosity and blood coagulation in normal subjects. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 4, 172-179, 1987.
- 29) 森本由美, 寺澤捷年, 伊藤 隆, 檜山幸孝, 鳥居塚和生 : 桂枝茯苓丸のヒト眼球結膜微小循環に対する効果 (1) — 正常人における急性負荷試験—. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 5, 286-287, 1988.
- 30) 織田真智子, 阿部博子, 有地 滋 : 赤血球変形能に対する桂枝茯苓丸の作用. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 1, 243-248, 1984.

表. 1 瘀血の診断基準

	男		女			男		女	
	男	女	男	女		男	女	男	女
眼輪部の色素沈着	10	10	臍傍圧痛・抵抗	左	5	5	5	5	
顔面黒色	2	2		右	10	10	10	10	
皮膚の甲錯 <sup>1)</sup>	2	5	正中		5	5	5	5	
口唇の暗赤化	2	2	回盲部圧痛・抵抗		5	5	2	2	
歯肉の暗赤化	10	5	S状部圧痛・抵抗		5	5	5	5	
舌の紫暗色化	10	10	季肋部圧痛・抵抗		5	5	5	5	
細絡 <sup>2)</sup>	5	5							
皮下溢血	2	10	痔疾		10	5	5	5	
手掌紅斑	2	5	月経障害		10	10	10	10	

1) 皮膚の荒れ、ザラツキ

2) 毛細血管の拡張、くも状血管腫など

【判定】 20点以下 非瘀血病態      21点以上 瘀血病態      40点以上 重度瘀血病態



表. 2 瘀血重症度により分類された3群の臨床像の比較

	非瘀血群 (n=10)	軽度瘀血群 (n=16)	重度瘀血群 (n=9)	
年齢 (歳) <sup>a)</sup>	62.0 ± 9.4	64.1 ± 11.5	67.4 ± 7.8	N.S.
神経症候 <sup>b)</sup>	2 (20.0%)	4 (33.3%)	2 (22.2%)	N.S.
合併症 <sup>b)</sup>				
高血圧	4 (40.0%)	5 (31.3%)	2 (22.2%)	N.S.
糖尿病	5 (50.0%)	6 (37.5%)	1 (11.1%)	N.S.
高脂血症	1 (10.0%)	3 (18.8%)	1 (11.1%)	N.S.
虚血性心疾患	1 (10.0%)	3 (18.8%)	2 (22.2%)	N.S.

a) 数値は平均±S.D.で示した。統計解析の方法として、Kruskal-Wallis検定を用いた。

b) 該当する症例数で示した。各群の独立性の解析方法として、 $\chi^2$ 検定を用いた。

表. 3 癩血症度により分類された3群の血液生化学検査所見の比較

	非癩血症 (n=10)	軽度癩血症 (n=16)	重度癩血症 (n=9)	
ヘマトクリット (%)	44.6 ± 3.0	43.8 ± 3.7	43.2 ± 2.1	N.S.
総蛋白 (g/dl)	7.2 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.3 ± 0.6	N.S.
アルブミン (g/dl)	4.3 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5	N.S.
総コレステロール (mg/dl)	177.6 ± 44.1	194.6 ± 34.1	195.6 ± 29.3	N.S.
中性脂肪 (mg/dl)	105.8 ± 58.8	116.3 ± 59.2	132.8 ± 64.7	N.S.
HDL-コレステロール (mg/dl)	40.1 ± 8.5	49.2 ± 10.3	50.8 ± 19.2	N.S.
空腹時血糖 (mg/dl)	104.6 ± 14.1	112.1 ± 19.5	103.6 ± 8.4	N.S.

数値は平均±S.D.で示した。統計解析の方法として、Kruskal-Wallis検定を用いた。

N.S. : not significant



表. 4 瘀血改善群と瘀血非改善群の臨床像の比較

	瘀血非改善群 (n=6)	瘀血改善群 (n=7)	
年齢 (歳) <sup>a)</sup>	62.2 ± 9.5	67.9 ± 8.4	N.S.
瘀血スコア (点) <sup>a)</sup>	22.2 ± 9.3	38.5 ± 7.7	P<0.01
神経症候 <sup>b)</sup>	1 (16.7%)	0 (0.0%)	N.S.
合併症 <sup>b)</sup>			
高血圧	3 (50.0%)	3 (42.9%)	N.S.
糖尿病	1 (16.7%)	1 (14.3%)	N.S.
高脂血症	3 (50.0%)	1 (14.3%)	N.S.
虚血性心疾患	0 (0.0%)	2 (28.6%)	N.S.

a) 数値は平均±S.D.で示した。統計解析の方法として、Mann-Whitney検定を用いた。

b) 該当する症例数で示した。2群の独立性の解析方法として、Fisherの直接確率法を用いた。

N.S. : not significant

表. 5 瘀血改善群と瘀血非改善群の血液生化学所見の比較

	瘀血非改善群 (n = 6)		瘀血改善群 (n = 7)		
ヘマトクリット (%)	43.7±3.8	44.0±3.7	N.S.		
平均赤血球容積 (MCV) ( $\mu\text{m}^3$ )	95.2±3.2	97.3±2.5	N.S.		
平均ヘモグロビン濃度 (MCHC) (%)	33.9±1.1	32.9±0.2	N.S.		
総蛋白 (g/dl)	7.3±0.4	7.4±0.5	N.S.		
アルブミン (g/dl)	4.5±0.2	4.3±0.3	N.S.		
総コレステロール (mg/dl)	209.3±43.4	195.6±37.8	N.S.		
中性脂肪 (mg/dl)	133.2±89.1	134.4±78.7	N.S.		
HDL-コレステロール (mg/dl)	51.4±14.4	47.9±16.9	N.S.		
空腹時血糖 (mg/dl)	99.6±8.1	99.3±11.8	N.S.		

数値は平均±S.D.で示した。統計解析の方法として、Mann-Whitney検定を用いた。

N.S. : not significant



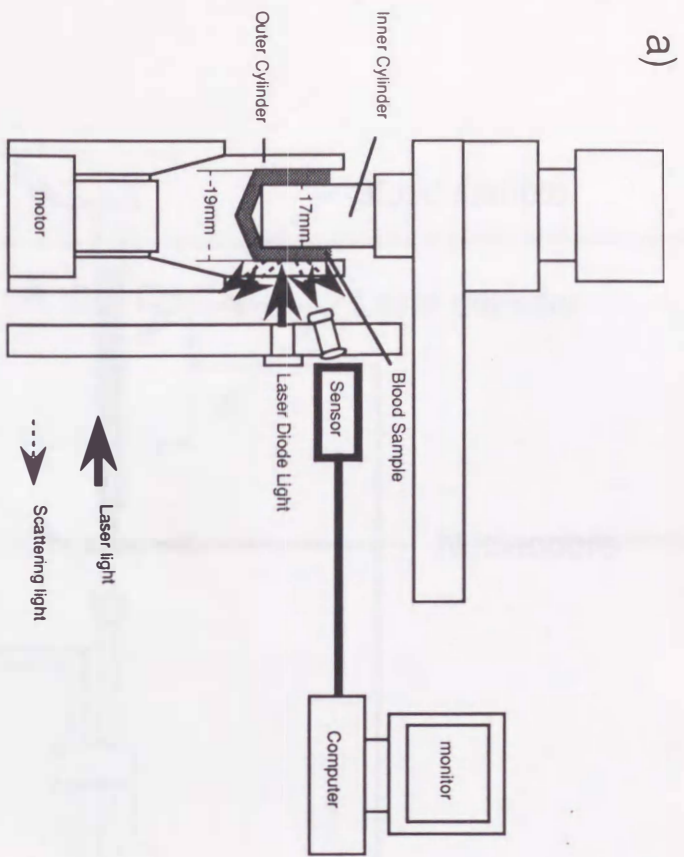


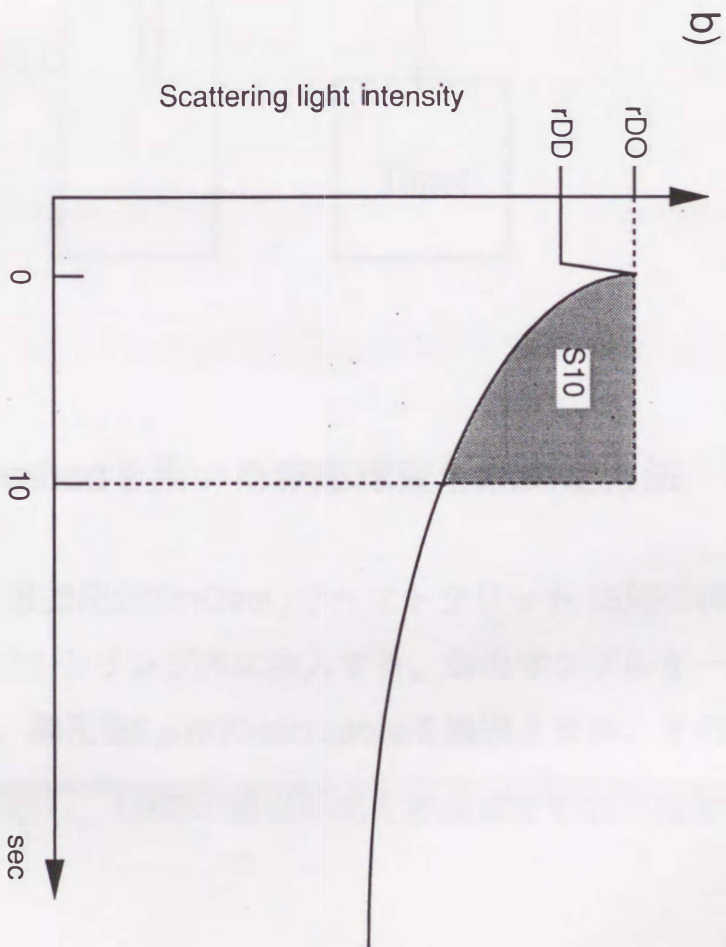
図. 1

a) Erythro-aggregometer (SEFAM™)

シリンダー内にヘマトクリット40%に調整した血液サンプルを注入し、外シリンダーを600 sec<sup>-1</sup>で回転させ、10秒後に急停止させる。ダイオードレーザー光を赤血球に照射し、得られた散乱光をセンサーで感知する。経時的に散乱光の減衰曲線がモニター上に描出される。

b) 散乱光減衰曲線

外シリンダー回転時には一定の光強度(rDD)を示すが、外シリンダー急停止により一旦光強度(rDO)は上昇する。その後赤血球の連鎖形成が進むにつれて、単位体積あたりの血球間の間隙が広がり、光強度は減衰する。外シリンダーを急停止させた時点と10秒後までの減衰曲線上の相対面積がS10である。



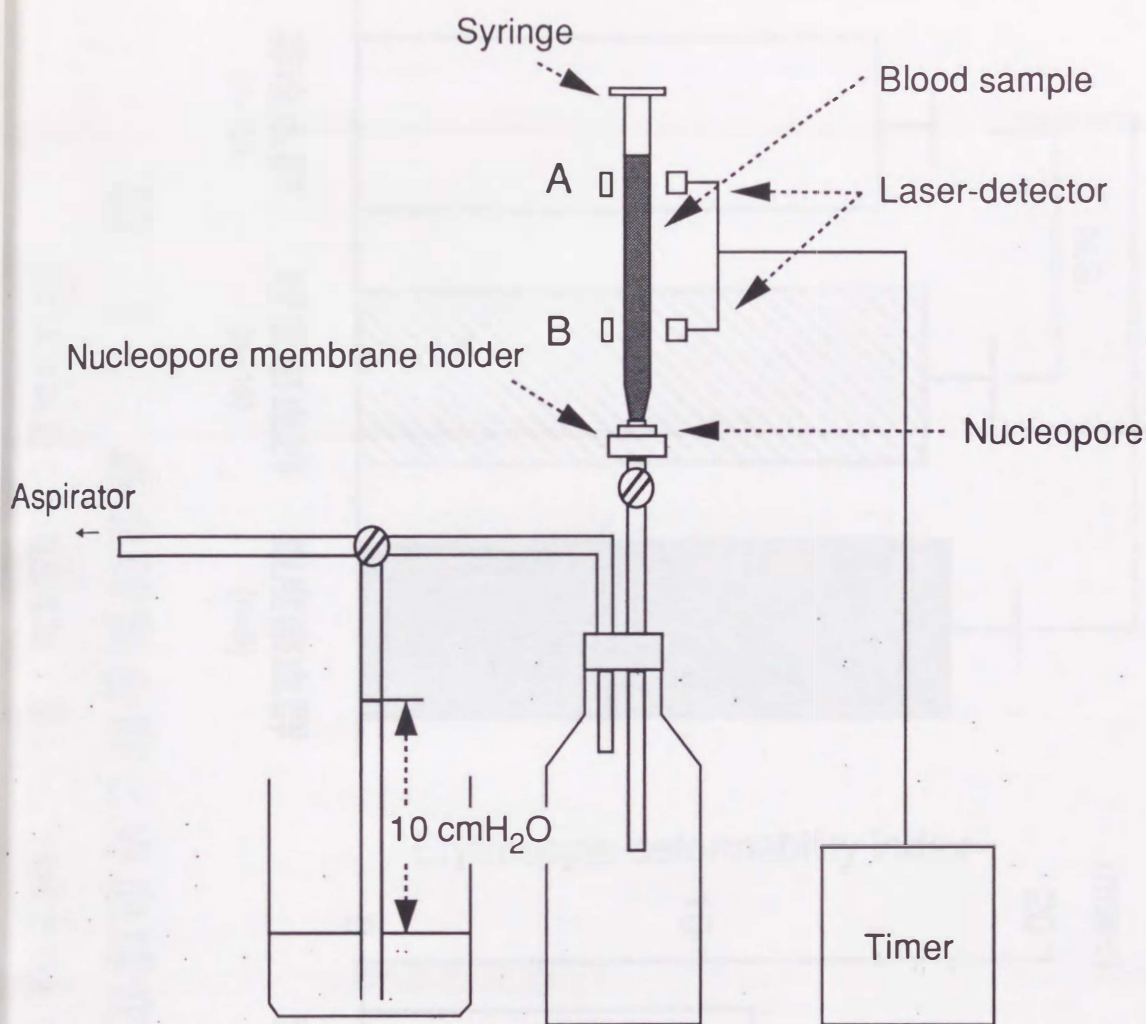


図. 2

### Erythrocyte filtration methodを用いた赤血球変形能測定方法

赤血球をリン酸緩衝液 (pH7.4, 浸透圧295mOsm) でヘマトクリット 15% に調整し, その血液サンプル 400  $\mu$ l をシリンジ内に注入する。血液サンプルを一定の陰圧 (10cmH<sub>2</sub>O) で吸引し, 細孔径 5  $\mu$ m の micropore を通過させる。その通過時間を Laser-detector で測定し, AB 間の通過時間を赤血球変形能の指標とした。



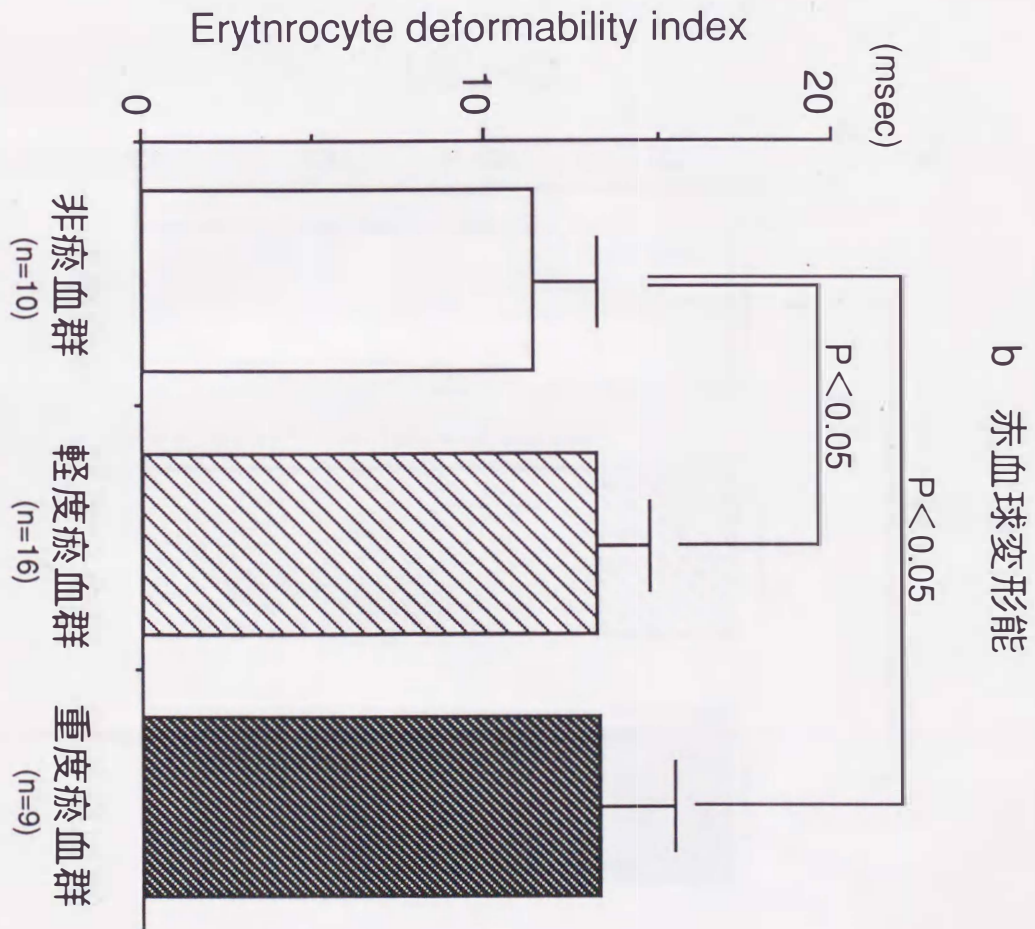
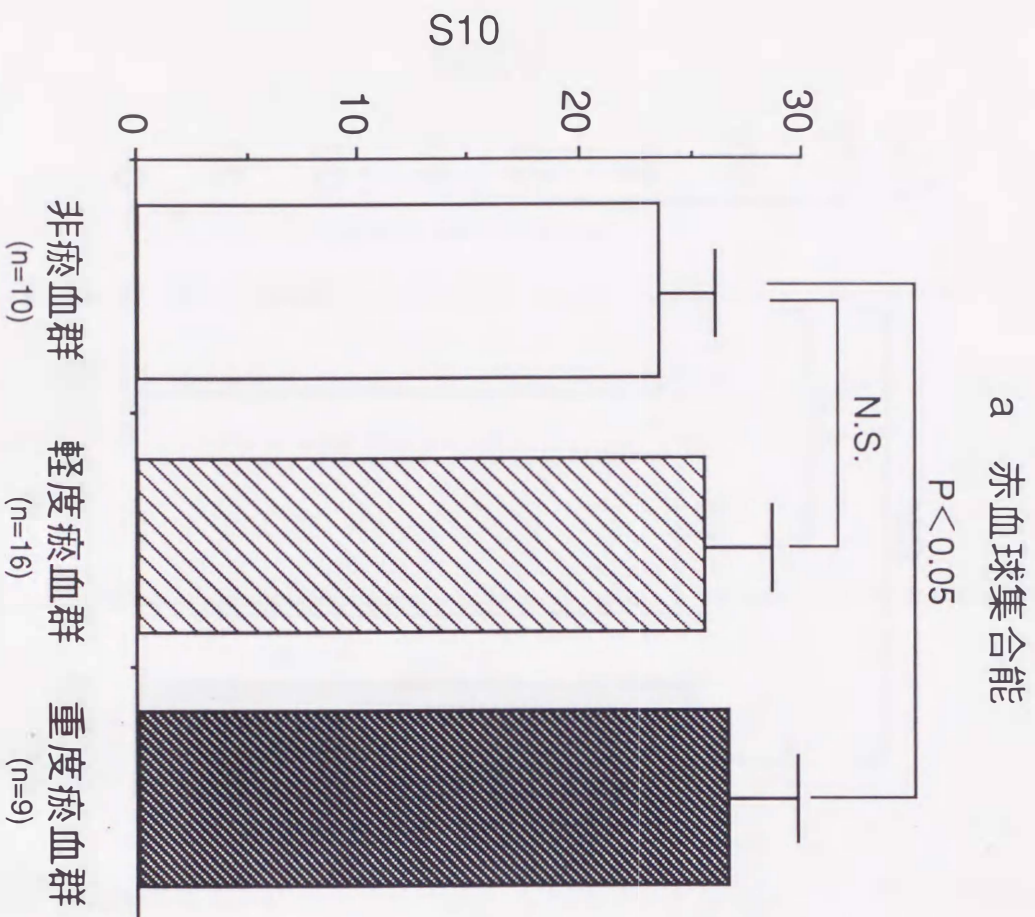


図. 3 赤血球集合能と赤血球変形能の群間比較

グラフは全て平均±S.D.で示した。解析方法として、Mann-Whitney検定を使用した。

N.S. : not significant



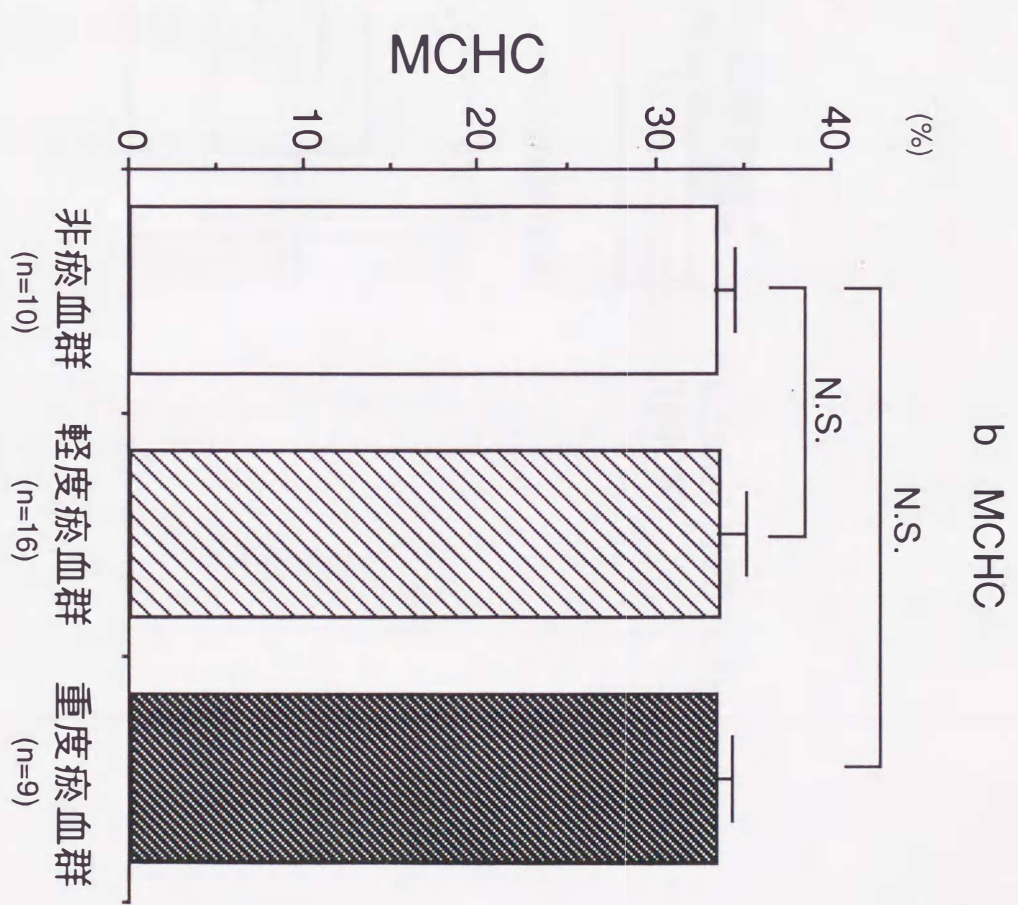
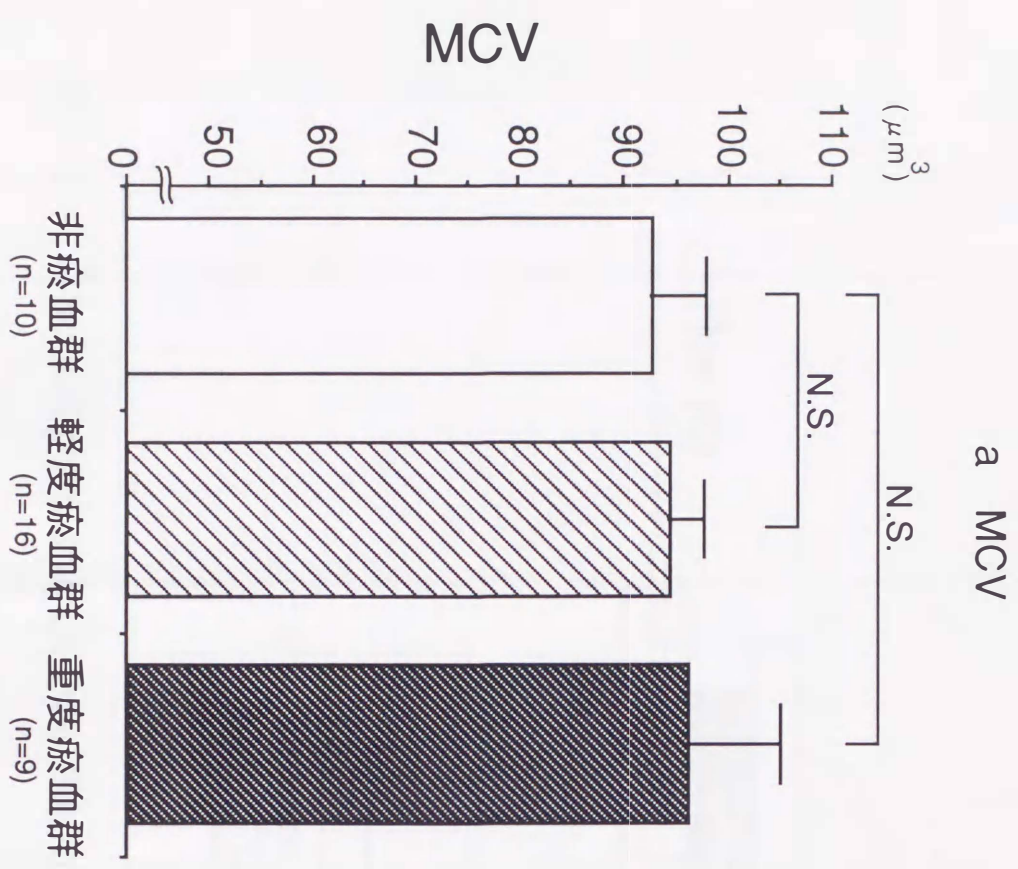


図. 4 MCVとMCHCの群間比較

グラフは全て平均±S.D.で示した。解析方法として、Mann-Whitney検定を使用した。

N.S. : not significant



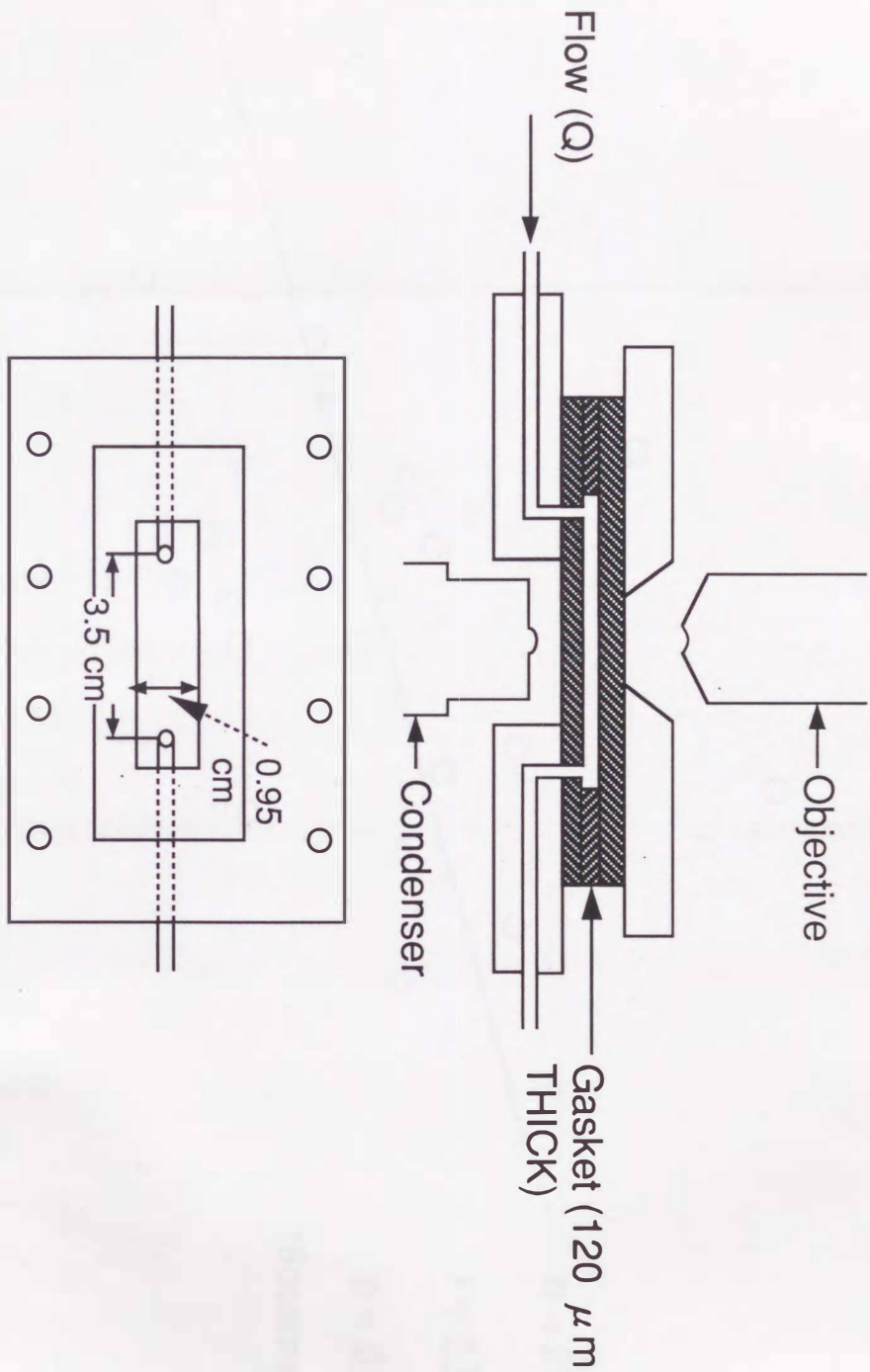


図. 5 Parallel plate flow channel chamber

等張リン酸緩衝液でヘマトクリット0.1%に調整した浮遊赤血球を、厚さ120  $\mu\text{m}$ のchamber内にDC infusion pumpを用いて、一定流速(100ml/hr)で注入する。この時赤血球が伸展する様子を倒立顕微鏡で観察し、CCDカメラで記録する。

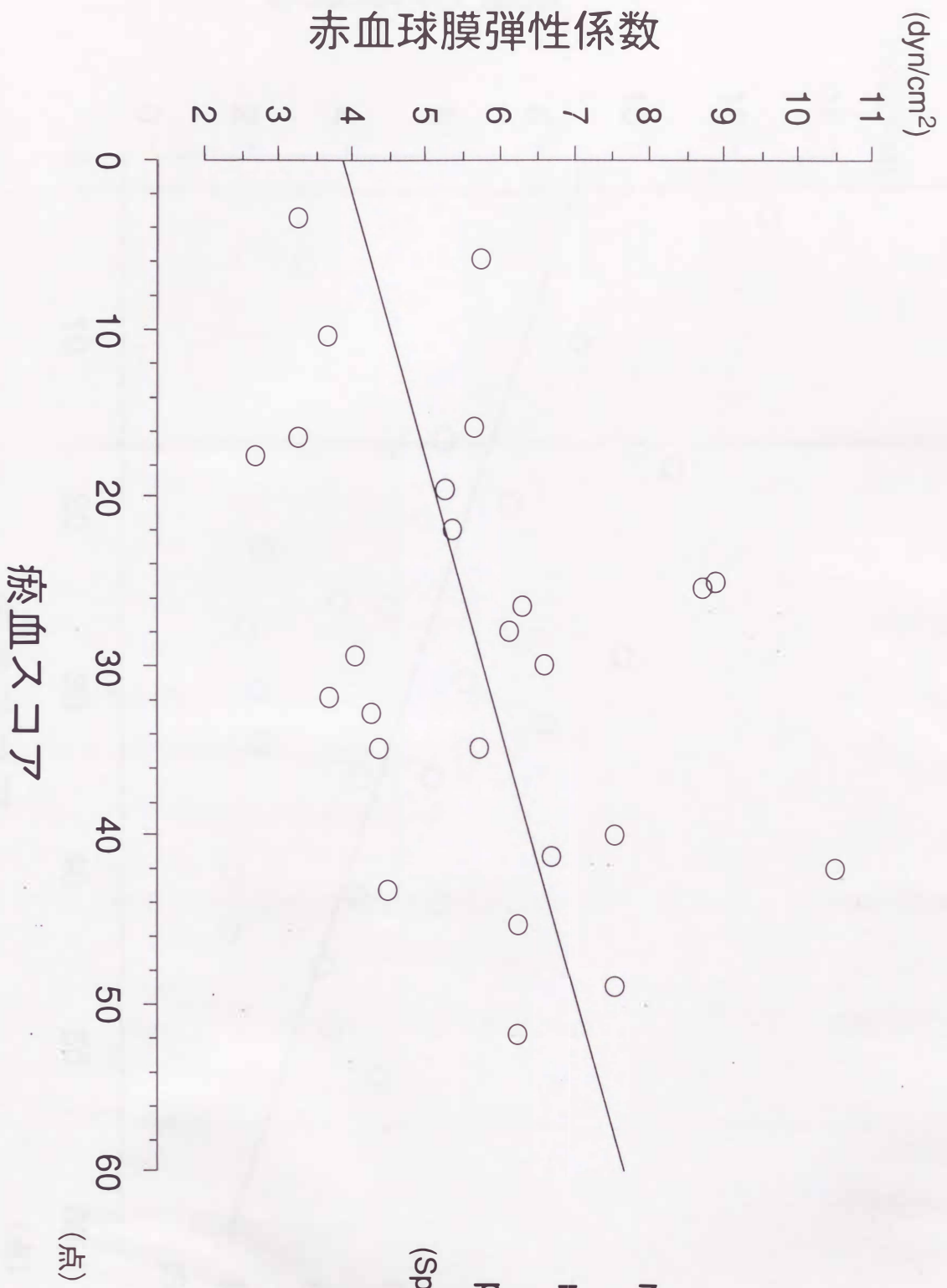


図. 6 瘀血スコアと赤血球膜弾性係数との相関



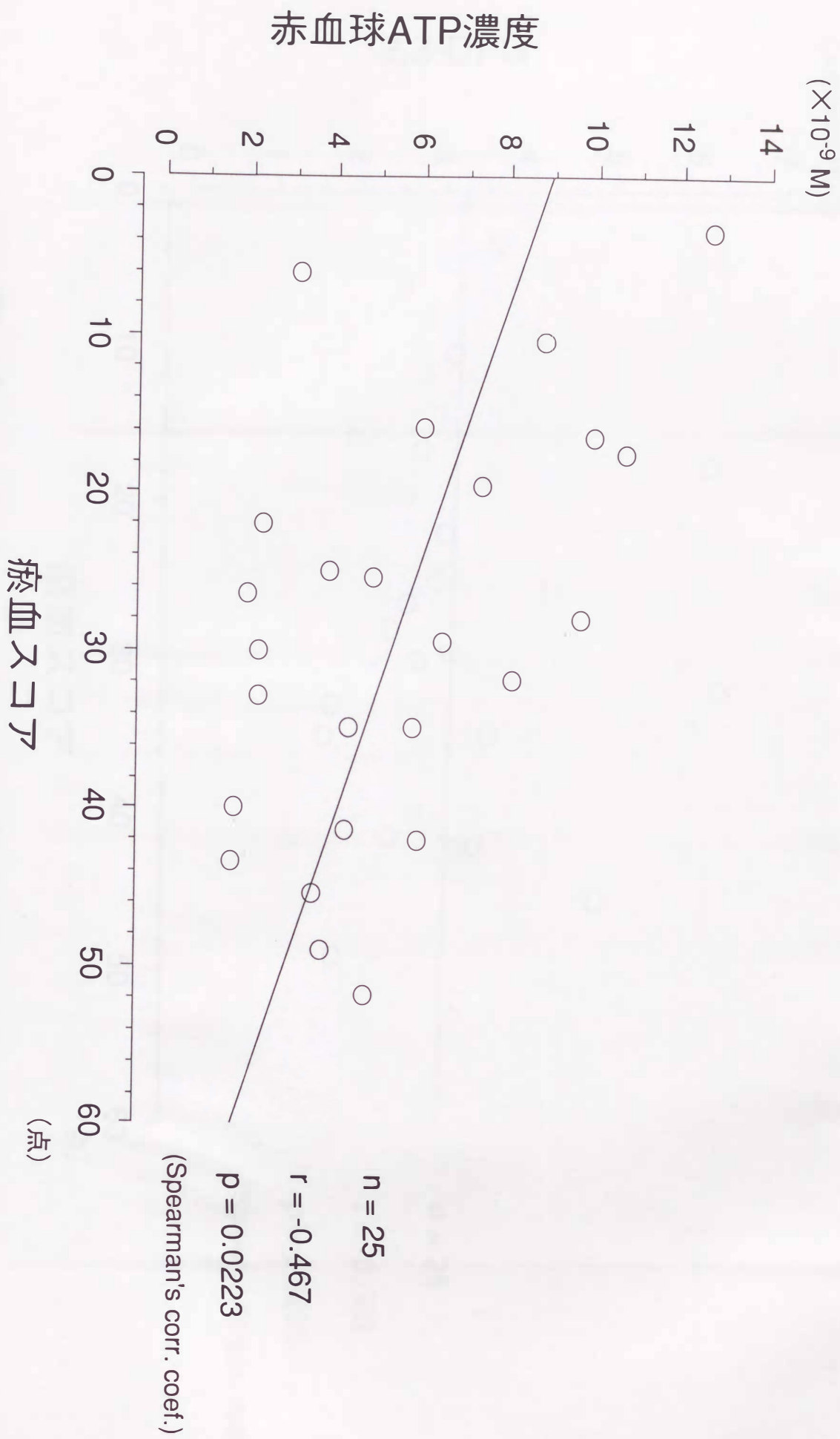


図. 7 瘀血スコアと赤血球ATP濃度との相関

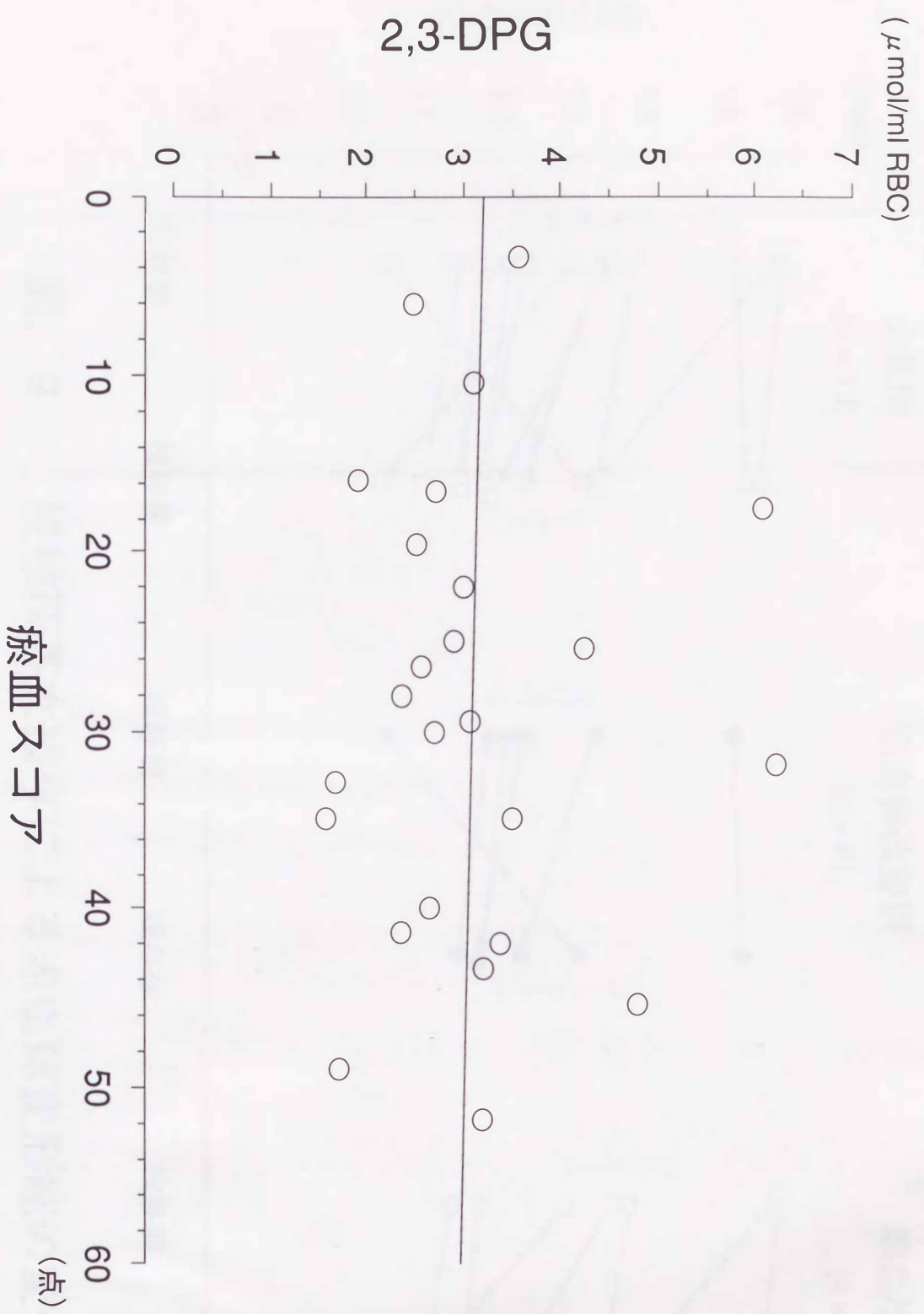


図. 8 療血スコアと赤血球2,3-DPG濃度との相関



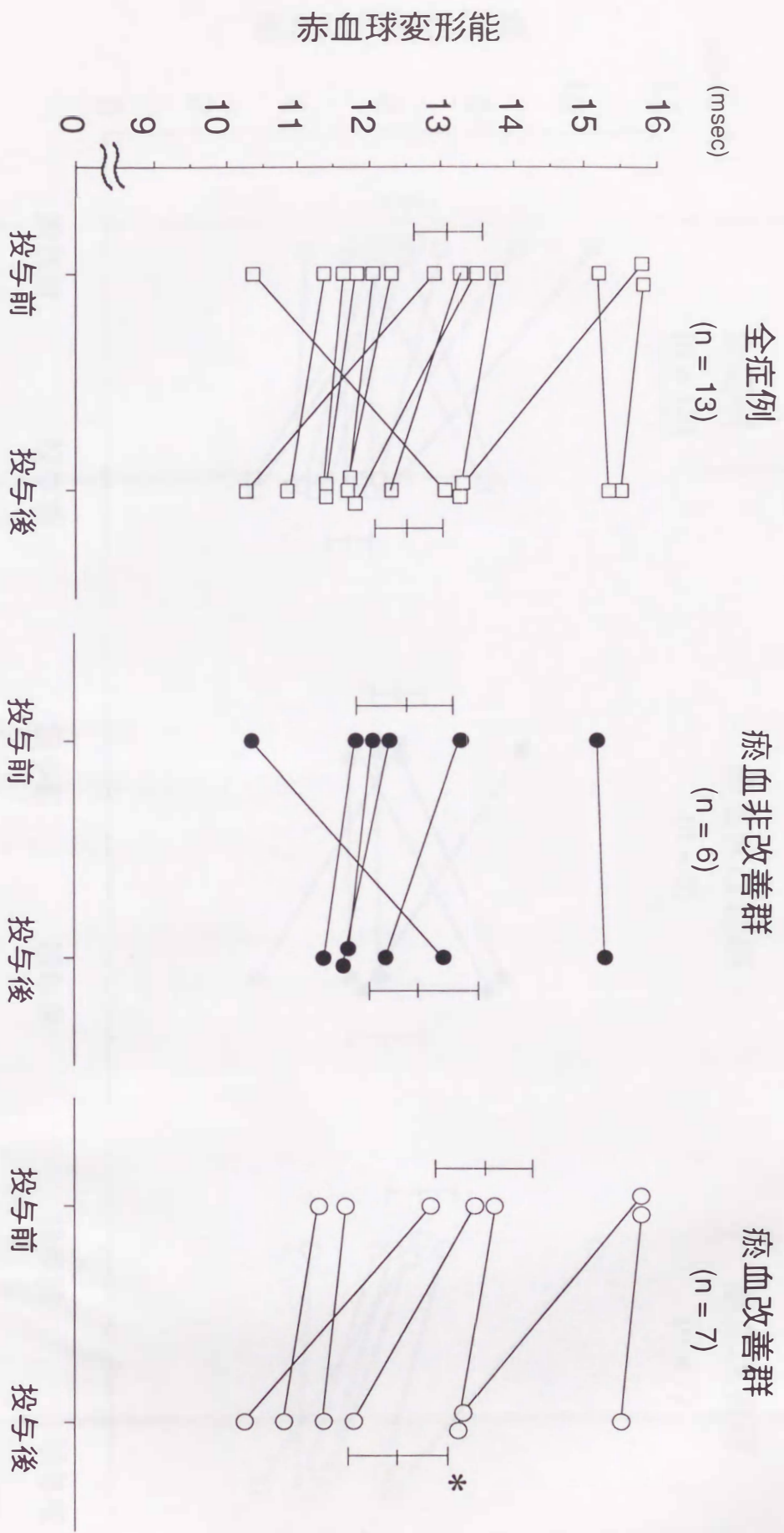


図. 9 桂枝茯苓丸投与による赤血球変形能の変化

平均±S.E.で示した。解析方法として、Wilcoxon検定を使用した。

\* : P<0.05

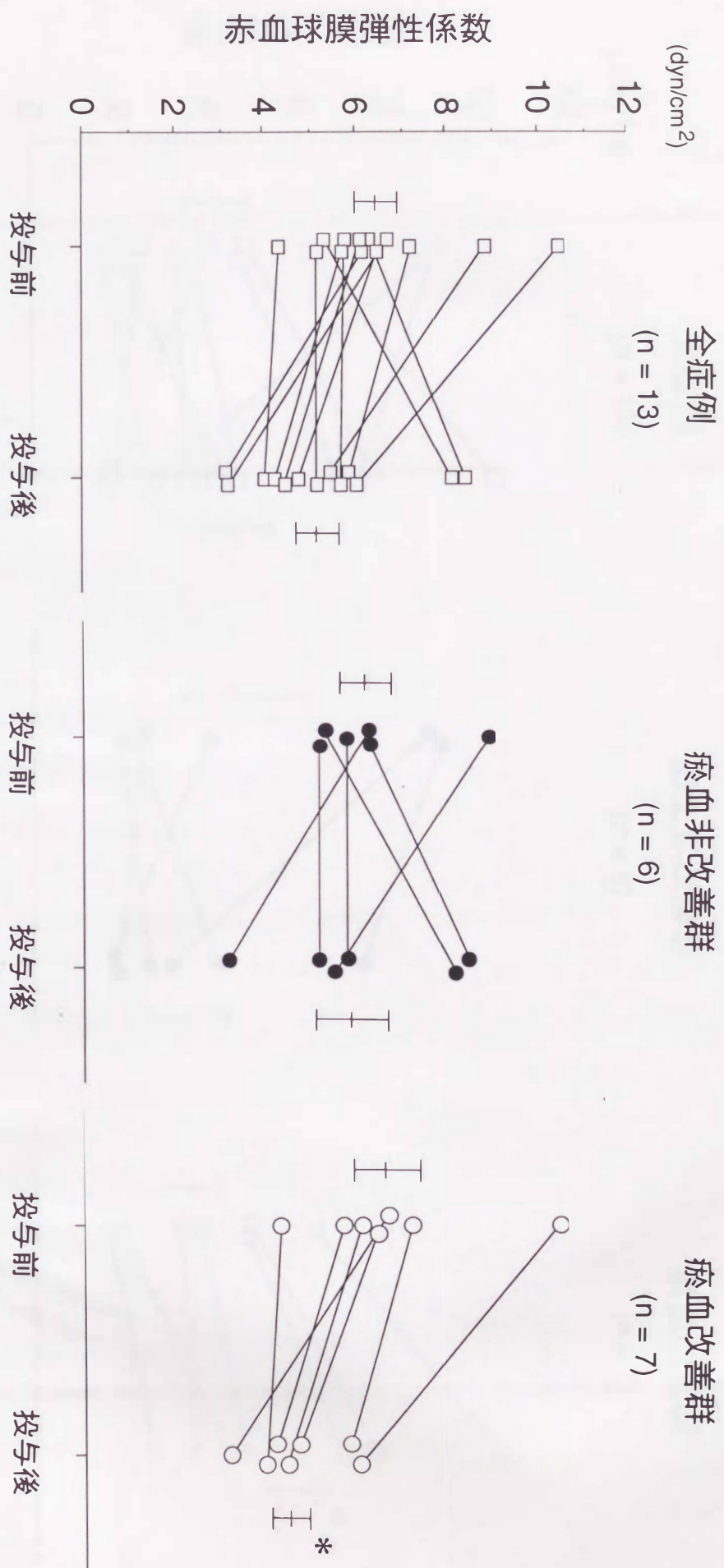


図. 10 桂枝茯苓丸投与による赤血球膜弾性係数の変化

平均±S.E.で示した。解析方法として、Wilcoxon検定を使用した。

\* : P < 0.05



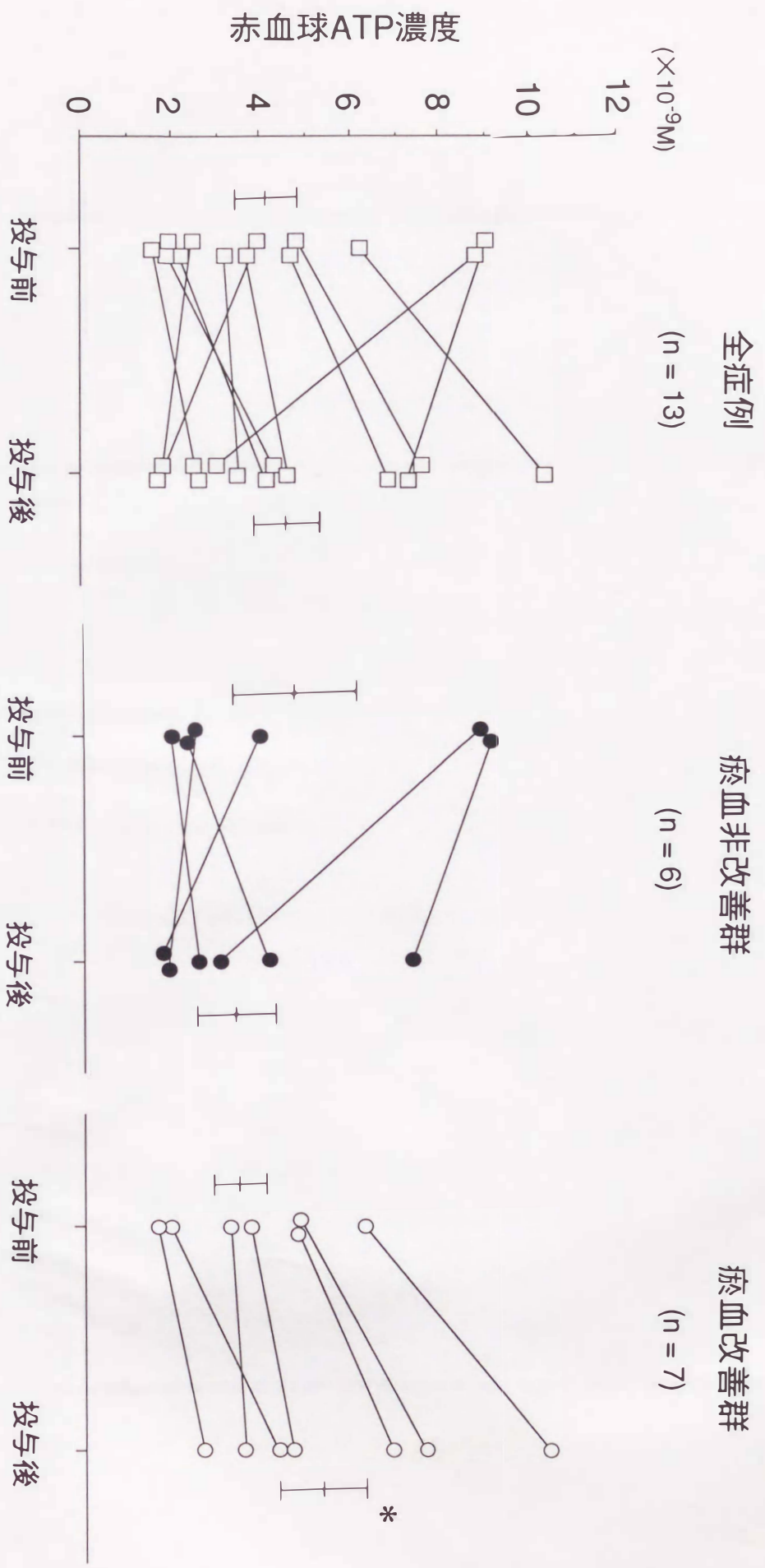
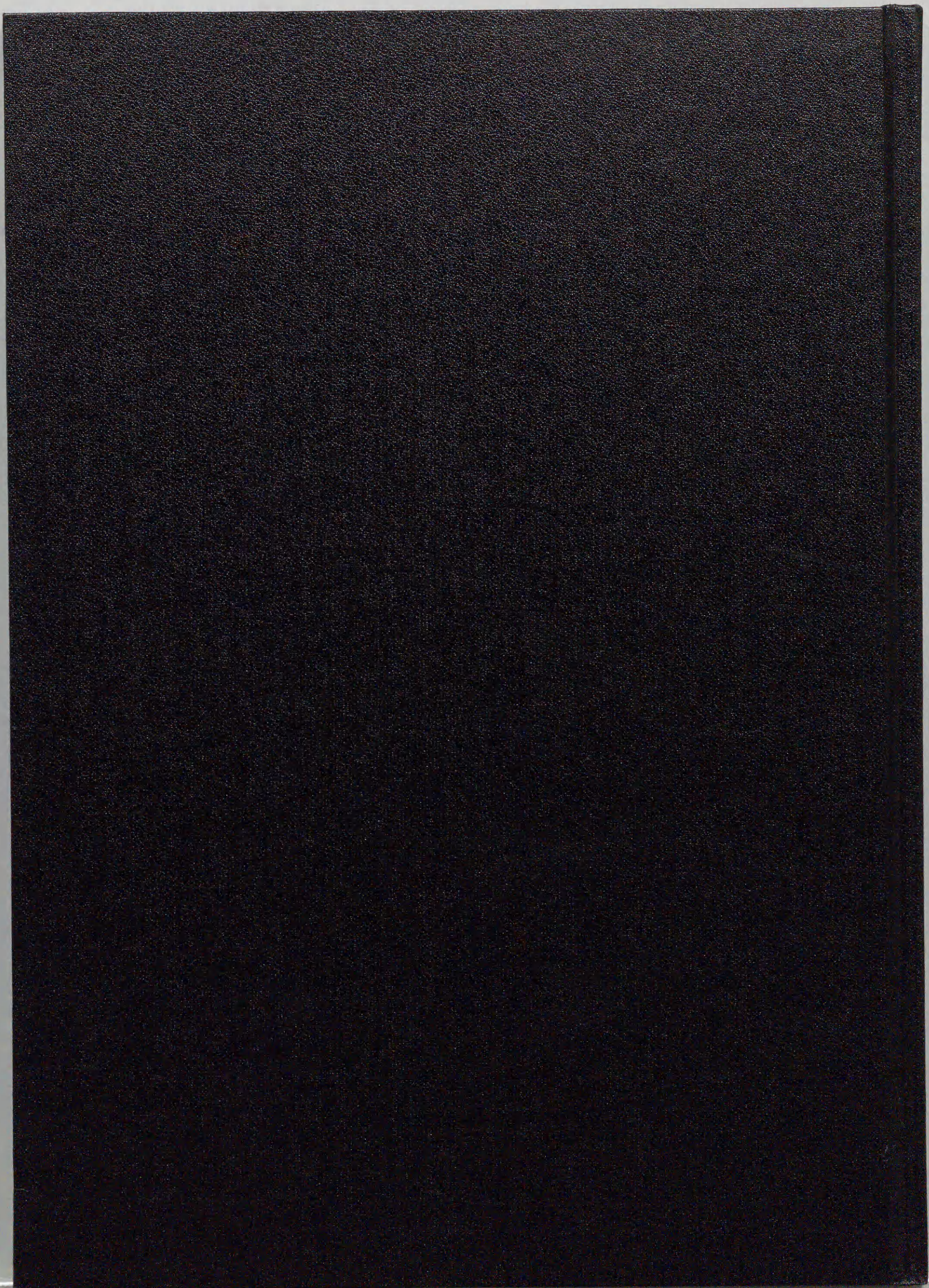


図. 11 桂枝茯苓丸投与による赤血球ATP濃度の変化

平均±S.E.で示した。解析方法として、Wilcoxon検定を使用した。

\* :  $P < 0.05$







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

# Kodak Gray Scale

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak