

生活習慣・ストレスに起因する認知情動行動障害に対する 和漢薬の作用解明

申請代表者	岡 淳一郎	東京理科大学薬学部薬理学研究室	教授
所外共同研究者	濱田 幸恵	東京理科大学薬学部薬理学研究室	助教
所内共同研究者	松本 欣三	病態制御部門複合薬物薬理学分野	教授

【報告セミナー要旨】

【目的】

申請代表者及び所外共同研究者は、幼若期発症1型糖尿病モデル(JDM)ラットの学習記憶障害発症メカニズムとその改善薬に関する研究を行っている。一方、所内共同研究者は、釣藤散が脳血管性認知症モデル動物の学習記憶障害、加齢あるいは2型糖尿病で発症する実験的認知障害に対して有効性を示すことを報告している。本共同研究では、JDMラットの学習記憶障害に対する釣藤散の作用、及び認知情動障害モデルである嗅球摘出(OBX)マウスを用いて、釣藤散の構成生薬である菊花の学習記憶行動及びうつ様行動に対する作用を調べた。

【方法】

1) 17日齢Wistar/ST系雄性ラットにstreptozotocine (85 mg/kg)を腹腔内投与した。静脈血を採血し、血糖値が300 mg/dL以上の動物をモデルとした。釣藤散[(株)ツムラから供与]は、脱イオン水で1 g/kgになるよう調製して1日1回経口投与した。釣藤散投与は21日齢から始め、実験で使用する前日まで投与した。行動実験及び電気生理学的実験は24日齢から28日齢ラットを用いた。学習記憶行動実験としてY字迷路試験を用い、Y字型に配置された3本のアームに対してラットが順番に進入する自発的交替行動を観察し、自発的交替行動率を算出した。モデル動物より急性海馬スライスを作製し、海馬CA3領域からCA1領域に投射するShaffer側枝を刺激して、CA1領域の集合興奮性シナプス後電位(fEPSP)を記録した。シナプス伝達効率の指標として、fEPSPの入力-出力関係(I-O)及び神経伝達物質の放出確率を反映した指標であるpaired pulse facilitation (PPF)を測定した。

2) ddY系雄性マウスを用い、麻酔下で嗅球を除去した(OBX)。除去せずに同様の手術を施したものを偽手術群とした(sham)。術後3日よりOBX群には水もしくは菊花エキス[KE:常盤薬品より供与]を1日1回経口投与し、投与開始2週間後より行動薬理実験を開始した。学習記憶能力は新規物体認知試験および改変型Y-迷路試験で評価した。不安情動およびうつ様行動は、各々高架式十字迷路試験および尾懸垂試験で評価した。

【結果と考察】

1) 幼若期発症1型糖尿病モデルラットで有意に減少している自発的交替行動率が、釣藤散の慢性投与によって有意に増加し、短期記憶障害(空間的作業記憶)が改善された。PPFは釣藤散の慢性投与で影響されなかった。しかし、I-Oの異常亢進、つまりシナプス伝達効率の異常亢進は釣藤散の慢性投与によって改善された。釣藤散は、糖尿病によるシナプス伝達効率異常亢進を抑制することにより認知行動障害を改善することが示唆された。

2) Sham群と比べOBX群に有意な学習記憶障害が発現した。OBX群の障害はKE投与により有意

に改善された。高架式十字迷路試験ではOBX群でopen armにおける滞在時間が有意に延長し、低不安様行動が観察された。OBX群のこの行動は、KE投与により改善された。尾懸垂試験では、KE投与によりOBX群の無動時間は有意に短縮した。これらの結果、菊花は認知行動障害および情動行動障害の何れに対しても有効である可能性が示唆された。

■背景・目的

精神神経疾患の発症には種々の環境要因や生活習慣が関与することが知られている。生活習慣病の1つである糖尿病は、三大合併症の腎症、網膜症、末梢神経障害の他に、アルツハイマー病をはじめとする認知症の重要な発症要因となることが知られている。認知症は介護する家族や社会の負担が甚大かつ、患者の生活の質を低下させることから治療方法の開発、発症機序の解明、治療薬創出が課題となっている。近年、20歳未満における1型糖尿病の患者数は2010年の179,388人から2050年には587,488人へ増加する（1,000人あたりの有病率：それぞれ2.13人および5.20人）ということが報告されている[1]。さらに、糖尿病発症における若年化が問題である。私達は過去に1型糖尿病モデルラットの発症時期が記憶学習の指標とされる海馬神経シナプス可塑性に異なる影響を与えることを報告した[2]。したがって、糖尿病発症若年化に伴った認知症治療薬の選択が必要である。本研究では、幼若期発症1型糖尿病モデルラットの認知機能および海馬神経シナプス伝達障害を改善する治療薬の候補として和漢薬の作用を調べた。和漢薬として釣藤散を用いた。釣藤散は、肩こりやめまい、慢性的な頭痛に用いられる。また、釣藤散は一過性の虚血による脳血管性認知症モデルの新規物体に対する認知記憶の障害[3]、また2型糖尿病db/dbマウスの空間学習記憶の障害[4]に対して有効であることが報告されている。そこで本研究では、幼若期発症1型糖尿病モデルラットの認知機能障害に対する釣藤散の有効性について検討することを目的とした。

一方、うつ病は、「ストレス社会」と言われる現代において、社会的にも大きな問題となっている疾患の1つである。WHOの疫学調査によると、国際疾患分類システム(ICD-10)に基づくすべての疾患のなかで、うつ病の有病率は7位に位置し、更に2020年には2位になると予想されている。日本においても、うつ病の有病率は男性で約2～3%、女性で約5～10%であり、そのうち自殺を考えるものが60%に及び自殺原因の中で1位と言われている。本研究では、うつ病およびアルツハイマー型認知症モデル動物として用いられている嗅球摘出マウスの認知情動行動障害を改善する治療薬の候補として菊花エキスの有効性について検討することを目的とした。菊花は釣藤散の構成生薬として用いられているほか、古くから延命長寿を目的に菊花茶として汎用されている生薬である。

■方法

(1) 幼若期発症1型糖尿病モデル動物の認知学習障害に対する釣藤散の作用解明

1. 方法

1-1. 幼若期発症1型糖尿病モデルラット作製方法

生後17日齢の雄性Wistar系ラット（日本SLC）にPBSまたはstreptozotocine (STZ) (85 mg/kg)を腹腔内投与し、前者をControlラット、後者を幼若期発症1型糖尿病モデル(JDM)ラットとし、生後21-28日齢で実験に使用した。動物は、室温 23 ± 1 ℃、湿度 55 ± 5 ℃で8:00～20:00の12時間明暗サイクルで動物室にて飼育し、水および飼料は自由に摂取させた。

1-2. 釣藤散の調製および投与方法

釣藤散(CTZ)は、(株)ツムラから供与されたものを用いた(釣藤散: セッコウ 5.0 g, チョウトウコウ 3.0 g, チンピ 3.0 g, バクモントウ 3.0 g, ハンゲ 3.0 g, ブクリヨウ 3.0 g, キクカ 2.0 g, ニンジン 2.0 g, ボウフウ 2.0 g, カンゾウ 1.0 g, ショウキョウ 1.0 g)。これを脱イオン水で1 g/kgになるよう調製し、1 g/kgを1日1回経口投与した。釣藤散投与は21日齢から始め、実験で使用する前日まで投与した。行動実験及び電気生理学的実験は24日齢から28日齢ラットを用いた (Fig. 1)。

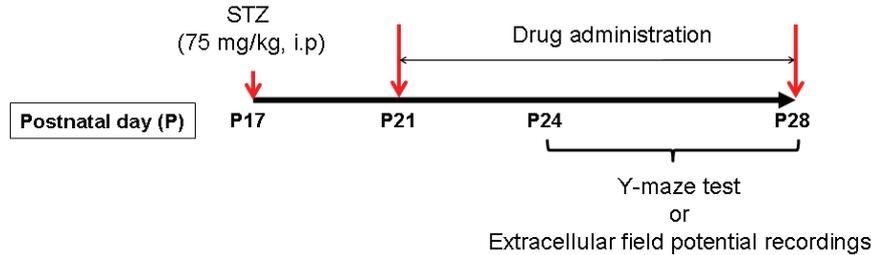


Fig. 1. Schematic drawing of experimental schedule

1-3. Y字迷路試験

24-28週齢のラットを用いた。実験装置として、黒色木製のY字型迷路を用いた。この迷路は、高さが25 cm, 幅が10 cm, 長さが35 cmのアーム3本からなり、それぞれのアームを120度のY字型にしたものを用いた。Y字型迷路は、実験室の床の中央に設置し、3本のアームにA・B・Cの名称を付けた。装置上部には記録用のデジタルカメラを取り付けてある。実験室および各アームの照度は 40 ± 5 lxに調整した。

ラットをY字型迷路におけるCのアームの端に入れ、自由に行動させ、その8分間の様子をビデオカメラにより記録した。記録されたビデオから、ラットがアームを選択して移動した順に、その経路を記録した。この際、ラット各アームに進入した回数の合計を総エントリー数(total arm entry)とし、この中で連続して異なる3つのアームを選択した回数を自発的交替行動率(% alternation)求めた。

$$\% \text{ alternation} = \{ \text{number of alternations} / (\text{total arm entries} - 2) \} \times 100$$

1-4. 急性海馬スライス標本の作製

24-28日齢のラットを用いた。

1-5. 細胞外電位記録法

Peristaltic pump (IWAKI)により一定速度(3 mL/min)でACSFを灌流した記録用チャンバー内に脳スライスを移した。顕微鏡観察下で海馬CA1野の錐体細胞樹状突起層に3-7 M Ω の記録電極(Tw150F-9, WPI, FL, USA, ACSF充填), Shaffer側枝に刺激用タングステン双極電極(WPI, FL, USA)をマニピレーターにより刺入した。刺激は1分間に1回の頻度で行い(80 μ sec duration), 誘発される集合興奮性シナプス後電位: field excitatory postsynaptic potential (fEPSP)は増幅機(SEZ-2400, NIHONKOH DEN)で増幅後、フィルター(FLA-01, Cygnus Technology)を通し10 kHz以上の波形を除外し、Power Lab 4/SP (ADI instrument, CA, USA)を介してコンピューター(Power Macintosh G4)に取り込んだ。解析はChart 5 (ADL instrument, CA, USA)により、オフラインでfEPSPの振幅amplitudeを測定した。

(2) 嗅球摘出マウスの認知情動障害に対する菊花エキスの効果とその作用特性

2.1. 実験動物および嗅球摘出術

本項目での実験では ddY 系雄性マウス（9 週齢）を用いた。嗅球摘出術は Yamada ら [9] の方法に準じ、ペントバルビタール麻酔下で頭蓋を切開して嗅球を吸引除去した（OBX 群）。吸引除去せず、同様の手術を施したものを偽手術群（sham）とした。

2.2. 薬物処置

OBX 処置の3日後より菊花エキス（Chrysanthemum flower : CF; 0.5 – 2 g（乾燥生葉換算）/kg/day, 経口）、参照薬タクリン（2.5 mg/kg, 腹腔内）、および抗うつ薬イミプラミン（IMP ; 10 mg/kg, 腹腔内）を8週間の実験期間中投与した。尚、エキスは常盤製薬より供与されたものを用いた。

2.3. 行動薬理的評価

行動薬理学実験は薬物投与開始の2週間後より、**Fig. 2**に示すスケジュールで行った。薬物効果の評価では各動物行動をDVDに記録し、記録した画像データをSMART (PanLab, Barcelona, Spain) を用いて解析した。

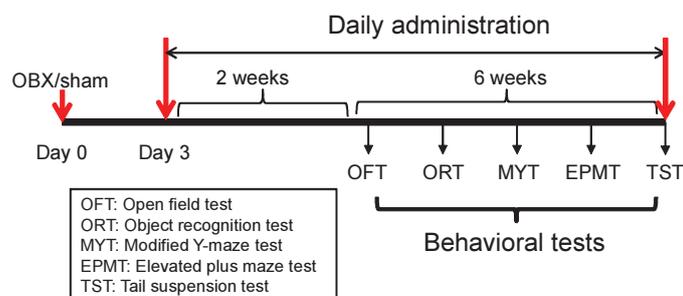


Fig. 2. Schematic drawing of experimental schedule

2.3.1. オープンフィールド試験

一辺が45cm四方のオープンフィールドにマウスを5分間入れ、その間の移動距離を自発運動量の指標として測定した。

2.3.2. 新規物体認知試験

本試験は Zhao らの方法 [3,4] に準じて行った。本試験は、サンプル試行とテスト試行からなり、サンプル試行では同色同形の物体2個を設置した観察箱内にマウスを5分間入れ、マウスが物体に鼻部を向けて接近する時間を物体認識の指標として測定した。その30分後に行ったテスト試行では2個の物体のうちの一つを新規の形状および色の物体に、他はサンプル試行で用いた物体と同色同形のコピーを設置した。再びマウスを5分間入れて各物体に関心を示す時間を測定した。

2.3.3. 改変型Y迷路試験

実験ではマウス用Y字型迷路を用い、その周囲には空間情報として3種類の手掛かりを掲示した。Yamada らの方法 [9] に準じ、訓練試行とテスト試行を行った。訓練試行では3つのアームの一つを壁で塞いだ迷路内にマウスを入れて5分間自由に探索させた。その30分後にテスト試行を行った。

テスト試行では全てのアームを開放した迷路内に再びマウスを5分間入れて自由探索させ、新規アーム、即ち訓練施行時に塞がれていたアーム内を探索する時間の割合を短期の空間記憶の指標とした。

2.3.4. 高架式十字迷路試験

OBXマウスの不安情動行動に対する薬物投与の効果を検討するために、高架式十字迷路を用いて解析した。本試験ではZhaoら[4, 11]の方法に従い、側壁のあるクローズドアームと側壁のないオープンアームが十字型に交差した装置を床より60cmの高さに設置して用いた。マウスをアームが交差するセンターに置き、5分間の観察時間中に各アームに滞在する時間を測定した。観察時間内のオープンアーム滞在時間を不安行動の指標とした。

2.3.5. 尾懸垂試験

薬物の抗うつ薬様効果の評価を目的に、尾懸垂試験法を用いた。マウスの尾部をテープで固定し、床から約50cmの位置から8分間、懸垂した[10]。この間のマウスの動きをDVD記録し、SMARTを用い、懸垂開始2分後から6分間の観察時間中の無動時間の割合を解析した。尚、動物体が0.05 cm²/sec以下の動きである場合、無動と判定した。

■結果・考察

ストレプトゾトシン誘発1型糖尿病モデルラットでは、Y字迷路試験において自発的交替行動率が対照群に比べて有意に減少した(Fig. 3)。釣藤散の慢性投与により、この短期記憶障害(空間的作業記憶)は改善した。さらに、電気生理学的検討により幼若期発症1型糖尿病モデルラットにおけるシナプス伝達の亢進が釣藤散投与により改善した(Fig. 4)。

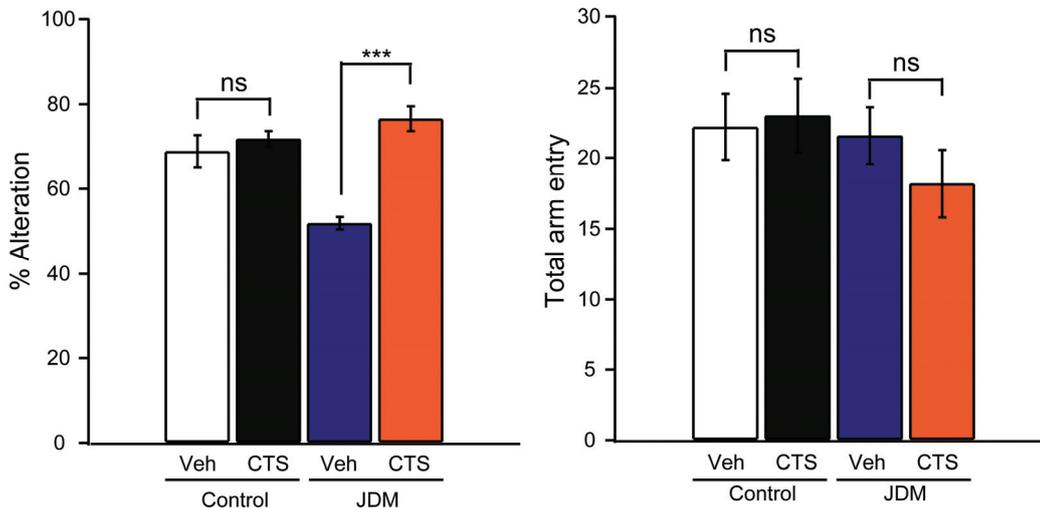


Fig. 3. CTS rescued impaired working memory in JDM rats in the Y-maze test. Each data column represents the mean ± S.E.M. (n=5 - 6). ***P<0.001, ns; non-significant.

釣藤散の慢性投与によって、Y字迷路試験における空間作業記憶がラットの行動量に影響を与えることなく改善した。先行研究において、釣藤散は新規物体に対する認知記憶および探索行動を改善している[3]。また、モリス水迷路試験における長期的な空間学習記憶を改善している[4]。本研究では、

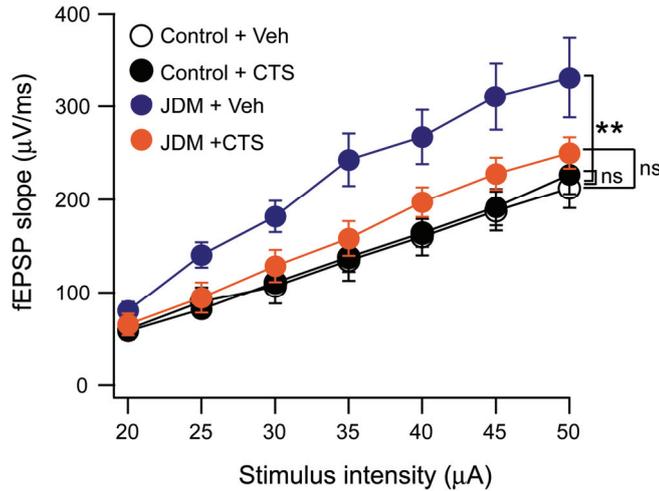


Fig. 4. The strengthened input-output relation was restored by CTS in JDM rats. Each data represents the mean \pm S.E.M. (n=8 - 10). **P<0.01, ns; non-significant.

Y字迷路試験における短期的な空間認知および作業記憶を釣藤散は改善した。

さらに、電気生理学的検討より幼若期発症1型糖尿病モデルラットでは、釣藤散の慢性投与によってシナプス伝達の亢進が回復した。このことは、プレシナプスからのグルタミン酸の放出に対するポストシナプスの反応性、すなわち海馬神経シナプス伝達効率が減弱されたことを示している。幼若期発症1型糖尿病モデルラットにおける海馬神経シナプス伝達効率の異常亢進を釣藤散は抑制し、対照群レベルのシナプス伝達効率に戻していることが示された。シナプス伝達異常亢進は、興奮性アミノ酸受容体を過剰刺激し神経細胞死を引き起こす可能性をもつ。先行研究では、釣藤散を構成する主要な生薬である釣藤鈎は、NMDA受容体の活性レベルを抑制することによる興奮毒性防止効果があることが報告されている [5]。さらに、釣藤鈎の有効成分であるアルカロイド、リンコフィリンには大脳皮質におけるNMDA受容体のサブユニットの一つであるNR2BのmRNA発現を減弱する作用がある [6]。さらに別の研究で、リンコフィリンはNMDA受容体を非競合的に阻害する作用があることが報告されている [7]。また、当研究室の過去の報告で幼若期発症1型糖尿病モデルラットにおいてNMDA受容体の活性が異常亢進していた [2, 8]。これらの事実から、釣藤散の慢性投与はNMDA受容体の活性化レベルを抑制する作用があると考えられる。

以上の結果、釣藤散が幼若期発症1型糖尿病モデルラットの認知機能障害の治療薬として有効である可能性が示された。

釣藤散の構成生薬である釣藤鈎については松本らのグループより認知行動障害改善効果における重要性が報告されている。今回は本方剤に特徴的に含まれる菊花の役割について注目し、OBXマウスの認知行動障害モデルを用いて検討を加えた。

OBX処置の約2週間後に行ったオープンフィールド試験を行い、自発運動量の変化を測定した。一般にOBX処置により運動量が亢進することが知られており、本実験においても偽手術群に比べて(水投与)OBX群で有意な自発運動量の亢進が認められた。一方、各薬物処置は運動量亢進を抑制する傾向はみられたものの、統計学的には有意ではなかった。

OBX群では、偽手術群と同様に、新規物体認知試験サンプル試行において二つの同一物体を探索する時間の割合には何ら差が認められなかった。このことからOBX処置はマウスの視覚若しくは視

覚的に物体を認識する能力に影響を与える可能性は低いと考えられた。一方、テスト試行において新規および既知物体に対して探索行動を示す時間および割合を解析したところ、偽手術群では既知物体と比べて新規物体に対する探索時間は有意に長く、正常の物体認知行動が観察されたが、OBX群では両物体に対する探索時間に差が認められなかった (Fig. 5)。この結果、OBX群ではサンプル試行で提示された物体を記憶する能力が低下していることが明らかとなった。OBX処置によるこのような障害は先の結果と一致する。一方、菊花エキス投与群では参照薬THA投与群と同様に既知物体よりも新規物体に対する探索時間が長く、更に両物体の弁別指標も有意に増大したことから、OBXによる物体認知記憶の障害は菊花投与で改善されることが明らかとなった。

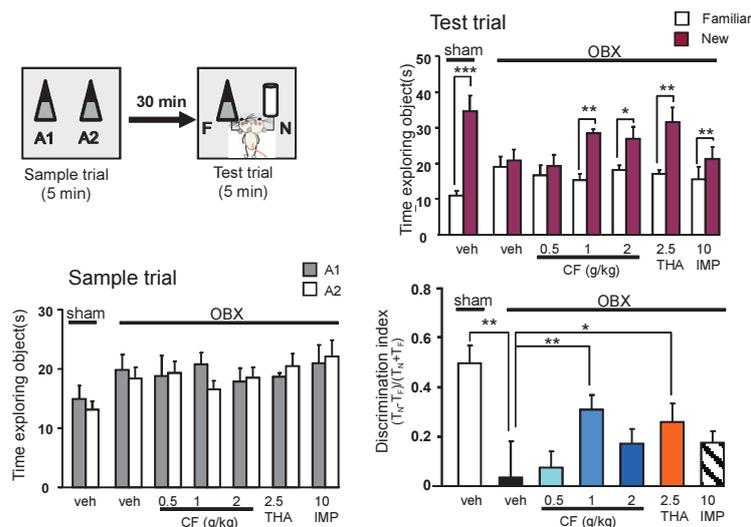


Fig. 5. CF improved object recognition performance of OBX-induced deficits mice. Each data column represents the mean \pm S.E.M. (n=9 - 10). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001

改変型Y迷路試験によりマウスの記憶能に対するOBX処置並びに薬物投与の効果について検討した。本試験はルールを学習する過程を含まず、新規性と空間記憶に基づいて特異的に作業記憶を評価できる課題として用いられている。本試験テスト試行における偽手術群の新規アーム内探索時間は、全アーム探索時間の50%以上であった。この値は期待値 (33.3%) よりも有意に高値であったことから、偽手術群では訓練試行での空間記憶に基づいて新規アームをより選択的に認識していることが明らかとなった。一方、OBX群では新規アームを探索する時間の割合は偽手術群と比較して有意に低下し、ほぼ期待値と同程度であったことから、空間作業記憶の障害を発症していると考えられた。この作業記憶障害は菊花およびTHA投与により有意に改善されたのに対し、IMP投与は無効であった。これらの薬物はどれもテスト試行におけるOBX群の迷路内自発運動量には全く影響を及ぼさなかった (Fig. 6)。

OBX誘発の情動行動障害として不安情動行動とうつ様行動を解析するとともに、菊花の効果を検討した。不安情動行動を評価する高架式十字迷路課題では偽手術群に比べ、OBX群では5分間の観察時間内でオープンアームに留まる時間の割合が有意に増加し、見かけ上の低不安行動が観察された。一般にこのような行動はdisinhibitionとも呼ばれ、認知障害を有する老化促進モデル動物SAMP8や β アミロイド前駆蛋白を高発現にした遺伝子改変動物においても同様の行動が認められ、釣藤散や抑肝散投与によって改善されることが知られている [11]。本実験では、菊花およびIMPを投与した

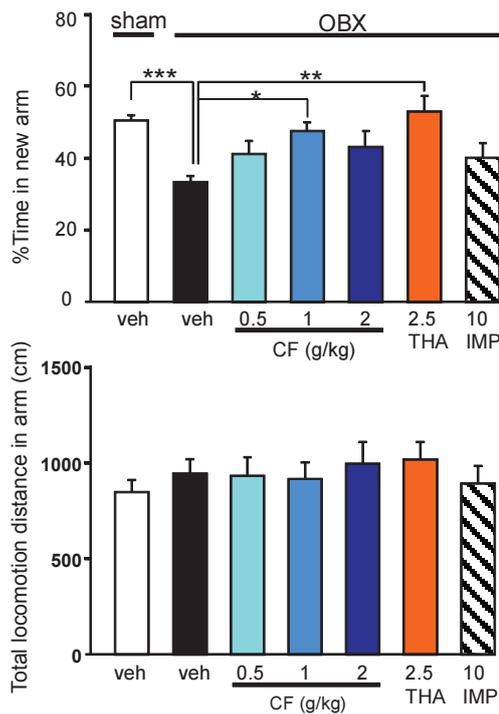


Fig. 6. CF in middle dosage and THA had significant effects on OBX-induced spatial working memory deficit. Each data column represents the mean \pm S.E.M. (n=9 - 10). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

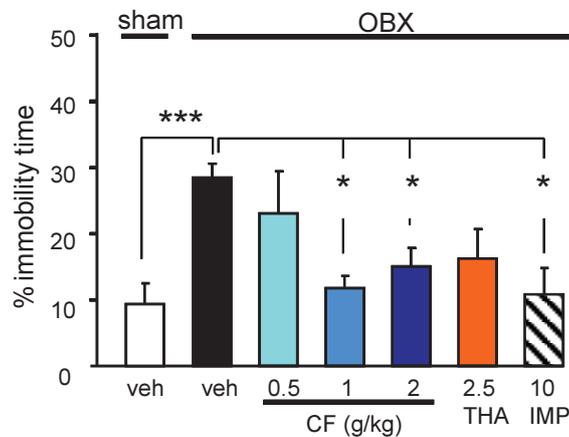


Fig. 7. CF and IMP but not THA reversed OBX-induced increase in immobility in TST. Each data column represents the mean \pm S.E.M. (n=8 - 10). *P<0.05, ***P<0.001

OBX群ではこの低不安様行動が有意に改善されることが明らかとなった。

OBX処置は認知行動障害のみならず、抗うつ薬によって改善される情動障害も誘発することが知られている。そこで尾懸垂試験における無動時間を指標にうつ様行動と菊花投与の影響を検討した。本試験では偽手術群と比べてOBX水投与群では有意に無動時間の割合が増加した。一方、菊花およびIMPを投与したOBX群では観察時間に占める無動時間の割合が有意に低下したのに対して、THA投与群では有意な変化は認められなかった。本試験では菊花投与により抗うつ薬IMPと同様の効果

が認められたことから、抗うつ薬様の効果を有する可能性が示唆された (Fig. 7)。

■結論

本研究では、釣藤散の慢性投与により幼若期発症1型糖尿病モデルラットの空間学習記憶が改善され、海馬神経シナプス伝達効率の異常亢進が抑制された。このことから釣藤散はNMDA受容体の非競合的阻害によって興奮毒性を抑え、認知機能改善効果を示す可能性が考えられ、幼若期発症1型糖尿病モデルラットの治療薬として有効であることが示唆された。さらに認知情動障害モデル動物として用いたOBXマウスにおける成績から、釣藤散の構成生薬の一つである菊花エキスには短期記憶の障害ならびにうつ様行動に対する改善効果が認められたことから、本方剤の認知機能改善効果の一部を担っている可能性が推測された。

■参考文献

- [1] Imperatore G, Boyle JP, Thompson TJ, Case D, Dabelea D, Hamman RF, Lawrence JM, Liese AD, Liu LL, Mayer-Davis EJ, Rodriguez BL. Projections of type 1 and type 2 diabetes burden in the U.S. population aged <20 Years Through 2050; Dynamic modeling of incidence, mortality, and population growth. *Diabetes Care*. 2012; 35: 2515-2520.
- [2] Sasaki-Hamada S, Sacai H, Oka JI. Diabetes onset influences hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-treated rats. *Neuroscience*. 2012;227: 293-304.
- [3] Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, Obi R, Shimada Y, Matsumoto K. Chotosan, a Kampo formula, ameliorates chronic cerebral hypoperfusion-induced deficits in object recognition behaviors and central cholinergic systems in mice. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2007; 103: 360-373
- [4] Zhao Q, Niu Y, Matsumoto K, Tsuneyama K, Tanaka K, Miyata T, Yokozawa T. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2012, 12:188
- [5] Lee J, Son D, Lee P, Kim DK, Shin MC, Jang MH, Kim CJ, Kim YS, Kim SY, Kim H. Protective effect of methanol extract of *Uncaria rhynchophylla* Against Excitotoxicity Induced by N-methyl-D-aspartate in rat hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2003; 92: 70-73.
- [6] Zhou JY, Mo ZX, Zhou SW. Rhynchophylline down-regulates NR2B expression in cortex and hippocampal CA1 area of amphetamine-induced conditioned place preference rat. *Archives of pharmacal research*. 2010; 33: 557-565.
- [7] Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi N, Watanabe H. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology* 2002; 455: 27-34.
- [8] Iwai T, Suzuki M, Kobayashi K, Mori K, Mogi Y, Oka JI. The influences of juvenile diabetes on memory and hippocampal plasticity in rats: improving effects of glucagon-like peptide-1. *Neuroscience Research*. 2009; 64: 67-74.

- [9] Yamada M., Hayashida M., Zhao Q., Shibahara N., Tanaka K., Miyata T., Matsumoto K. Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory deficits in olfactory bulbectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 135: 737-746.
- [10] Sithisarn P., Rojsanga P., Jarikasem S., Tanaka K., Matsumoto K. Ameliorative effects of *Acanthopanax trifoliatum* on cognitive and emotional deficits in olfactory bulbectomized mice, an animal model of depression and cognitive deficits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013; Volume 2013, Article ID 701956.
- [11] Zhao Q., Yokozawa T., Tsuneyama T., Tanaka K., Miyata T., Shibahara N., Matsumoto K. Chotosan-induced improvement of cognitive deficits in senescence-accelerated mouse (SAMP8) involves normalization of angiogenic/neurotrophic factors and neuroplasticity systems in the brain. *Chinese Medicine* 2011; 6: 33