

隔離飼育動物モデルにおけるエピジェネティックな精神神経性障害の発症機構解明と薬物（和漢薬）制御

申請代表者	矢部 武士	摂南大学薬学部複合薬物解析学	教授
所外共同研究者	荒木 良太	摂南大学薬学部複合薬物解析学	助教
所内共同研究者	松本 欣三	複合薬物薬理学分野	教授

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】

統合失調症や不安障害などの精神疾患は決して稀な疾患ではないにもかかわらず、詳細な発症機序が不明であることや、既存薬では十分な治療効果が見られないことなど、依然として問題点が多数存在する。種々の精神疾患の発症には、遺伝的要因だけでなく、環境要因が関与することが示唆されており、隔離飼育マウスは幼少期の環境要因に基づく精神疾患の一部の症状を反映するものと考えられている。本研究では、隔離飼育マウスで見られる異常行動の発症機序、及び漢方薬による改善作用について、背側縫線核におけるGABA神経関連遺伝子のエピジェネティクス制御に焦点をあて解析を行っている。

【方法】

隔離飼育マウスは、ddY系雄性マウスを3週齢から周囲の見えないケージにて6週間個別飼育することで作製した。隔離飼育マウスを用いて、遺伝子発現解析、タンパク質発現解析、DNAメチル化解析、ヒストンアセチル化解析、行動薬理的解析を行った。

【結果・考察】

隔離飼育マウスでは、背側縫線核においてGABA_{B1a} (GABA_B受容体サブユニットの1つ) のmRNA発現量が有意に増加していた。一方、GABA_B受容体の他のサブユニットであるGABA_{B1b}のmRNAに発現変動は見られなかった。背側縫線核におけるGABA_{B1a}の増加はタンパク質レベルでも確認された。発現増加が見られたGABA_{B1a}のプロモーター領域ではDNAメチル化の有意な減少、ヒストンH3アセチル化の有意な増加が見られた。しかしながら、ヒストンH4のアセチル化に変動は見られなかった。一方で、発現変動が見られなかったGABA_{B1b}のプロモーター領域においてはDNAメチル化やヒストンH3、H4アセチル化の変動は見られなかった。GABA_{B1a}の発現増加が見られた背側縫線核にGABA_B受容体遮断薬Phaclofenを0.3 nmol投与すると、隔離飼育マウスの多動と攻撃行動が抑制された。

本結果から、DNAメチル化の減少やヒストンH3アセチル化の増加といったエピジェネティクス制御の変化による、背側縫線核のGABA_B受容体の発現増加が、隔離飼育マウスの多動や攻撃行動といった異常行動に関与しているものと考えられた。

また隔離飼育マウスの異常行動に対する和漢薬の作用について検討したところ、加味温胆湯(1g/

kg/day, p.o.)の14日間投与が隔離飼育マウスの多動を改善することを見出した。本作用は最終投与の24時間後も持続していたことから、即時的な神経伝達調節作用などではなく、持続的なエピジェネティクス制御変化が関与している可能性が考えられる。今後、背側縫線核におけるGABA_{B1a}発現のエピジェネティクス制御に及ぼす加味温胆湯投与の影響について解析を行う予定である。

■背景・目的

統合失調症、うつ病、不安障害といった精神疾患の患者数は近年増加の一途を辿っており、社会的な問題となっている。これらの疾患の発症機序に関しては不明な部分が多く残されているが、現状、アミノ酸・モノアミン神経系を標的とした治療薬が頻用されている。しかしながらこれらの薬物に反応しない治療抵抗性患者が多数存在することや、副作用が高頻度で認められることなど、多くの問題点がある。こうした問題点を解決するには、疾患の発症機序の解明と、その発症機序に基づく新たな治療戦略の開発が必要である。近年、精神疾患の発症原因の一つとして、DNAやヒストンの化学的修飾による遺伝子発現制御機構、すなわちエピジェネティクスの関与が示唆されている。精神疾患の発症には遺伝要因に加えて環境要因、とりわけ発育期の環境が大きく寄与すると考えられており、発育期のエピジェネティックな遺伝子発現制御の変動が疾患の発症に強く関与するものと推測される。

我々はこれまでに精神疾患の発症機序の解明を目的に、発育期に他個体から隔離して飼育した長期隔離飼育マウスの研究を行ってきた。本マウスは、過剰な攻撃行動といった異常行動を示すこと、こうした異常行動が既存の抗精神病薬、抗うつ薬、抗不安薬等により抑制されることから、発育期の環境要因により発症する精神疾患病態の分子基盤を解明する上で有用なモデルと考えられる。これまでの検討から、隔離飼育マウスでは新奇マウスとの遭遇といったエンカウンター刺激により多動反応を示すこと、この多動反応は抗精神病薬や抗不安薬より抑制されることを明らかにしている。さらに、この多動反応に背側縫線核にセロトニン神経の興奮が関与していることを見出していることから¹⁾、背側縫線核のセロトニン神経の興奮が精神疾患の分子基盤の一端である可能性が考えられる。背側縫線核のセロトニン神経は主にGABA神経によって制御されていることが報告されていることから²⁾、我々は隔離飼育により背側縫線核のGABA神経系の機能に変化が生じているものと推測している。

一方で近年、漢方薬の抑肝散が治療抵抗性統合失調症に対して治療効果を示し、かつ副作用が見られないことが報告されるなど³⁾、精神疾患領域における新たな治療戦略の一つとして、漢方薬による治療が注目されている。しかしながら、漢方薬は長い年月に及ぶ使用経験に基づき治療法が確立されてきたものであり、西洋薬とは異なり科学的根拠に乏しい。現在では根拠に基づいた医療が求められており、治療効果における科学的根拠の蓄積が漢方薬治療を進める上での課題となっている。

上述の背景を踏まえ本研究では、エピジェネティックな精神疾患の発症機序およびそれに対する和漢薬効果の解明を目的とし、背側縫線核におけるGABA神経関連遺伝子のエピジェネティクス制御の解析と異常行動に対する漢方薬の作用について解析した。

■方法

隔離飼育マウスの作成

雄性のddY系マウス (Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd., Kyoto, Japan) を3週齢から6週間、集団飼育マウスは透明なケージ (24 × 17 × 12 cm) にて5匹で、隔離飼育マウスは同じサイズの周囲が灰色のケージにて1匹で飼育して実験に用いた。動物は、室温 23 ± 1°C で明期 8:00 ~ 20:00、暗期 20:00 ~ 8:00 の12時間明暗サイクルで飼育した。水および飼料は自由に摂取させた。

mRNA 発現量の解析

マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野を採取し、TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、抽出した total RNA 1 µg から cDNA を合成した。合成した cDNA の定量は、表 1 のプライマーを用いて real-time PCR 法により行った。

表 1. mRNA 発現量の解析に用いたプライマー

mRNA	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
GABA _{Aα1}	CTGCTGGACGGTTATGACAA	AAACTGGTCCGAAACTGGTG
GABA _{Aβ2}	TGCCAACAAATGAGAAGATGC	GATGTGGCCATCTCGTTTTT
GABA _{Aγ2}	GGCACCTGCATTATTTTTGT	GTTGCTGATCTGGGACGAAT
GABA _{B1a}	ACGTCACCTCGGAAGGTTG	CACAGGCAGGAAATTGATGGC
GABA _{B1b}	GCCTTCTACTCCCCTCATCT	GATCTTGATGGGGTCGTTGT
GABA _{B2}	CAGCAAGCGTTCGGGTGTA	GTCTTGGCGATGACCCAGAT
GAD67	GCCTGAAGATCTGTGGCTTC	AGCAGGTTCTTGGAGGACTG
GAD65	AGAGAGGGCCAACTCTGTGA	CTCTGCATCAGTCCCTCCTC

タンパク質発現量の解析

マウスの背側縫線核を採取し、ウェスタンブロット法により GABAB1a タンパク質の発現量を解析した。

DNA メチル化の解析

マウスの背側縫線核または大脳皮質前頭前野からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理した DNA を鋳型とし、表 2 のプライマーを用いて PCR 法により CpG アイランドを増幅しクローニングした。各サンプルにつき 8 ~ 10 クローンの塩基配列を解析した。

表 2. DNA メチル化の解析に用いたプライマー

CpG アイランド	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
1	TTGGATTTTTGTGGAAGAAGAATAG	CACCAACAACAACAACATCTA
2	AAGTTTTTTTTTTAGTTTTTTTTTTTTT	AAATCTACTTCACAATCCCAAAA

表3. ヒストンアセチル化の解析に用いたプライマー

GABA _{B1a} 転写 開始点からの 距離(bp)	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')
-1034~-816	GGTGTAAGCATTGCGCTGCT	ACCAAGGCTCTCAACCTTCA
-161~38	GGTCTCTCGGCAGCTCTTAG	GAGGGTGCAGGGGAAGAC
197~430	CCTGGATTCTGTGGAAGAA	CTACCCCATCACTCGCCTCT
2841~3048	CCACCCTCCTTTCCTTTAGTG	GCAAAGGACCAGTCCTAGAAGA
4714~4838	GTCTCTTGGCCCTAGGAAGC	GACACTTCTTCTGGGGAAGG
4928~5049	CTGCCTCTTCTGCTGGTGAT	TATACTGCACGCCGTTCTGA

ヒストンアセチル化の解析

マウスの背側縫線核を採取し、DNAとタンパク質を架橋した後にDNAを断片化した。免疫沈降は抗アセチル化ヒストンH3抗体と、抗アセチル化ヒストンH4抗体を用いて行った。表3のプライマーを用いてreal-time PCRを行い、免疫沈降DNAとインプットDNA中のGABA_{B1}遺伝子プロモーター領域の定量を行った。

脳内への薬物投与

ガイドカニューレを背側縫線核（ブレグマから後方4.4mm、右側1.5mm、26度の角度で深さ3.8mm）に設置し、1週間の回復期間の後に行動実験を行った。マウス1匹あたり0.2 μlの薬液を5分間かけて投与し、10分後に行動実験を行った。薬物はリンゲル液（147.2 mM NaCl, 4.0 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂; pH 6.0）に溶解した。

エンカウンター刺激負荷と行動解析

透明なアクリルケージ（30×30×35cm）に網目状の仕切りをし、residentとして集団飼育または隔離飼育マウスを大きい区画に入れ、3時間の馴化の後、intruderとして同週齢の新奇マウスを小さい区画に入れた（図1）。その後20分間のresidentの行動をANY-maze video tracking software (Stoelting Company, Wood Dale, IL)を用いて解析した。

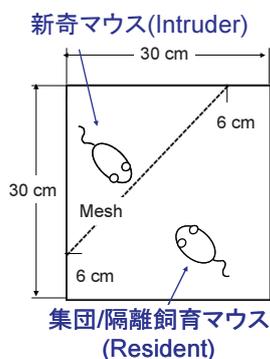


図1. エンカウンター刺激負荷に用いるケージ

攻撃行動の解析

隔離飼育マウスと9週齢のddY系雄性マウスを測定用ケージ（24×17×12 cm）に入れ、20分間行動をビデオ撮影した。隔離飼育マウスが示した噛み付き行動を攻撃行動と定義し、攻撃行動の時間を測定した。

■結果・考察

GABA 神経関連遺伝子の mRNA 発現量の解析

我々はまず、隔離飼育マウスの背側縫線核と大脳皮質前頭前野において、GABA 神経関連遺伝子 ($GABA_{A\alpha1}$ 、 $GABA_{A\beta2}$ 、 $GABA_{A\gamma2}$ 、 $GABA_{B1a}$ 、 $GABA_{B1b}$ 、 $GABA_{B2}$ 、 $GAD67$ 、 $GAD65$) の mRNA 発現量を解析した。隔離飼育マウスでは背側縫線核において、 $GABA_B$ 受容体サブユニットの1つである $GABA_{B1a}$ の mRNA 発現量が有意に増加していた。一方で、他の GABA 神経関連遺伝子の mRNA 発現量に変化は見られなかった (図 2 A)。また、大脳皮質前頭前野ではいずれの GABA 神経関連遺伝子の mRNA 発現量にも変化は見られなかった (図 2 B)。

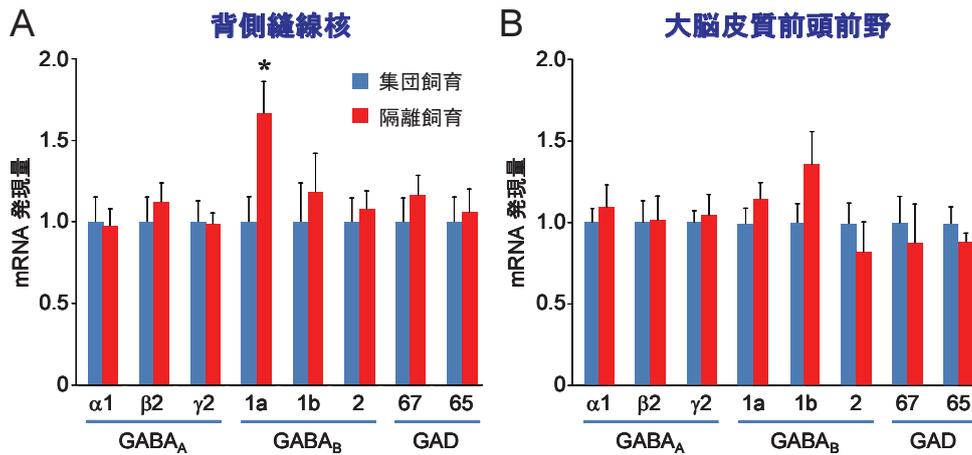


図 2. 背側縫線核 (A) と大脳皮質前頭前野 (B) における GABA 神経関連遺伝子の mRNA 発現量。
* $p < 0.05$ vs. 集団飼育。

$GABA_{B1a}$ タンパク質の発現量の解析

隔離飼育マウスの背側縫線核において $GABA_{B1a}$ の mRNA 発現量が増加していたことから、我々は次に $GABA_{B1a}$ のタンパク質発現量を解析した。隔離飼育マウスの背側縫線核では mRNA 発現量の増加と同様に、 $GABA_{B1a}$ のタンパク質発現量の有意な増加が確認された (図 3)。

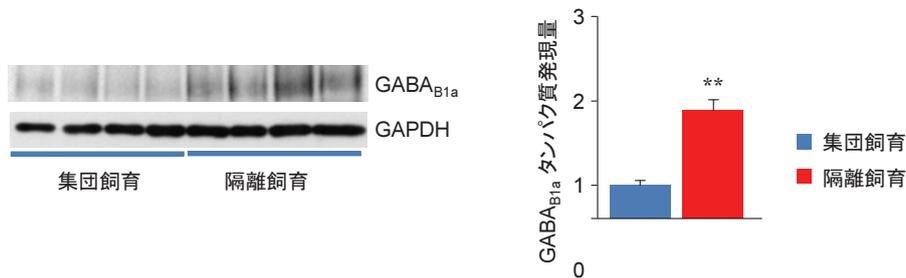


図 3. 背側縫線核における $GABA_{B1a}$ タンパク質発現量
** $p < 0.01$ vs. 集団飼育。

$GABA_{B1}$ 遺伝子の CpG アイランドにおける DNA メチル化の解析

これまでの検討から、隔離飼育といった環境要因により背側縫線核の $GABA_{B1a}$ の発現量が増加することを見出してきた。我々は、こうした環境要因による遺伝子発現の変動にエピジェネティクス制

御の変化が関与していると推測している。

DNAのメチル化は、CpGサイトと呼ばれるシトシンとグアニンが並んだジヌクレオチドのシトシンにおいて生じることが知られている。多くの遺伝子のプロモーター領域にはCpGサイトが集中しているCpGアイランドが存在しており、このCpGアイランドにおけるDNAのメチル化は遺伝子の転写に影響を及ぼすものと考えられている。GABA_{B1}遺伝子には2つの主要なスプライシングバリエントGABA_{B1a}およびGABA_{B1b}が存在するが、これらのスプライシングバリエントの転写は異なるプロモーター領域を介して調節されていることが知られている⁴⁾。GABA_{B1a}とGABA_{B1b}の転写開始点周辺にはそれぞれCpGアイランドが存在しており(図4A; 以下、GABA_{B1a}転写開始点周辺に存在するCpGアイランドをCpGアイランド1、GABA_{B1b}転写開始点周辺に存在するCpGアイランドをCpGアイランド2とする)、CpGアイランド1におけるDNAのメチル化はGABA_{B1a}の転写に、CpGアイランド2におけるDNAのメチル化はGABA_{B1b}の転写に影響を及ぼすものと推測される。そこで我々は、隔離飼育マウスの背側縫線核においてCpGアイランド1とCpGアイランド2におけるDNAのメチル化を解析した。隔離飼育マウスではCpGアイランド1のDNAのメチル化が有意に減少していた(図4B)。一方で、CpGアイランド2のDNAのメチル化は集団飼育マウスと隔離飼育マウスとで違いは見られなかった(図4C)。また、隔離飼育マウスの背側縫線核で見られたようなCpGアイランド1におけるDNAのメチル化の減少は、大脳皮質前頭前野においては観察されなかった(図4D)。

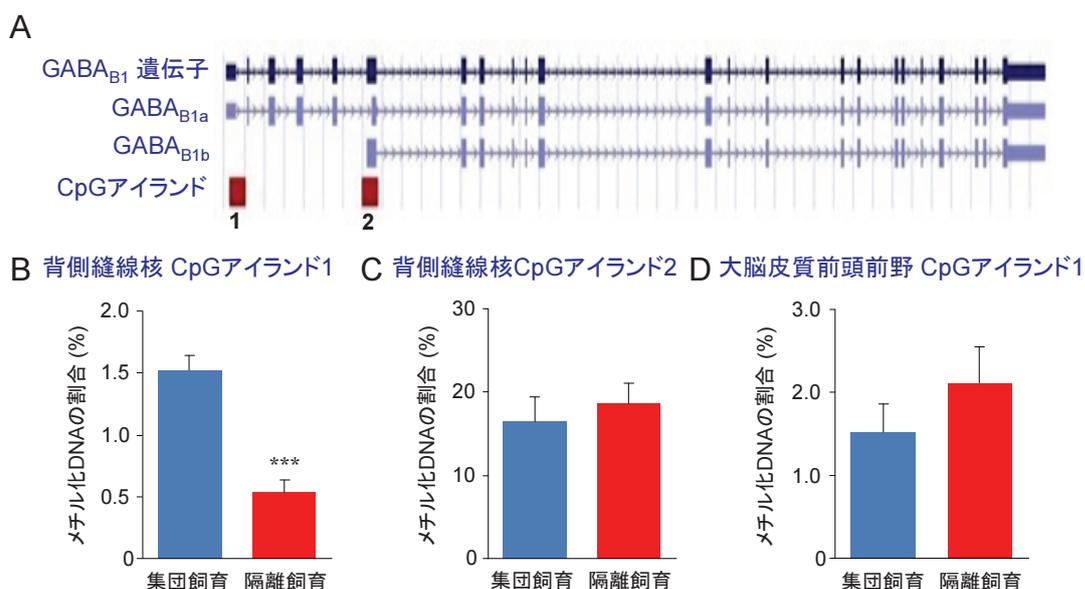


図4. GABA_{B1}遺伝子におけるCpGアイランドの位置(A)と、背側縫線核におけるCpGアイランド1(B)とCpGアイランド2(C)および大脳皮質前頭前野におけるCpGアイランド1(D)のDNAのメチル化の割合。
****p*<0.001 vs. 集団飼育。

GABA_{B1}遺伝子プロモーター領域におけるヒストンのアセチル化の解析

メチル化したDNAにはメチル化DNA結合タンパクを介してヒストン脱アセチル化酵素が結合し、近傍のヒストンを脱アセチル化することにより転写を抑制することが知られている⁵⁻⁸⁾。そこで我々は、隔離飼育マウスの背側縫線核において、GABA_{B1}遺伝子のプロモーター領域におけるヒス

トンH3サブユニットとヒストンH4サブユニットのアセチル化の割合を解析した。隔離飼育マウスではGABA_{B1a}の転写開始点周辺においてヒストンH3のアセチル化が有意に増加していた。一方でGABA_{B1b}の転写開始点周辺におけるヒストンH3のアセチル化に関しては有意な差は認められなかった(図5A)。またヒストンH4のアセチル化は、GABA_{B1a}、GABA_{B1b}の両方の転写開始点周辺において変化は見られなかった(図5B)。こうした結果から、GABA_{B1a}の転写開始点周辺において、DNAメチル化が減少することによりヒストンH3のアセチル化が増加し、GABA_{B1a}の転写が亢進する可能性が考えられた。

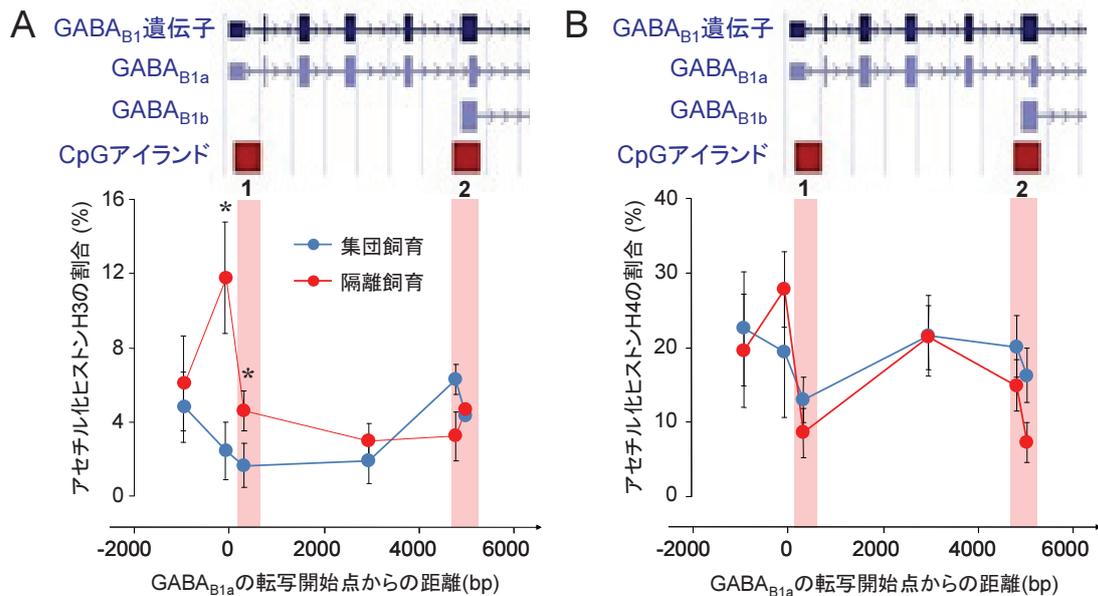


図5. 背側縫線核におけるヒストンH3のアセチル化 (A) とヒストンH4のアセチル化 (B) の割合。
*p<0.05 vs. 集団飼育。

異常行動発現における背側縫線核のGABA_B受容体機能の関与の解析

これまでの検討から、隔離飼育マウスでは環境要因によるエピジェネティクス制御の変化を介して、背側縫線核のGABA_{B1a}の発現量が増加すると考えられる。このGABA_{B1a}の増加により背側縫線核におけるGABA_B受容体の機能に変化が生じることで、異常行動が発現すると推測される。そこで我々は、背側縫線核のGABA_B受容体機能と異常行動との関連性を明らかにするために、GABA_B受容体リガンドの背側縫線核内投与が隔離飼育マウスの異常行動に与える影響について解析した。GABA_B受容体アゴニスト baclofen(0.06 nmol)の背側縫線核内投与は、隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応を増悪させた。一方で、GABA_B受容体アンタゴニスト phaclofen(0.3 nmol)の背側縫線核内投与は、多動反応を抑制した(図6)。また、phaclofen(0.3 nmol)の背側縫線核内投与は隔離飼育マウスの攻撃行動も有意に抑制した(図7)。これらの結果は、背側縫線核のGABA_B受容体の機能が、エンカウンター刺激による多動反応や攻撃行動といった隔離飼育マウスの異常行動に関与する可能性を示唆するものと考えられる。

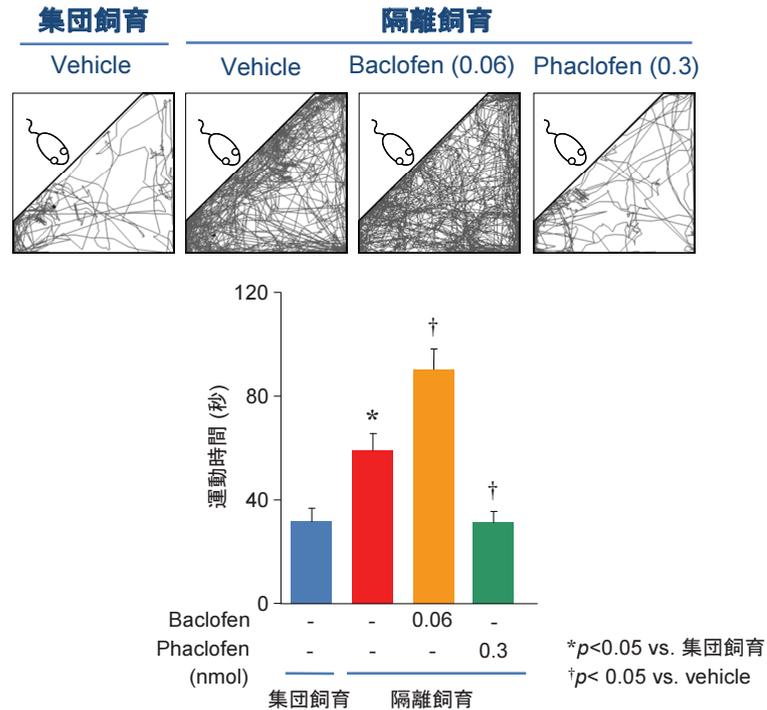


図6. エンカウンター刺激による多動反応に対するGABA_B受容体リガンドの背側縫線核内投与の影響。
**p*<0.05 vs. 集団飼育。†*p*<0.05 vs. vehicle。

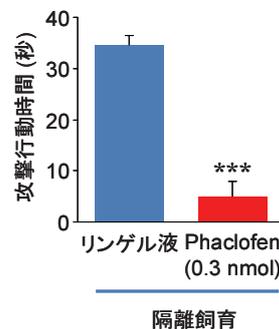


図7. 隔離飼育マウスの攻撃行動に対するGABA_B受容体アンタゴニストの背側縫線核内投与の影響。
****p*<0.001 vs. リンゲル液。

隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応に対する抑肝散の作用

本研究では、これまでに見出した隔離飼育マウスの行動異常とエピソード制御変化に対する漢方薬の作用について解析している。まず我々は、抑肝散の作用について解析を行った。抑肝散は臨床研究において、治療抵抗性統合失調症に対して改善作用を示すことや³⁾、アルツハイマー病の周辺症状に対して有効であることが報告されている⁹⁾。また基礎研究においても、隔離飼育マウスの攻撃行動を抑制することなどが報告されており¹⁰⁻¹⁴⁾、精神機能障害に対して有用な処方であると考えられる。しかしながら、隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応に対して、抑肝散(0.3 g/kg/day, p.o.)の2週間投与(投与スケジュール: 図8A)は改善作用を示さなかった(図8B)。

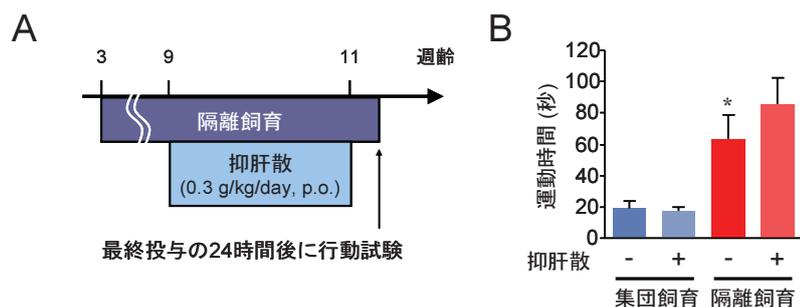


図8. 抑肝散の投与スケジュール (A) とエンカウンター刺激による多動反応に対する抑肝散の影響 (B)。
* $p < 0.05$ vs. 集団飼育。

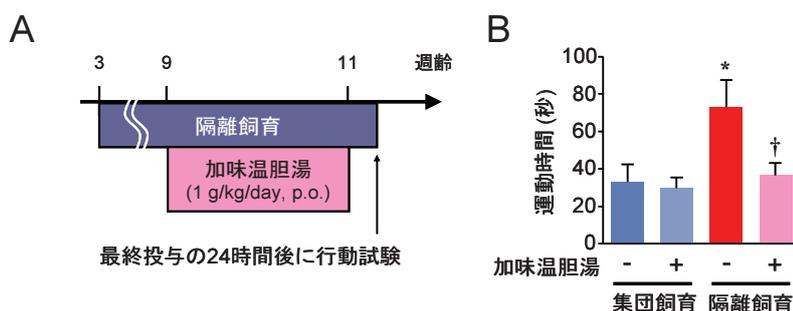


図9. 加味温胆湯の投与スケジュール (A) とエンカウンター刺激による多動反応に対する加味温胆湯の影響 (B)。
* $p < 0.05$ vs. 集団飼育。† $p < 0.05$ vs. vehicle。

隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応に対する加味温胆湯の作用

我々は次に、基礎研究においてうつ様行動を改善することが報告されている加味温胆湯の作用について解析を行った¹⁵⁾。隔離飼育マウスの多動反応に対して、加味温胆湯 (1 g/kg/day, p.o.) の2週間投与 (投与スケジュール: 図9A) は有意な改善作用を示した (図9B)。

■結論

本研究では、隔離飼育といった発育期の環境要因により、エピジェネティクス制御変化を介した背側縫線核のGABA_{B1a}の増加が生じることを明らかにした。また、こうした背側縫線核のGABA_{B1a}の増加がエンカウンター刺激による多動反応や攻撃行動に関与するものと考えられた。

漢方薬の加味温胆湯は、隔離飼育マウスが示すエンカウンター刺激による多動反応を有意に改善した。この改善作用にエピジェネティクス制御変化が関与する可能性が考えられることから、今後は、加味温胆湯の改善作用にエピジェネティクス制御変化が関与しているかを解析する予定である。

■引用文献

1. Ago Y., Araki R., Tanaka T., Sasaga A., Nishiyama S., Takuma K., Matsuda T. Role of social encounter-induced activation of prefrontal serotonergic systems in the abnormal behaviors of isolation-reared mice. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38: 1535-1547.
2. Tao R., Auerbach SB. Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids.

- Journal of psychopharmacology 2000; 14: 100-113.
3. Miyaoka T., Furuya M., Horiguchi J., Wake R., Hashioka S., Tohyama M., Mori N., Minabe Y., Iyo M., Ueno S., Ezoe S., Murotani K., Hoshino S., Seno H. Efficacy and safety of yokukansan in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (a Positive and Negative Syndrome Scale, five-factor analysis). *Psychopharmacology* 2015; 232: 155-164.
 4. Steiger JL., Bandyopadhyay S., Farb DH., Russek SJ. cAMP response element-binding protein, activating transcription factor-4, and upstream stimulatory factor differentially control hippocampal GABABR1a and GABABR1b subunit gene expression through alternative promoters. *The Journal of neuroscience* 2004; 24: 6115-6126.
 5. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 1997; 389: 349-352.
 6. Nan X., Ng HH., Johnson CA., Laherty CD., Turner BM., Eisenman RN., Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386-389.
 7. Ng HH., Zhang Y., Hendrich B., Johnson CA., Turner BM., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D., Bird A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nature genetics* 1999; 23: 58-61.
 8. Wade PA., Geggion A., Jones PL., Ballestar E., Aubry F., Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature genetics* 1999; 23: 62-66.
 9. Hayashi Y., Ishida Y., Inoue T., Udagawa M., Takeuchi K., Yoshimuta H., Kiue K., Ninomiya Y., Kawano J., Sameshima T., Kawahara T., Goto I., Shudo K., Kurayama S., Nakamura J., Okahara K., Mitsuyama Y. Treatment of behavioral and psychological symptoms of Alzheimer-type dementia with Yokukansan in clinical practice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34: 541-545.
 10. Uchida N., Egashira N., Iwasaki K., Ishibashi A., Tashiro R., Nogami A., Manome N., Abe M., Takasaki K., Mishima K., Takata J., Oishi R., Nishimura R., Fujiwara M. Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol Pharm Bull.* 2009; 32: 372-375.
 11. Kanno H., Sekiguchi K., Yamaguchi T., Terawaki K., Yuzurihara M., Kase Y., Ikarashi Y. Effect of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on social and aggressive behaviour of para-chloroamphetamine-injected rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61: 1249-1256.
 12. Sekiguchi K., Yamaguchi T., Tabuchi M., Ikarashi Y., Kase Y. Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on aggressiveness induced by intracerebroventricular injection of amyloid beta protein into mice. *Phytother Res.* 2009; 23: 1175-1181.
 13. Tamano H., Kan F., Oku N., Takeda A. Ameliorative effect of Yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient young mice. *Brain Res Bull.* 2010; 83: 351-355.
 14. Takeda A., Iwaki H., Ide K., Tamano H., Oku N. Therapeutic effect of Yokukansan on social

isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient and pair-fed mice. *Brain Res Bull.* 2012; 87: 551-555.

15. Nakagawasai O., Yamadera F., Iwasaki K., Asao T., Tan-No K., Nijima F., Arai H., Tadano T. Preventive effect of kami-untan-to on performance in the forced swimming test in thiamine-deficient mice: relationship to functions of catecholaminergic neurons. *Behav Brain Res.* 2007; 177: 315-321.