

Effects of Yokukansan on memory disturbance and behavioral and psychological symptoms of dementia induced by thiamine deficiency in mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/17293

チアミン欠乏マウスの記憶障害とその周辺症状に対する抑肝散の効果

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻医薬情報統御学
(旧講座名：薬剤部)
(主任：宮本謙一教授)

山 口 琢 児

漢方方剤である抑肝散の記憶障害およびその周辺症状に対する効果をチアミン欠乏 (thiamine deficiency, TD) マウスを用いて検討した。TDマウスは4週齢の ddY 系雄性マウスを TD 食で 21 日間飼育することにより作製した。動物は、TD 食飼育の 14 日目以降から食欲低下および体重増加抑制が認められ、それらは 21 日目まで続いた。TD 動物はコントロール動物 (正常食飼育) に比べ、19 日目のステップ・スルー型受動的回避試験において記憶保持能の低下、21 日目のソーシャル・インタラクティブ試験において攻撃性の増加と社会的行動性の低下、20 日目のオープンフィールド試験において不安状態および 14 日目のガラス玉覆い隠し試験においては不安と同時に強迫性障害が生じていることが示唆された。このような TD マウスにおける記憶障害およびその周辺症状は、抑肝散 (0.5 および 1.0g/kg) を毎日 (1 日 1 回) 経口投与することにより用量依存的に改善された。以上の結果から、抑肝散は TD マウスの記憶障害、不安・強迫性障害、攻撃性や社会的行動性の低下を改善する可能性が示唆された。また、これらの結果は抑肝散の効果の背景にある作用メカニズムの解明に TD マウスが動物モデルとして有用な生体ツールになることを示唆した。

Key words 抑肝散, 記憶, 攻撃性, 不安, チアミン

高齢化が進むわが国において今後益々高齢者の占める割合が高まると伴に認知症患者数も更に増加することが予想される。このことから、認知症の予防および治療法の確立は急務と考えられる。認知症は、記憶・学習障害などの中核症状のほかに、周辺症状として幻覚、妄想、興奮、攻撃性、焦燥、不安、抑うつ、不眠、徘徊などのさまざまな精神および行動的な異常症状 (behavioral and psychological symptoms of dementia, BPSD) が認められる。このような症状のうち、特に興奮、攻撃性、易怒性、暴力などの陽性 BPSD が強く認められる患者においては家族や介護者に暴力を振るったり対人関係が保てなくなったりして介護負担感を増大させる¹⁾。易怒性、攻撃性、暴力、対人関係の低下などは、不安や強迫・恐怖心などの感情の不安定に深く関与していることが人格障害患者などでも報告されている²⁾。これまで、このような BPSD 治療には抗精神病薬が用いられていたが、錐体外路系症状 (パーキンソン症状) や過鎮静などの副作用が認められること、さらに 2005 年 4 月には米国食品医薬管理局 (Food and Drug Administration, FDA) から死亡率が増加するとの勧告が出されたことから、副作用の少ない治療薬の出現が望まれている。

最近、医療用漢方製剤・抑肝散がアルツハイマー型やレビー小体型認知症患者で、しばしば認められる興奮・攻撃性、幻覚などの BPSD に対し有効であること^{3,4)}、さらに境界性人格障害患者 (制御のできない衝動的行動、感情の不安定、認知・知覚障害および人間関係の不安定などの複数の症状が組み合わされ

ていることを特徴とする) の諸症状に対しても有効であること⁵⁾ が報告された。しかし、それらの臨床研究では抑肝散の味や香りなどを包括した適切なプラセボがまだ作製されていないことから、いずれも二重盲検試験ではなく、オープンブライント法による臨床試験による成果である。また、これらの臨床成果を裏付ける基礎研究はまだ少なく、作用機序に関してはまだ明確ではない。

本研究では、抑肝散の臨床成果をプラセボ効果の受けにくい動物モデルを用いて客観的かつ定量的に評価し、作用機序解明の手がかりを見出すことを目的とした。認知症の動物モデルとして家族性アルツハイマー患者のアミロイドβ変異前駆蛋白を導入したトランスジェニックマウス (APP-Tg マウス)、脳虚血マウスやスコボラミン誘発健忘マウスなどがあるが、それらの研究のほとんどは学習・記憶などの中核症状に対する病因や治療に焦点が当てられており、BPSD に関する研究はあまり報告されていない。そのような背景において、我々はチアミン欠乏 (thiamine deficiency, TD) マウスが、認知症患者に見られるような学習・記憶障害だけでなく、攻撃性、抑うつなどの周辺症状まで網羅した病態モデルであるという報告に着目した⁶⁻⁸⁾。本研究では学習・記憶障害に加え、その周辺症状として攻撃性、社会的行動性、またそれらの発現と関連する不安・強迫性などの精神・行動異常に的を絞り、TD マウスにおいて実際にこれらの異常が発症するか否か、抑肝散が各精神・行動障害に有効か否かを行動薬理学的手法により客観的に評価すると同時に、

平成 20 年 4 月 9 日受付, 平成 20 年 5 月 28 日受理

Abbreviations: ACh, acetylcholine; BPSD, behavioral and psychological symptoms of dementia; 5-HT, serotonin; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; TD, thiamine deficiency

このモデルが今後の抑肝散作用メカニズムの解明に有用な動物モデルとなりえるかどうかを評価した。

材料および方法

I. 動物

実験には ddY 系雄性マウスを用いた。これらの動物は3週齢(10~12g)で日本エスエルシー株式会社(浜松)から購入し、1週間馴化飼育した後、4週齢で実験に用いた。これらの動物は、温度 23 ± 2℃、湿度 55 ± 5%、照明 12 時間(明期: 7:00 ~ 19:00)の飼育条件下でマウス用プラスチックケージ(230 × 310 × 155mm)で飼育した。馴化飼育期間中は、普通飼料(MF, オリエンタル酵母, 東京)を自由摂取させ、実験期間中はオリエンタル酵母より購入したコントロール飼料(AIN-93G)および TD 飼料を後述する実験デザインに従って給餌した。飲料水は、全動物とも馴化および実験期間を通して自由摂取させた。実験期間中は、マウス用プラスチックケージをアクリル板で半分仕切り、個別飼育した。

実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」の趣旨に基づき定めた株式会社ツムラ「動物実験に関する内規」に従い実施した。

II. TD 飼料

TD 飼料はそのベースとなるコントロール飼料(AIN-93G)の作製過程においてチアミンを除く(無添加)ことにより作製した。AIN-93G(コントロール食)のチアミン含有量は普通飼料 MF と同様の 0.5mg / 100g である。

TD 飼料は製造後、再度チアミン含量を測定したが検出されなかった。

III. 被験物質

抑肝散は、蒼朮、茯苓、川芎、当帰、柴胡、甘草および釣藤鈎の7種の混合生薬で本実験には水抽出エキス末(ツムラ Lot No.20654020)を用いた。本薬剤は室温・遮光下でデシケータ内に保存した。本実験で用いた抑肝散の投与量(0.5および1.0g/kg)は、0.5および1.0gの抑肝散を10mlの蒸留水で溶解(用時調製)し、動物体重1kgあたり10mlの割合(10ml/kg用量)で経口投与した。

IV. 抑肝散のチアミン定量

抑肝散を蒸留水で35mg/mlに溶解し、10分間遠心した。上清を0.45 μmメンブランフィルターで濾過し、濾液の一部(20 μl)を高速度液体クロマトグラフィー(LC-10V, 島津製作所, 京都)によりチアミン量を測定した。クロマトグラフィー条件は、移動相に5mMヘプタンスルホン酸ナトリウムおよび9%アセトニトリルを含有する20mMのリン酸溶液を用いた。固定相にはTSK gel ODS-80TMカラム(4.6 φ x 250mm, トーソー, 東京)を用いた。カラム温度は40℃、流速は、1.0ml/minに設定した。検出器はSPD-M10Avp(島津製作所, 京都)を用いた。2次元クロマトグラフィー解析では254nmの固定波長、3次元クロマトグラフィー解析では200から400nmの波長スキャンにより分析した。

V. 実験デザイン

1. TD マウスの記憶障害および周辺症状発現の検討

4週齢のマウスをコントロール群, TD群の2群にそれぞれ10匹ずつ分け、コントロール群にはコントロール食(AIN-93G), TD群はTD食を自由摂取させ21日間飼育した。記憶保持障害は9日および19日目にステップ・スルー型受動的回避反応試験

により、攻撃行動は14日および21日目にソーシャル・インタラクション試験により評価した。また、別に設定した同様の実験条件において、不安状態を10日および20日目にオープンフィールド試験により、不安・強迫性を14日および21日目にガラス玉覆い隠し行動試験により評価した。

2. TD マウスの記憶障害および周辺症状に対する抑肝散の効果の検討

抑肝散の効果を検討するため、4週齢のマウスを1) コントロール群, 2) TD群, 3) TD + 0.5g/kg抑肝散群および4) TD + 1.0g/kg抑肝散群の4群に各10匹ずつ分けた。1)群はコントロール食, 2)~4)群はTD食を自由摂取させ、21日間飼育した。その間、1)および2)群には蒸留水(10ml/kg), 3)および4)群には各用量の抑肝散を毎日、1日1回経口投与した。

記憶保持状態は、試験開始前(TD食飼育に切替える前)の5日間でステップ・スルー型受動的回避反応装置において電気フットショックに対する回避記憶を覚えさせた(獲得試行)。記憶保持能は20日目(最終薬物投与の1時間後)に同装置における再生試行により評価した。また、別に設定した同様の実験条件において、不安状態(オープンフィールド試験)は20日目、攻撃性・社会的行動性(ソーシャル・インタラクション試験)は21日目の最終薬物投与の1時間後に評価した。さらに別に設定した同様の実験条件において(但し、用いた動物数は各群20匹)、不安・強迫性(ガラス玉覆い隠し行動試験)を14日目の最終薬物投与の1時間後に評価した。

VI. 行動分析法

1. 記憶障害の評価法

記憶障害評価に用いたステップ・スルー型受動的回避反応試験装置(TK-042, ユニコム, 東京)は、明室(130x50x90mm, 照度27w, 1500lx.)と暗室(170x50x90mm)の2つのコンパートメントからなり、ギロチンドアにより連結されている。マウスを明室に入れ3秒後にギロチンドアを開けるとマウスは暗室に入る。動物が暗室に入るとギロチンドアが自動的に閉まり、暗室のグリッド床に1~2秒間通電(フットショック: 0.01mA, 200v, 50Hz)される。マウスが明室から暗室に入るまでの明室滞在時間を反応潜時(Latency time)として測定した。後日、同マウスを同様に明室に入れると、動物は暗室に侵入すると電気ショックを受けることを覚えているため反応潜時が長くなる。このような記憶の獲得試行を繰り返すことにより動物は明室に入れても暗室には入らなくなる。反応潜時が300秒を超えた時、動物は回避記憶を獲得したと判断した。本実験では、このような獲得試行を1日1回、TD食またコントロール食に切り替える前の普通食飼育期間中に5日間連続して行った。

本試験での記憶保持能力は回避記憶を獲得したマウスを再度、本装置の明室(フットショックは行わない)に入れ、反応潜時を測定した。再生試行において、反応潜時が長いほど回避記憶が保持されていると判断した。反応潜時の測定は300秒とした。

2. 攻撃性・社会的行動性の評価法

攻撃性および社会的行動性に対する作用は、ソーシャル・インタラクション試験を用いて評価した⁹⁾¹⁰⁾。本試験は被験動物と別に群飼育した正常動物の2匹を四方フィールド(500x500x400mm, (株)ニューロサイエンス, 東京)に入れ、マウス間で観察される行動を10分間ビデオカメラで自動録画した。後日、正常動物に対する被験動物の追尾行動、接触・探索行動、

臭い嗅ぎ行動の発現回数をカウントして、その総数を社会的行動性として評価した。また、噛付きなどの攻撃行動 (attack)、追撃行動 (chase)、速く尾を振る行動 (tail rattling) の発現回数をカウントし、その総数を攻撃性として評価した。測定は複数人で行った。

3. 不安状態の評価法

不安に対する効果は、四方フィールド (500x500x250mm) 型のオープンフィールド試験により評価した¹⁰。25マスに線分画された装置の床の中央分画にマウスを置いた後、5分間の行動をコンピューターに取り込み、行動解析ソフト (LimeLight, Actimetrics, Wilmette, USA) を用いて動物のフィールド内における分画移動数、中央分画への進入回数を解析した¹²。オープンフィールド試験では、不安状態を呈するマウスは中央部での探索行動が有意に低下し、抗不安薬によりその減少が改善されることが知られていることから¹¹、中央分画への進入回数が減少したとき動物は不安状態にあると判断した。

4. 不安・強迫性障害の評価法

マウスなどの小動物は不安、恐怖、嫌悪を感じる対象や新奇で奇異な異物に対して防衛的な埋め隠し行動を示すことが知られている¹³。本試験では、動物の不安・強迫性障害をその行動学的評価法として汎用されているガラス玉覆い隠し行動試験により評価した^{13,14}。本試験装置は透明アクリル製ボックス (250x250x300mm) の底に厚さ5cmになるように床敷 (ウッドチップ) を敷き詰め、その上に25個のガラス玉 (直径2cm) を縦横5個ずつ3cm間隔で均等に並べた。ボックスは防音箱の中に設置した。マウスを入れ、15分後にボックスを防音箱から取り出し床敷により2/3以上覆い隠されたガラス玉の数を目視により複数人で測定した。覆い隠されたガラス玉の数が多いほど不安、強迫性障害の程度が強いと判断した。

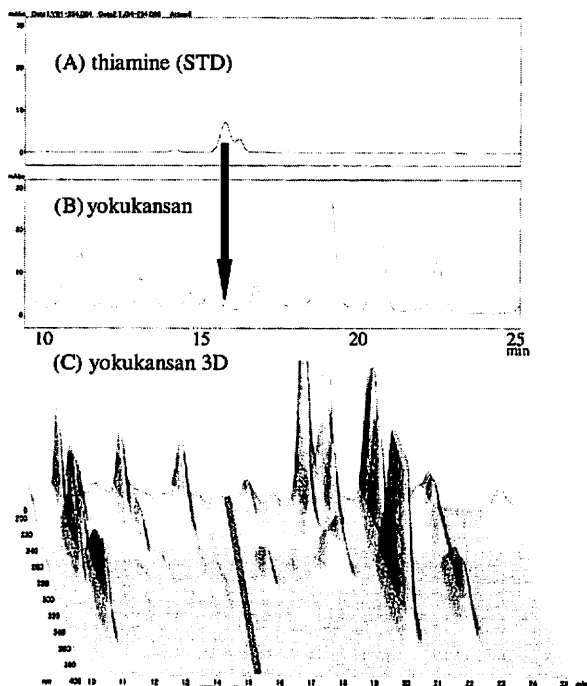


Fig.1. Chromatograms of thiamine and yokukansan.

Ⅶ. 統計解析法

各試験の結果は平均±SEMあるいは箱ひげ図で示した。各群間の有意性は、記憶障害および周辺症状発現に関する2群間の比較については、t検定により、記憶障害および周辺症状に対する抑肝散の作用に関する一連の実験 (ステップ・スルー型受動的回避反応試験、ソーシャル・インタラクション試験およびガラス玉覆い隠し行動試験) については、一元配置分散分析後のFisher検定により評価した。また、オープンフィールド試験は、Wilcoxonの順位和検定により評価した。全ての検定においてp値が0.05以下を有意差ありと判断した。

成績

I. 抑肝散のチアミン量

抑肝散中のチアミン含量を測定したクロマトグラムを図1に示した。標準物質・チアミン (図1A) は2次元クロマトグラム上で16分の保持時間で検出された。しかし、同分析条件において抑肝散の水抽出液中には同保持時間にチアミンピークは認められなかった (図1B)。更に同サンプルは200から400nmの範囲でスキャンして、3次元クロマト解析を行ったが同保持時間を有するピークは他の波長においても認められなかった。

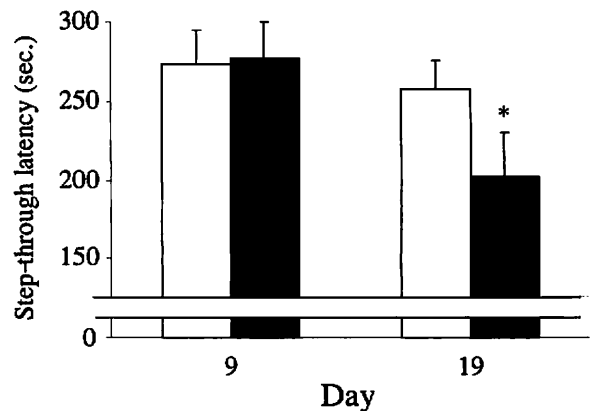


Fig.2. Influence of TD on the latency time of step-through passive avoidance task. Values are expressed as the $\bar{x} \pm$ SEM (n=10). *p<0.05 vs. Control group. □, control; ■, TD.

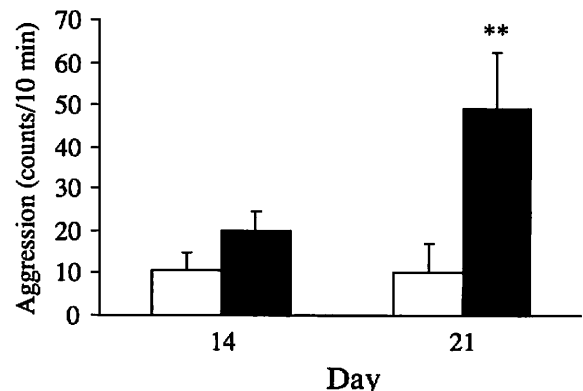


Fig.3. Influence of TD on aggressive behavior of social interaction test. Values are expressed as the $\bar{x} \pm$ SEM (n=10). **p<0.01 vs. Control group. □, control; ■, TD.

II. TD マウスの記憶障害および周辺症状

1. 記憶障害

TD マウスの9日および19日目におけるステップ・スルー型受動的回避反応試験の結果を図2に示した。TD 食飼育9日目では、TD 群の反応潜時 (277.4 ± 22.6秒) はコントロール群 (273.4 ± 18.0秒) との比較において有意な差は認められなかった。19日目においては、コントロール群は9日目とほぼ同様な反応潜時を維持していたが、TD 群の反応潜時は有意に短縮した。

2. 攻撃性の検討

TD マウスの14日および21日目におけるソーシャル・インタラクション試験の結果を図3に示した。14日目の攻撃行動はまだ少なく、TD 群 (20.0 ± 4.7回/10分) およびコントロール群 (10.5 ± 4.4回/10分) の間に有意な差は認められなかった。しかし、21日目では、コントロール群 (10.3 ± 6.7回/10分) は14日目とほぼ同程度であったのに対し、TD 群で著しい増加 (49.1 ± 13.1回/10分) が認められた。

3. 不安状態発現時期の検討

TD マウスの10日および20日目におけるオープンフィールド試験の結果を図4に示した。10日目におけるTD 群の中央分画進入回数は、コントロール群に比べ減少傾向 (統計的に有意差は

認められなかった) を示した。しかし、20日目ではTD マウス群の中央分画進入回数はコントロール群に比べ有意に減少した。

4. 不安・強迫性の発現時期の検討

TD マウスの14および21日目におけるガラス玉覆い隠し行動試験の結果を図5に示した。覆い隠したガラス玉の数は、14および21日目のいずれにおいてもTD 群の方が、コントロール群に比べ多い傾向 (統計的に有意差は認められなかった) を示した。その傾向は14日目のほうが大きかった。

以上の結果を基に、TD マウスの記憶障害、不安および攻撃性・社会的行動性低下に対する抑肝散の効果は、ステップ・スルー型受動的回避反応試験、ソーシャル・インタラクション試験、オープンフィールド試験を用いて19日から21日の間で評価した。また、不安・強迫性についてはガラス玉覆い隠し行動試験を用いて14日目に評価した。

III. TD マウスの記憶障害および周辺症状に対する抑肝散の作用

1. 体重、摂餌量に対する抑肝散の作用

実験期間中の各群における動物の体重推移を図6に示した。コントロール群は、21日間の実験期間を通して飼育経過に伴う

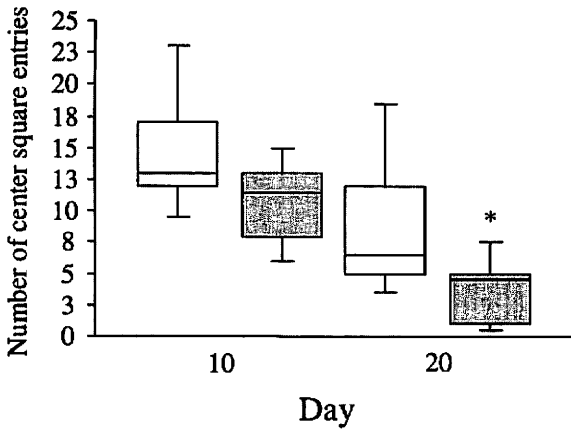


Fig.4. Influence of TD on open-field test. Each column indicates median and interquarater values (n=10). *p<0.05 vs. Control group. □, control; ■, TD

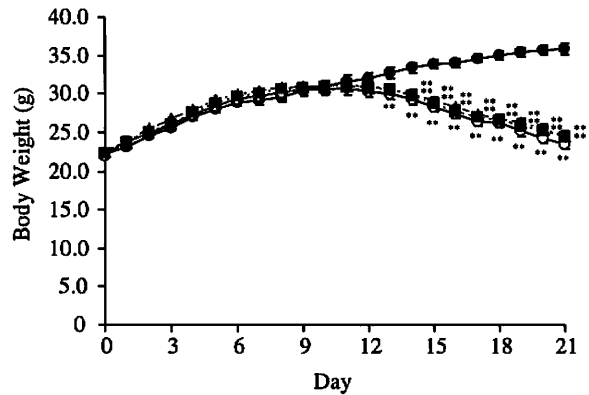


Fig.6. Effects of yokukansan on body weight in TD mice. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=10). **p<0.01 vs. Control group. ●, control; ○, TD; ■, TD+0.5 g/kg yokukansan; △, TD+1.0 g/kg yokukansan.

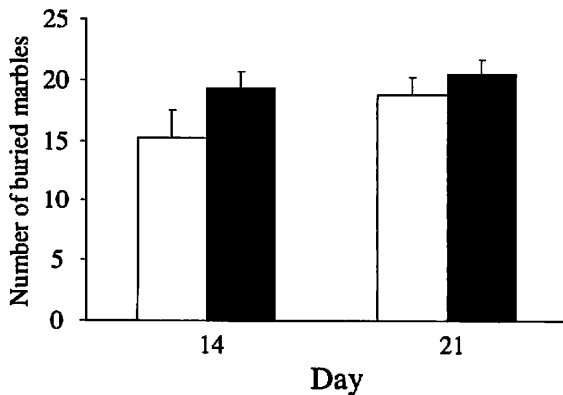


Fig.5. Influence of TD on marble-burying behavior test. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=10). □, control; ■, TD.

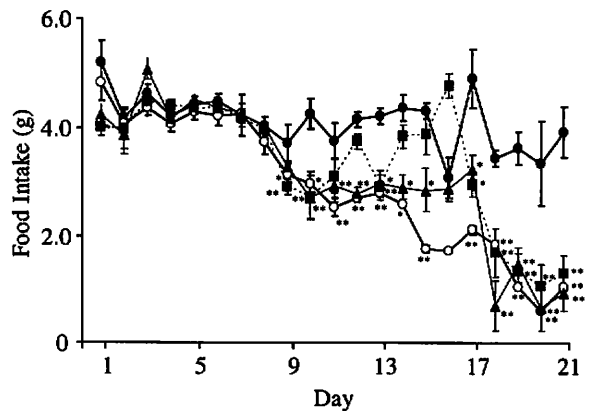


Fig.7. Effects of TD on food intake in mice. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=10). *p<0.05, **p<0.01 vs. Control group. ●, control; ○, TD; ■, TD+0.5 g/kg yokukansan; ▲, TD+1.0 g/kg yokukansan.

体重増加がみられた。TD群およびTD+抑肝散群は飼育14日後より体重の減少が観察され、抑肝散は、TDによる体重減少に影響しなかった。実験期間中の各群における動物の摂餌量を図7に示した。コントロール群の摂餌量に対し、TD群およびTD+抑肝散群の摂餌量低下が9日後より認められた。しかし、TD群とTD+抑肝散群の間に有意な変化は認められなかった。

2. 記憶障害に対する抑肝散の作用 (ステップ・スルー型受動的回避反応試験)

TD食飼育前 (普通食飼育) に実施したステップ・スルー型受動的回避反応試験 (獲得試行) の結果を図8Aに示した。獲得試行の1日目では、各群の動物は明室に入ると直ぐに暗室に入った。その反応潜時は 5.8 ± 0.6 秒であった。いずれの群においても5日間の試行の繰り返しにより反応潜時は300秒に達した。5日間の獲得試行において各群間の反応潜時に有意性は認められなかった。

TD食飼育の20日目における再生試行の結果を図8Bに示した。コントロール群の反応潜時は300秒を示したのに対し、TD群の反応潜時は有意に短縮した。この反応潜時の短縮はTD+抑肝散 (0.5および1.0g/kg) 群で用量依存的に改善された。

3. 攻撃性・社会的行動性に対する抑肝散の作用 (ソーシャル・インタラクション試験)

21日目におけるソーシャル・インタラクション試験における攻撃行動数 (A)、社会的行動数 (B) の測定結果を図9に示した。

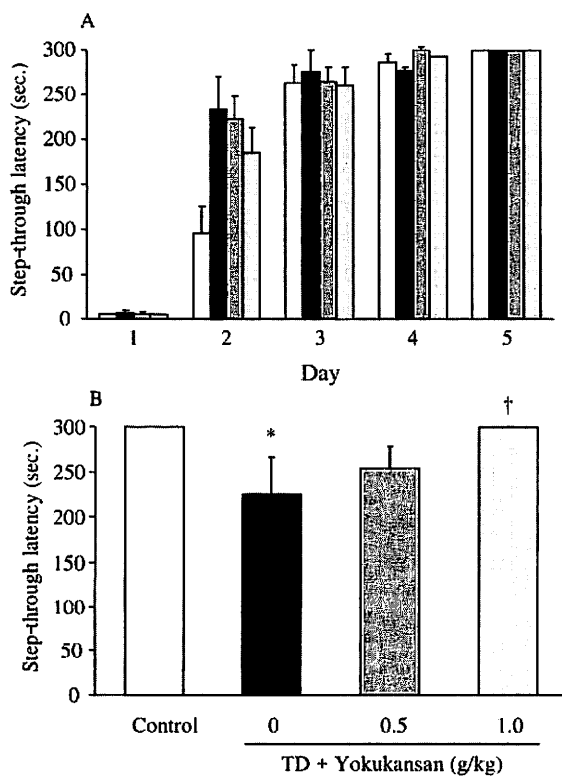


Fig.8. Effects of yokukansan on the latency of step-through passive avoidance task in TD mice. (A) acquisition trial and (B) retention trial. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=10). * p<0.05 vs. Control and † p<0.05 vs. TD group. □, control; ■, TD; ▨, TD+0.5g/kg yokukansan; ▩, TD+1.0g/kg yokukansan

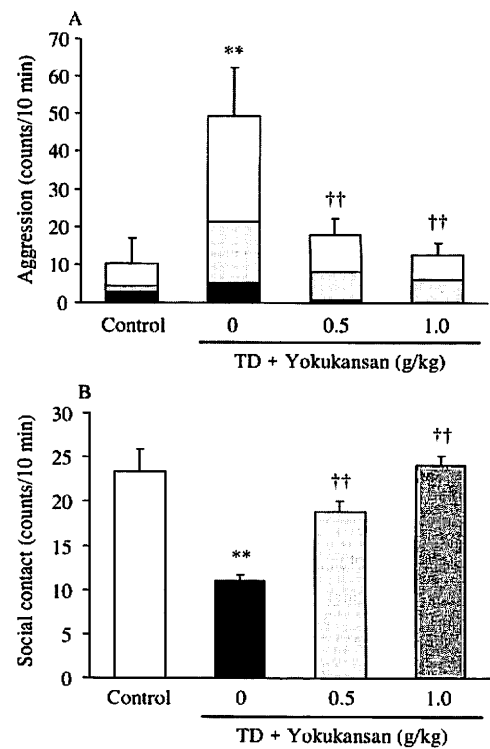


Fig.9. Effects of yokukansan on aggressive (A) and decreased sociable behaviors (B) in social interaction test in TD mice. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ (n=10). ** p<0.01 vs. Control and †† p<0.01 vs. TD group. □, tail rattling; ▨, chase; ■, attack.

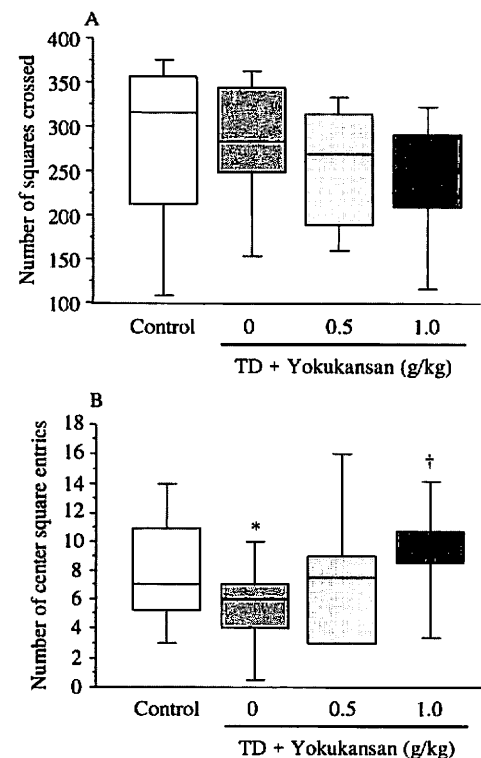


Fig.10. Effects of yokukansan on number of squares crossings (A) and number of center square entries (B) in open-field test in TD mice. Each column indicates median and interquartile values (n=10). * p<0.05 vs. Control and † p<0.05 vs. TD group.

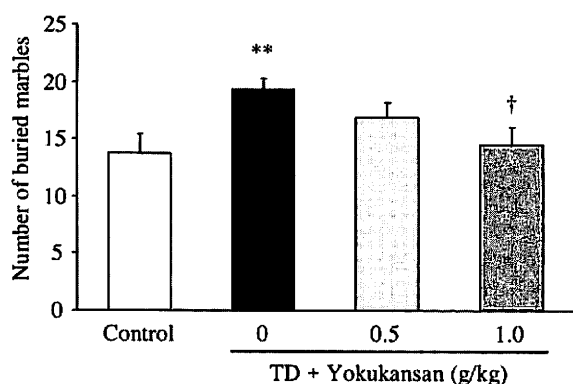


Fig.11. Effects of yokukansan on number of buried marbles in marble-burying behavior test in TD mice. Values are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ($n=20$). ** $p<0.01$ vs. Control and † $p<0.05$ vs. TD group.

TD群の、噛付きなどの攻撃行動 (attack)、追撃行動 (chase)、速く尾を振る行動 (tail rattling) の総発現回数はコントロール群に比べ有意に増加した。抑肝散は、TDによる攻撃行動の増加を用量依存的に抑制した (図9A)。一方、TD群における追尾行動、接触・探索行動、臭い嗅ぎ行動などの社会的行動の総発現回数は、コントロール群に対して有意に低下した (図9B)。この低下した社会的行動回数は抑肝散投与群で用量依存的に改善した。

4. 不安に対する抑肝散の作用 (オープンフィールド試験)

20日目におけるオープンフィールド試験における分画移動数 (A)、中央分画への進入回数 (B) の結果を図10に示した。分画移動数に関しては、各群間で有意な差は認められなかった (図10A)。しかし、TD群の中央分画への進入回数はコントロール群に比べ有意に減少し、その減少は抑肝散により用量依存的に改善された (図10B)。

5. 不安・強迫性に対する抑肝散の作用 (ガラス玉覆い隠し行動試験)

ガラス玉覆い隠し行動の結果を図11に示した。TD群で覆い隠したガラス玉の数はコントロール群に比べ有意に増加した。この増加は抑肝散投与により用量依存的に抑制された。

考 察

本報では、マウスをTD食で飼育することにより記憶障害、攻撃性、社会的行動性の低下、不安および強迫性障害が併発することを示し、抑肝散はこれらの症状を改善することを明らかにした。

TD状態が学習や記憶障害を引き起こすことはラットやマウスを用いた水迷路¹⁵⁾やT迷路課題¹⁶⁾およびステップ・スルー型受動的回避反応試験¹⁷⁾により実証されている。本試験でも、TD群でステップ・スルー型受動的回避反応試験の再生試行において記憶保持能の低下が認められ、TDと記憶障害の関連性を強く支持した。本実験ではTD食飼育前の獲得試行において群間の記憶獲得能に有意差がなかったことを確認している。従って、この保持能の低下は、試験開始前の群間における動物の記憶能力差によるものではないと考えられる。抑肝散がTDで誘発される記憶障害を改善した結果は、本剤が中核症状に対しても有効である可能性を示唆した。江頭ら¹⁸⁾は、抑肝散に陳皮と半夏

を加えた抑肝散加陳皮半夏がアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 受容体拮抗薬スコポラミンにより誘発される空間認知障害を改善すること、および記憶障害に関与する脳内ACh濃度やACh合成酵素活性を増加させることを報告している。また、臨床においても認知症患者の認知機能の診断指標であるMMSE (Mini-Mental State Examination) が抑肝散により有意に改善した例などが報告されている¹⁹⁾。これらの報告は、いずれも本試験で示唆した抑肝散の中核症状改善作用の可能性を支持する所見と考えられる。

認知症患者は攻撃的言動や行動、また対人関係などが保てないことが報告されている¹⁾。本実験でもTDマウスの記憶障害に伴い周辺症状である攻撃性や社会的行動性の低下が認められ、ヒトのBPSD患者や人格障害患者に認められる症状¹²⁾とよく類似しているように思われた。攻撃性の評価にはいくつかの評価法が報告されているが、ホームケージに侵入した同種動物に対する攻撃性の実験モデル²⁰⁾や鼻先に差し出した棒に対する攻撃反応などの一般症状観察による抽象的な評価法に対し、ソーシャル・インタラクション試験は、より臨床に即した客観的な評価法と考えられる。抑肝散がTDマウスの攻撃性や社会的行動性低下を改善した結果は、抑肝散が認知症患者の興奮・攻撃性の改善や対人関係の改善効果^{3)~5)}を認めた臨床成果を支持するものと考えられる。攻撃性や対人関係の低下に不安や強迫・恐怖心が関与していることが以前より指摘されている²¹⁾。本試験で用いたTDマウスはオープンフィールド試験やガラス玉覆い隠し試験での評価から不安や強迫・恐怖心が惹起されていることが示唆され、抑肝散はこれらの症状を改善することが示唆された。抑肝散の抗不安作用については、高架式十字迷路試験で惹起される不安行動を抑制すること²²⁾、その作用は抗不安薬 diazepam の作用を増強し、flumazenil で抑えられることからベンゾジアゼピン受容体への関与が指摘されているが²²⁾、強迫感に関する報告はない。本試験では、オープンフィールド試験とガラス玉覆い隠し試験を併用し、TDマウスでは不安や強迫・恐怖心が同時に惹起されていることが示唆された。その発症時期 (14日目) が、攻撃性や社会的行動性低下より先行して現れたことから、不安や強迫感が攻撃性や社会的行動性の低下の惹起要因である可能性が推察された。抑肝散は、このようなTDマウスにおける不安・強迫感から攻撃性発症に至る一連の症状を改善することが明らかとなった。

以上の結果から、抑肝散が認知症として認められる中核症状や周辺症状を改善する可能性がTDマウスにおいて実証された。今後、このモデル動物が抑肝散の作用メカニズムを解明するための有効な生体ツールとなることが示唆された。

抑肝散の精神障害改善作用がチアミン補充によるものか否かを明らかにするため、抑肝散中のチアミン量を測定したところ、抑肝散にチアミンは検出されなかった。また、TDの特長である摂餌量の低下や体重増加抑制はチアミン含有食により回復するが²³⁾、本試験では抑肝散投与群において、それらの改善作用は認められなかった。これらの結果を併せると、抑肝散によるTDマウスの精神障害改善作用は抑肝散によるチアミン補充療法ではないことが示唆された。

抑肝散の作用メカニズムについては、本実験からは明らかではない。しかし、精神機能を営む神経細胞や各種グリア細胞などの脳細胞はグルコースを利用した解糖系/TCA回路などのエネルギー産生系によりその生命や機能を維持していること、チ

アミンは解糖系のピルビン酸脱水素酵素およびTCA回路の α ケトグルタル酸脱水素酵素の補酵素として関与していることから、TDによる精神障害の発症には脳内エネルギー代謝の低下が深く関与していることが示唆される²⁴⁾。事実、TD動物脳で神経細胞やアストロサイト(グルタミン酸の不活化機能を担い神経細胞の異常興奮・細胞死の保護作用を担う)の器質的障害や細胞外液グルタミン酸濃度の上昇が報告されている²⁵⁾。最近、五十嵐²⁶⁾はTDラット脳において神経細胞やアストロサイトの変性が生じていること、およびそれらの変性を抑肝散が改善することを報告した。これらの結果は、TDにより誘発される精神障害にグルタミン酸の神経細胞に対する興奮毒性が関与し、その改善作用に抑肝散が関与している可能性が推察される。

TDラットやマウスでは、脳細胞の器質的変化に加え神経機能的な変化も報告されている^{6)~8)}。本試験では不安や攻撃性などの発症を確認し、また、村田ら²⁷⁾はうつ症状などの発症を報告している。さらに、TDで誘発されるラットのムリサイド行動(マウスを噛み殺す行動)はセロトニン(serotonin, 5-HT)前駆体である5-ヒドロキシトリプトファン(5-hydroxytryptophan)²⁸⁾、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI)であるchlorimipramine²⁹⁾などにより改善すること、うつ様症状は、SSRIであるfluvoxamine²⁷⁾や三環系抗うつ薬であるimipramine⁷⁾により改善することなどが報告されている。これらの知見は、TDマウスの精神障害には5-HT神経系の異常が関与していることを示唆する。このような観点から抑肝散によるTDマウスの不安、攻撃性改善効果を考えると、その作用メカニズムの一つに5-HT神経系が関与している可能性が推察される。最近、抑肝散が5-HT_{2A}受容体作動薬1-(2,5-dimethoxy 4-indophenyl)-2-amino propane (DOI)による首振り行動を抑制すること³⁰⁾、脳内5-HT含量低下により発症する攻撃性や社会的行動性低下を改善すること³¹⁾などが報告された。これらの知見も抑肝散の作用に5-HT神経系が関与していることを支持する。

ところで、こうした抑肝散の精神障害改善作用に対する構成生薬や成分の相互作用については未だ明らかではない。すなわち、抑肝散は蒼朮、茯苓、川芎、当帰、柴胡、甘草および釣藤鈎の7生薬の混合エキスであり、多くの成分が含有されているため複雑な相互作用が推察される。しかし、これまでに各構成生薬やいくつかの成分に関し、いくつかの中樞作用が報告されている³⁰⁾。例えば、5-HT神経系に対しては、釣藤鈎に5-HT_{1A}受容体刺激作用³²⁾、釣藤鈎のアルカロイド成分であるgeissoschizine methyl etherには5-HT_{1A}受容体刺激作用および5-HT_{2A}受容体拮抗作用などが報告されている³³⁾。グルタミン酸神経系に対しては、釣藤鈎およびgeissoschizine methyl etherにグルタミン酸誘発興奮抑制作用³⁴⁾、釣藤鈎にグルタミン酸誘発またはN-メチル-D-アスパラギン酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)誘発神経細胞障害抑制作用などが報告されている³⁵⁾³⁶⁾。さらに、蒼朮、甘草、川芎、柴胡には中樞抑制作用³⁰⁾、釣藤鈎および当帰に γ -アミノ酪酸や5-HT受容体に対する結合作用が知られている³⁷⁾³⁸⁾。これらの構成生薬や成分の単一効果をもって、複合剤である抑肝散の作用機序を説明することは困難ではあるが、今後、作用解明をする上で有力な情報として活用できるものと考えられる。

以上より、本報において抑肝散が中核症状およびその周辺症状である攻撃性、社会的行動性低下および不安・強迫性障害を

改善する可能性が示唆された。特にBPSDに関する結果は動物を用いた客観的データとして臨床試験での成果を支持した。これらの結果は抑肝散の効果の背景にある作用メカニズムの解明にTDマウスが動物モデルとして有効なツールになることを示唆した。

結 論

本報では抑肝散の記憶障害および周辺症状に対する効果をTDマウスで検討し、以下の結果を得た。

- 1) ステップ・スルー型受動的回避反応試験において、TDにより誘発された記憶障害を用量依存的に改善した。
- 2) ソーシャル・インタラクション試験において、TDにより誘発された攻撃行動の増加および社会的行動の低下を用量依存的に改善した。
- 3) オープンフィールド試験において、TDにより誘発される不安様症状を用量依存的に改善した。
- 4) ガラス玉覆い隠し試験において、TDにより誘発された不安・強迫性障害を用量依存的に改善した。

以上の結果から、抑肝散は記憶障害およびBPSDに有用な治療薬となりうる可能性を示唆した。特にBPSDに関する結果は動物を用いた客観的データとして臨床試験での成果を支持した。これらの結果はTDマウスが今後解明すべき抑肝散の作用機序解明のための有効な動物モデルになりうることを示唆した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻医薬情報統御学・宮本謙一教授に深甚の謝意を捧げます。本研究の遂行に当たってご指導およびご協力頂いたツムラ研究所・青葉研究2グループ五十嵐康博士、関口協二博士ならびに各グループ員の皆様には深謝いたします。抑肝散の分析を実施して頂いた製剤技術部・桐原敏博士に深謝いたします。また、本研究の機会をあたえて頂いたツムラ研究所長・加瀬義夫博士、分析技術部部长・竹田秀一博士、および武蔵野大学薬学部教授・油田正樹博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 守田嘉男. モジュール2: 臨床的な問題. BPSD痴癡の行動と心理症状(日本老年精神医学会監訳), 第1版, 25-49頁, アルタ出版株式会社, 東京, 2005
- 2) Zetzsche T, Preuss UW, Frodl T, Schmitt G, Seifert D, Munchhausen E, Tabrizi S, Leinsinger G, Born C, Reiser M, Möller HJ, Meisenzahl EM. Hippocampal volume reduction and history of aggressive behaviour in patients with borderline personality disorder. *Psychiatry Res* 154: 157-170, 2007
- 3) Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M, Monma Y, Nemoto M, Tomita N, Tanji H, Fujiwara H, Seki T, Fujii M, Arai H, Sasaki H. A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-Gan San for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J Clin Psychiatry* 66: 248-252, 2005
- 4) Iwasaki K, Maruyama M, Tomita N, Furukawa K, Nemoto M, Fujiwara H, Seki T, Fujii M, Kodama M, Arai H. Effects of the traditional Chinese herbal medicine Yi-Gan San for cholinesterase inhibitor-resistant visual hallucinations and neuropsychiatric symptoms in patients with dementia with Lewy bodies. *J Clin Psychiatry* 66: 1612-1613, 2005
- 5) Miyaoka T, Furuya M, Yasuda H, Hayashia M, Inagaki T,

- Horiguchi J. Yi-gan san for the treatment of borderline personality disorder: an open-label study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 150-154, 2008
- 6) Nakagawasai O, Tadano T, Hozumi S, Tan-no K, Nijima F, Kisara K. Immunohistochemical estimation of brain choline acetyltransferase and somatostatin related to the impairment of avoidance learning induced by thiamine deficiency. *Brain Res Bull* 52: 189-196, 2000
- 7) Nakagawasai O, Tadano T, Hozumi S, Taniguchi R, Tan-No K, Esashi A, Nijima F, Kisara K. Characteristics of depressive behavior induced by feeding thiamine-deficient diet in mice. *Life Sci* 69: 1181-1191, 2001
- 8) Nakagawasai O. Behavioral and neurochemical alterations following thiamine deficiency in rodents: relationship to functions of cholinergic neurons. *Yakugaku Zasshi* 125: 549-554, 2005
- 9) File SE. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J Neurosci Methods* 2: 219-238, 1980
- 10) Lumley LA, Robison CL, Slusher BS, Wozniak K, Dawood M, Meyerhoff JL. Reduced isolation-induced aggressiveness in mice following NAALADase inhibition. *Psychopharmacol* 171: 375-381, 2004
- 11) Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463: 3-33, 2003
- 12) Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. The mother or the fetus? 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *J Neurosci* 26: 3840-3844, 2006
- 13) 今西泰一郎, 吉田昌子, 奥野昌代, 平沼豊一. 不安・強迫性障害モデルとしてのマウスのガラス玉覆い隠し行動 (marble-burying behavior). *日薬理誌* 126: 94-98, 2005
- 14) Ichimaru Y, Egawa T, Sawa A. 5-HT_{1A} -receptor subtype mediates the effect of Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. *Jpn J Pharmacol* 68: 65-70, 1995
- 15) Langlais PJ, Mandel RJ, Mair RG. Diencephalic lesions, learning impairments, and intact retrograde memory following acute thiamine deficiency in the rat. *Behav Brain Res* 48: 177-185, 1992
- 16) Mair RG, Anderson CD, Langlais PJ, McEntee WJ. Behavioral impairments, brain lesions and monoaminergic activity in the rat following recovery from a bout of thiamine deficiency. *Behav Brain Res* 27: 223-239, 1988
- 17) Nakagawasai O, Yamadera F, Iwasaki K, Arai H, Taniguchi R, Tan-no K, Sasaki H, Tadano T. Effect of kami-untan-to on the impairment of learning and memory induced by thiamine-deficient feeding in mice. *Neuroscience* 125: 233-241, 2004
- 18) Egashira N, Mishima K, Kurauchi K, Iwasaki K, Matsumoto Y, Fujiwara M. Cholinergic involvement in the improving effects of Yoku-kan-san-ka-chimpi-hange (Yi-Gan-San-Jia-Chen-Pi-Ban-Xia) on the disruption of spatial cognition and the electroconvulsive shock-induced immobilization. *J Trad Med* 18: 71-80, 2001
- 19) 佐々木石雄. 認知症の心理行動学的症状に対する抑肝散および抑肝散加陳皮半夏の治療効果. *神経治療学* 24: 374, 2007
- 20) 上森尚人, 盛政忠臣. 実験動物の攻撃性モデルとセロトニン神経系の関与. *日神精薬理誌* 14: 1-8, 1994
- 21) 善田 聡, 内田周作. 核内受容体による情動性行動制御. *日薬理誌* 125: 17-24, 2005
- 22) 栗原久, 丸山悠司. マウスの改良型高架式十字迷路テストによる漢方方剤の抗不安効果—ベンゾジアゼピン受容体の関与—. *神経精神薬理* 18: 179-190, 1996
- 23) Onodera K, Shinoda H, Watanabe T. Effects of thiamine administration on hypothermia and hypothalamic histamine levels in dietary-induced thiamine deficient rats. *Jpn J Pharmacol* 54: 339-343, 1990
- 24) Todd KG, Butterworth RF. Mechanisms of selective neuronal cell death due to thiamine deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 893: 404-411, 1999
- 25) Hazell AS, Todd KG, Butterworth RF. Mechanism of neuronal cell death in Wernicke's encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13: 97-122, 1998
- 26) 五十嵐康. 抑肝散の動物モデルにおけるBPSD様症状の改善作用. *老年精神医学* 18: 46-49, 2007
- 27) 村田篤信, 中川西修, 山寺文博, 大場憲, 和久井研至, 新井裕一郎, 只野武. ビタミンB₁欠乏マウスにおける5-HT神経系の障害—SSRIの作用に着目して—. *日神精薬理誌* 24: 93-99, 2004
- 28) Onodera K, Kisara K, Ogura Y. Effects of 5-hydroxytryptophan on muricide response induced by thiamine deficiency. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 240: 220-227, 1979
- 29) Onodera K, Ogura Y, Kisara K. Characteristics of muricide induced by thiamine deficiency and its suppression by antidepressants or intraventricular serotonin. *Physiol Behav* 27: 847-853, 1981
- 30) 藤原道弘, 江頭伸昭, 内田直樹, 西村良二. 認知症の問題行動における漢方製剤の有用性: 抑肝散の薬理を中心に. *医薬ジャーナル* 43: 103-110, 2007
- 31) 寺脇潔, 関口協二, 山口琢見, 今村幸子, 菅野仁美, 五十嵐康, 加瀬義夫, 竹田秀一. 抑肝散のパラクロロアンフェタミン誘発攻撃行動に対する改善作用. *日神精薬理誌* 27: 285, 2007
- 32) Jung JW, Ahn NY, Oh HR, Lee BK, Lee KJ, Kim SY, Cheong JH, Ryu JH. Anxiolytic effects of the aqueous extract of *Uncaria rhynchophylla*. *J Ethnopharmacol* 108: 193-197, 2006
- 33) Pengsuparp T, Indra B, Nakagawasai O, Tadano T, Mimaki Y, Sashida T, Ohizumi Y, Kisara K. Pharmacological studies of geissoschizine methyl ether, isolated from *Uncaria sinensis* Oliv., in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 425: 211-218, 2001
- 34) 三巻祥浩, 利水紳倫, 山田健二, 指田豊. 釣藤散および釣藤鈎の抗痙攣作用と活性成分. *薬学雑誌* 117: 1011-1021, 1997
- 35) Shimada Y, Goto H, Itoh T, Sakakibara I, Kubo M, Sasaki H, Terasawa K. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule

cells from rats. *J Pharm Pharmacol* 51: 715-722, 1999

36) 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. *J Pharmacol Sci* 92: 70-73, 2003

37) Zhu M, Bowery NG, Greengrass PM, Phillipson JD. Application of radioligand receptor binding assays in the search

for CNS active principles from Chinese medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 54: 153-164, 1996

38) Liao JF, Jan YM, Huang SY, Wang HH, Yu LL, Chen CF. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 19: 151-158, 1995

Effects of Yokukansan on memory disturbance and behavioral and psychological symptoms of dementia induced by thiamine deficiency in mice Takuji Yamaguchi Department of medicinal informatics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 *Juzen Med. Soc.*, **117**, 28 – 36 (2008)

Key words yokukansan, memory, aggression, anxiety, thiamine

Abstract

The purpose of the present study is to clarify the effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on memory disturbance and psychological symptoms in thiamine-deficient (TD) mice. TD mice were produced by feeding TD diet for 21 days. Memory dysfunction suggested by decreased latency in the retention test of step-through passive avoidance test was observed on Day 20 after TD feeding. The increase in aggressive behaviors and the decrease in social behaviors were observed in social interaction test on Day 21. Anxiety-like behaviors such as decrease of locomotion in the central area were observed in open-field test on Day 20. Anxiety and/or obsessive compulsive disorder behaviors were observed in marble-burying behavior on Day 14. Yokukansan (0.5 and 1.0 g/kg) was orally administered to the mice everyday (once a day) during the feeding period. Yokukansan inhibited memory disturbance and psychological symptoms induced by TD in a dose-dependent manner. These results suggest the possibility that yokukansan is improved memory disturbance, anxiety, obsessive compulsive disorder, aggressive behavior and decreased social behavior. It is also suggested that TD mice is a useful tool for animal model to clarify the pharmacological mechanisms underlying the effect of yokukansan.