

福岡大学審査学位論文

抑肝散の活性成分ガイソシジンメチルエーテルの
薬理作用と血液脳関門透過性に関する研究

2014年3月

今村 幸子

目次

緒言	1
第1章 抑肝散の薬効評価：動物 (<i>in vivo</i>) 試験	
はじめに	7
第1節 アミロイド β 前駆体変異遺伝子改変マウス (APP-Tg マウス) の精神行動障害改善作用	8
1. 実験方法	
1.1. 実験動物	8
1.2. 薬物および試薬	9
1.3. YKS 混餌飼料の作製	9
1.4. 実験デザイン	9
1.4.1. モーリス水迷路試験法	10
1.4.2. 高架式十字迷路試験法	10
1.4.3. オープンフィールド試験法	12
1.4.4. A β の組織学および生化学的評価法	12
1.5. 統計解析	13
2. 実験結果	
2.1. 体重および摂餌量の変化	13
2.2. モーリス水迷路試験	14
2.3. 高架式十字迷路試験	16
2.4. オープンフィールド試験	16
2.5. 組織学的検査	17
2.6. 脳内 A β の定量	18
3. 小括	18

第2節 隔離飼育マウスの攻撃性および社会性改善効果 19

1. 実験方法

- 1.1. 実験動物 20
- 1.2. 薬物および試薬 20
- 1.3. ソーシャルインタラクション試験 21
- 1.4. 隔離飼育マウスの攻撃行動と社会行動の変化 21
- 1.5. YKS および UH の単回投与効果 22
- 1.6. YKS、UH および YKS-UH の反復投与効果 22
- 1.7. WAY-100635 の単独効果 22
- 1.8. 統計解析 22

2. 実験結果

- 2.1. 隔離飼育マウスの攻撃行動と社会行動 23
- 2.2. 攻撃行動および社会行動に対する YKS の単回投与効果 24
- 2.3. 攻撃行動および社会行動に対する YKS の反復投与効果 25
- 2.4. 攻撃行動および社会行動に対する UH の単回投与効果 26
- 2.5. 攻撃行動および社会行動に対する UH の反復投与効果 27
- 2.6. 攻撃行動および社会行動に対する WAY-100635 の効果 28

3. 小括 28

考察 30

第2章 抑肝散の作用機序：培養細胞 (*in vitro*) 試験

はじめに 35

第1節 5-HT_{1A} 受容体に対する作用 37

1. 実験方法

- 1.1. 薬物および試薬 37

1.2.	5-HT _{1A} 受容体に対する競合的結合試験法	40
1.3.	5-HT _{1A} 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト評価： [³⁵ S]GTPγS 結合試験法	40
1.4.	統計解析	41
2.	実験結果	
2.1.	GM の 5-HT _{1A} 受容体に対する結合性	42
2.2.	GM の 5-HT _{1A} 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性	43
3.	小括	43
第 2 節	5-HT₇受容体に対する作用	44
1.	実験方法	
1.1.	薬物および試薬	45
1.1.1.	UH アルカロイド	45
1.1.2.	競合的結合試験用試薬	45
1.1.3.	HEK293-h5-HT ₇ 細胞作製用試薬	45
1.1.4.	細胞内 cAMP 測定試薬	46
1.2.	5-HT ₇ 受容体に対する競合的結合試験	46
1.3.	HEK293-h5-HT ₇ 細胞の構築	47
1.4.	5-HT ₇ 受容体に対する被験化合物のアゴニスト/ アンタゴニスト試験	48
1.5.	統計解析	48
2.	実験結果	
2.1.	5-HT ₇ 受容体に対する 7 種 UH 成分の結合性	50
2.2.	HEK293-h5-HT ₇ 細胞の cAMP 産生に対する 5-HT と フォルスコリンの作用	51
2.3.	5-HT ₇ 受容体に対する UH アルカロイド成分の アゴニスト/アンタゴニスト作用	53
3.	小括	53
考察		54

第3章 ガイソシジンメチルエーテルの血液脳関門透過性

はじめに	57
第1節 抑肝散中の釣藤鈎アルカロイド成分定量	58
1. 実験方法	
1.1. 薬物および試薬	58
1.2. YKSに含まれる7種UHアルカロイド成分の定量法	58
2. 実験結果	
2.1. YKS中のGM含量	59
3. 小括	60
第2節 抑肝散経口投与後の血漿および脳におけるGMの検出	61
1. 実験方法	
1.1. 薬物および試薬	61
1.2. 実験動物	61
1.3. 血漿および脳中の釣藤鈎アルカロイド検出法	62
2. 実験結果	
2.1. YKS経口投与後の血漿中および脳中のGM検出	63
3. 小括	63
第3節 <i>in vitro</i> BBBモデルにおけるGMの透過性	65
1. 実験方法	
1.1. 薬物および試薬	65
1.2. <i>in vitro</i> BBBモデル	65
1.3. BBB障害性の評価	66
1.4. 被験物質のBBB透過性測定	68
1.5. 被験物質の疎水性(XLogP3)の計算	68
2. 実験結果	
2.1. BBB障害性の評価	69
2.2. GMのBBB透過率と透過係数	70
3. 小括	70
考察	71

第4章 GMの薬理効果の検証

はじめに	73
第1節 GMの薬理効果の検証	74
1. 実験方法	
1.1. 薬物および試薬	74
1.2. 実験動物	74
1.3. ソーシャルインタラクション試験	75
1.4. 攻撃行動および社会行動に対するGMの単回投与効果	75
1.5. 攻撃行動および社会行動に対するGMの反復投与効果	75
1.6. GMの反復投与効果に対するWAY-100635の併用効果	76
1.7. GMの反復投与効果の持続性	76
1.8. 統計解析	76
2. 実験結果	
2.1. 攻撃行動および社会行動に対するGMの単回投与効果	77
2.2. 攻撃行動および社会行動に対するGMの反復投与効果	78
2.3. GM反復投与の攻撃および社会行動改善効果に対する WAY-100635の併用効果	79
2.4. GM反復投与による攻撃行動および社会行動改善の持続効果	80
3. 小括	80
考察	81
総括	83
引用文献	87
論文審査主査および副査	101
公表論文目録	102
謝辞	103

緒言

抑肝散（ヨクカンサン）、この名称の由来は、経絡の一種である「肝経」の機能失調により起こるとされる発熱、興奮、ひきつけ等を抑制するという効能に基づいて名付けられたと云われている。すなわち、漢方医学には「経絡（けいらく）」と言う考え方があり、「経」は経脈（上下に直行する脈）、「絡」は絡脈（左右に横行する脈）のことを云う。経絡の名称には臓器の名称が用いられている。その中の一つが「肝経」である。肝経は親指から足の甲一脚一下腹部一腹一喉一目一額一頭部へと上行しており、その走行周囲にある生殖器、肝臓および頭部（脳）などと連絡していると云われている。この肝経の機能が弱ってくると、肉体的・精神的な多岐にわたる症状が現れてくる。抑肝散は、この「肝経」の機能失調により起こる肉体的・精神的症状を抑制する。

抑肝散の原典は「明」時代の1555年に書かれた小児の医学全書「保嬰撮要（ほえいさつよう）」である。これは薛鎧（せつがい）が書いたものを息子の薛己（せつき）が注釈し出版した。その内容は配合生薬の割合や煎じ方、効能（小児の夜なきや疳症、痙攣や神経過敏など）のほか母子同腹などが記載されている。保嬰撮要は、後に薛氏医案（せつしいあん）という叢書（ぞうしょ）に収められた¹⁾。

抑肝散の日本への伝来は17世紀後半であり、しばらくは原典どおりに小児に用いられていたが18世紀後半から「成人に用いる」という新たな展開が図られた。更には、二陳湯を配した「抑肝散加陳皮半夏」や「抑肝散加厚朴芍薬」などの派生方も編み出された。このような歴史的背景から、抑肝散は中国で生まれ日本で育った方剤と云われている¹⁾。

現在我々が用いている抑肝散は、厚生省薬務局薬審2第120号通知に基づき製造承認された医療用漢方エキス製剤である²⁾。その効能または効果は「虚弱な体質で神経が高ぶるものの神経症、不眠症、小児夜なき、小児疳症であり、体力中等度の人で神経過敏で興奮し易く、怒りやすい、イライラする、眠れないなどの精神神経症状を訴える場合に用いる」とされている。

現代に至り我が国は高齢化社会に入っている。高齢化に伴い認知症の患者数が年々増加している。2010年に厚生労働省は、わが国の認知症患者数が200万人を超え15年後の2025年には300万人以上に達するだろうと発表した。しかし、その発表の2年後、2012年8月にはすでに305万人、2025年には470万人に達すると修正された。更に、その翌年の2013年6月には65歳以上の高齢者のうち認知症患者は推計15%で、2012年度時点で462万人にのぼっていたことが、厚生労働省研究班（代表研究者：浅田隆・筑波大教

授)の調査でわかった。また軽度認知症障害(MCI)と呼ばれる「予備群」が約400万人いることも初めて報告された。年齢層別に見ると、74歳まで数%の有病率は年齢とともに上がり、85歳以上では4割を超えていた。多くの年齢層で女性のほうが高い傾向であった。また、アルツハイマー型が67.6%と最多で、脳出血や脳梗塞などの脳血管障害が19.5%、幻視などを伴うレビー小体型が4.3%だった。認知機能の低下はあるが日常生活は送れるMCIの全国調査はこの報告が初めてであり、医療機関などで適切なケアを受けずに放置すれば、5年後には半数の人が認知症に進む可能性があることから、研究班はMCIの段階から対策をしていく必要性を指摘した。

認知症は学習・記憶障害などの記銘力障害、失見当識、判断力低下、失語、失行、失認などの中核症状を特徴とするが、これに加え興奮、攻撃性、幻覚、不眠、不安、徘徊、抑うつなど様々な周辺症状を併発する。後者の周辺症状は、現在では「認知症の行動および心理症状: Behavioral and Psychiatry Symptoms of Dementia」として広義的に括られ、その頭文字をとってBPSDという言葉で一般的に呼ばれている。様々な症状を含むBPSDは、必ずしも認知症患者に特異的に認められる症状だけではなく、統合失調症、うつ病、てんかん、不安神経症、薬物中毒(幻覚・覚醒剤・麻薬など)などと類似するBPS(Behavioral and Psychiatry Symptoms)が含まれる。そのため、様々な諸症状を包括するBPSDは個々の発症に合わせた対症薬物療法が行われている。その中で興奮、攻撃性、易刺激性、焦燥、幻覚、妄想などの陽性症状に対しては抗精神病薬や気分安定剤(抗てんかん薬)が、無気力、無関心、抑うつなどの陰性症状に対しては脳循環・代謝改善薬や抗うつ薬などが用いられている。ベンゾジアゼピン系抗不安薬の使用は、錯乱や焦燥を来すリスクがあるため推奨されていない³⁾。BPSDの陽性症状に対し最もよく用いられたのは、リスペリドン、オランザピン、クエチアピンなどの非定型抗精神病薬である。高齢者に抗精神病薬を用いると若年者より副作用(錐体外路症状、血圧低下、過沈静など)が生じやすいことは周知の事実である。その点、非定型抗精神病薬はこれらの副作用が生じにくいことから高齢者に使いやすくとされ、急速に普及した。しかし、非定型抗精神病薬にも耐糖能異常、高血圧症、不整脈、脳血管系のリスク、死亡率の増加などの問題があることが示唆されていた^{3,4)}。それに加え、2005年の4月に米国食品医薬品管理局(FDA)はBPSDに関する17件のプラセボ対照試験について検討し、非定型抗精神病薬を投与した群はプラセボ投与群よりも死亡率が1.6-1.7倍高く、死亡の多くは心臓障害(心不全、突然死など)か感染症(肺炎)であると発表した⁵⁾。また、Wangらは死亡リスクは定型抗精神病のほうが非定型抗精神病薬よりも有意に高いことを明らかにした⁶⁾。さらに非定型抗精神病薬の有用性について否定的な論文も発表された⁷⁾。従って、

非定型抗精神病薬に臨床効果があるとは云えども、その効果は副作用によって相殺されるため、BPSDに対する有用性は低いとされた⁴⁾。

このような背景において、Iwasakiらは2005年に神経過敏で興奮しやすい、イライラする、眠れないなどの精神神経症状に効果を持つ「抑肝散」が重篤な副作用なく、アルツハイマー型やレビー小体型認知症の幻覚、興奮・攻撃性、焦燥、問題行動などに有効であることを明らかにした^{8,9)}。この報告を契機に抑肝散はBPSDに対する新たな治療薬として注目された。これは冒頭に述べた「抑肝散の歴史的用法」を発展させ、現代社会の高齢化と認知症の増加という課題に応用したものである。認知症BPSDに対して一般的に用いられる向精神病薬に比べ、抑肝散には悪性症候群（高熱、発汗、振戦、頻脈など向精神病薬を使用する際に常に考慮される重大な副作用）や錐体外路症状の発現に伴う転倒や誤嚥などの副作用もないことから、元々体力虚弱な認知症高齢者にも比較的安全に使用しやすいと報告されている¹⁾。

その後、日本全国で多施設による抑肝散のBPSD治療に関する臨床研究が一斉に実施された。Mizukamiらは関東20施設で106名のアルツハイマー病（AD）およびレビー小体型認知症（DLB）患者を対象に¹⁰⁾、Hayashiらは宮崎・鹿児島の18施設で26名のAD患者を対象に¹¹⁾、Iwasakiらは全国15施設で63名のDLB患者を対象に抑肝散の効果を検討し^{12,13)}、いずれも4週間投与でBPSD（特に幻覚・妄想・興奮/攻撃性）が有意に改善したことを報告した。また、Monjiらは、九州大学関連病院でスルピリド（定型抗精神病薬）を服用しても効果の認められなかった15名のAD患者を対象に抑肝散との併用効果を検討し、12週間投与による有意なBPSD改善効果と併用によるスルピリドの減量効果を報告した¹⁴⁾。Okaharaらは、宮崎・鹿児島の18施設でドネペジルを服用しても効果の認められなかった63名のAD患者を対象に抑肝散との併用効果を検討し、4週間投与でBPSDが有意に改善したことを報告した¹⁵⁾。また、最近Nagataらは、13名の脳血管障害性認知症（VaD）患者を対象に抑肝散の効果を検討し、4週間投与でBPSDが有意に改善したことを報告した¹⁶⁾。Hayashiら¹¹⁾、Iwasakiら^{12,13)}、およびNagataら¹⁶⁾の報告から、抑肝散はAD、DLBおよびVaDなどの認知症のタイプに関係なくBPSDを改善することが示唆された。一方、Matsudaらは、先のIwasakiら⁸⁾、Mizukamiら¹⁰⁾、Monjiら¹⁴⁾およびOkaharaら¹⁵⁾の4つのランダム化比較試験を統合したメタ解析（総数236症例、平均試験期間6週間）を行い、抑肝散投与群は非投与群に比べNPI総スコアでBPSDと日常生活動作の有意な改善、そのサブスコアでは興奮、妄想、幻覚で有意な改善があることを示し、抑肝散の効果の信頼性の高さを強調した¹⁷⁾。

抑肝散の有効性を示す臨床的エビデンスの蓄積と平行して、その効果、作用機序およ

び活性生薬・成分、薬物動態などを究明する基礎研究も多くの研究機関で実施された。表 1 には著者の研究も含めた現時点における基礎研究成果を動物モデルを用いた *in vivo* 試験と培養細胞系を用いた *in vitro* 試験に分けて示した。これらの成果からも判るように、古来より経験的に用いられていた抑肝散のその薬効、作用機序および活性成分などが現代科学の手法に基づいて科学的に解明されつつある。ヒトの臨床症状に相当する動物での BPSD 様作用改善効果を客観的に検証し¹⁸⁻⁴³⁾、そのメカニズムにセロトニン神経系^{20,31,33,36,37,39,49,50)}、グルタミン酸神経系^{18,19,23-26,40,41,42,43,44,45,46,48)}、アドレナリン神経系⁴³⁾、ドパミン神経系^{33,34,41)}、コリン神経系^{22,35)}、GABA 神経系^{30,38)}、神経細胞保護作用^{18,19,44-48,51)}、神経細胞増殖・新生³²⁾、A β 凝集抑制作用^{28,52)}などの様々な機序が関与している可能性が示唆されている。活性成分に関しても構成生薬であるチョウトウコウ^{28,31,43,46,49,50,52,53)}、カンゾウ^{43,45,46,54)}、センキュウ⁵¹⁾などの成分の関与が明らかにされてきた。

抑肝散を含めた漢方薬は多成分合剤である。それ故に多くの複合効果が期待されるが、逆にメカニズム解明の困難さもある。著者は臨床での抑肝散の BPSD 改善効果を裏付ける薬効、薬理機序、活性成分および薬物動態などを明らかにするため、モデル動物での BPSD 改善効果とその作用機序として抑肝散の標的症状である興奮、攻撃性、幻覚症状などと密接な関係にあるセロトニン神経系に着目し研究を行った。本論文はそれらの成果をまとめたものである。

第 1 章では、抑肝散の薬効をアルツハイマー病動物モデルである A β 前駆体変異遺伝子改変マウス (ATT-Tg マウス) およびセロトニン神経障害との関係が示唆されている隔離飼育マウスを用いて評価した。第 2 章では、*in vitro* 受容体結合試験を用いて 5-HT_{1A} パーシャルアゴニスト活性が報告されているチョウトウコウから活性成分を探求した。第 3 章では 2 章で明らかにした活性成分ガイソシジンメチルエーテル (GM) の血液脳関門 (BBB) 透過性を証明した。本章は第 1 章の *in vivo* (動物) での薬効 (中枢作用) と第 2 章での *in vitro* 試験系で推察した活性成分 GM の作用機序を一体化するための重要な位置付けにある。そして終章 (第 4 章) では抑肝散含有量の GM 量で抑肝散と同様な薬効 (攻撃性改善作用) を示すことを再度生体 (隔離飼育マウス) で検証した³¹⁾。

以上、4 章からなる本研究成果から、著者は「抑肝散が服用されるとその成分である GM が消化管吸収を経て血中に移行し、BBB を通過し脳内に達する。脳内に達した GM はセロトニン神経の機能異常に対し 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニストおよび 5-HT₇ 受容体アンタゴニストとして作用し、興奮、攻撃性、社会性などの BPSD を改善する」という一連の作用機序を提唱した。以下、本論文を構成した研究の詳細について順に論述する。

表 1 抑肝散の基礎研究一覧

区分	モデル	効果	文献
動物実験 (in vivo試験)	TDラット	攻撃性・不安・神経症状・記憶障害・GLU上昇・脳細胞障害改善作用	Ikarashi et al (2009) ¹⁸⁾ Iizuka et al (2010) ¹⁹⁾
	PCA投与ラット	攻撃性改善作用	Kanno et al (2009) ²⁰⁾
	脳室内Aβ注入マウス	攻撃性・記憶障害改善作用	Sekiguchi et al (2009, 2011) ^{21,22)}
	低Zn食飼育マウス・ラット	攻撃性・グルココルチコイド分泌異常改善作用、 脳GLU酸放出抑制作用	Takeda et al (2008a,b, 2012) ^{23,24,25)} Tamano et al (2010) ²⁶⁾
	APP-Tgマウス	攻撃性・記憶障害・不安・改善作用、脳Aβ蓄積抑制作用	Tabuchi et al (2009) ²⁷⁾ Fujiwara et al (2011) ²⁸⁾
	隔離飼育マウス	攻撃性・過活動・睡眠障害改善作用	Uchida et al (2009) ²⁹⁾ Egashira et al (2011) ³⁰⁾ Nishi et al (2012) ³¹⁾
	高齢ラット	不安・作業記憶障害・コンドロイチン蓄積・5-HT/DA放出障害改善作用、 神経細胞増殖作用	Tanaka et al (2009) ³²⁾ Mizoguchi et al (2010, 2011) ^{33,34)}
	脳虚血+Aβ注入ラット	空間認知障害改善作用、ACh放出改善	Uchida et al (2013) ³⁵⁾
	脳虚血ラット	不安改善作用	Nogami et al (2011) ³⁶⁾
	恐怖条件付けラット	不安改善作用	Yamaguchi et al (2012) ³⁷⁾
	正常ラット	不安改善作用	Kamei et al (2009) ³⁸⁾
	DOI処置ラット	首振行動改善作用、5-HT _{2A} 受容体ダウンレギュレーション	Egashira et al (2008) ³⁹⁾
	Poly I:Cマウス	PPI・NORT・過活動・脳内GSH増加改善作用	Makinodan et al (2009) ⁴⁰⁾
	ハロペリドール処置ラット	遅発性ジスキネジア改善作用	Sekiguchi et al (2012) ⁴¹⁾
	CCIラット	アロデニア改善作用	Suzuki et al (2012) ⁴²⁾
モルヒネ依存マウス	身体依存形成抑制作用	Nakagawa et al (2012) ⁴³⁾	
培養細胞 実験 (in vitro 試験)	アストロサイト	GLU取込・トランスポーター障害改善作用、PKC阻害作用	Kawakami et al (2009, 2010) ^{44,45)}
	PC12細胞	GLU誘発細胞死保護作用、GSH上昇作用	Kawakami et al (2011a) ⁴⁶⁾
	神経細胞	Aβ誘発またはGLU誘発細胞死改善作用	Tateno et al (2008) ⁴⁷⁾ Kawakami et al (2011b) ⁴⁸⁾
	CHO-h5-HT _{1A} 細胞	5HT _{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用	Terawaki et al (2010) ⁴⁹⁾ Nishi et al (2012) ³¹⁾
	HEK293-h5-HT ₇ 細胞	5HT ₇ 受容体アンタゴニスト作用	Ueki et al (2013) ⁵⁰⁾
	N2a・SK-N-SH細胞	ERストレス誘発細胞死保護作用、カスベース-4阻害作用	Hiratsuka et al (2010) ⁵¹⁾
	Sf9細胞	α2A受容体アンタゴニスト作用	Nakagawa et al (2012) ⁴³⁾
	CHO-hDA _R 細胞	各種DA受容体サブタイプ非結合	Sekiguchi et al (2012) ⁴¹⁾
	試験管内Aβ凝集	Aβ凝集抑制および分解作用	Fujiwara et al (2006,2011) ^{28,52)}
	BBB共培養細胞	チョウトウコウおよびカンゾウ成分のBBB透過性	Imamura et al (2011) ⁵³⁾ Tabuchi et al (2012) ⁵⁴⁾

【略語】 TD：チアミン欠乏、GLU：グルタミン酸、PCA：パラクロロアンフェタミン、Aβ：アミロイドβ蛋白、Zn：亜鉛、APP-Tg：ヒト変異アミロイド前駆蛋白遺伝子改変、5-HT：セロトニン、DA：ドパミン、DOI：5-HT_{2A}受容体作動薬、Poly IC：ポリイノシン・ポリシチジン(ウイルス擬似感染剤)、PPI：プレパルスインヒビション、NORT：新奇物体認識試験、CCI：絞扼性神経損傷)、GSH：グルタチオン、PKC：プロテインカイネース C、PC12細胞：ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫由来細胞、CHO-h5-HT_{1A}細胞：ヒト 5-HT₁受容体安定発現チャイニーズハムスター卵巣細胞、HEK293-h5-HT₇細胞：ヒト 5-HT₇受容体安定発現ヒト胎児腎 293 細胞、N2a細胞：マウス神経芽種細胞株由来細胞、SK-N-SH細胞：ヒト神経芽細胞腫由来細胞、ER：小胞体、Sf9細胞：昆虫培養株由来細胞、CHO-hDA_R細胞：ヒト各種 DA 受容体サブタイプ安定発現チャイニーズハムスター卵巣細胞、BBB：血液脳関門

第 1 章

抑肝散の薬効評価：動物 (*in vivo*) 試験

はじめに

不安、抑うつ、興奮、怒り、幻覚および徘徊などの認知症の行動と心理症状 (Behavioral and psychological symptoms of dementia : BPSD) は、アルツハイマー型認知症患者やレビー小体型認知症患者などで頻繁に認められる⁸⁾。この BPSD の重症度と介護負担は正相関を示すため、BPSD の治療は認知障害 (中核症状) と同様に重要である⁵⁵⁾。これまでに定型および非定型抗精神病薬が BPSD の治療に用いられているが、薬剤誘発性の錐体外路系症状や他の副作用が認められる⁵⁶⁾。更に、2005 年に米国 FDA は抗精神病薬が高齢患者に対し致死率を増加させることを勧告したことなどから⁵⁾、副作用の少ない新しい治療法が探し求められていた。

近年、「神経症、不眠症、小児夜なき、小児痲症の治療薬」として厚生労働省に承認されたている漢方薬・抑肝散 (YKS) がアルツハイマー病 (AD) やレビー小体型などの認知症患者に認められる BPSD、特に幻覚、焦燥感、攻撃性などの BPSD に有効であることが報告されている^{8,9,10,57)}。しかし、YKS の認知症や BPSD に対する基礎研究はまだ十分に行われていなかった。

そこで、本章第 1 節ではアルツハイマー病の動物モデルとして知られている APP-Tg(+) マウスの学習障害と BPSD 様症状に対する YKS の効果、また第 2 節では隔離飼育マウスで認められる攻撃性や社会性低下などの BPSD 様症状に対する YKS の効果を検討することにより、YKS の BPSD 改善効果を動物レベルで客観的に評価した。

第1節

アミロイド β 前駆体変異遺伝子改変マウス (APP-Tg マウス) の 精神行動障害改善作用

ヒトの APP695SWE 遺伝子を発現する Tg2576 マウス (APP-Tg マウス) はアルツハイマー病のモデルとして知られている。このマウスの脳ではアルツハイマー病の原因候補蛋白である β -アミロイド ($A\beta$) が加齢に伴い蓄積する⁵⁸⁾。さらに、認知機能障害だけでなく脱抑制、過活動や衝動的行動のような非認知機能障害である BPSD 様症状が認められる^{59,60,61,62,63,64)}。これらの知見は APP-Tg マウスが認知症や BPSD の評価モデルとして有用であることを示唆している。

YKS の基礎研究がまだ十分でなかったことから第1節では APP-Tg(+)マウスの学習障害と BPSD 様非認知機能障害に対する YYS の効果について検討した。

1. 実験方法

1.1. 実験動物

Tg(HuAPP695/SWE)2576 遺伝子改変-陽性雌マウス (APP-Tg(+)マウス) とその対照である陰性雌コントロールマウス (APP-Tg(-)マウス) は Taconic Farms Inc. (Germantown, NY, USA) から購入した。APP-Tg(+) マウスはヒト APP (amyloid precursor protein ; アミロイド前駆体蛋白質) の二重変異 (Lys670→Asn, Met671→Leu) を含む変異遺伝子を有し、ヒトプリオン蛋白の cosmid vector のコントロール下で発現する。脳における $A\beta$ の沈着は 6~7 ヶ月齢から観察され、加齢に伴い増加する⁶⁵⁾。

本研究で用いた APP-Tg マウスは室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $55\pm 10\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明期 07:00~19:00) 条件下で 1 ケージあたり 3~4 匹を群飼育した。飲料水と食餌は (標準飼料 MF、オリエンタル酵母株式会社、東京、日本) は自由摂取とした。

すべての試験は株式会社ツムラの実験動物審査会の承認のもとで実施した。

1.2. 薬物および試薬

本試験に用いた抑肝散エキス末 (YKS) は、株式会社ツムラ (東京、日本) で製造された。YKS は7種の生薬からなる。ソウジュツ(ALR) 4.0 parts [Atractylodis Lanceae Rhizoma (rhizome of *Atractylodes lancea* De Candolle, Compositae)], ブクリヨウ(PS) 4.0 parts [Poria (sclerotium of *Poria cocos* Wolf, Polyporaceae)], センキュウ(CR) 3.0 parts [Cnidii Rhizoma (rhizome of *Cnidium officinale* Makino, Umbelliferae)], トウキ(JAR) 3.0 parts [Japanese Angelicae Radix (root of *Angelica acutiloba* Kitagawa, Umbelliferae)], サイコ(BR) 2.0 parts [Bupleuri Radix (root of *Bupleurum falcatum* Linné, Umbelliferae)], カンゾウ(GR) 1.5 parts [Glycyrrhizae Radix (root and stolon of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher, Leguminosae)]とチョウトウコウ(UH) 3.0 parts [Uncaria Uncis Cum Ramulus (hook of *Uncaria rhynchophylla* Miquel, Rubiaceae)]。それぞれの生薬は日本薬局方とツムラ社内基準に従い、植物の外部形態およびマーカー成分で同定された。上述の割合で配合した7生薬は95°Cの純水で1時間抽出され、不溶性残渣を分離した後、減圧下で濃縮された。エキスの乾燥粉末化はスプレードライ法を用いた。

1.3. YKS混餌飼料の作製

0.5%および1.0%のYKS含有飼料は通常粉末飼料 (本試験のコントロール飼料MF: オリエンタル酵母) にYKSエキス末を混合して作製した。

1.4. 実験デザイン

5ヵ月齢のAPP-Tgマウスを次の4群に無作為に分けた。Tg(-) control群 (n = 10)、Tg(+)群 (n = 10)、0.5% YKS群 (n = 10)および1.0% YKS群 (n = 10)。Tg(-) control群は、APP-Tg(-)マウスに粉末通常飼料 (MF) を5ヵ月齢から15ヵ月齢までの10ヵ月間与えた。Tg(+)群のAPP-Tg(+)マウスにもMF飼料を同期間与えた。0.5% YKS群および1.0% YKS群のAPP-Tg(+)マウスには0.5%および1.0%のYKS含有粉末飼料をそれぞれ同期間与えた。摂餌量は1週間に2回ケージ単位で測定し、飼育匹数で割ることにより1匹あたりの摂餌量を算出した。1日摂餌量はさらにその値を測定間隔日数で割って算出した。体重は1週間に1回測定した。

モーリス水迷路試験は学習能力を評価するため11ヵ月齢で行った。高架式十字迷路試

験は不安を評価するため7ヵ月齢と10ヵ月齢で行った。オープンフィールド試験は移所行動量を評価するため7、10、および14ヵ月齢で行った。全ての行動実験は10:00から17:00の間に行った。行動試験終了後、脳内のA β 蓄積量に対するYKSの効果の評価するため、全ての動物を15ヵ月齢で断頭し、その脳をA β の組織学的評価または生化学的評価に用いた。

1.4.1. モーリス水迷路試験法

モーリス水迷路試験の装置(図1)は、高さ25cmの壁に囲まれた直径100cmの青い円形プラスチック製プールで構成される。プールは水温19℃の水で満たされ、直径8cmの透明なプラスチック製プラットフォームを水面下0.5cm、プールの壁から18cm離して設置した。方向探索(navigation)の視覚的手掛かりとして4つのポスターを部屋の4壁に貼った。

モーリス水迷路試験の訓練試行では、マウスをプールのプラットフォーム設置領域の反対領域に入れ、最長60秒間遊泳させた。その行動をビデオで撮影し、プラットフォームに到着するまでの時間(latency period; 潜時)と遊泳距離を解析ソフト(LimeLight、Neuroscience Inc、東京、日本)を用いて測定した。マウスが60秒以内にプラットフォームを発見しなかった場合は、プラットフォーム上に15秒間滞在させた。このような訓練試行を1日1回、5日間繰り返した。遊泳運動能力の指標として訓練試行の5日目に各マウスの遊泳速度を測定した。

モーリス水迷路試験のプローブ試験は5日間の訓練試行終了の翌日にプラットフォームを除去した条件下で実施した。プールに入れられたマウスは60秒間プラットフォームを探して遊泳する。この試験ではマウスの訓練試行時に獲得した記憶をプラットフォーム除去条件下で再検証するものであり、これまで設置していたプラットフォームの領域を横切る回数を測定することにより評価した。

1.4.2. 高架式十字迷路試験法

高架式十字迷路試験装置(図2)は、プラスチック製の向き合う2本のオープンアーム(長さ20cm x 幅5cm)と、同じ大きさで20cmの壁をもつ2本のクローズドアームで構成されている。これらのアームは5cm四方の中央で結合した十字路を形成している。装置(十字路)は床から40cmの高さにあり、試験は暗照明条件下で行った。マウスを

十字迷路装置の中央四角部分に置き、その後 5 分間の行動を装置上方に設置したビデオカメラ（ビデオ追跡システム）で撮影した。行動データはコンピューターに保存され、後日、保存データから 5 分間のオープンアームへの進入回数と滞在時間について専用ソフト（Lime Light）を用いて解析した。

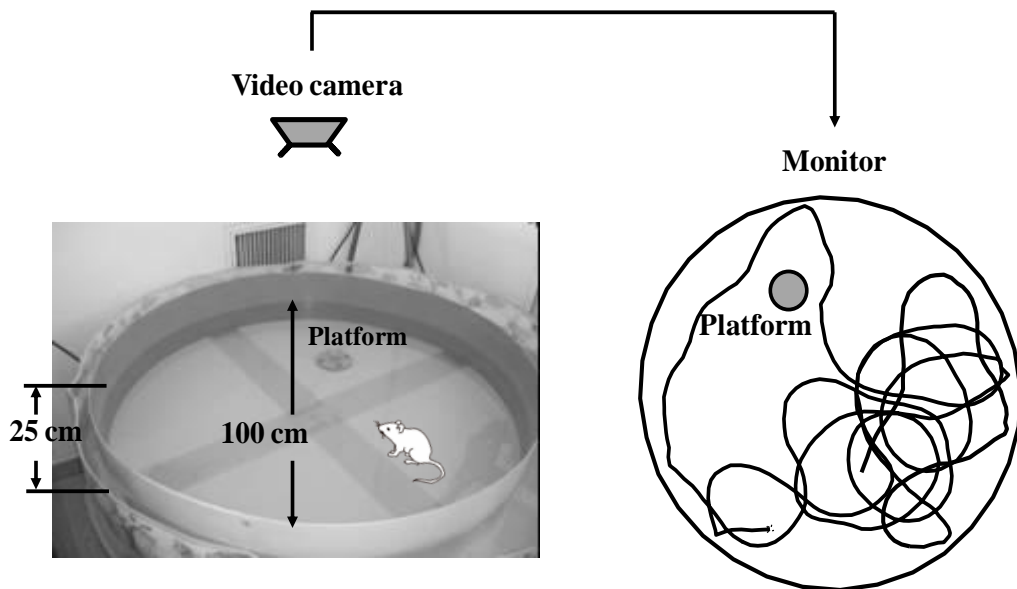


図 1 モーリス水迷路試験装置

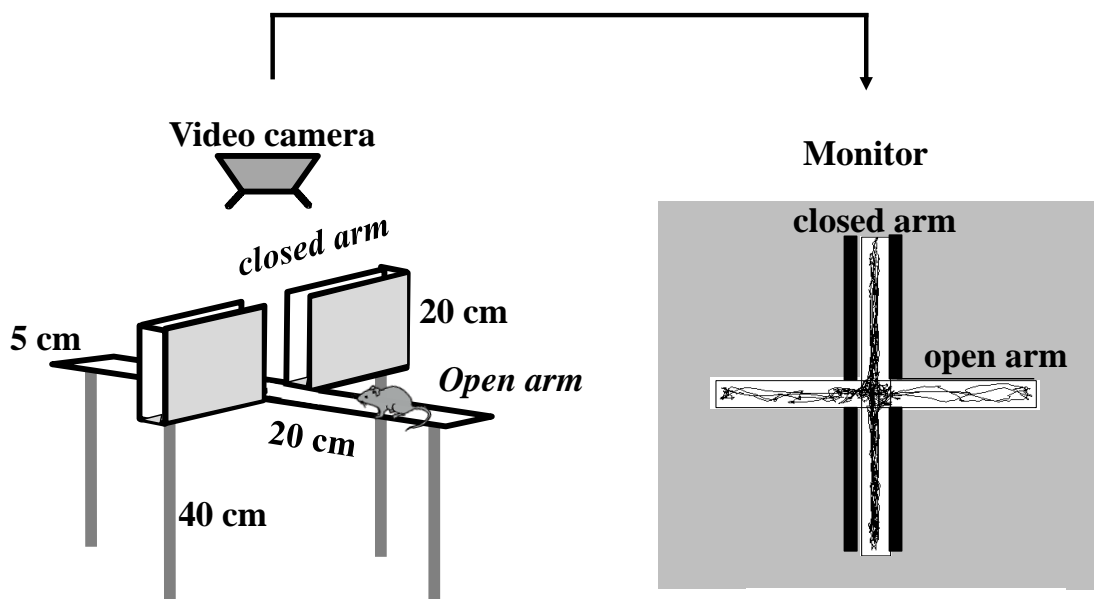


図 2 高架式十字迷路試験装置

1.4.3. オープンフィールド試験法

移所行動量を評価するためのオープンフィールド試験は高架式十字迷路試験の24時間後に行った。本装置（図3、Neuroscience Inc.）、は高さ25 cmの壁を持つ50 cm四方の床からできている。マウスの行動は動物を装置床の中央に置いた後、5分間ビデオカメラ（ビデオ追跡システム）で撮影した。行動データはコンピューターに保存され、後日、オープンフィールド内における5分間の総移動距離（cm）について専用ソフト（Lime Light）を用いて解析した。

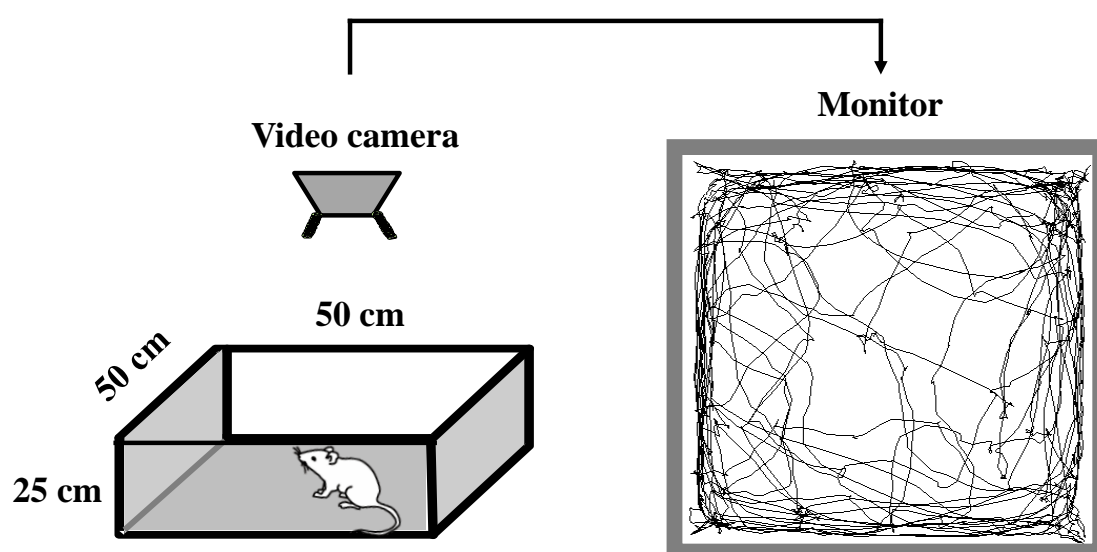


図3 オープンフィールド試験装置

1.4.4. A β の組織学的および生化学的評価法

行動試験終了後、Tg(+)群と1.0% YKS群の各3匹（15ヵ月齢）をA β の組織学的評価に用いた。動物を断頭し、摘出した全脳を4%緩衝パラホルムアルヒドで固定後、脱水しパラフィン包埋した。大脳皮質と海馬を含む横断連続切片をコンゴレッドとヘマトキシリンで染色した。各切片中のA β 斑50個の面積について専用ソフト（Image J, NIH）を用いて計測した。

Tg(-)群、Tg(+)群、0.5% YKS 群および 1.0% YKS 群のその他の 7 匹を可溶性と不溶性 A β 量の測定に用いた。A β 測定は Kawarabayashi らの方法に準じた⁶⁵⁾。すなわち、凍結脳（湿重量 150 mg）を 1 mL のプロテアーゼ阻害剤入り溶液 [20 mM Tris-saline buffer 50 mL に complete protease inhibitor cocktail (Boehringer) を 1 錠溶解した溶液] で 30 秒間ホモジナイズした (level 7, Ultra Homogenizer, SMT Co., Japan)。遠心分離 (100,000 g, 4°C, 1 hr) 後、上清を取り去り、沈殿を protease inhibitors 入りの 2% SDS (sodium dodecylsulfate) でホモジナイズした。遠心分離 (100,000 g, 4°C, 1 hr) 後の上清は、SDS 可溶性画分として用いた。沈殿は 70% formic acid でホモジナイズし、SDS 不溶性 A β を溶出した。遠心分離後、その上清を SDS 不溶性画分として用いた。SDS 可溶性画分と SDS 不溶性画分中の A β 濃度は sandwich ELISA kit (Cat. No. 27713 and Cat. No. 27711, IBL Co. Ltd.) を用いて測定した。画分の蛋白質濃度は protein assay kit (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) で測定した。A β 量は最終的に蛋白質 (g) あたりのモル数 (pmol) で示した。

1.5. 統計解析

すべての値は平均値 \pm 標準誤差で示した。モーリス水迷路試験における遺伝子タイプ間 [Tg(-) control 群 vs Tg(+)群] および薬物効果 [0.5 and 1.0% YKS 群 vs Tg(+) 群] の統計学的有意性は Mann-Whitney U test で評価し、その他は one-way ANOVA 検定後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) test で評価した。各統計解析の有意差水準は $P < 0.05$ とした。

2. 実験結果

2.1. 体重および摂餌量の変化

試験期間を通し各群の体重は 20.4 ± 0.3 g (Mean \pm SE) から 29.4 ± 0.8 g に増加した。各群間に有意差は認められなかった。試験期間における一匹あたりの一日摂餌量を算出したところ、Tg(-)コントロール群は 6.1 ± 0.5 g/day、Tg(+)群は 5.0 ± 0.3 g/day、0.5% YKS 群は 6.9 ± 0.8 g/day および 1.0% YKS 群は 6.4 ± 0.4 g/day であり、各群間に有意な差は認められなかった。この一日摂餌量から抑肝散摂取量を算出すると 0.5% YKS 群は 1.3 ± 0.1 g/kg(BW)/day および 1.0% YKS 群は約 2 倍の 2.5 ± 0.1 g/kg(BW)/day であった。

2.2. モーリス水迷路試験

モーリス水迷路試験は11ヵ月齢（YKS 6ヵ月間投与）で実施した。訓練試行の1日目と5日目における Tg(-) control 群、Tg(+)群と 1.0% YKS 群マウスの典型的な行動軌跡を図4に示した。訓練試行1日目では各群のマウスは円形プール内を活発に泳いだ。繰り返し試行により5日目では、Tg(-) control 群のマウスはプラットフォームに比較的早く到着したが、Tg(+)群のマウスはなかなか到着しなかった。YKS 投与群マウスは Tg(-) control 群とほぼ同様、比較的速くプラットフォームに到着した。

訓練試行とそれに続くプローブ試行における潜時（プラットフォームに到着するまでの時間、latency period）を図5に示した。訓練試行初日では（training day 1: 図5A）、各群の潜時はいずれも約50秒であり、Tg(-) control 群、Tg(+)群、0.5% YKS 群と 1.0% YKS 群の間に有意な差は認められなかった。しかし、Tg(-)群の潜時は5日間の訓練を繰り返すことによって有意に短縮した（図5B）。一方、Tg(+)群の潜時は5日間の訓練でも変化せず、Tg(-) control 群に比べ有意に延長した。この Tg(+)群の潜時延長は 1.0% YKS 群で有意に改善した。

モーリス水迷路試験のプローブ試験は5日間の訓練終了の翌日に行った。その結果を図5Cに示す。Tg(+)群マウスがプラットフォーム除去領域を横切った回数は Tg(-) control 群よりも有意に減少した。Tg(+)群のこの減少は 1.0% Tg(+)群で有意に改善した。

各動物の遊泳速度を訓練試行5日目における遊泳運動能の指標として調べた。図5Dに示すように、各群間に有意な差は認められなかった。

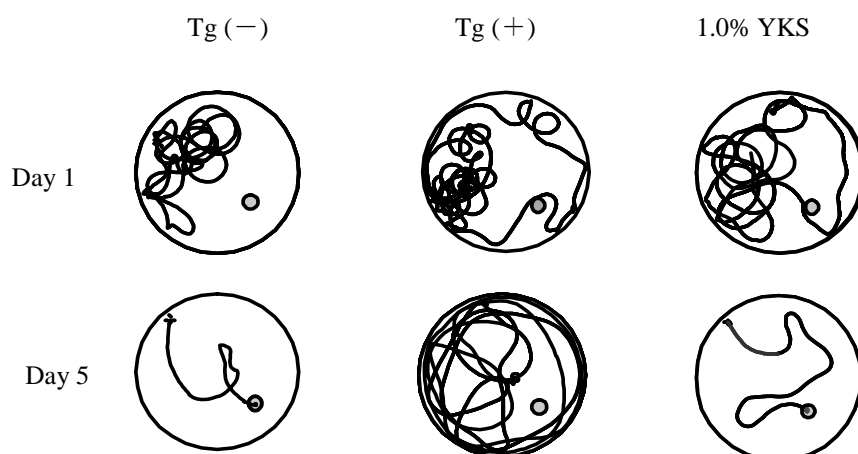


図4 モーリス水迷路試験におけるの典型的な行動軌跡。Tg(-) control 群、Tg(+)群と 1.0% YKS 群マウスの訓練試行時の1日目と5日目。

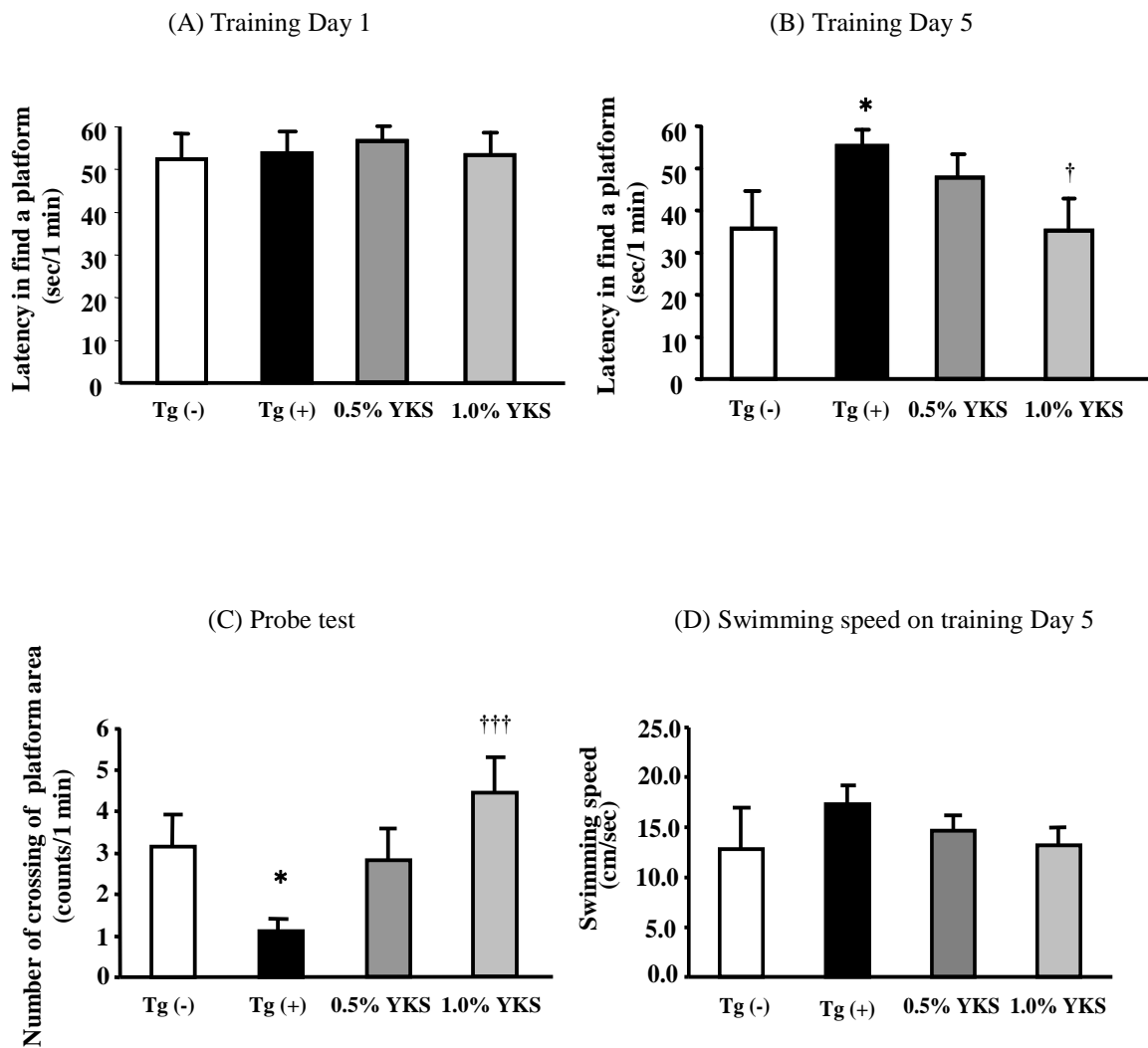


図5 11ヵ月齢 Tg(-)コントロール群、Tg(+)群、0.5%および1.0% YKS 群マウスのモーリス水迷路試験における、1日目 (A) と5日目 (B) の訓練試行およびプローブ試行 (C)。訓練試行は5日間連続で行った (1 試行/日)。プローブ試行は訓練試行終了の翌日に行った。図 A と B は各群の訓練試行1日目と5日目における水面下プラットフォームに到着するまでの潜時を示す。図 C はプローブ試験における、かつて設置されていたプラットフォーム領域を横切った回数を示す。図 D は訓練試行5日目における遊泳速度を示す。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 10)。統計学的有意性は Mann-Whitney U test で評価した。* $P < 0.05$ は Tg(-)群に対する有意性、† $P < 0.05$ および††† $P < 0.001$ は Tg(+)群に対する有意性を示す。

2.3. 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は7ヵ月齢(YKS 2ヵ月間投与)と10ヵ月齢(YKS 5ヵ月間投与)で行った。図6は高架式十字迷路試験におけるオープンアームへの進入回数と滞在時間を示した。7ヵ月齢と10ヵ月齢において、Tg(+)群の進入回数と滞在時間はTg(-) control群のそれらよりも有意に増加した。Tg(+)群の両パラメーターの増加は1.0% YKS群の7ヵ月齢で有意に改善したが、その効果は10ヵ月齢では認められなかった。

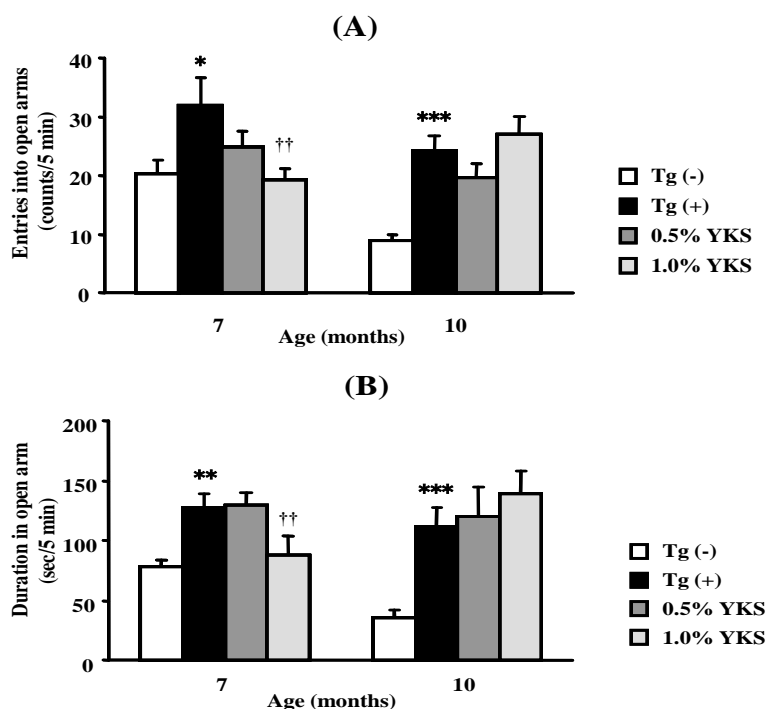


図6 高架式十字迷路試験におけるYKSの作用。Tg(-)コントロール群、Tg(+群、0.5%および1.0% YKS群マウスのオープンアームへの進入回数(A)と滞在時間(B)。高架式十字迷路試験は7および10ヵ月齢で行った。各値は平均値 ± 標準誤差で示した(n = 10)。統計学的有意性はone-way ANOVA検定後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) testで評価した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ および*** $P < 0.001$ はTg(-)群に対する有意性、†† $P < 0.01$ はTg(+群に対する有意性を示す。

2.4. オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は7、10、14ヵ月齢(それぞれYKS投与2、5、9ヵ月間)に行った。それらの結果を図7に示した。Tg(+群の総移動距離(cm/5 min)はTg(-) control群に比べ、7、10、14ヵ月齢のいずれにおいても有意に増加した。これらの増加は1.0% YKSの9ヵ月間投与によって(14ヵ月齢)コントロール群レベルまで有意に抑制された。

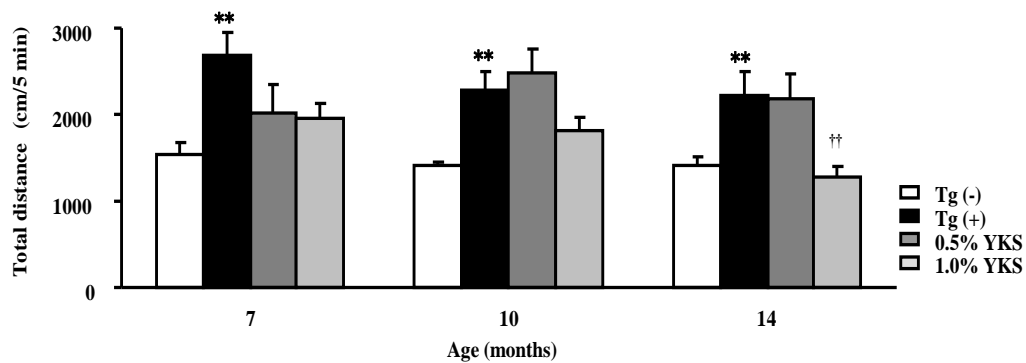


図7 マウスの活動量に対する YKS の作用。Tg(-)コントロール群、Tg(+群、0.5%および 1.0% YKS 群の活動量はオープンフィールド内における 5 分間の総移動距離 (cm) を活動量として測定し、各群の 7、10 および 14 ヶ月齢時に同時測定した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した(n = 10)。統計学的有意性は one-way ANOVA 検定後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) test で評価した。** $P < 0.01$ は Tg(-) 群に対する有意性、†† $P < 0.01$ は Tg(+群に対する有意性を示す。

2.5. 組織学的検査

A β 沈着の光学顕微鏡検査はすべての行動試験が終了した後の 15 ヶ月齢で行われた。図 8 に Tg(+マウス (A) と 1.0% Tg(+マウス (B) の大脳皮質において観察された典型的な A β 沈着写真を示した。コンゴレッドで染色された A β 沈着が Tg(+マウスと 1.0% YKS マウスに観察された。しかし、図 8C に示すように、A β 斑 50 個の面積は両群間で有意な差はなかった。

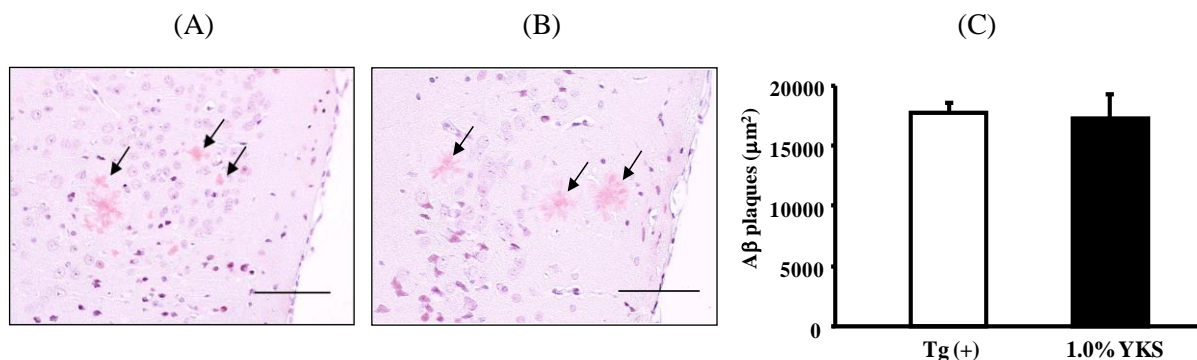


図 8 A β 沈着病理組織像および面積。15 ヶ月齢での Tg(+マウス (A)、および 1.0% YKS 投与マウス (B) の大脳皮質における A β 沈着。矢印はコンゴレッドで染色された A β 沈着を示す。バーは 50 μm (x 50) を示す。(C) は A β 斑 50 個の面積(μm^2)を示す。

2.6. 脳内 A β の定量

図 9 は Tg(+)マウスの脳に蓄積された SDS 可溶性および SDS 不溶性の A β 量に対する YKS の効果を示した。両タイプの A β 量はいずれも Tg(+)マウスで増加した。しかし、YKS はどちらの A β 量に対しても影響は与えなかった。

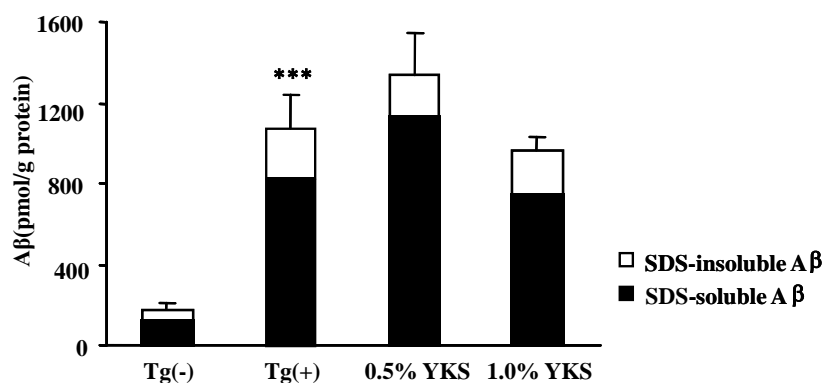


図 9 15 カ月齢の Tg(+)マウスの脳に蓄積された SDS 可溶性および SDS 不溶性の A β 量に対する YKS の作用。Tg(-)コントロール群と Tg(+)群は粉末通常飼料 (MF) を 5 カ月齢から 15 カ月齢までの 10 カ月間与えた。0.5%または 1.0% YKS 群は Tg(+)マウスに 0.5%または 1.0%の YKS 含有粉末飼料を同期間与えた。全ての動物は脳内 A β 量定量のため 15 カ月齢で断頭した。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した(n = 7)。統計学的有意性は one-way ANOVA 検定後、Fisher's protected least significant difference (PLSD) test で評価した。*** $P < 0.001$ は Tg(-)群に対する有意性を示す。

3. 小括

本節ではアルツハイマー病の動物モデルである APP-Tg マウスを用いて学習障害と非認知機能障害 (不安および過活動) に対する YKS の効果を検討し以下の結果を得た。

- 1) モーリス水迷路試験において、YKS は APP-Tg(+)マウスのプラットフォーム到着時間の延長 (学習障害) を有意に改善した。
- 2) 高架式十字迷路試験において、YKS は APP Tg(+)マウスで認められたオープンアームへの進入回数と滞在時間の増加 (低不安障害または脱抑制障害) を有意に改善した。
- 3) オープンフィールド試験において、YKS は APP-Tg(+)マウスの活動量の増加 (過活動) を有意に改善した。

第 2 節

隔離飼育マウスの攻撃性および社会性改善効果

YKS はアルツハイマー病、レビー小体型認知症やその他の老年性認知症患者の幻覚、興奮、攻撃性などの BPSD 症状を改善することが報告されている^{8,9,10,57)}。しかし、その有効性を裏付ける基礎研究はまだ十分に行われていなかった。本章第 1 節ではアルツハイマー病モデルとして知られている APP-Tg マウスを用いて YKS が中核（学習障害）や BPSD 様作用（不安や過活動）に対し有効であることを示した。

一方、アルツハイマー病（AD）患者脳（縫線核）ではセロトニン（5-HT）欠乏^{66,67,68)}や側頭皮質 5-HT_{1A} 受容体結合性低下と攻撃行動の発症相関性⁶⁹⁾が報告されている。また、LSD-25 や *N,N*-dimethyltryptamine、bufotenine、psilocin、harmine、harmaline などの幻覚剤はラットやマウスにおいて脳内 5-HT の放出や代謝回転を低下させ、首振り行動や攻撃行動などを誘発する⁷⁰⁾。攻撃行動は、*para*-chloroamphetamine（PCA）、*para*-chloro-phenylalanine、5,7-dihydroxytryptamine、3,4-methylenedioxymethamphetamine やトリプトファン欠乏飼料などにより脳内 5-HT を枯渇させると発症する^{71,72,73,74,75,76)}。これらの知見は、攻撃性や幻覚などの行動および精神症状と脳内 5-HT 神経系の機能不全が密接に関連していることを示唆する。YKS は攻撃性や幻覚を改善することから、その作用機序にも 5-HT 神経系が関与している可能性が推察された。

著者の研究グループは、これまでに YKS が 5-HT 神経毒、パラクロロアンフェタミン（PCA）で誘発したラットやマウスの攻撃行動や社会行動を改善し、この改善効果が 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 の併用投与により拮抗されることを明らかにした²⁰⁾。さらに、*in vitro* 受容体結合試験において、YKS と構成生薬の一つであるチョウトウコウ（*Uncaria hook* : UH）が 5-HT_{1A} 受容体に対してパーシャルアゴニスト作用を持つことを示した⁴⁹⁾。これらの結果から、YKS の向精神作用は 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用を示した UH が寄与している可能性を推察した。しかし、この *in vitro* の作用が生体（*in vivo*）で反映されるかどうかを PCA モデルで検証しようとした矢先に PCA が覚せい剤製造の原料になることから供給が中止され、PCA モデルでのこれ以上の研究が不可能になった。

そこで、著者は 5-HT 神経系との関係が示唆されている隔離飼育マウスに着目した。即ち、隔離飼育はげっ歯類で 5-HT 代謝や 5-HT（1A および 1B）受容体密度を変化させ攻

撃行動増加を引き起こす^{77,78)}。この隔離飼育で誘発される攻撃性は 5-HT_{1A} 受容体と 5-HT_{1B} 受容体のアゴニスト、5-HT_{2A} 受容体のアンタゴニスト、セロトニン取り込み阻害薬により減少する^{77,79,80,81,82,83,84)}。これらの知見は隔離飼育マウスがセロトニン神経系の異常に関連した攻撃性の評価モデルとして有用であることを示唆している。

本節では隔離飼育マウスの攻撃性や社会性異常の発症過程を検討し、それら異常行動に対する YKS の治療効果を検討した。次いで、*in vitro* 試験で YKS と同じ 5-HT_{1A} パーシャルアゴニスト作用を示した UH に YKS と同様な攻撃性や社会性改善効果があるか否かを検討した。

1. 実験方法

1.1. 実験動物

4 週齢の ddY 系雄マウスは日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。一週間の馴化後、動物は実験期間中透明ケージ (11.5 x 31 x 15.5 cm) で個別飼育した。群飼育対照群およびソーシャルインタラクション試験の対峙マウスは 1 ケージ (23 x 31 x 15.5 cm) あたり 5 匹で群飼育した。全ての動物は馴化期間から試験期間を通じ室温: 23±2℃、相対湿度: 55±10%、12 時間明暗周期 (明期: 7:00 から 19:00)、自由飲水および自由摂食 (普通飼料 MF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) 条件で飼育した。

すべての試験は株式会社ツムラの実験動物審査会の承認のもとで実施した。

1.2. 薬物および試薬

本試験には第 1 節と同様、株式会社ツムラ (東京、日本) で製造された抑肝散エキス末 (YKS) を用いた。構成生薬の配合は第 1 節の「薬物および試薬」の記載と同様である。本節ではこの YKS に加え、YKS から UH を除去した製剤、いわゆるき 1 抜き処方 (YKS-UH) および UH エキス末を用いた。これらはいずれも株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部より提供を受けた。YKS、YKS-UH および UH は蒸留水に溶解し実験に用いた。

5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 マレイン酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。実験には生理食塩水で調整した薬液を用いた。

1.3. ソーシャルインタラクション試験

ソーシャルインタラクション試験は、これまでに報告した方法に従った¹⁸⁾。被験マウスと対峙用マウス（無処置の同週齢群飼育マウス）をオープンフィールド装置（50 x 50 x 50 cm、Neuroscience, Inc., Tokyo, Japan）に入れ、両者間の行動をビデオカメラで10分間記録した。後日、図10に示したような対峙動物に対する被験動物の攻撃行動（aggressive grooming：攻撃的グルーミング、tail rattling：尾の威嚇的振戦、chasing：追撃行動、attacking：噛み付き行動）および社会行動（sniffing：臭い嗅ぎ行動、following：追尾行動、contacting：接近探索行動）をカウントした。活動量は、ソーシャルインタラクション試験時の保存データから移動距離（cm）を専用ソフト（analyzing behavior system, Viewer II：Bioserve, Bonn, Germany）を用いて解析した。

コミュニケーション（社会的相互認識行動）



攻撃性（怒り・敵意・攻撃）

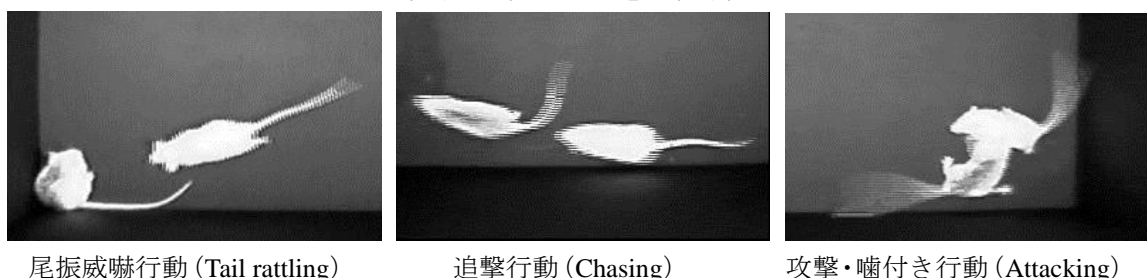


図10 ソーシャルインタラクション試験で測定される攻撃行動と社会行動。10分間に観察された攻撃行動（攻撃、尾の威嚇的振戦、追撃行動）の総数を攻撃性、社会的行動（臭い嗅ぎ行動、追跡行動、接近・認識行動）の総数を社会性として評価した。

1.4. 隔離飼育マウスの攻撃行動と社会行動の変化

ソーシャルインタラクション行動と隔離飼育期間の関係を明らかにするために、隔離飼育前（0週）、3週目、4週目および6週目の攻撃行動、社会行動、活動量の変化をソーシャルインタラクション試験で同時に評価した。

1.5. YKS および UH の単回投与効果

YKS (0.5、1.0 g/kg) および UH (75、150 mg/kg) を 4 週間隔離飼育したマウスに単回経口投与した。コントロールとして蒸留水 (10.0 ml/kg) を同様のスケジュールで隔離飼育マウスおよび群飼育マウスに経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は薬剤投与の 60 分後に行った。

1.6. YKS、UH および YKS-UH の反復投与効果

隔離飼育マウスに YKS (0.5、1.0 g/kg)、UH (75、150 mg/kg)、および YKS-UH (1.0 g/kg) を隔離飼育 4 週目から 6 週目まで 14 日間 (1 日 1 回) 経口投与した。コントロールとして蒸留水 (10.0 ml/kg) を同様のスケジュールで隔離飼育マウスおよび群飼育マウスに経口投与した。WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10.0 ml/kg) は、14 日目に YKS (1.0 g/kg) および UH (150 mg/kg) 投与の 30 分前に単回腹腔内投与した。ソーシャルインタラクション試験は 14 日目の YKS および UH 投与の 60 分後に行った。

1.7. WAY-100635 の単独効果

WAY-100635 の単回投与効果は、4 週間隔離飼育したマウスに WAY-100635 (0.1 および 1.0 mg/kg) または生理食塩水 (10.0 ml/kg) を単回腹腔内投与し、その 30 分後にソーシャルインタラクション試験を行って評価した。

WAY-100635 の反復投与効果は、WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10.0 ml/kg) を隔離飼育 4 週から 6 週目まで 14 日間 (1 日一回) 腹腔内投与した翌日 (15 日目) にソーシャルインタラクション試験を行って評価した (試験当日は WAY-100635 を投与しなかった)。

1.8. 統計解析

行動試験データは平均値 \pm 標準誤差で示した。攻撃性と社会性の経時的変化には 2 元配置分散分析を用いた。2 群間比較は Student's *t*-検定、複数群間比較には Dunnett's 検定を用いた。それぞれの統計解析の有意水準は $P < 0.05$ とした。

2. 実験結果

2.1. 隔離飼育マウスの攻撃行動と社会行動

図 11 に隔離飼育マウスと群飼育マウスの飼育 0、3、4 および 6 週目における攻撃行動と社会行動の変化を示す。2 元分散分析の群要因で攻撃行動 ($F_{1,50}=18.352, P < 0.01$) と社会行動 ($F_{1,50}=87.414, P < 0.01$) に有意差が認められた。攻撃行動は 6 週間の隔離飼育により徐々に増加し、逆に社会行動は徐々に減少した。一方、群飼育マウスでは両行動に経時的に有意な変化は認められなかった。それぞれの時点で両群を比較すると、攻撃行動は隔離飼育の 4 週 ($P < 0.01$) と 6 週目 ($P < 0.05$) で有意に増加し (図 11A)、社会行動は 3 週、4 週および 6 週目で有意に減少した ($P < 0.01$) (図 11B)。

活動量は 6 週間を通し有意な変化は認められなかった (図 11C)。

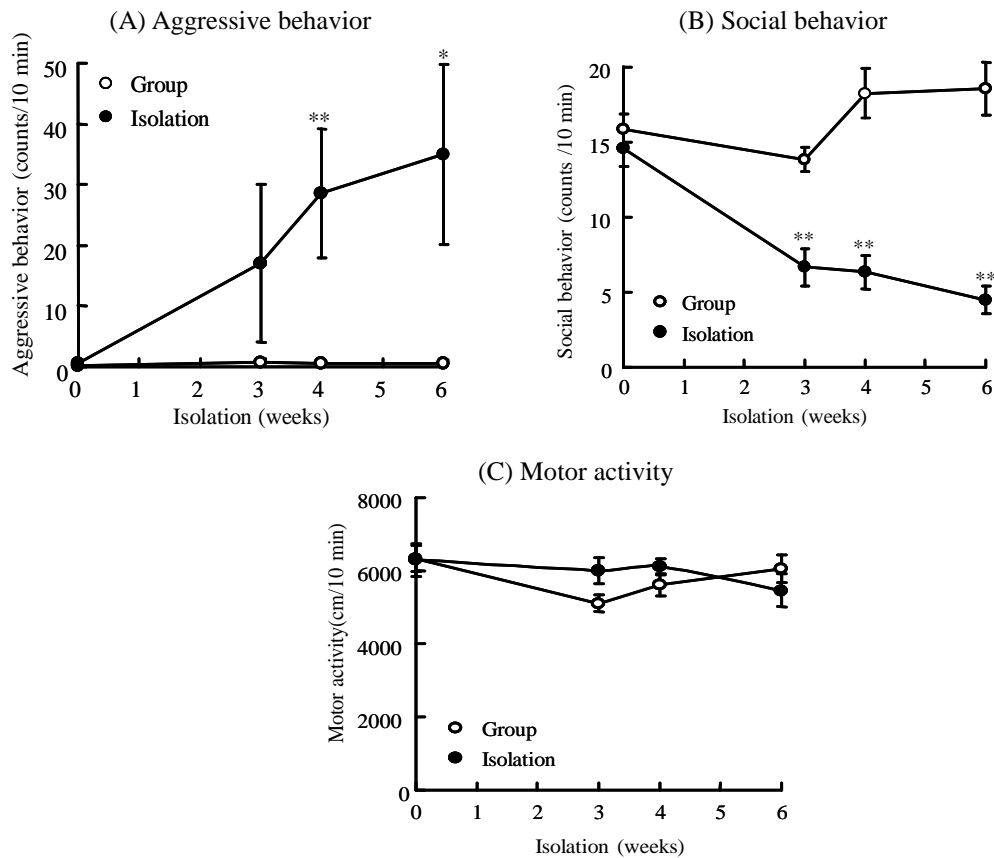


図 11 隔離飼育マウスと群飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) の変化。ソーシャルインタラクション試験は隔離飼育の 0、3、4 および 6 週目に行った。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 6-8$ /群)。統計学的有意性は two-way ANOVA 検定後、student's t-test で評価した。 $* p < 0.05$ および $** p < 0.01$ は各週齢の群飼育に対する有意性を示す。

2.2. 攻撃行動および社会行動に対する YKS の単回投与効果

YKS の単回投与（0.5 および 1.0 g/kg）は、隔離飼育で誘発した攻撃行動の増加に影響を与えなかったが（図 12A）、社会行動の減少を有意（ $P < 0.05$ ）に改善した（図 12B）。活動量には両群間に有意差は認められなかった（図 12C）。

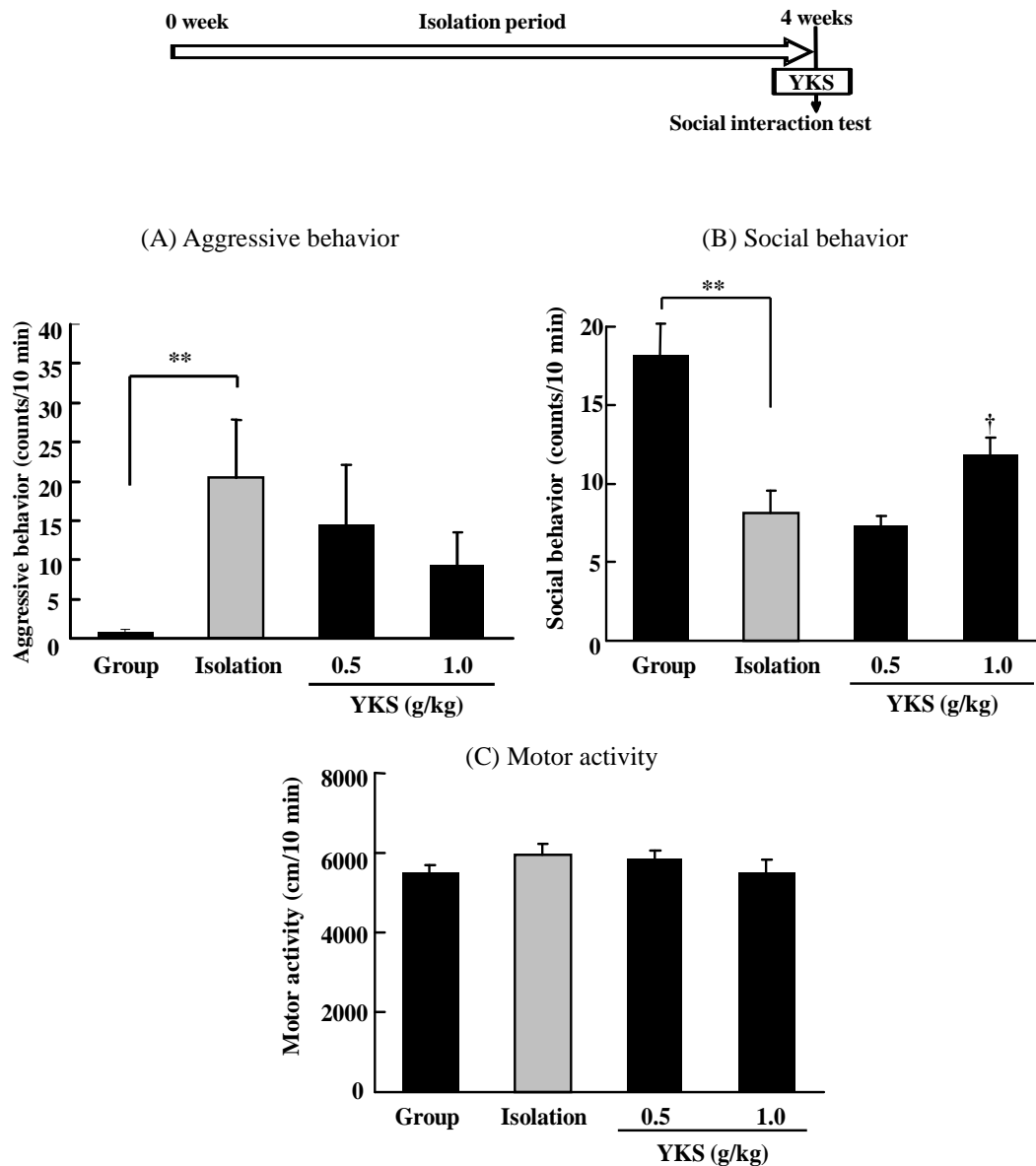


図 12 隔離マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する YKS の単回投与効果。4 週目の隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに YKS (0.5 および 1.0 g/kg) または蒸留水 (10 ml/kg) を単回経口投与し、その 60 分後にソーシャルインタラクション試験を行った。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 9-10/群)。** $p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性、† $p < 0.05$ は隔離飼育コントロールに対する有意性を示す。

2.3. 攻撃行動および社会行動に対する YKS の反復投与効果

YKS の反復投与 (0.5 および 1.0 g/kg, 14 日間) は、隔離飼育により誘発された攻撃行動の増加 (図 13A) および社会行動の低下 (図 13B) を有意に改善した。これらの改善効果は UH 除去 YKS (YKS-UH) では認められなかった ($P < 0.01$)。また、YKS のこれら改善効果は 14 日目の WAY-100635 (0.1 mg/kg, 単回投与) によって阻止された ($P < 0.01$) (図 13A および 13B)。活動量は各群間で有意差は認められなかった (図 13C)。

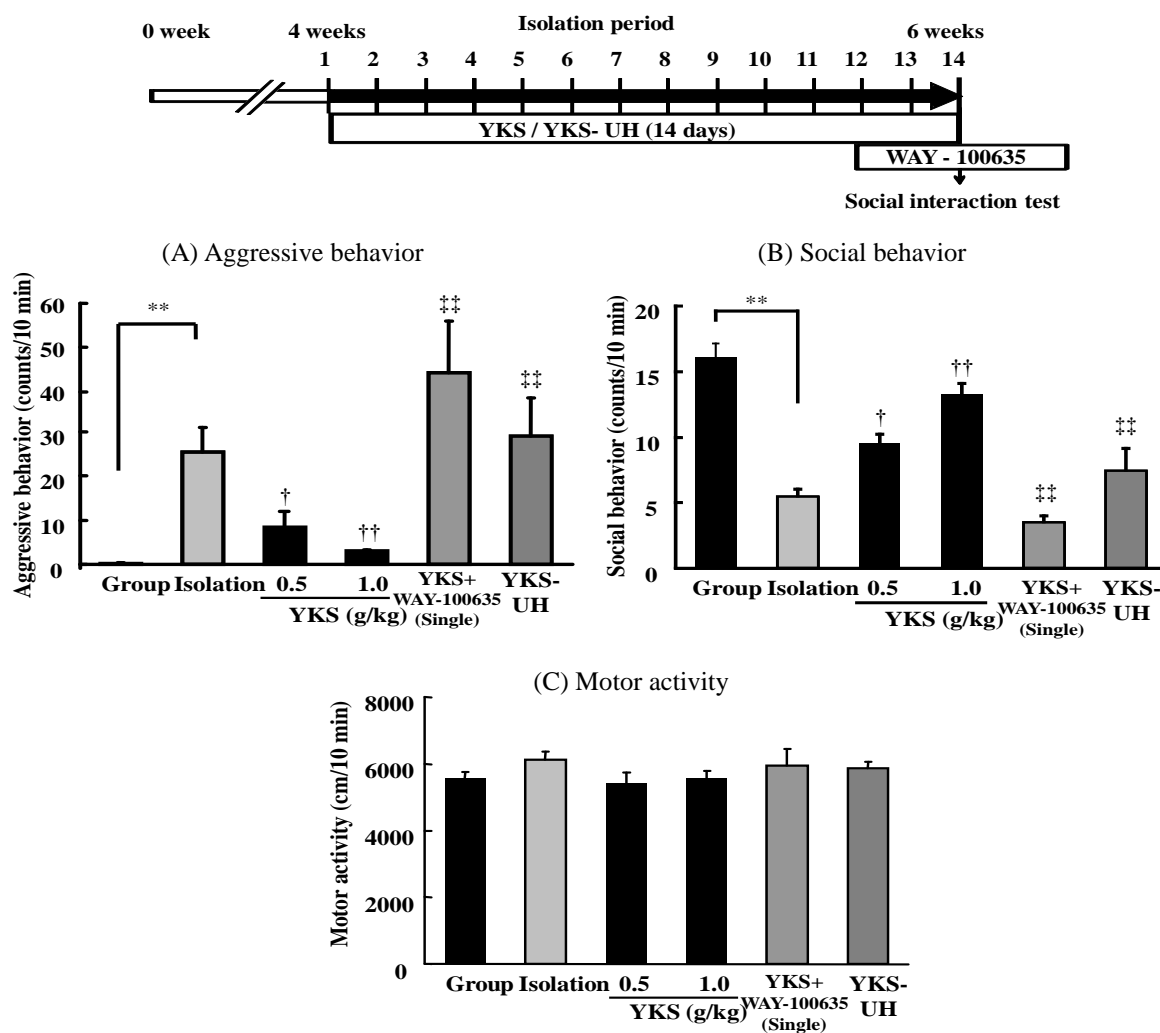


図 13 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する YKS の反復投与効果。4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに YKS (0.5 and 1.0 g/kg) または蒸留水 (10 ml/kg) を毎日経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は最終日 (14 日目) の各薬液投与の 60 分後に行った。WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10 ml/kg) はソーシャルインタラクション試験の 30 分前に腹腔内投与した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 9-36/群)。** $p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性、†† $p < 0.01$ および † $p < 0.05$ は隔離飼育コントロールに対する有意性、また†† $p < 0.01$ は YKS (1.0 g/kg) 群に対する有意性を示す。

2.4.攻撃行動および社会行動に対する UH の単回投与効果

UH の単回投与 (75、150 mg/kg) は隔離飼育により誘発した攻撃行動の増加に対し有意な影響を与えなかった (図 14A)。しかし、社会行動の減少に対しては 150 mg/kg 用量で有意 ($P < 0.01$) な改善効果が認められた (図 14B)。活動量は各群間で有意差は認められなかった (図 14C)。

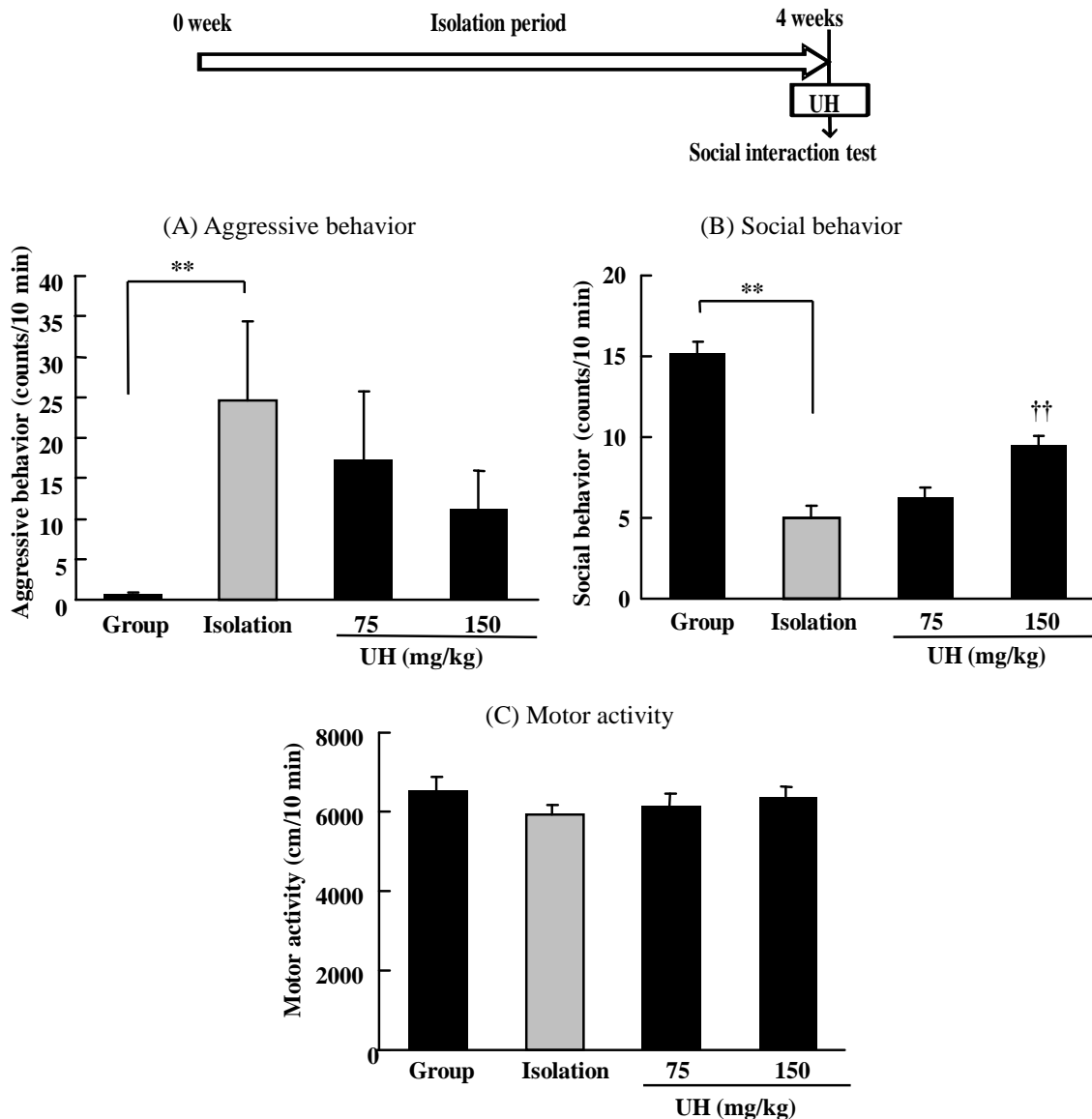


図 14 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する UH の単回投与効果。4 週目の隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに UH (75 および 150 mg/kg) または蒸留水 (10 ml/kg) を単回経口投与し、その 60 分後にソーシャルインタラクション試験を行った。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 7-10/群)。** $p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性、†† $p < 0.01$ は隔離飼育コントロールに対する有意性を示す。

2.5. 攻撃行動および社会行動に対する UH の反復投与効果

UH (150 mg/kg) の 14 日間反復投与は隔離飼育で誘発した攻撃行動の増加 (図 15A) および社会行動の減少 (図 15B) を有意 ($P < 0.01$) に改善した。UH のこれら改善効果は 14 日目の WAY-100635 (0.1 mg/kg) の単回投与によって阻止された (図 15A および 15B)。活動量は群飼育と隔離飼育群間で有意差を認めたが ($P < 0.05$)、隔離飼育群と薬物投与群 (UH または UH+WAY 群) 間では有意差は認められなかった (図 15C)。

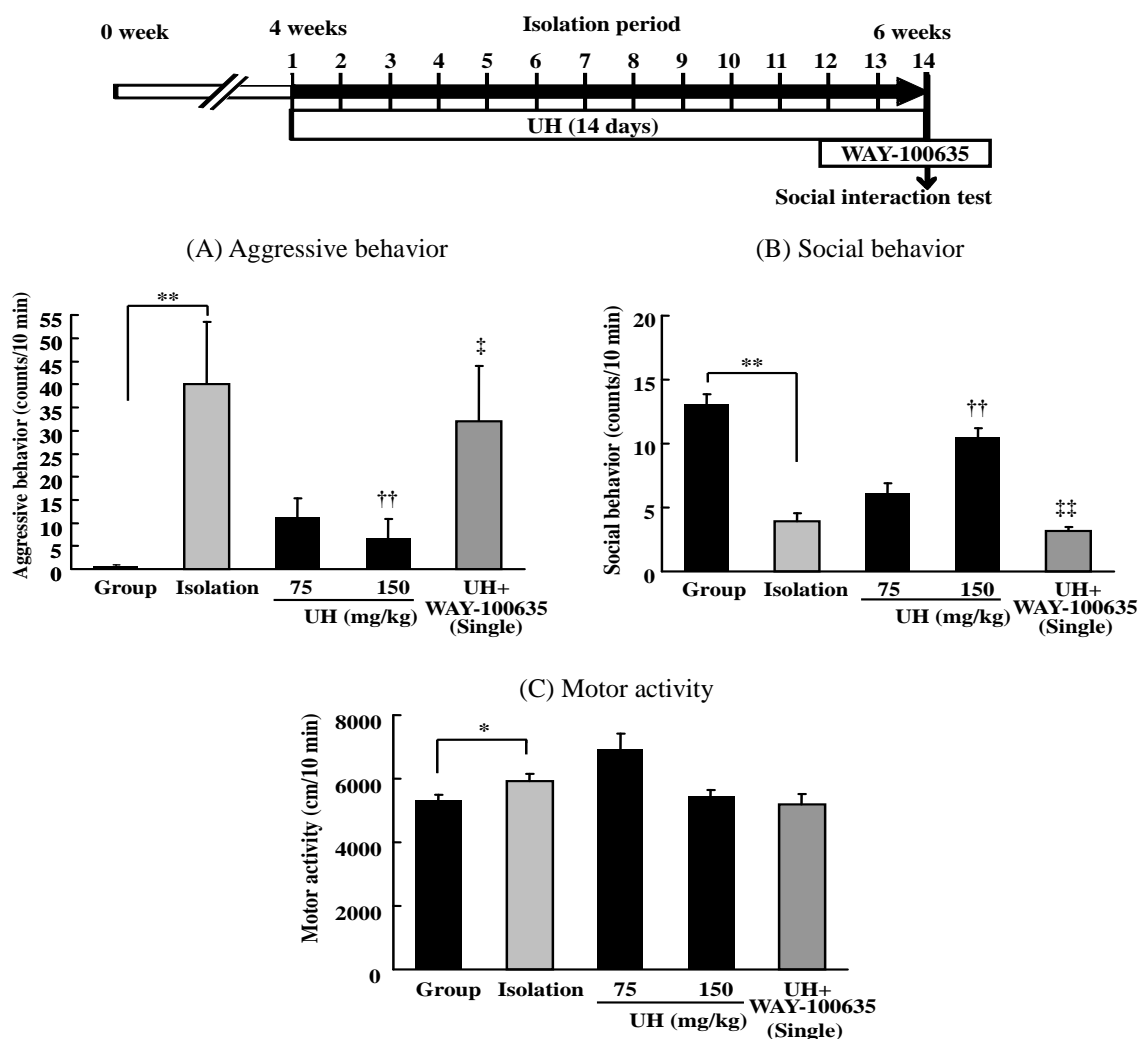


図 15 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する UH の反復投与効果。4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに UH (75 および 150 mg/kg) または蒸留水 (10 ml/kg) を毎日経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は最終日 (14 日目) の各薬液投与の 60 分後に行った。WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10 ml/kg) はソーシャルインタラクション試験の 30 分前に腹腔内投与した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 4-20/群)。** $p < 0.01$ および * $p < 0.05$ は群飼育コントロールに対する有意性、†† $p < 0.01$ は隔離飼育コントロールに対する有意性、また† $p < 0.05$ および‡ $p < 0.01$ は UH (150 mg/kg) 群に対する有意性を示す。

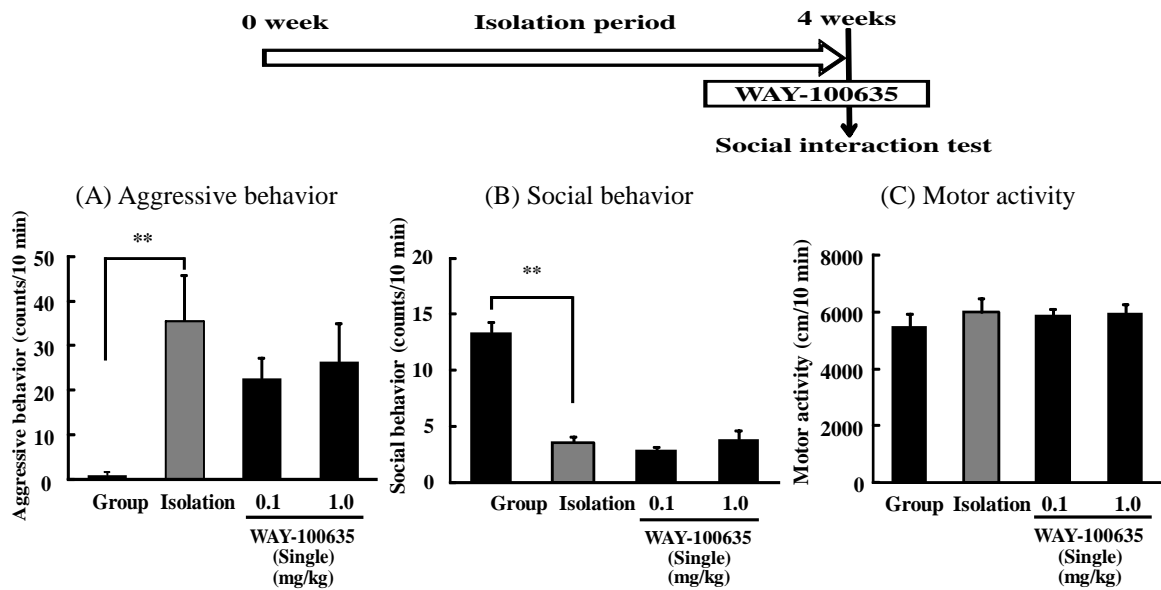
2.6. 攻撃行動および社会行動に対する WAY-100635 の効果

図 13 および 15 で示したように、隔離飼育で誘発された攻撃行動と社会行動に対する YKS および UH の改善効果はいずれも WAY-100635 との併用で阻止された。ここでは、隔離飼育により誘発した攻撃行動と社会行動に対する WAY-100635 の単独効果を調べた (図 16)。WAY-100635 だけを単回 (0.1 および 1.0 mg/kg) または 14 日間反復投与 (0.1 mg/kg) しても攻撃行動 (図 16A,16D) や社会行動 (図 16B,16E) には影響しなかった。また、活動量 (図 16C,16F) も各群で有意な差は認められなかった。

3. 小括

マウスの攻撃行動増加と社会行動低下が隔離飼育の 4 週以降に認められた。YKS (0.5 および 1.0 g/kg) の 2 週間投与 (4 週から 6 週までの 14 日間) は、隔離飼育で誘発した攻撃行動増加および社会行動低下を有意に改善した。このような効果は UH 抜き処方では認められなかった。YKS と同様な行動改善作用は UH (YKS 含有量:75 および 150 mg/kg) の 2 週間投与でも認められた。YKS および UH の改善効果は 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 の併用で阻止された。これらの結果から、YKS の攻撃および社会行動改善効果には少なくとも 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト作用が関与し、UH がその作用を担っている可能性が示唆された。

Single administration



Repeated administration

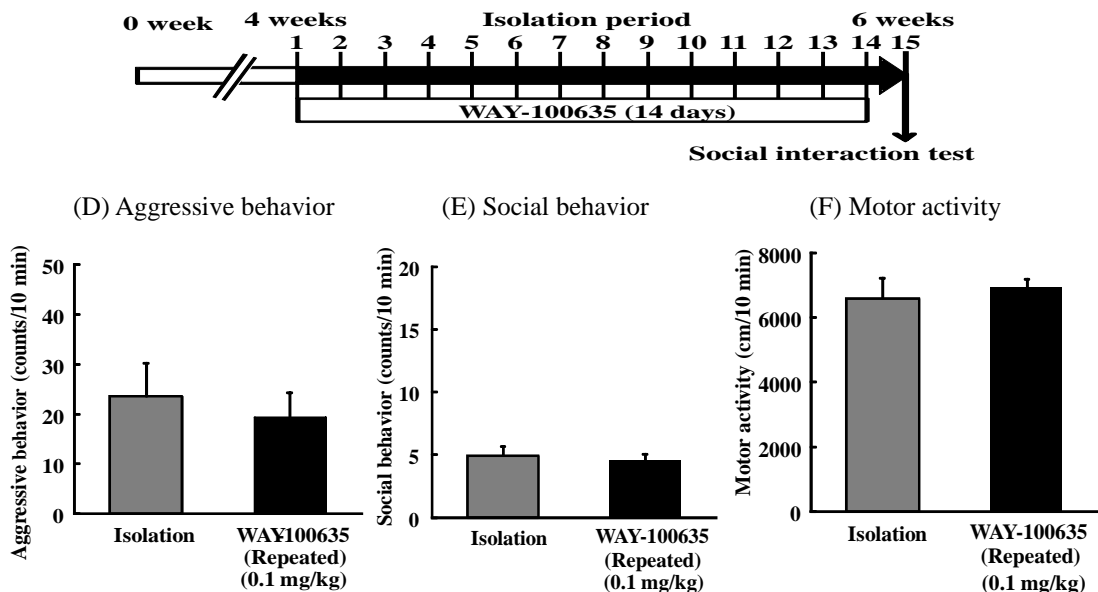


図 16 隔離飼育マウスの攻撃行動、社会行動および活動量に対する WAY-100635 の単回および反復投与効果。図 A、B および C は単回投与試験における攻撃行動、社会行動および活動量の結果を示す。この試験では 4 週目の隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに WAY-100635 (0.1 および 1.0 mg/kg) または蒸留水 (10 ml/kg) を単回腹腔内投与し、その 30 分後にソーシャルインタラクション試験を行った。図 D、E、および F は反復投与試験における攻撃行動、社会行動および活動量の結果を示す。この試験では 4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10 ml/kg) を毎日腹腔内投与した。ソーシャルインタラクション試験は最終投与の翌日 (15 日目: 薬物投与なし) に行った。図 A から F の各値は平均値 ± 標準誤差で示した (単回投与試験: n = 7-9/群、反復投与試験: n = 12-13/群)。** $p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性を示す。

考察

本章では YKS の薬効を動物試験で客観的に評価した。先ず第 1 節ではアルツハイマー病の動物モデルとして知られている APP-Tg マウスの学習障害と BPSD 様症状に対する YKS の効果について検討した。今回用いた APP-Tg マウス (ヒト APP695SWE 変異発現マウス) は A β の沈着と斑の増加、グリア細胞の活性化、モーリス水迷路と T-迷路における空間的記憶障害などのアルツハイマー病様の症状を発症することが知られている^{58,85,86)}。そこで、最初にモーリス水迷路試験を用いてこのモデル動物で本当に空間認知障害が発症するのか否かを調べた。訓練試行において、Tg(-) control マウスの潜時は 5 日間の訓練を繰り返すことによって有意に減少した。一方、Tg(+)マウスの潜時は繰り返し訓練によっても短縮しなかった。これらの結果は Tg(+)マウスの空間認知機能が 11 ヶ月齢で既に障害されていることを示唆した。また、Tg(+)マウスの認知機能障害はプローブ試験の結果によっても検証された。今回の結果は、モーリス水迷路試験における Tg(+)マウスの空間認知・学習障害が脳内 A β 蓄積を示す 9~10 ヶ月齢で認められるというこれまでの報告⁵⁸⁾と一致した。YKS は水迷路試験の訓練試行とプローブ試行において反応潜時を短縮させたことから、本剤には学習障害改善効果があると推察された。この改善効果は Tg(+)と YKS 群間で運動能力の指標として測定した遊泳速度に影響がなかったことから YKS が運動量を増加させることによってプラットフォームへの到達時間を短縮したわけではないことが判る。一方、オープンフィールド試験では Tg(+)群で過活動となり YKS 群ではその活動亢進が抑えられた。テスト課題が異なることから一概に比較できないが、Tg(+)群で過活動であったとしてもプラットフォームの探索時間は有意に延長し、また YKS 群でその過活動が抑制されていたとしても到達時間はむしろ有意に短縮していることになる。以上のことから、著者は水迷路試験で評価した学習障害改善効果は運動活性に依存しない特異的な学習改善作用と判断した。

高架式十字迷路試験では、Tg(-)マウスのオープンアーム進入回数と滞在時間が加齢とともに減少した。同様の結果は他の研究者らからも報告されている⁸⁷⁾。Tg(+)マウスの高架式十字迷路試験における両パラメーターは 7 ヶ月齢と 10 ヶ月齢において Tg(-) control 群のそれらよりも有意に増加した。この結果はこれまでの報告とよく一致し、低不安または脱抑制に起因すると考えられている^{59,61,88)}。Tg(+)群の両パラメーターの増加は 7 ヶ月齢では YKS 投与によって減少したが、10 ヶ月齢ではその効果は認められなかった。10 ヶ月齢でこの効果が消失する理由は明らかではないが、これらの結果は YKS が低不安の改善または脱抑制の改善に役立つ可能性を示唆した。

オープンフィールド試験では Tg(+)マウスの活動量（総移動距離の増加）がすでに7ヵ月齢で発症しており、Tg(-)マウスに比べ、それは、14ヵ月齢まで持続していることが判った。この結果は同モデルマウスの3ヵ月齢⁸⁹⁾や16~17ヶ月齢⁵⁹⁾で報告されている過活動（hyperactivity）と一致した。YKSは14ヵ月齢における過活動を有意に改善したことから、過活動改善効果が推察された。

可溶性 A β は Tg2576 若齢マウス（4~6ヵ月齢）で記憶障害を誘発することが報告されている^{90,91)}。Fujiwara ら⁹²⁾は YKS の構成生薬である UH（チョウトウコウ）に A β の凝集抑制効果があることを *in vitro* で証明している。そこで、UH を含有する YKS の脳内 A β 蓄積に対する抑制効果を組織学および生化学的に検討したが、図 8（組織切片レベル）および図 9（脳ホモジネイトによる組織含量レベル）に示したように A β 組織沈着または可溶性/不溶性 A β 量に対し有意な作用は認められなかった。これらの結果は認知障害および非認知機能障害に対する YKS の改善効果は A β 沈着には依存していない可能性を示唆した。

アルツハイマー病患者では老人班蓄積（A β 蓄積）と共にアセチルコリン（ACh）神経細胞の選択的な変性・減少（細胞死）が報告されている^{93,94,95)}。著者が用いた Tg マウスでも記憶に関与する海馬を含む多くの領域でアセチルコリン濃度が著しく低下していること⁹⁶⁾や海馬の長期増強（long-term potentiation : LTP）障害が既に報告されている⁹⁷⁾。この LTP 障害には A β による直接的障害の他に ACh 神経障害を介した発生機序も報告されている^{98,99)}。また、A β はコリン作動性神経障害¹⁰⁰⁾に加えグルタミン酸作動性神経障害¹⁰¹⁾およびセロトニン作動性神経障害¹⁰²⁾など様々な神経機能障害を誘導し、認知症状や非認知症状に関係する長期増強（long-term potentiation）を抑制する⁹¹⁾。従って、Tg マウスで認められた学習障害には A β に伴ったこれらの様々な要因が関与している可能性が推察される。

今回の結果は YKS 改善効果が A β 蓄積に直接作用するというよりも、むしろに A β によって誘発される様々な神経系の機能障害に対し改善作用を示しているように思われる。例えば、抑肝散には細胞保護作用があること^{46,48)}、最近では YKS が神経細胞の増加・新生、分化や神経突起伸長作用など可塑性に関係する ERK1/2 および PI3/Akt などの活性化作用も報告されている¹⁰³⁾。ACh 神経系に関しては、YKS は ACh 合成酵素や分解酵素、ムスカリン受容体やニコチン受容体には作用しないが²²⁾、脳虚血+A β 脳室内注入ラットで低下した海馬の ACh 放出をダイナミン 1 活性化により増加させることが報告されている³⁵⁾。グルタミン酸やセロトニン神経系に関しては、YKS がチアミン欠乏で誘発されるアストロサイト機能低下を改善することで脳内グルタミン酸外液濃度上昇を抑制する

こと^{18,44)}、亜鉛欠乏ラットの海馬におけるグルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸神経伝達物質の過剰放出を抑制すること²³⁾、ラットの前頭皮質における 5-HT_{2A} 受容体発現を減少させること³⁹⁾が証明されている。更に、YKS を構成するいくつかの生薬や成分に関して、構成生薬であるトウキやチョウトウコウの抽出物にスコポラミン誘発性¹⁰⁴⁾、低酸素誘発性¹⁰⁵⁾および虚血誘発性¹⁰⁶⁾の空間認知障害改善効果があること、またYKS 成分であるリンコフィリン、イソリンコフィリン、ガイソシジンメチルエーテルおよびフェノール性成分がムスカリン、NMDA およびセロトニン受容体などのアンタゴニスト作用を介して神経細胞障害を抑制することが報告されている^{105,107,108,109,110)}。抑肝散の改善作用にはこれらの機序や成分などが関与している可能性が推察される。

著者の研究成果が報告されると、Fujiwara らは同系の Tg マウスを用いた追従研究を行い、YKS が記憶障害（ステップスルー受動回避試験）および攻撃性／社会的行動障害を改善し、同様な効果が UH 投与でも認められたことを報告した²⁸⁾。この結果はYKS の効果にUH が関与している可能性を示唆した。

これらの結果を合わせるとYKS はAPP-Tg マウスに見られた学習・記憶障害、不安、過活動、攻撃性や社会行動性の異常を改善し、それらの改善効果には少なくともUH が関与している可能性が示唆された。

第2節では隔離飼育マウスで認められる攻撃性や社会性低下などのBPSD 様症状に対するYKS の効果を検討した。攻撃性と社会性は複合的にニューロンやホルモンの経路が相互に作用している複雑なプロセスである。今日、そのメカニズムや創薬ターゲットの研究のためにいくつかの動物モデルが開発されている^{111,112)}。その中で、隔離飼育動物に5-HT 代謝、5-HT_{1A} 受容体および5-HT_{1B} 受容体に変化があり、発症する攻撃性や社会性の異常が5-HT_{1A} や5-HT_{1B} 受容体アゴニスト、5-HT_{2A} 受容体アンタゴニストおよびセロトニン取り込み阻害薬などにより改善することが報告されている^{77,78,79,80,81,82,83,84,113)}。

著者の研究グループでは、YKS とその構成生薬であるUH が5-HT_{1A} 受容体に結合し、5-HT_{2B} 受容体には結合しないこと⁴⁹⁾や予備検討ではあるが*in vitro* 結合試験で5-HT_{1B} 受容体ならびにセロトニントランスポーターに結合しないことを確認している。一方、Kamei らはYKS の抗不安作用はGABA_A 受容体の活性化による可能性があり、YKS の水抽出分画にその活性成分が含まれている可能性を示唆している³⁸⁾。Liao らは*in vitro* 試験において、YKS の構成生薬であるトウキの水抽出物がGABA_A 受容体に結合することを報告している¹¹⁴⁾。そこでGABA_A 受容体に対するYKS の*in vitro* 結合試験を行ったところ、YKS は確かにGABA 受容体に結合するが、それはYKS に含まれるGABA（水溶性植物性アミノ酸）によるためであることが判った（未発表）。すなわち、YKS 含有GABA を水で

完全除去した後に得たメタノール抽出エキスには GABA およびベンゾジアゼピン結合性は全く認められなかった。これらの結果は、GABA_A 受容体の両結合部位に対して効果を持つ成分はメタノール抽出物中には含まれていないことを示唆した。上述のとおり、YKS は構成生薬由来の植物性 GABA を含んでいるが、一般的に経口投与した GABA は血液脳関門を通過することが困難である¹¹⁵⁾。したがって、YKS は *in vivo* では脳内 GABA_A 受容体に対し直接的作用はないものと推察した。

隔離飼育マウスの攻撃性は 5-HT_{1A} および 5-HT_{1B} 受容体アゴニスト、5-HT_{2A} 受容体アンタゴニスト、セロトニン取り込み阻害薬などにより影響されることは先にも述べたが、上述したように 5-HT_{1A} 受容体以外に対する結合性が認められなかったという結果から本研究では YKS の 5-HT_{1A} 受容体に焦点あて研究を進めた。

本研究では、攻撃行動増加と社会行動の低下が 6 週間の隔離により徐々に発症し 4 週目以降から有意性をもって増加した。本試験ではこれらの行動に有意な変化が認められる 4 週から 6 週の 2 週間 (14 日間)、毎日被験薬を投与することによって治療効果を評価した。図 13 に示したように YKS の 14 日間反復投与は攻撃行動と社会行動を有意に改善した。YKS の攻撃性および社会性に対する改善効果は、PCA 投与ラット²⁰⁾、脳室内 Aβ 注入マウス²¹⁾ および APP-Tg マウス²⁸⁾ においても同じように改善されることが報告されている。したがって、YKS は攻撃性や社会性の基本的なメカニズムに作用している可能性が推察された。この研究では、YKS の 14 日間投与による攻撃行動と社会行動の改善効果は 14 日目の 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニストで (WAY-100635 の単回投与) により阻止された (図 13)。この結果は 5-HT_{1A} 受容体が YKS の攻撃行動と社会行動の改善作用に関係していることを示唆した。

これまでに著者の研究グループでは YKS の 7 種構成生薬の 5-HT_{1A} 受容体に対する *in vitro* 結合試験を行い、UH に 5-HT_{1A} 受容体にパーシャルアゴニスト作用があることを報告している⁴⁹⁾。しかし、この UH の *in vitro* 結果は生体 (*in vivo*) ではまだ検証されていない。そこで、著者は第 2 節で UH の攻撃行動と社会行動の改善作用を隔離飼育マウスを用いて検証した。YKS の改善作用は YKS から UH を除くことにより完全に消失した。また、YKS 1.0g/kg に含まれる UH 含量 (150mg/kg) を反復投与すると YKS と同様に攻撃行動および社会行動の有意な改善が認められた (図 15)。これらの生体 (*in vivo*) での結果は UH が YKS の作用を担う生薬であると同時に UH にはその作用に寄与する活性成分が含まれていることを強く示唆した。

YKS の改善作用のメカニズムの詳細を明らかにするためには更なる研究が必要であるが、隔離飼育マウスでの結果は YKS が 2 種類の異なった作用を持っている可能性を示唆

した。それは、社会性に対する単回投与効果と攻撃性に対する連続投与効果である。前者の急性作用は YKS の持つ 5-HT_{1A} パーシャルアゴニスト作用で理解されるが、後者の慢性作用については何らかのホメオスタシス（神経適応）が関与している可能性が推察された。例えば、Egashira らは、DOI（5-HT_{2A} 受容体アゴニスト）により誘発される首振り行動は YKS の単回投与では抑制されないが、慢性投与（14 日間投与）によって抑制されることを報告している³⁹⁾。そのメカニズムとして YKS の慢性投与による 5-HT_{2A} 受容体タンパク質の発現抑制（down-regulation）を示唆している。しかし、YKS は 5-HT_{1A} 受容体へは結合するが、5-HT_{2A} 受容体には結合しない⁴⁹⁾。この結果は、YKS の攻撃行動または首振り行動の改善作用は 5-HT_{2A} 受容体への直接的な作用によるためではないことを示唆している。近年、Carrasco ら¹¹⁶⁾や Wieland ら¹¹⁷⁾は、5-HT_{1A} 受容体の活性化が 5-HT_{2A} 受容体の脱感作を引き起こすことを報告している。このことは、5-HT_{2A} 受容体が 5-HT_{1A} 受容体により影響を受けることを示唆する。このように、YKS も 5-HT_{1A} 受容体へのアゴニスト結合を介して 5-HT_{2A} 受容体機能（攻撃行動または首振り行動）を抑制している可能性が推察された。すでに述べたように攻撃行動や首振り行動は、YKS の単回投与では改善されず慢性投与によって改善される。この結果は、YKS の 5-HT_{1A} 受容体に対する慢性的な部分アゴニスト刺激が 5-HT_{2A} 受容体発現を抑制している可能性を推察させた。この仮説を確かめるためには今後さらに詳細な研究が必要である。

以上、第 1 章では 2 種の動物モデルを用いて YKS の効果を評価し、以下のことが明らかとなった。

- 1) 認知症動物モデル（APP-Tg マウス）の結果から、YKS は記憶・学習障害などの中核症状に加えおよび攻撃性、社会性、低不安または脱抑制、過剰行動などの BPSD 様行動を改善する作用がある。
- 2) 隔離飼育マウスの結果から、YKS は攻撃性や社会行動の異常を改善し、その作用機序の一つに 5-HT_{1A} 受容体の活性化（パーシャルアゴニスト）作用が関与している可能性がある。
- 3) YKS の作用には UH が寄与し、それに活性成分が含まれている可能性がある。

本章の結果を受け、次章（第 2 章）では UH に含まれる活性成分の探索について述べる。

第2章

抑肝散の作用機序：培養細胞 (*in vitro*) 試験

はじめに

第1章では APP-Tg マウスと隔離飼育マウスの2種の動物モデルを用いて抑肝散 (YKS) の精神行動改善効果を評価し、以下のことが明らかとなった。

- 1) YYS は記憶・学習障害、および攻撃性、社会性、不安、過剰行動などの BPSD 様行動を改善する。
- 2) YYS の作用機序の一つに 5-HT_{1A} 受容体の活性化作用が関与している。
- 3) YYS の作用にはチオウトウコウ (UH) が関与している。

この第1章で述べた研究とは別に著者の研究グループでは平行してセロトニン神経系に対する YYS の作用について、動物実験 (*in vivo* 実験) および受容体結合実験 (*in vivo* 実験) を実施していた。その結果、YYS はセロトニン神経毒パラクロロアンフェタミン (PCA) で誘発されるラット攻撃行動を 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト (ブスピロン) および 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニスト (ケタンセリン) と同じように有意に改善することを見出した²⁰⁾。これらの結果から、YYS の改善効果には 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト作用または 5-HT_{2A} 受容体アンタゴニスト作用が関与している可能性を推察した。その仮説を明らかにするため、5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体に対する YYS の *in vitro* 結合試験を行ったところ 5-HT_{1A} 受容体に濃度依存的に強く結合したが、5-HT_{2A} 受容体には結合しなかった。同様の結合作用が YYS の7構成生薬の中で UH だけに認められた。さらに、³⁵S]GTPγS 結合試験の結果から、YYS および UH の 5HT_{1A} 受容体結合は、パーシャルアゴニスト作用であることを示した⁴⁹⁾。

この *in vitro* での仮説は1章の APP-Tg マウスや隔離飼育マウスで認められた攻撃および社会行動が YYS と同様に UH でも確認されたこと、また、PCA²⁰⁾や隔離³¹⁾で誘発された攻撃性に対する YYS および UH の改善効果が 5-HT_{1A} アンタゴニスト (WAY-100635)

との併用で阻止されたことから強く支持された。以上の結果は 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用を有する UH が YKS の作用に大きく寄与していることに加え、UH にはそれを担う活性成分が含まれていることを強く示唆した。

そこで、本章ではその活性成分を明らかにするため、UH に含まれる主要なアルカロイド 7 成分について培養細胞を用いた *in vitro* 試験を実施した。

第 1 節ではヒトの 5-HT_{1A} 受容体を発現させたチャイニーズハムスターの卵細胞(CHO)を用いた競合的結合試験と [³⁵S]GTP γ S 結合試験を行ない、YKS および UH に共通した 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト活性を示す成分・ガイソチジンメチルエーテル (GM) を見出した成果について述べる。第 2 節では第 1 節で同定した GM が 5-HT₇ 受容体に対し 5-HT_{1A} 受容体に勝るとも劣らない強い結合性を示し、アンタゴニストとして作用することについて述べる。これら一連の結果は UH に含まれる GM が YKS の薬理作用を担う活性成分であることを示唆している。

第 1 節

5-HT_{1A} 受容体に対する作用

YKS は 5-HT 神経毒・パラクロロアンフェタミン (PCA) により誘発されるラットの攻撃行動や社会行動を改善し、これらの改善効果は 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 の併用により拮抗される²⁰⁾。 *in vitro* 結合試験では、YKS とその構成生薬の一つである UH が 5-HT_{1A} 受容体に対してパーシャルアゴニスト作用を示すことが証明されている⁴⁹⁾。これらの結果から、YKS の向精神 (中枢) 作用は 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用を示す UH が寄与している可能性が推察された。これらの結果は UH にはそれを担う活性成分が含まれていることを強く示唆した。

本節では、ツムラ研究所で抽出・同定・保管されている 7 種の UH アルカロイド成分 (geissoshizine methyl ether: GM, hirsuteine: HTE, hirsutine: HIT, rhynchophylline: RP, isorhynchophylline: IRP, corynoxine: CX, isocorynoxine: ICX) を対象に、ヒトの 5-HT_{1A} 受容体を安定発現させたチャイニーズハムスターの卵細胞 (CHO) 膜を用いた競合的結合試験および [³⁵S]GTPγS 結合試験を行ない、YKS および UH に共通した 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト活性を示す活性成分を探索した。

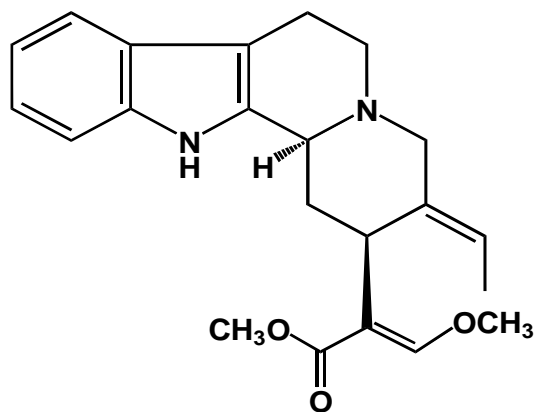
1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

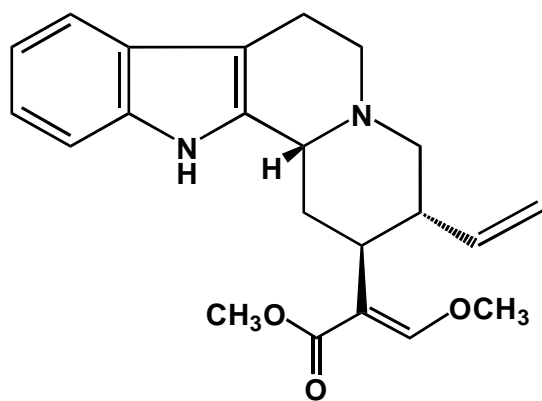
YKS は第 1 章第 1 節・実験方法「1.2. 薬物および試薬」の項に記載したエキス末を使用した。UH 由来アルカロイド RP、IRP、CX、ICX、HTE、HIT および GM は株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部より提供を受けた。これらの化学構造をインドールアルカロイド成分については図 17、オキシインドールアルカロイド成分については図 18 に示す。

ヒト 5-HT_{1A} 受容体を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-h5-HT1A) 膜および [³H] 8-hydroxy-2-(di-n-propyl amino)tetralin (8-OH-DPAT) (NET929, 170.2 Ci/mmol) は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) より購入した。 [³⁵S]5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTPγS)

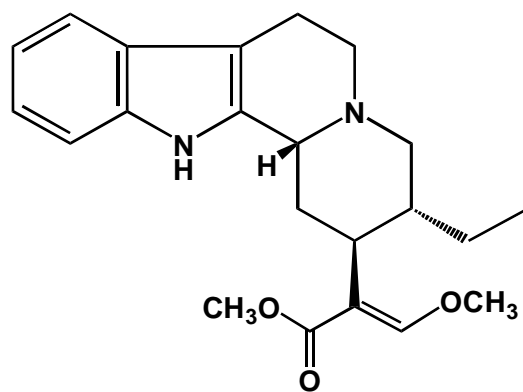
(SJ-1308, 1033 Ci/mmol) は GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK) より購入した。Dithiothreitol (DTT) , metergoline, 5-HT, guanosine-5'-diphosphate (GDP) , $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ および 4-(2-hydroxy-ethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。結合試験のその他の試薬は市販されている特級試薬を用いた。



Geissoshizine methyl ether (GM)

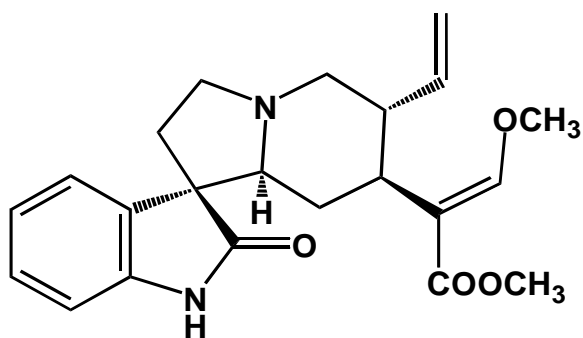


Hirsuteine (HTE)

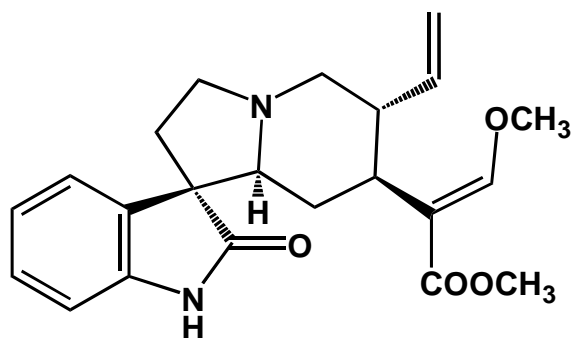


Hirsutine (HIT)

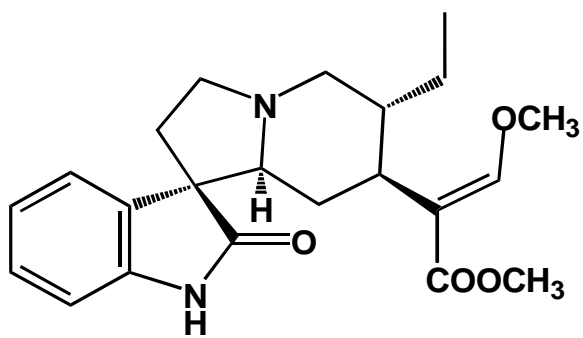
図 17 UH の 3 種のインドールアルカロイド成分の化学構造式



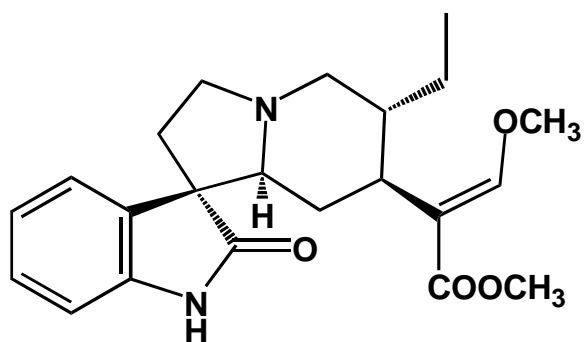
Corynoxine (CX)



Isocorynoxine (ICX)



Rhynchophylline (RP)



Isorhynchophylline (IRP)

図 18 UH の 4 種 の オキシインドールアルカロイド成分の化学構造式

1.2. 5-HT_{1A} 受容体に対する競合的結合試験法

被験物質の 5-HT_{1A} 受容体に対する競合結合試験と次項で記載したアゴニスト/アンタゴニスト活性を調べるための [³⁵S]GTPγS 結合試験の原理を図 19 に示した。

5-HT_{1A} 受容体競合的結合試験は既報に記載した方法に従った⁴⁹⁾。これに用いた種々濃度の被験物質 (GM, HTE, HIT, CX, ICX, RP, IRP) 溶液は 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) で調整した。結合試験の概略を以下に示す。5.25 μl の被験物質溶液および溶媒を 500 μl の CHO-h5-HT_{1A} 細胞膜溶液 (60–92 μg protein/ml) と 20 μl の 40 nM [³H]8-OH- DPAT (この溶液は 0.1% ascorbic acid、0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) および 10 mM MgSO₄ を含有する pH 7.4 の Tris-HCl で調整) と共に 25°C で 60 分間インキュベーションした。非特異的結合は 10 μM の metergoline を用いて決定した。インキュベーション後、5-HT_{1A} 受容体リガンド複合体は cell harvester (Brandel MLR-48, Skatron Micro-96, PerkinElmer) により Whatman GF/B filter で急速ろ過し単離した。トラップした放射性複合体は、3 ml の氷冷した 50 mM Tris-HCl 溶液で 4 回リンスした後、乾燥した。乾燥フィルターにトラップした放射活性 (カウント/分、cpm) は、液体シンチレーションカウンター (PerkinElmer) で測定した。特異的結合は全結合から非特異的結合を差し引き、次式にて阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1-(c-a)/(b-a)] \times 100$$

“a”は非特異的結合の平均 cpm 値、“b”は全結合の平均 cpm 値、“c”は被験物質存在下での平均 cpm 値を示す。

1.3. 5-HT_{1A} 受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト評価 : [³⁵S]GTPγS 結合試験法

GM の 5-HT_{1A} 受容体に対する [³⁵S]GTPγS 結合性は既報⁴⁹⁾に記載した方法に従った。0.42 μl の GM 溶液 (50% DMSO 溶液で調整) または溶媒を 50 μl の CHO-h5-HT_{1A} 膜溶液 (25–30 μg protein/ml) と 25 μl の 10 μM GDP (この溶液は 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT および 1 mM EDTA を含有する pH 7.4 の 20 mM HEPES 緩衝液で調整) と共に 30°C で 20 分間プレインキュベーションし、さらに wheat germ agglutinin-coated scintillation proximity assay beads (PerkinElmer) を加えた後、同一温度で 60 分間インキュベーション

した。結合反応は混合液中に 10 μ l の 3.3 nM [35 S]GTP γ S を加え開始し、その放射活性は 30 分間インキュベーションの後に液体シンチレーションカウンター（MicroBeta, PerkinElmer）で測定した。非特異的結合は 100 μ M GTP γ S を用いて求めた。被験物質による [35 S]GTP γ S 結合率は 5HT $_{1A}$ 受容体のフルアゴニストである 5-HT の 300 nM 濃度での結合率と比較した。

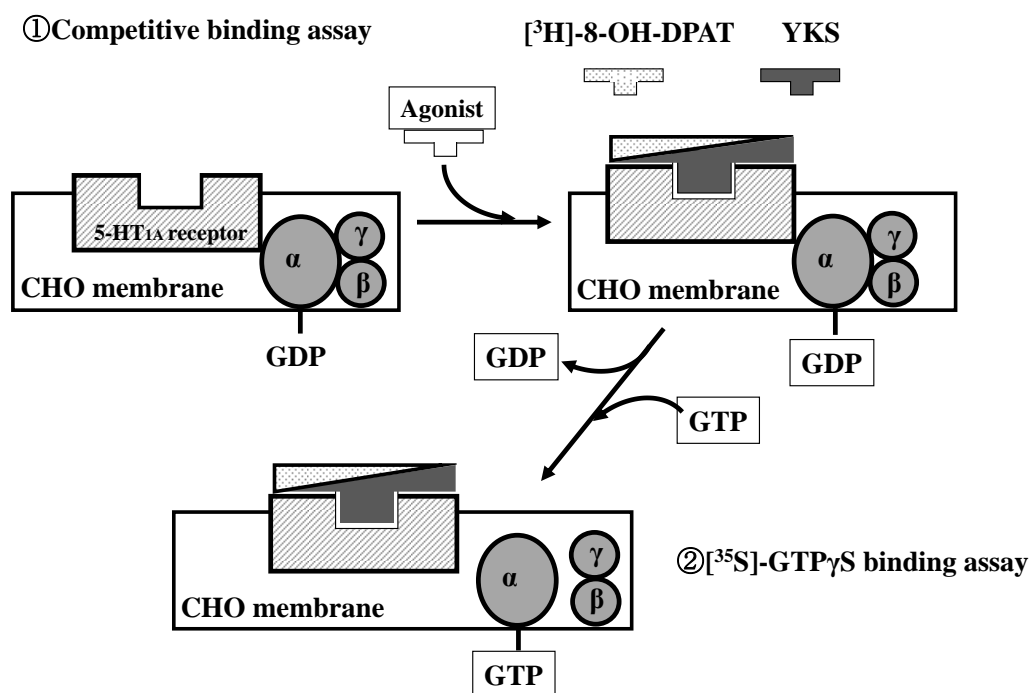


図 19 5-HT $_{1A}$ 受容体結合とアゴニスト/アンタゴニスト活性の測定原理。競合的結合試験では被験物質が受容体に結合すると放射性リガンドの結合が抑制される。即ち、放射性リガンド結合の抑制程度が被験物質の結合性として示される。 [35 S]GTP γ S 結合試験では受容体に結合した被験物質がアゴニストとして作用すると受容体と連結する G 蛋白ヘテロ三量体の α サブユニットに結合している GDP と GTP の交換が生じる。測定系ではこの GTP のラベル体 [35 S]GTP γ S の結合を測定することによりアゴニスト作用を評価した。アンタゴニスト作用はあらかじめアゴニストで増加させた [35 S]GTP γ S 結合量の抑制効果を見ることで評価した。

1.4. 統計解析

競合的結合試験と [35 S]GTP γ S 結合試験のデータは duplicate (2 回測定) の平均値で示した。

2. 実験結果

2.1. GM の 5-HT_{1A} 受容体に対する結合性

5-HT_{1A} 受容体への³H] 8-OH-DPAT 結合に対する 7 種 UH アルカロイド成分の *in vitro* 競合的結合試験の結果を図 20 に示した。GM (0.01-100 μ M) は他の 6 成分と比較して、濃度依存的に³H]8-OH-DPAT の 5-HT_{1A} 受容体結合を強く阻害した。GM の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) および阻害定数 (K_i) 値はそれぞれ 0.904 μ M および 0.517 μ M と推定された。

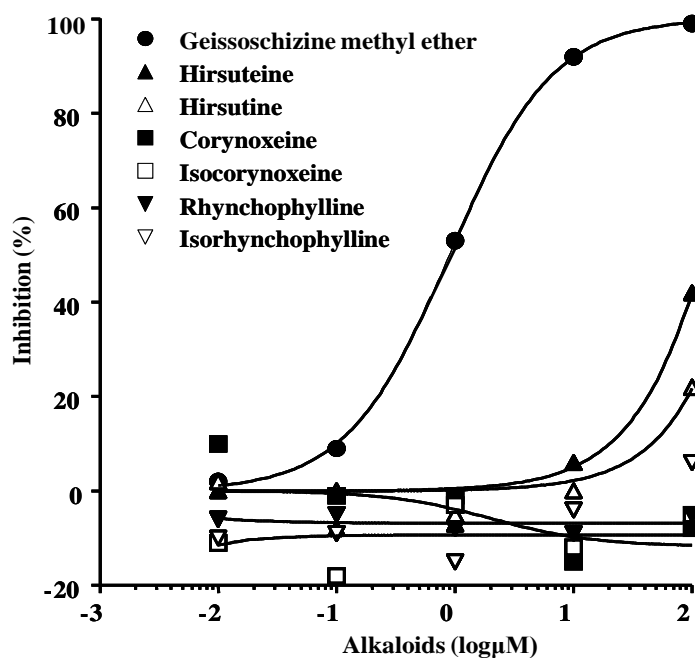


図 20 5-HT_{1A} 受容体に対する UH アルカロイド 7 成分の *in vitro* 競合的結合試験。各成分の競合的結合は、5-HT_{1A} 受容体に対する³H] 8-OH-DPAT 結合阻害率により算出した。各値は二回測定の前平均値で示した。

2.2. GMの5-HT_{1A}受容体に対するアゴニスト/アンタゴニスト活性

5-HT_{1A}受容体に対するGMのアゴニスト効果を明らかにするために、^[35S]GTPγSの*in vitro*結合試験を行った(図21)。^[35S]GTPγS結合はGM(0.1–100μM)またはフルアゴニストである5-HT(1–300nM)により濃度依存的に増加した。しかし、GMの結合率は5-HTの約40%でプラトーに達した。

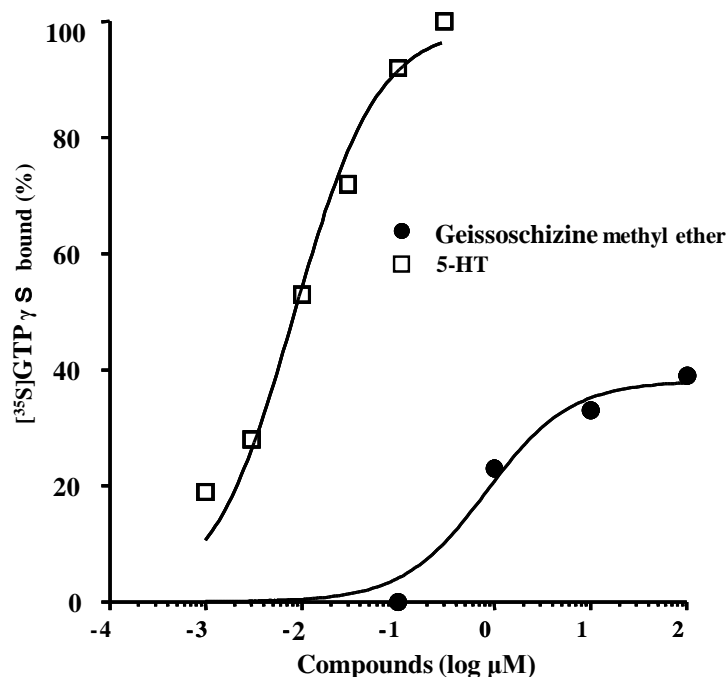


図21 5-HTとGMの5-HT_{1A}受容体に対する^[35S]GTPγSの*in vitro*結合試験。5-HTは、完全アゴニストとして使用した。各値は二回測定の前平均値で示した。

3. 小括

UHの7種アルカロイド成分の内、インドールアルカロイド成分GMにYKSやUHと同様の5-HT_{1A}受容体に対する強い結合性とパーシャルアゴニスト活性が認められた。

第 2 節

5-HT₇受容体に対する作用

第 1 節では YKS の 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト活性が UH 成分の GM であることを証明した。

GM はインドールアルカロイドであり、その構造は神経伝達物質であるセロトニンと類似する。セロトニン受容体には多様なサブタイプ（少なくとも 7 ファミリー）が存在する。そこで、著者はこれらサブタイプに対する GM の結合性をスクリーニングしたところ、5-HT₇ 受容体に対し 5-HT_{1A} 受容体に勝るとも劣らない強い結合性があることを見出した。

この情報を受け、Ueda らは、*in vitro* カルシウムイメージング解析を用いて、GM が 5-HT_{1A} 受容体のパーシャルアゴニスト作用の他に 5-HT₇ 受容体の強力なアンタゴニスト作用を有することを証明した^{118,119}。5-HT₇ 受容体は G α と共役することでアデニル酸シクラーゼを活性化しセカンド・メッセンジャーである cAMP を増大させる G タンパク共役型受容体である¹²⁰。この受容体は細胞内のカルシウムイオンの動員 ([Ca²⁺]_i) 系には連動していない。すなわち、イノシトール三リン酸を活性化しカルシウム動員を促す 5-HT₂ 受容体のような G α_q とリンクした G タンパク共役型受容体とは異なる¹²¹。従って、カルシウム動員の変化によって 5-HT₇ 受容体の活性化を評価することは一般的には不可能である。しかし、Ueda らはヒト 5-HT₇ 受容体を発現させたヒト胎児由来腎臓(HEK)293T 細胞に G α_{i5} を遺伝子導入することによりカルシウム流入に連結させるという新たな方法を開発し評価した^{118,119}。この方法はあらゆる受容体活性をカルシウムイメージングという形で評価することができる反面、被験物質の受容体結合率を求めることができない。また本来細胞に備わっているシグナル伝達系での評価ではないため、その結果の信頼性が問われた。G α_s や G α_i とリンクする G タンパク共役型受容体を直接的かつ絶対的に評価をするには GTP 結合やセカンド・メッセンジャーである cAMP を測定することが最も適した方法である。

また、UH は GM に加えて、hirsuteine (HTE), hirsutine (HIT), rhynchophylline (RP), isorhynchophylline (IRP), corynoxine (CX) および isocorynoxine (ICX) のような GM に類似した様々なインドールおよびオキシインドールアルカイドを含んでいるが、5-HT₇ 受容体

に対するこれらのアルカロイドの作用は、未だ明らかになっていない。

そこで、本節では GM を含めた 7 種 UH アルカロイド成分の 5-HT₇ 受容体に対する作用を本来の細胞内 G 蛋白/cAMP 産生系を用いた直接的な検証を試みた。この課題を解決するために、ヒト組換え 5-HT₇ 受容体を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣細胞膜 (CHO-h5-HT₇ 細胞膜) を用いた競合的結合試験を最初の実施し受容体結合性を明確にした。次に、5-HT₇ 受容体に対するこれら被験物質のアゴニスト/アンタゴニスト作用をヒト組換え 5-HT₇ 受容体の安定発現 HEK293 細胞を用いた細胞内 cAMP 量を測定することによって検証した。

1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

1.1.1. UH アルカロイド

GM, HTE, HIT, RP, IRP, CX, および ICX は株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部より提供された。これら成分の構造式は前節の図 17、18 に示した。

1.1.2. 競合的結合試験用試薬

CHO-h5-HT₇ 細胞膜およびは放射性リガンド [³H]-lysergic acid diethylamide (LSD) (NET638 80 Ci/mmol) は PerkinElmer (Waltham, MA, USA) より購入した。結合試験に用いたその他の試薬は市販されている特級を用いた。

1.1.3. HEK293-h5-HT₇ 細胞作製用試薬

Ultimate Human ORF clone の一つである全長をコードした 5-HT₇ 受容体プラスミド (ID:IOH45473) , 発現ベクター (pcDNA6.2/c TC-Tag-DEST) , Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) , Lipofectamin2000 Transfection Reagent および Blasticidin S は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より購入した。HEK293 細胞は American Type Culture Collection (ATCC: Manassas, VA, USA) より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は JRH Bioscience (Lenexa, KS, USA) より購入した。

1.1.4. 細胞内 cAMP 測定試薬

cAMP-Glo assay kit は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。DMEM と透析 FBS は Life Technologies より購入した。96-well 組織培養プレートは BD Bioscience (San Jose, CA, USA) より購入した。Isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), 4-(3-butoxy-4-methoxy-benzyl)imidazolidone (Ro 20-1724), 5-HT, forskolin および SB-26997 は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。

1.2. 5-HT₇ 受容体に対する競合的結合試験

種々濃度の被験化合物 (GM, HTE, HIT, RP, IRP, CX および ICX) 溶液は 1.0% dimethyl sulfoxide (DMSO) で調整した。5-HT₇ 受容体競合的結合試験は既報に記載された方法で行った^{122,123}。すなわち、2 μl の被験溶液またはその溶媒を 200 μl の CHO-h5-HT₇ 細胞膜溶液 (130 μg protein/ml) とインキュベーションバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid: EDTA, 10 mM MgCl₂) で溶解した 20 μl の 40 nM LSD (NET638 80 Ci/mmol) を 25°C で 120 分間インキュベーションした。試験は duplicate で行った。非特異的結合は 10 μM の 5-HT を用いて決定した。インキュベーション後、5-HT₇ 受容体リガンド複合体は cell harvester (Filter Mate Universal Harvester, PerkinElmer) により Whatman GF/C filter で急速ろ過し単離した。トラップした放射性複合体は氷冷した 50 mM Tris-HCl 溶液で 4 回洗浄した後、乾燥した。乾燥フィルターにトラップした放射活性 (カウント/分、cpm) は液体シンチレーションカウンター (Top CountNXT, PerkinElmer) で測定した。特異的結合は全結合から非特異的結合を差し引いて算出した。その後、以下の式を用いて阻害率 (%) を求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1-(c-a)/(b-a)] \times 100$$

“a”は非特異的結合の cpm 平均値、“b”は全結合の cpm 平均値、“c”は被験物質存在下での cpm 平均値を表す。被験物質の IC₅₀ 値 (特異的結合の 50% 阻害濃度) は MathIQTM (IDBusiness Solutions Ltd., Guildford, UK) を用い、非線形最小二乗法によって算出した。

1.3. HEK293-h5-HT₇細胞の構築

HEK293-h5-HT₇細胞の構築手順の概要を図22に示した。全長をコードしたヒト5-HT₇受容体遺伝子(プラスミド)は Gateway Technology^{124,125)}を用いて哺乳類発現ベクターpcDNA6.2/cTC-Tag-DESTに移し変えた。次いでLipofectamin 2000 Transfection Reagentを用いて5-HT₇受容体発現プラスミドをHEK293細胞に導入し、10% FBSを添加したDMEMで培養した。24時間培養後、遺伝子を導入した細胞に8 μg/ml Blasticidin Sを添加し、直径10 cmディッシュで2週間培養した。Blasticidin S耐性細胞よりなるコロニーを単離・増殖し、5-HTによってcAMPを産生する5HT₇受容体安定発現株細胞をcAMP-Glo Assay kitを用いてスクリーニングした。上記方法によって得られたHEK293-h5-HT₇細胞は8 μg/ml Blasticidin S存在下で培養することによって維持した。これらの細胞を5-HT₇受容体に対する被験化合物のアゴニスト/アンタゴニスト試験に用いた。

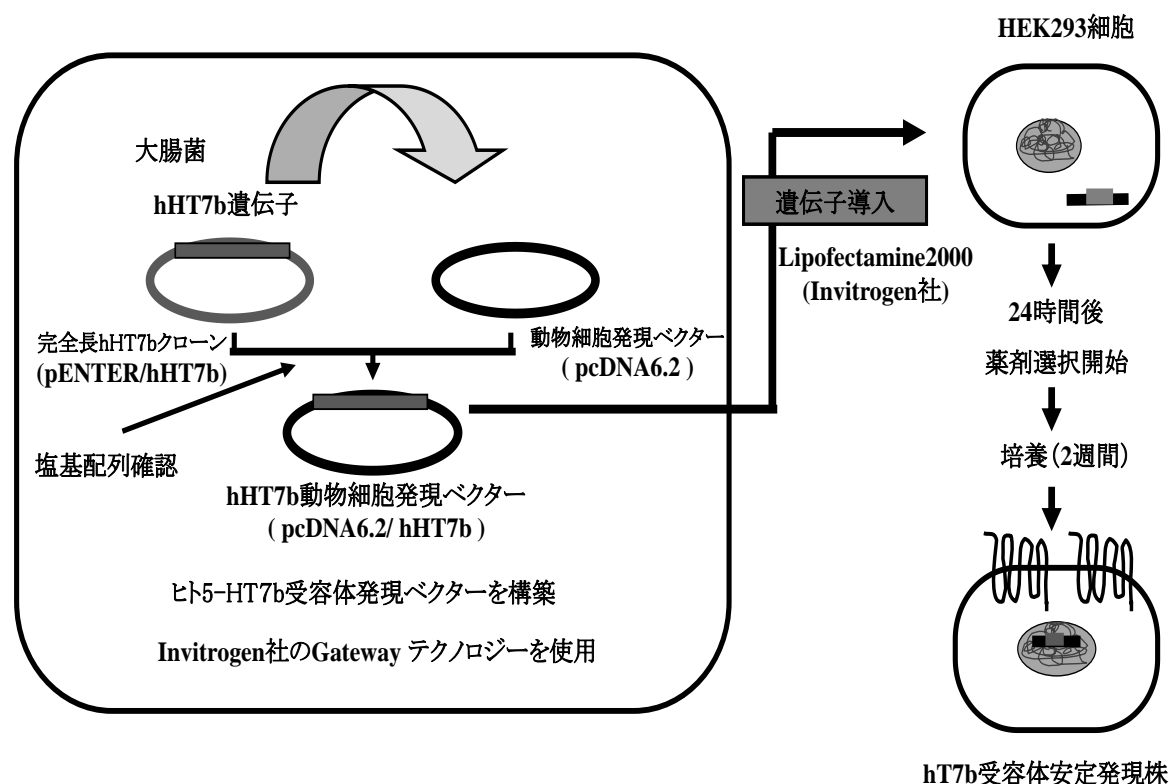


図 22 HEK293-h5-HT₇細胞の構築手順の概要

1.4. 5-HT₇受容体に対する被験化合物のアゴニスト/アンタゴニスト試験

HEK293-h5-HT₇細胞は0.5%透析FBS添加DMEMを用いて4000 cel/wellとなるように96-well 組織培養プレートに播種した。翌日、5-HT₇受容体に対する化合物のアゴニスト/アンタゴニスト試験を細胞内cAMP測定により評価した。cAMP測定はcAMP-Glo assay kitの使用説明書に従った¹²⁶⁾。

即ち、アゴニスト試験では、培地を除いた後、500 μMのIBMXと100 μM Ro 20-1724 (cAMP加水分解酵素・ホスホジエステラーゼ阻害剤)を含む20 μLの誘導緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水:PBS)と様々な濃度の被験化合物溶液を添加し30分間室温でインキュベーションした。インキュベーション後、20 μLのcAMP-Glo溶解緩衝液と40 μLのプロテインキナーゼA(PKA)を含んだcAMP検出溶液を加え、室温で20分間インキュベーションした。80 μLのルシフェリン・ルシフェラーゼからなるKinase-Glo試薬を加え、混合液を室温でさらに10分間インキュベーションした。発光強度はInfinite M200プレートリーダー(Tecan, Grodig, Austria)を用いて測定した。

被験化合物のアンタゴニスト試験は5-HT誘発cAMP産生の抑制により評価した。即ち、上記と同じ方法でHEK293-h5-HT₇細胞を被験化合物と100 nM 5-HTの混合物と一緒にインキュベーションした。もし被験物質がアンタゴニスト作用を示すなら細胞の5-HT誘発cAMP増加は抑制される。この測定原理を図23に示す。リガンドがG蛋白を介しcAMPを産生すると、cAMPがPKAを活性化させ、活性化したPKAは基質をリン酸化しATPを減少させる。ルシフェリン/ルシフェラーゼ活性によって生じる発光強度はATP量に依存するので、cAMP産生は発光強度の減少をもたらす。このように発光強度とcAMP産生量は逆相関を示す。従って、もし被験化合物がアゴニスト活性を示せばcAMP量が増加し発光強度は減少する。逆に、被験化合物がアンタゴニスト活性を示せば5-HTで誘発されるcAMP量の増加は抑制され発光強度が増加する。

1.5. 統計解析

競合的結合試験のデータはduplicate測定の平均値で示した。他のデータは平均値 ± 標準誤差(mean ± S.E.M)で示した。群間の統計的有意性はOne-way analysis of variance (ANOVA) 検定を行った後のScheffe's testにより評価した。統計解析の有意水準はP<0.0001とした。

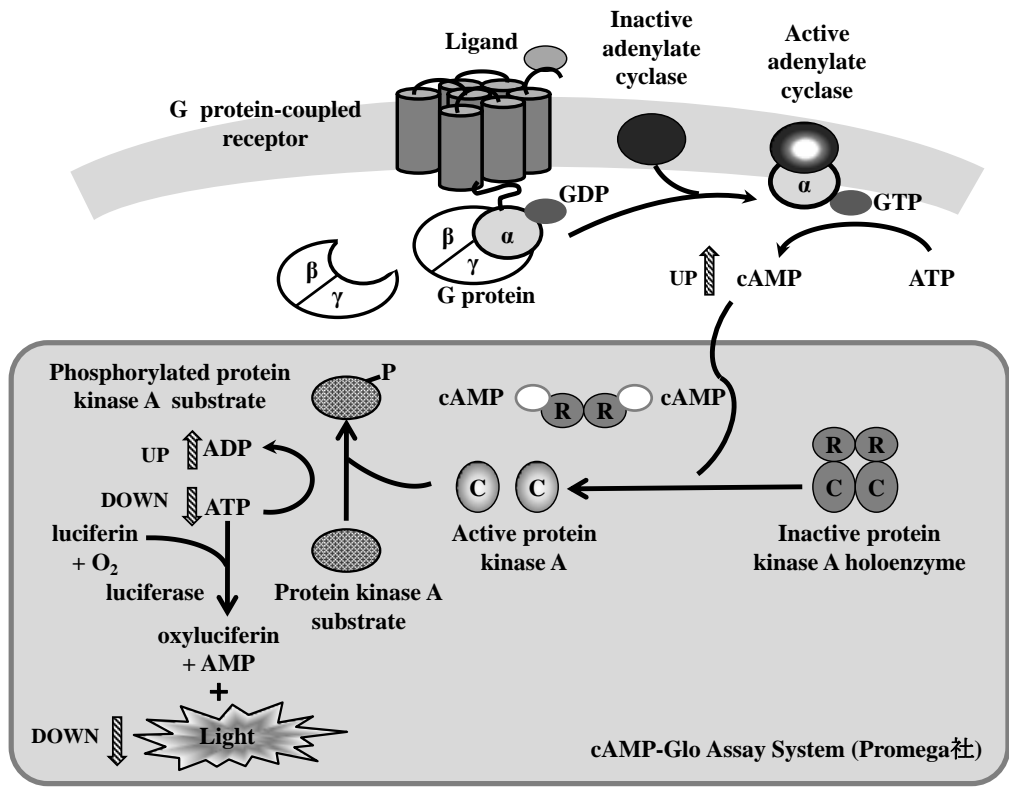
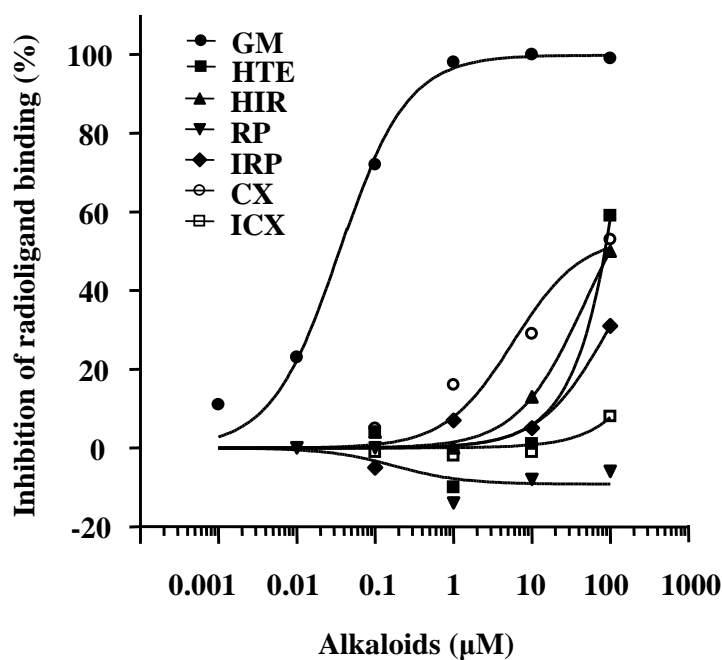


図 23 細胞内 cAMP の測定原理

2. 実験結果

2.1. 5-HT₇受容体に対する7種UH成分の結合性

図24に5-HT₇受容体に対する放射性リガンド[³H]LSDと7種UH成分の競合的結合試験における用量依存曲線およびIC₅₀値を示した。RP、IRPおよびICX以外のアルカロイドは、濃度依存的に放射性リガンドの5-HT₇受容体への結合を阻害した。GMが最も高い親和性を示し(IC₅₀=0.034 μM)、続いてCX、HTEおよびHITであった。しかし、後者成分のIC₅₀値(CX: 75.6 μM, HTE: 84.7 μM, HIT: 99.0 μM)はGMに比べ著しく低かった。一方、RP、IRPおよびICXは5-HT₇受容体に対する放射リガンドの結合を阻害しなかった。従って、これらの成分のIC₅₀値は100 μMの範囲において算出不可能であった。



IC₅₀ values of UH components

Component	GM	HTE	HIT	RP	IRP	CX	ICX
IC ₅₀ (μM)	0.034	84.7	99.0	-	-	75.6	-

図24 5-HT₇受容体に対するUHアルカロイド7成分の*in vitro*競合的結合試験。各成分の競合的結合は、CHO細胞膜の5-HT₇受容体に対する[³H]LSD結合阻害により算出した。各値は二回測定の平均値で示した。IC₅₀値は非線形最小二乗法(MathIQTTMソフト)によって算出した。-: RP、IRPおよびICXのIC₅₀は100 μMの範囲内で測定不能だった。

2.2. HEK293-h5-HT₇細胞の cAMP 産生に対する 5-HT とフォルスコリンの作用

5-HT₇ 受容体に対する 7 種 UH 成分のアゴニスト/アンタゴニスト作用を HEK293-h5-HT₇細胞を用いて検討した。図 25 にはセロトニン (1、10、100 nM) および フォルスコリン (3、10、30 μM) の作用を示した。フォルスコリンは直接アデニルシクラーゼを活性化し cAMP 量を増加させることが多種多様な細胞で報告されている物質である¹²⁰⁾。フォルスコリンは非遺伝子導入 HEK293 細胞 (non-receptor-expressing cells) および遺伝子導入 HEK293-h5-HT₇ (5-HT₇受容体発現細胞) のいずれに対しても cAMP 産生に伴う発光強度の減少が認められた。しかし、5-HT は非遺伝子導入 HEK293 細胞に対し有意な変化を認めなかったが (図 25A)、5-HT₇受容体発現細胞では (図 25B) フォルスコリンと同様な発光強度の濃度依存的減少 (cAMP 産生増加) が認められた。

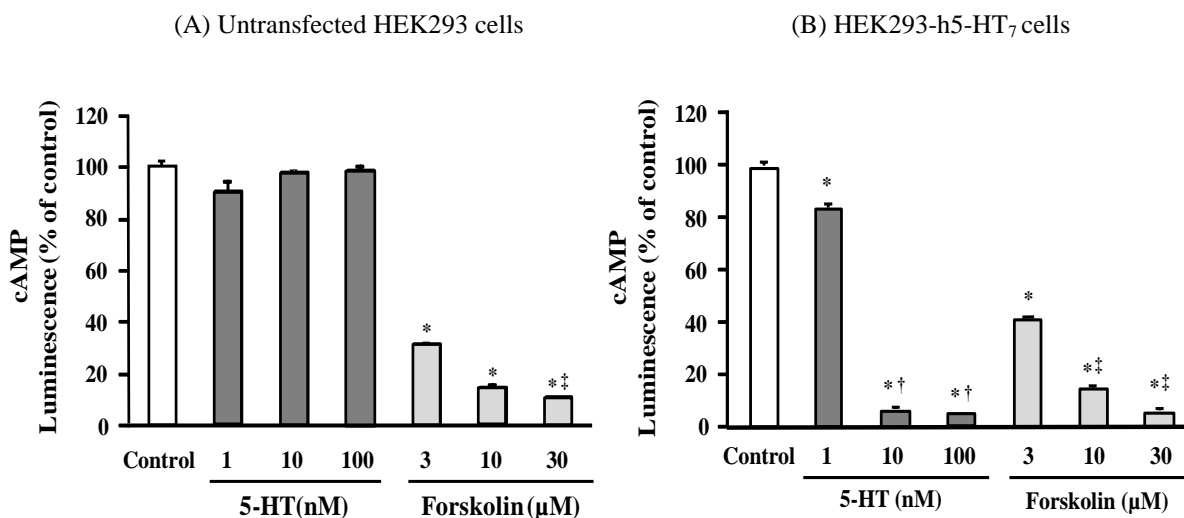


図 25 非遺伝子導入細胞 (A) およびヒト 5-HT₇受容体遺伝子導入 HEK293 細胞 (HEK293-h5-HT₇細胞) (B) における細胞内 cAMP 量に対するフォルスコリンと 5-HT の作用。この試験では、cAMP は PKA 基質をリン酸化し ATP を減少させる。ルシフェリン/ルシフェラーゼ活性によって生じる発光強度は ATP 量に依存するので、cAMP 産生は発光強度の減少をもたらす。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n=3)。* $P < 0.0001$ はコントロールに対する有意性、† $P < 0.0001$ は 1 nM 5-HT に対する有意性、‡ $P < 0.0001$ は 3 nM フォルスコリンに対する有意性を示す (one-way ANOVA + Scheffé's test)。

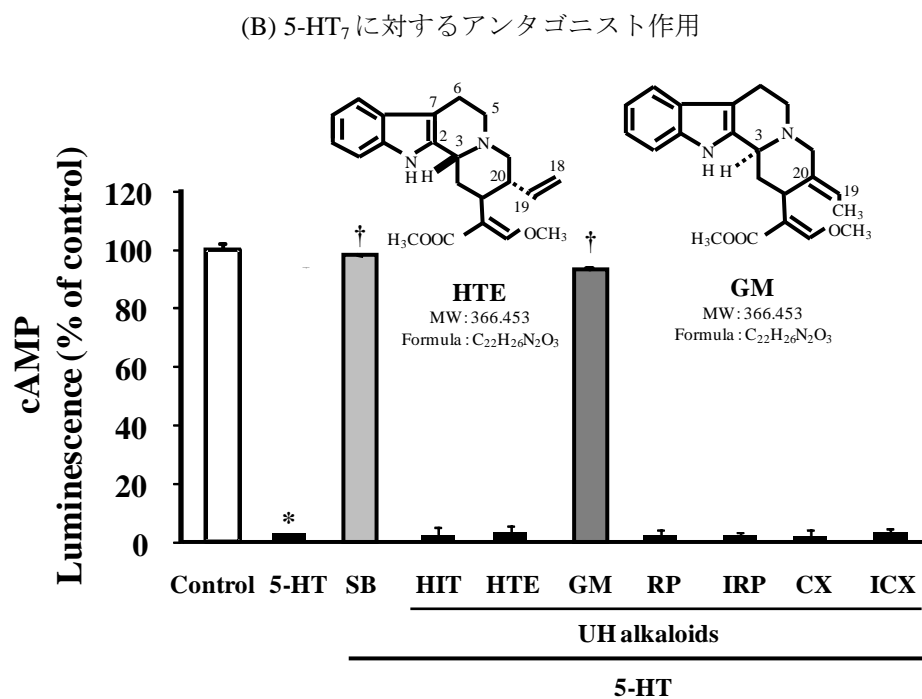
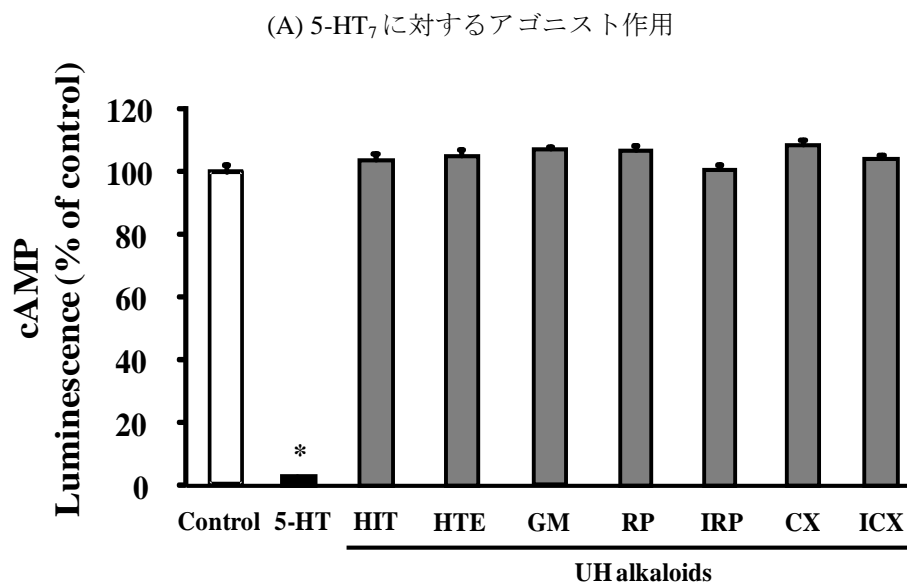


図 26 UH アルカロイド 7 成分のアゴニスト (A) およびアンタゴニスト (B) 作用。これらの作用は HEK293-h5-HT₇ 細胞における細胞内 cAMP 量の測定で検討した。この試験では、cAMP は PKA 基質をリン酸化し ATP を減少させる。ルシフェリン/ルシフェラーゼ活性によって生じる発光強度は ATP 量に依存するので、cAMP 産生は発光強度の減少をもたらす。各成分の作用は全て同一濃度 (100 nM) で検討した。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。*P < 0.0001 はコントロールに対する有意性、†P < 0.0001 は 5-HT に対する有意性を示す (one-way ANOVA + Scheffé's test)。
【略名】 SB : SB-269970、GM : ガイソジジンメチルエーテル、HIT : ヒルスチン、HTE : ヒルスチン、RP : リンコフィリン、IRP : イソリンコフィリン、CX : コリノキセイン、および ICX : イソコリノキセイン。

2.3. 5-HT₇受容体に対する UH アルカロイド成分のアゴニスト/アンタゴニスト作用

図 26 には 7 種 UH アルカロイドの 5-HT₇受容体 (HEK293-h5-HT₇ 細胞使用) に対するアゴニスト/アンタゴニスト作用について 50 μM 固定濃度で検討した結果を示した。5-HT (100 nM) の添加によって発光強度は減少 (cAMP 産生に対するアゴニスト作用) したが、7 種のアルカイドは発光強度に影響を与えなかった (図 26A)。アンタゴニスト作用は 5-HT (100 nM) 誘発-発光強度減少 (cAMP 産生) に対する作用で調べた。その結果、GM だけが 5-HT₇ 特異的アンタゴニスト SB-269970 (1 μM) と同じように、この 5-HT 誘発-発光強度減少を有意に増加させた (図 26B)。

GM (0.1-100 μM) のこの作用には濃度依存性が認められた (図 27)。すなわち、この結果は GM が 5-HT で誘発した cAMP 産生を阻害したこと (アンタゴニスト作用を持つこと) を示した。その IC₅₀ 値は、6.0 μM であった。

一方、遺伝子を導入していない HEK293 細胞では、7 種のアルカロイドは発光強度に影響を与えなかった(データは示していない)。

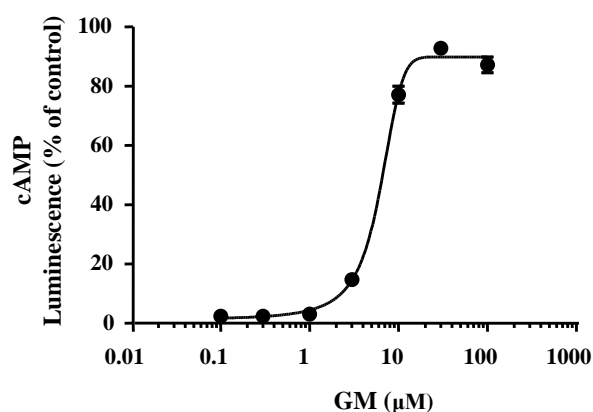


図 27 5-HT₇ 受容体に対する GM の濃度依存性アンタゴニスト作用。これらの反応は、HEK293-h5-HT₇ 細胞における細胞内 cAMP 量の測定で検討した。この試験では、cAMP は PKA 基質をリン酸化し ATP を減少させる。ルシフェリン/ルシフェラーゼ活性によって生じる発光強度は ATP 量に依存するので、cAMP 産生は発光強度の減少をもたらす。各値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。

3. 小括

本節では GM が 5-HT₇ 受容体に対しアンタゴニスト作用を示すことをヒト 5-HT₇ 受容体安定発現 CHO 細胞膜の競合的受容体結合試験と 5-HT₇ 受容体安定発現させたヒト胎児腎 HEK293 細胞の cAMP 測定により直接的に証明した。

考察

第1章ではAPP-Tgマウスと隔離飼育マウスの2種の動物モデルを用いて抑肝散の精神行動改善効果の作用機序の一つに5-HT_{1A}受容体の活性化作用が関与しており、その作用機序には構成生薬のチョウトウコウ(UH)が寄与していることを示唆した。この結果は「抑肝散が5-HT_{1A}受容体にパーシャルアゴニストとして作用し、その作用をUHが担っている」という*in vitro*試験の結果とよく一致した⁴⁹⁾。これらの結果は同時にUHには5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を担う活性成分が含まれていることを強く示唆した。そこで、本章ではUHに含まれる主要なアルカロイド7成分を対象に*in vitro*試験による活性成分の探索を行った。

本章第1節では、UHアルカロイド成分の5-HT_{1A}受容体に対する結合性を明らかにするため、ヒトの5-HT_{1A}受容体を安定発現させたCHO細胞膜(CHO-h5-HT1A)を用いた*in vitro*結合試験を行った。この結合試験において、GMは他の成分に比べ5-HT_{1A}受容体に対する放射性リガンドの結合を濃度依存的に強く抑制した。この結果は放射性リガンドと競合してGMが5-HT_{1A}受容体に結合したことを示唆する。そこで、GMの5-HT_{1A}受容体に対する結合特性(アゴニスト/アンタゴニスト作用)を調べるために、CHO-h5-HT1A細胞膜を用いた[³⁵S]GTP結合試験を行った。Gタンパク質共役型受容体へのアゴニスト結合は、ヘテロ三量体Gタンパクのαサブユニットに結合しているGDPとGTPの交換を促す¹²⁷⁾。非加水分解アナログである[³⁵S]GTPγSは、Gタンパク質共役型受容体に対する被験物質の本質的活性、すなわちアゴニスト/アンタゴニスト活性の評価に用いられている^{128,129)}。完全アゴニストである5-HTは、濃度依存的に[³⁵S]GTPγS結合を増加した。この結合増加は5-HT_{1A}受容体アンタゴニストであるWAY-100635によって拮抗されることから⁴⁹⁾、5-HT誘発[³⁵S]GTPγS結合増加は5-HT_{1A}受容体アゴニスト活性を介していることが推察された。GMは[³⁵S]GTPγS結合の増加を誘発し、その最大結合率はフルアゴニストである5-HTの約40%だった。この結果は、GMが5-HT_{1A}受容体に対し部分的(パーシャル)アゴニストであることを示唆した。更に、この結果はGMを含有するUH、およびUHを含有するYKSの結合様式と全く同じであった⁴⁹⁾。これらの結果から、YKSの5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用はUH成分のGMが担っていることが示唆された。

第2節では1節で同定したGMが5-HT_{1A}受容体に勝るとも劣らない5-HT₇受容体結合

性を示し、アンタゴニストとして作用することを証明した。

CHO-h5-HT₇細胞を用いた競合的結合試験では、GMが他の6つのアルカロイドに比べ5-HT₇受容体に対して放射性リガンドの結合を強く阻止した。この結果はGMが5-HT₇受容体に強く結合することを示唆した。第2節の成果は、Gタンパク共役受容体である5-HT₇受容体に対しUHアルカロイドの相対的な効力を示した最初の研究である。この受容体はGs蛋白を介してアデニル酸シクラーゼ活性を活性化する^{130,131})。5-HT₇受容体の薬理的結合特性として、5-HT₁受容体アゴニスト(5-カルボキシトリプタミン:5-CT、5-HT、8-ヒドロキシ-2-ジ-n-プロピルアミノテトラリン:8-OH-DPAT)や5-HT₂受容体アンタゴニスト(リタンセリン、メテルゴリンン、メスレルギン、リスペリドン)なども高い親和性を持つことが報告されている^{132,133,134,135})。GMも第1節で示したように5HT_{1A}受容体に対し(パーシャル)アゴニスト作用を示す³¹)。また、GMは5-HT_{2A}受容体に対しアンタゴニスト作用を有することがUedaらにより報告されている¹¹²)。これらの知見もGMが5-HT₇受容体に対し高い親和性を持つことを支持する。

GMを含むUHアルカロイドのアゴニスト・アンタゴニスト作用を調べるために、これらの作用をヒト組換え5-HT₇受容体を安定発現させたHEK293-h5-HT₇細胞の細胞内cAMP測定により直接的に評価した。図27Aで示したように、フォルスコリンは非遺伝子導入細胞の細胞内cAMP産生を誘導したが、5-HTではそのような誘導は認められなかった。この結果は、HEK293細胞は5-HT₇受容体を発現していないが、cAMPを産生するためのGs-AC複合体を本来備えていることを示唆した。一方、図27Bに示したように、5-HTは5-HT₇受容体発現細胞において細胞内cAMPを産生した。この結果はGs-AC複合体と5-HT₇受容体を連結した本節での遺伝子導入手法が適切であったことを示唆する。5-HT₇受容体発現細胞では、UHの7種アルカロイドのうちGMのみがアンタゴニスト作用を示した。GM、HTEおよびHITはインドールアルカロイドである。一方、RP、IRP、CXおよびICXはオキシインドールアルカロイドでありインドールアルカロイド構造の五員環のC2位でカルボニル基を有している。このようにオキシインドール構造になるとその成分は全くアンタゴニスト活性を示さないことが判る。興味深い点は、GMと同じインドールアルカロイドで化学組成が同じヒルス테인(HTE:C₂₂H₂₆N₂O₃)に全く活性がなく、GMに強いアンタゴニスト活性が認められたことである。図26に示したように、両者はC₃の立体配置とC₂₀の側鎖が異なっている(GMはC₁₉₋₂₀、HTEはC₁₈₋₁₉が二重結合)。特にC₃の立体配置の違いにより分子体全体の立体構造が大きく違うことが5-HT₇受容体への結合や活性に関係していると思われる。同様のことが1節で述べた5-HT_{1A}受容体結

合にも認められ、今後、受容体結合と構造相関を研究するための手掛かりになると思われる。

GM のアンタゴニスト作用はフォルスコリンのようなアデニレートシクラーゼに対する直接作用ではない。なぜなら、遺伝子導入をしていない 5-HT₇ 受容体非発現細胞では、アゴニスト/アンタゴニスト作用が全く認められなかったからである。すなわち、5-HT 誘発 cAMP 産生における GM のアンタゴニスト作用は 5-HT₇ 受容体を介した特異的作用と考えられる。

5-HT₇ 受容体の生理学的機能は完全には理解されていない。しかし、数種類の摘出血管を用いた研究において、血管の弛緩^{122,136)}や概日リズム制御^{137,138)}への関与が示唆されている。Hedlund & Sutcliffe も 5-HT₇ 受容体が、体温調節、概日リズム、学習および記憶、海馬のシグナリング、睡眠などに対し重要な機能的役割を担っていることを示唆している¹³¹⁾。さらに、クロザピンやリスペリドンのような非定型抗精神病薬、およびいくつかの抗うつ薬は 5-HT₇ 受容体に対しアンタゴニストとして高い親和性を示す。これらの知見から、この受容体のアンタゴニスト作用は抗精神病作用あるいは抗うつ作用に関わっている可能性が推察される^{130,134,139,140)}。抑肝散やその成分もまた単離したラット胸部大動脈における強力な血管弛緩作用¹³⁵⁾やヒトの概日リズムと関わる REM 睡眠改善作用¹⁴²⁾を示す。抑肝散とその成分である GM は隔離飼育によって誘発されるマウスの攻撃行動および社会的行動・不安行動を改善する³¹⁾。抑肝散のこのような作用は、第 1 節で述べた GM の 5-HT_{1A} パーシャルアゴニスト作用による Gi 蛋白活性化を介した細胞内 cAMP 産生抑制作用によるためと推察される。第 2 節では、GM が Gs タンパク質共役型 5-HT₇ 受容体を抑制することによって細胞内 cAMP 産生を減少させることを示した。今後より詳細な研究が必要であるが、本章で得られた結果は GM の 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用と 5-HT₇ 受容体アンタゴニスト作用の相加・相乗作用が抑肝散の薬理効果に関与している可能性を示唆した。

以上、第 2 章（第 1 節および 2 節）の *in vitro* 試験の結果から、著者は UH アルカロイド成分の GM が抑肝散の薬効薬理機序を担う活性成分の一つである可能性を強く示唆した。

第3章

ガイソシジンメチルエーテルの血液脳関門透過性

はじめに

第1章では動物モデルを用いて薬効薬理評価 (*in vivo* 試験) を行い、抑肝散 (YKS) の中核および BPSD 改善作用にチョウトウコウ (UH) が寄与していること示唆した。第2章、*in vitro* 試験では UH 成分の GM が 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニストおよび 5-HT₇ 受容体アンタゴニスト作用の活性成分として寄与していることを示した。本章ではこの *in vivo* と *in vitro* の結果を連結するため、GM の血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) 透過性について検討した。

YKS (経口剤) の作用は中枢作用である。第1章の薬効が第2章で証明した活性成分 GM の作用機序によるものであるなら、経口投与された YKS 中の GM が血中に移行し、BBB を通過し脳内に達しなければならない。これを証明することが YKS の薬効/薬理/活性成分を一体化するために非常に重要である

しかし、これまでに GM を含む UH アルカロイド成分の BBB 透過性に関しては全く報告されていない。そこで、著者は UH アルカロイド7成分 (geissoshizine methyl ether: GM, hirsuteine: HTE, hirsutine: HIT, rhynchophylline: RP, isorhynchophylline: IRP, corynoxine: CX, isocorynoxine: ICX) の BBB 透過性を *in vivo* および *in vitro* 実験にて検討した。

第1節では、YKS エキス末中の釣藤鈎アルカロイド成分を定量した。第2節 (*in vivo* 試験) では、1節で確認したアルカロイド成分を含む YKS をラットに経口投与しその血漿および脳からのアルカロイド成分の検出を試みた。第3節 (*in vitro* 試験) では内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを共培養した *in vitro* BBB モデルを用いてアルカロイド成分の BBB 透過性を検討した。

第 1 節

抑肝散中の釣藤鈎アルカロイド成分定量

GM を含む UH アルカロイド成分の BBB 透過性については、これまで全く報告されていない。そこで、UH アルカロイド 7 成分 (GM, HTE, HIT, RP, IRP, CX, ICX) の BBB 透過性を評価するにあたり抑肝散にはどのくらいの該当成分が含まれているかを調べた。

1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

YKS は第 1 章、第 1 節の実験方法「1.2. 薬物および試薬」の項に記載したエキス末を使用した。UH アルカロイド成分 (GM、HTE、HIT、RP、IRP、ICX、CX) は、株式会社ツムラ製剤技術部製剤・品質研究センターより提供された。各化合物の化学構造は第 2 章 1 節に記載した。アルカロイドの定量に用いた試薬は市販されている特級を用いた。

1.2. YKS に含まれる 7 種 UH アルカロイド成分の定量法

YKS (150 mg) を 1.5 ml の methanol/diluted acetic acid (7:3) に懸濁し、US-4 ultrasonicator (Iuchi, Tokyo, Japan) で 10 分間超音波処理した後、SR-1 shaker (Taitec, Tokyo, Japan) で 30 分間振とうした。懸濁液は 3,000 回転/分で 10 分間遠心分離し上清を 5 ml フラスコに分取した。残渣は同様の手順で 2 回抽出し、上澄みを同フラスコに加えた。全上清量を methanol/diluted acetic acid 溶液を用いて 5 ml に調製し、ポリ四フッ化エチレン膜フィルター (Advantec, Tokyo, Japan) でろ過した。ろ液の一部 (25 μ l) を高速液体クロマトグラフィー (LC-10ADVP, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) に注入しアルカロイド成分を測定した。

クロマトグラフィー条件は以下の通りである。カラム : TSK-gel ODS-80TS (4.6 Φ mm x 250 mm long, Tosoh Co., Tokyo, Japan)、移動層 : ammonium acetate buffer containing 25% methanol および 15% acetonitrile、カラム温度: 40°C、流速: 1.0 ml/min、検出器: photodiode array (SPD-M10AVP, Shimadzu Co.) および検出波長: UV 250 nm。

2. 実験結果

2.1. YKS 中の GM 含量

図 28 には YKS メタノール抽出エキスの UV 検出による定性三次元クロマトグラムを示した（社内データ）。メタノールエキス中には UH の 7 種アルカロイドを含む UV 検出成分が 25 種類検出された。本試験ではこの検出条件を参考にして本節「1.3.」記載の方法により YKS に含まれる 7 種 UH アルカロイド成分の濃度を定量した。その結果を表 2 に示した。GM は YKS エキス中に約 0.014% 含まれていた。従って、1.0g の YKS 中には約 140 μ g の GM が含まれていることが判った。

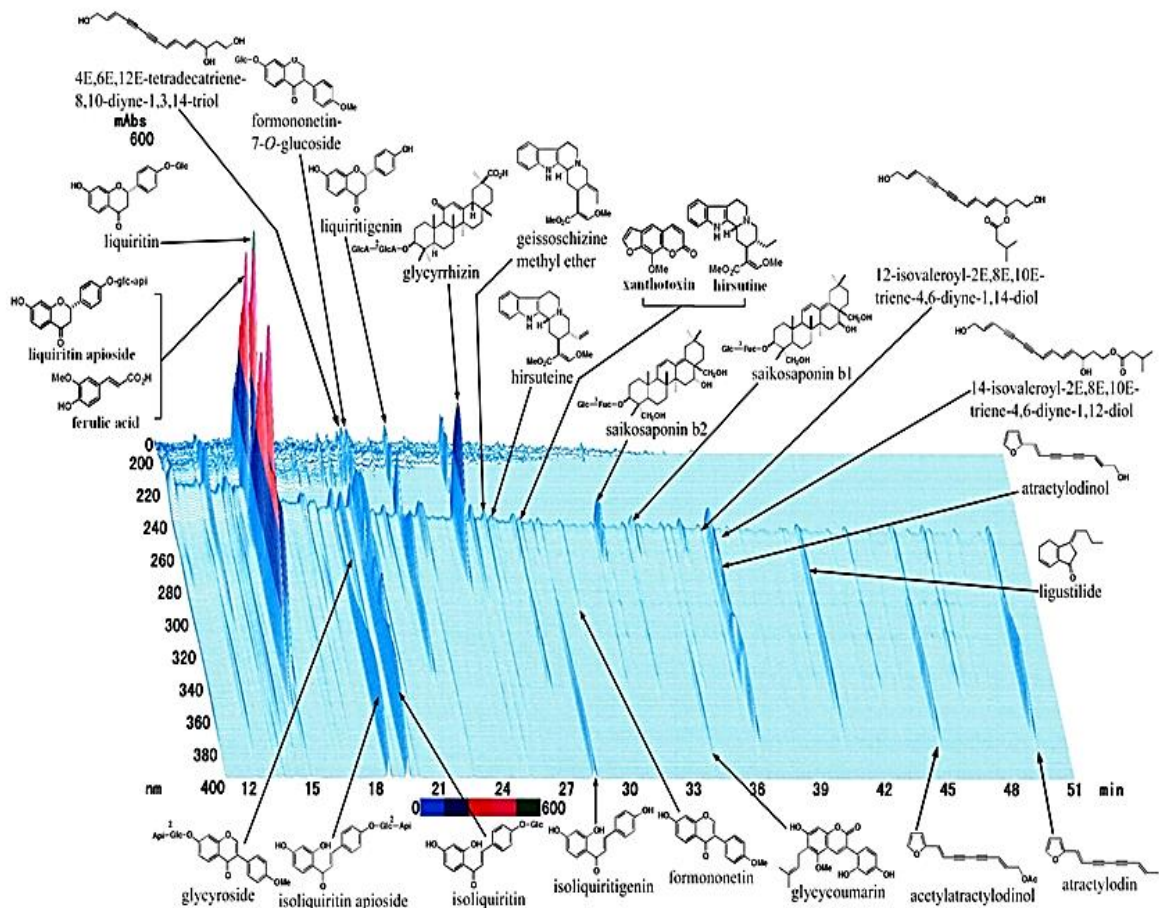


図 28 YKS メタノール抽出エキス三次元クロマトグラムを示す（定性 UV 検出：ツムラ社内データ）

表2 YKSに含まれる7種のUHアルカロイド成分濃度

Compound	Concentration (%)
Geissoschizine methyl ether	0.014 ± 0.000015
Hirsuteine	0.015 ± 0.000015
Hirsutine	0.013 ± 0.000022
Corynoxine	0.026 ± 0.000028
Isocorynoxine	0.009 ± 0.000012
Rhynchophylline	0.027 ± 0.000008
Isorhynchophylline	0.005 ± 0.000005

各成分濃度 (%) は4ロットの平均値 ± 標準誤差で示した。

3. 小括

本節では YKS エキス中に含まれている釣藤鈎アルカロイド成分濃度を明らかにした (表2)。その中で活性成分候補である GM の YKS エキス中含量は約 0.014%であった。従って、YKS 1.0g 中には約 140 μg の GM が含まれていることが判った。

第 2 節

抑肝散経口投与後の血漿および脳における GM の検出

第 2 章の *in vitro* 試験で示唆した GM が活性成分であるならば、抑肝散が経口投与された際、この成分は消化管から吸収され血中に移行し、血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) を通過して脳内に到達しなければならない。本節では、このことを証明するため、第 1 節で明らかにしたアルカロイド成分を含有する抑肝散をラットに経口投与した際の血漿および脳での GM を含むアルカロイド成分の検出を試みた。

1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

YKS は第 1 章、第 1 節の実験方法「1.2. 薬物および試薬」の項に記載したエキス末を使用した。釣藤鈎アルカロイド成分の GM、ICX、IRP、HTE、HIT、RP および CX は、株式会社ツムラ製剤技術部製剤・品質研究センターより提供された。各化合物の化学構造は第 2 章 1 節に記載した。

内部標準物質のビンカミンは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。LC-MS/MS 測定に用いた分析用試薬は市販されている特級を用いた。

1.2. 実験動物

本試験に用いた Sprague-Dawley 系雌性ラット (7 週齢, 体重 180 ± 15 g) は日本チャールスリバー株式会社 (横浜、日本) より購入した。動物は、購入後 1 週間の馴化期間中は群飼育 (1 ケージあたり 5 匹)、その後の実験期間中はステンレスケージ (RBC-12 type、260 x 380 x 200 mm、株式会社イシハラ、東京、日本) で個別飼育した。馴化期間中は室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、7:00-19:00 の明暗サイクルで標準飼料と水を自由摂取させ飼育した。実験期間中の給餌給水は実験デザインに従った。全ての試験は株式会社ツムラの実験動物審査会の承認のもとで実施した。

1.3. 血漿および脳中の釣藤鈎アルカロイド検出法

予備検討において、YKS 投与 1 時間後に血漿中の GM 濃度が上昇することを確認した (図 29)。この結果に基づいて、本試験では YKS 投与 1 時間後の血漿と脳を採取した。

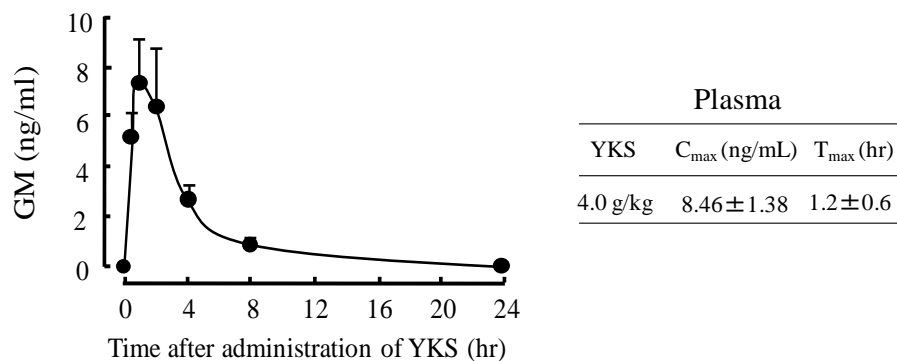


図 29 抑肝散 (4.0 g/kg) を雌ラットに経口投与した後の血漿中 GM 濃度の推移。各値は平均 ± 標準誤差 (n = 3) で示した。

具体的には、16 時間絶食したラット (この間飲料水は自由摂取) に YKS (1.0 および 4.0 g/kg, n=4) を経口投与した。その 1 時間後にペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg, 腹腔投与) 下で下大静脈から血液を採取した後、直ちに全脳を摘出した。血漿は、600 g、4°C で 15 分間遠心分離し採取した。脳は 4 倍量の氷冷蒸留水中でウルトラホモジナイザー (Ultra-Turrax, IKA, 大阪, 日本) を用いてホモジナズした。血漿または脳のホモジナイズサンプル 50 μL に、内部標準物質のビンカミンを 15 ng 含んだメタノール 200 μL を加えた。その液を 12,000 g, 4°C で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を釣藤鈎アルカロイド成分の分析に用いた。分析は液体クロマトグラフィー質量分析/質量分析—多チャンネルの選択反応モニタリングシステム LC-MS/MS-MRM (API 4000 J150, Applied Biosystems Japan, 東京, 日本) を用いた。

LC-MS/MS の LC 条件は、Capcell pak カラム (内径 2mm × 長さ 50mm, 資生堂, 東京, 日本)、移動相は 0.1% アンモニア含有蒸留水 (70% → 55%) および 0.1% アンモニア含有アセトニトリル (30% → 45%) の 10 分間グラジュエント、カラム温度は 30°C、流速は 0.4 ml/min、注入量は 10 μL、検出器はダイオードアレー、スキャンレンジは 200-400 nm UV で測定した。MS/MS 条件は、エレクトロスプレーイオン化源 (Electrospray ionization source) : ポジティブイオンモード (EST+)、カーテンガス圧 (Curtain gas pressure, CUR) : 20 psi、噴霧ガス圧 (nebulizing gas pressure, GS1) : 80 psi、チューブガス圧 (tube gas pressure, GS2) : 70 psi、イオンスプレー電圧 (ion spray voltage, IS) : 5000 V、ヒーター

ガス温度 (heater gas temperature, TEM) : 600°C、衝突活性解離ガス圧 (collision-activated dissociation gas, CAD) : 6 psi および各アルカロイドの衝突エネルギー (collision energy, CE) は GM (45 V)、ICX (47 V)、IRP (51 V)、HTE (41 V)、HIT (45 V)、RP (45 V)、CX (43 V) にそれぞれ設定し、各物質の正イオンを多チャンネル選択反応モニタリング (Multiple reaction monitoring, MRM) で測定した (モニター時間 : Dwell time 100 分)。収集した MRM データ (クロマトグラム) は MDS Sciex Analyst®1.4.1 により解析した。

2. 実験結果

2.1. YKS 経口投与後の血漿中および脳中の GM 検出

図 30A および 30B に YKS を経口投与した 1 時間後のラット血漿および脳中の GM の LC-MS/MS-MRM クロマトグラムを示した。また、図 30A には MS/MS 衝撃による GM 分子の開裂を示した。すなわち、最初の MS 衝撃によって検出される GM (MW: 366) のプロトン化分子イオン ($[MH]^+$: 367) は、二回目の MS 衝撃によって $[MH]^+$: 144 (MW: 143) と $[MH]^+$: 224 (MW: 223) イオンに解離する。本実験では、GM は固有保持時間 (5.2 分) と親化合物の解離により生成された $[MH]^+$: 144 イオンの検出によって同定した。

表 3 には GM を含む UH アルカロイド 7 成分の血漿と脳中の定量データを示した。GM 濃度は、YKS の経口投与 (1.0 および 4.0 g/kg) により血漿および脳で用量依存的に増加した。イソコリノキセインは血漿中および脳中からも検出されなかった。一方、その他の 5 成分は、血漿中では用量に依存して検出されたが、脳では低用量 (1.0 g/kg) では検出されず、高用量 (4 g/kg) でヒルステイン (3.9 ng/g) とコリノキセイン (1.7 ng/g) が検出された。

3. 小括

GM はラットに YKS を経口投与した 1 時間後に血漿および脳内に用量依存的に検出された。

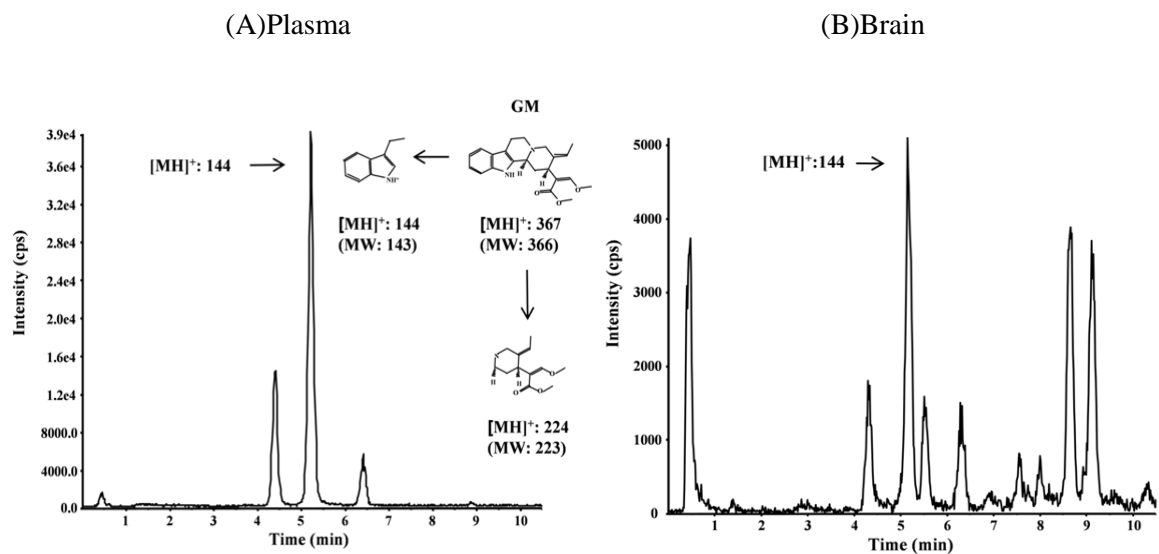


図 30 GM 由来化合物であるプロトン化分子イオン([MH]⁺:144)の血漿中 (A) および脳中 (B) MRM クロマトグラム最初の MS 衝撃によって検出される GM (MW: 366) のプロトン化分子イオン ([MH]⁺: 367) は、二回目の MS 衝撃によって [MH]⁺: 144 (MW: 143) と [MH]⁺: 224 (MW: 223) イオンに分解される。図 A と図 B で、GM は特異的な保持時間 (5.2 分) および親化合物の分解産物である [MH]⁺: 144 イオンによって同定された。

表 3 YKS 経口投与後の血漿および脳中の UH アルカロイド 7 成分の濃度

Test substance	Molecular weight	Monitor ion [MH] ⁺	Plasma (ng/mL)		Brain (ng/g)	
			1 g/kg	4 g/kg	1 g/kg	4 g/kg
Geissoschizine methyl ether	366	144	2.1	9.0	1.6	5.9
Isocorynoxine	382	160	ND	ND	ND	ND
Isorhynchophylline	384	160	ND	0.7	ND	ND
Hirsuteine	366	144	1.0	6.0	ND	3.9
Hirsutine	368	144	0.6	1.6	ND	ND
Rhynchophylline	384	160	1.8	10.8	ND	ND
Corynoxine	382	160	1.9	14.5	ND	1.7

YKS (1.0 または 4.0 g/kg、経口投与) をラットに経口投与した。1 時間後に脳と血液を採取した。UH アルカロイド 7 成分 (モニターイオン) は LC-MS/MS-MRM 分析により解析した。全ての成分の検出限界は、血漿では 0.3 ng/mL、脳では 1.5 ng/g であった。ND は未検出を意味する。

第3節

in vitro BBB モデルにおける GM の透過性

第1節では抑肝散 (YKS) をラットに経口投与した1時間後の血漿および脳から GM を用量依存的に検出したことにより、YKS 中の GM が血中に移行し、脳に到達していることを示唆した。

本節では内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトを共培養した BBB モデル^{143,144)} を用いて GM を含む7種アルカロイド成分の BBB 透過性を検討した。

1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

YKS は第1章、第1節の実験方法「1.2. 薬物および試薬」の項に記載したエキス末を使用した。チョウトウコウ (UH) アルカロイド成分の GM、ICX、IRP、HTE、HIT、RP および CX は、株式会社ツムラ製剤技術部製剤・品質研究センターより提供された。各化合物の化学構造は第2章1節に記載した。

カルバマゼピン、大腸菌 055:B5 のリポポリサッカライド (LPS)、ビンカミン、ナトリウムフルオレセイン (Na-F) および内部標準物質のクロラムフェニコールは、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。その他の分析用試薬は市販されている特級を用いた。

1.2. *in vitro* BBB モデル

図 31 に BBB モデルの模式図を示した。12 well プレートの各ウェルは、組み込まれたバスケット (インサート) によって上下の領域に分かれている。インサート底面は、孔径 $0.4\ \mu\text{m}$ 、 4×10^6 孔/ cm^2 の微小孔を持つコラーゲンコート済みのポリエステル性メンブレンである。ラット脳微小血管から採取された内皮細胞がインサートのメンブレン上面に播種されている。メンブレン下面には、ペリサイトが播種されている。ラット脳から採取されたアストロサイトは、下領域のウェル底の部分に播種されている。したがっ

て、膜の上側が血管腔、下側が脳側にそれぞれ相当している。この BBB キット (PET-12) を Pharma Co-cell 社 (長崎、日本) より購入し、UH の 7 種アルカロイド成分の BBB 透過率と透過係数 (P_e : 速度の指数) を算出した。概略は、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトを 5% 二酸化炭素と 95% 空気の混合ガス供給下にて温度 37°C および相対湿度 95% で共培養した。培養液は Nakagawa ら^{143,144)}の方法に従い 5 日間に 2 回交換した。培養後 4 日目または 5 日目にこのモデルを実験に使用した。

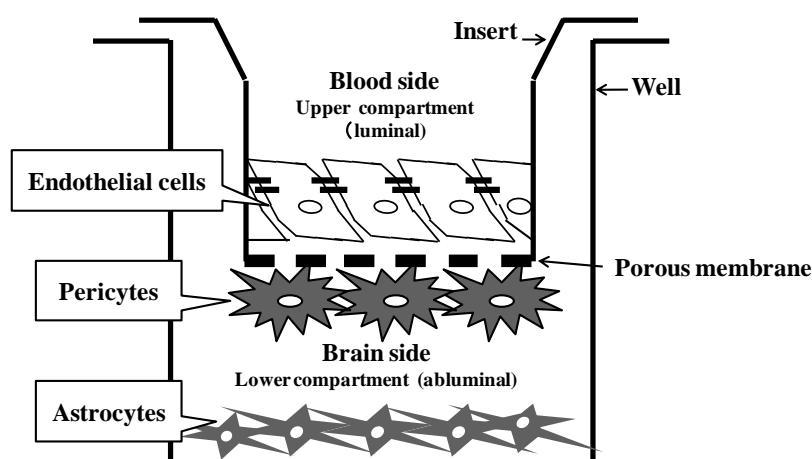


図 31 BBB モデル。このモデルは、内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトから構成されている。ウェルは組み込まれたバスケット (インサート) によって上部の領域 (血管腔側) と下部の領域 (脳実質側) に分けられている。内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトはそれぞれ、インサート膜の上表面、その膜の逆の表面、下部の領域であるウェルの底面に培養されている。このモデルを培養 4 日目と 5 日目に実験に使用した。

1.3. BBB 障害性の評価

脳の微小血管内皮細胞は、隣接細胞であるアストロサイト、ペリサイト、血管周囲ミクログリアおよび神経などと密接に相互的な関係を構築している。これらの相互作用 (細胞間のクロストーク) が内皮細胞の BBB (タイトジャンクション) 形成に寄与している^{145,146,147,148)}。本研究に使用した BBB モデルはラット脳の微小血管内皮細胞、ペリサイトおよびアストロサイトの初代培養細胞から成り、*in vivo* の解剖学的構造と類似している^{143,144)}。ペリサイトとアストロサイトが存在すると上述したように血管内皮細胞間の結合が強固になる (タイトジャンクション形成)。BBB が形成されると内皮細胞の抵抗値 (TEER 値) が大きくなり、分子量が小さく水溶性の蛍光トレーサーである Na-F の透過性 (P_e 値) が小さくなることから、これらの数値がこの BBB モデルの品質を評価するため

の重要な指標として用いられている。

経内皮電気抵抗 (TEER) は培養条件化で細胞層の主にナトリウムイオン流入を反映する。本試験では TEER を Epithelial-voltohm メーターと Endohm-12 チャンバー電極(World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)を使って測定した。

単層内皮細胞を通過する Na-F (MW : 376) の流入はすでに報告されている方法^{149,150)}に従って測定した。細胞培養した 12 well のインサートに 1.5ml の Ringer-Hepes buffer (136 mM NaCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 25 mM glucose, and 10 mM Hepes, pH 7.4)を入れ 12 well プレートにセットし、TEER 値を測定した。すなわち、インサート内の培養液を 10 µg/ml Na-F を含む buffer、または、10 µg/ml Na-F と 5 µM の被験物質を含む buffer に交換した後、60 分間インキュベーションした。この間、ウェル溶液(インサート外溶液)は 20 分と 40 分の 2 回、新しい Ringer-Hepes buffer と交換した。インサート TEER 値は 60 分後に測定した。インサート外液は、20 分、40 分と 60 分に、インサート内液は 60 分後に回収した。液中の Na-F 濃度は Infinite M200 蛍光マルチウェルプレートリーダー (TECAN, Männedorf, Switzerland; excitation 波長: 485 nm, 放出波長: 535 nm) で測定した。細胞を播種していないインサートでの透過性についても、Transwell 3402 ポリカーボネートメンブレンインサート (Costar) を使い測定した。経内皮細胞の P_e 値は、既に報告されている方法によって算出した^{144,145,151)}。概略すると、 P_e 値を得るために、先ず血管腔側から脳側に透過した各時間の Na-F 濃度を用いて次式から Cleared volume (µl) を計算した。

$$\text{Cleared volume } (\mu\text{l}) = [C]_A \times V_A \times [C]_L^{-1}$$

$[C]_A$ はインサート外の Na-F 濃度、 V_A はインサート外液量、 $[C]_L$ はインサート内への Na-F 添加濃度を示す。

Cleared volume は 60 分の間、時間と共に増加した。Clearance (cleared volume カーブの傾き) は直線回帰解析によって求めた。

内皮単層細胞の PS 値【 PS は透過性 x 表面積(µL/分)】は、次式から計算した。

$$PS_e^{-1} = PS_{\text{kit}}^{-1} - PS_{\text{cell-free}}^{-1}$$

PS_{kit} は BBB kit のインサートの clearance、 $PS_{\text{cell-free}}$ は無細胞インサートの clearance を示す。最終的に PS_e 値は底面積 (1 cm²)あたりの値 (10⁻⁶ cm/sec) で算出した。

1.4. 被験物質の BBB 透過性測定

被験物質は DMSO で 1 mM 溶液を作製した後、さらに Ringer-Hepes buffer で 5 μ M に希釈した。インサート内の培養液は TEER を測定した後、5 μ M 被験物質溶液 (2,500 pmol/0.5mL) に交換し 37°C でインキュベーションした。その後、20 分間隔でインサートを Ringer-Hepes buffer を入れた新しいウェルに移し 20、40 および 60 分に 20 分間隔ウェルを回収した。各回収溶液 (1.3mL) に 3 倍量のアセトニトリルを添加した。その中には内部標準物質として 1.3 nmol のクロラムフェニコールが含まれている。その混合液を 800 g、10°C で 10 分間遠心分離し、上澄みを減圧下で乾燥した。乾燥抽出物を 100%アセトニトリルで溶解および遠心分離した。上澄み液を同条件で再乾燥し、その乾燥抽出物を 130 μ L の 20%アセトニトリル含有 0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)で溶解した。溶解液を 0.45 μ m のフィルターで濾過した後、その一部 (40 μ L) を被験物質測定用 HPLC システム (Alliance HT2795, Nihon Waters Co. 東京, 日本) に注入した。

クロマトグラフ条件は、カラム: L-column 2 (内径 2.1mm x 長さ 150 mm、Chemicals Evaluation and Research Institute、埼玉, 日本)、移動相: 0.1%TFA 含有蒸留水 (80%→40%) と 0.1%TFA 含有アセトニトリル (20%→60%) のリニアグラジエント 11 分、カラム温度: 40°C、流速: 0.2mL/分、検出器:photodiode array、波長: UV 256 nm である。

この方法による被験物質の回収率は約 83%だった。各被験物質の P_e 値は「BBB 障害性の評価」の項に記述した公式を使って算出した。被験物質の透過率は、上分画 (血管腔側) への添加量に対する下分画 (脳側) への透過量の百分率で示した。

1.5. 被験物質の疎水性 (XLogP3) の計算

本研究に使用した各被験物質の疎水性は、NCBI chemical compound library (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, Jan 12, 2011) に掲載されている値を用いた。

2. 実験結果

2.1. BBB 障害性の評価

図 32 に内皮細胞の TEER 値と Na-F の P_e 値に対する被検物質の効果を示した。インサート内 (血管腔側) の培養液をバッファーに置換した時、TEER 値 (抵抗値) は $186 \Omega \text{cm}^2$ だった。10 $\mu\text{g/ml}$ の Na-F 含む buffer に置換しても TEER 値は、ほぼ同じ値であり、Na-F の P_e 値は $6.4 \pm 2.0 (10^{-6} \text{ cm/sec})$ だった。これらの値を対照とした時、この Na-F 溶液に LPS (0.1 および 1.0 mg/ml) を添加すると、TEER 値は著しく低下し、Na-F の P_e 値は添加濃度に依存して増加した。しかし、アルカロイド 7 成分は、添加しても対照群と同様の TEER 値と P_e 値を維持した。

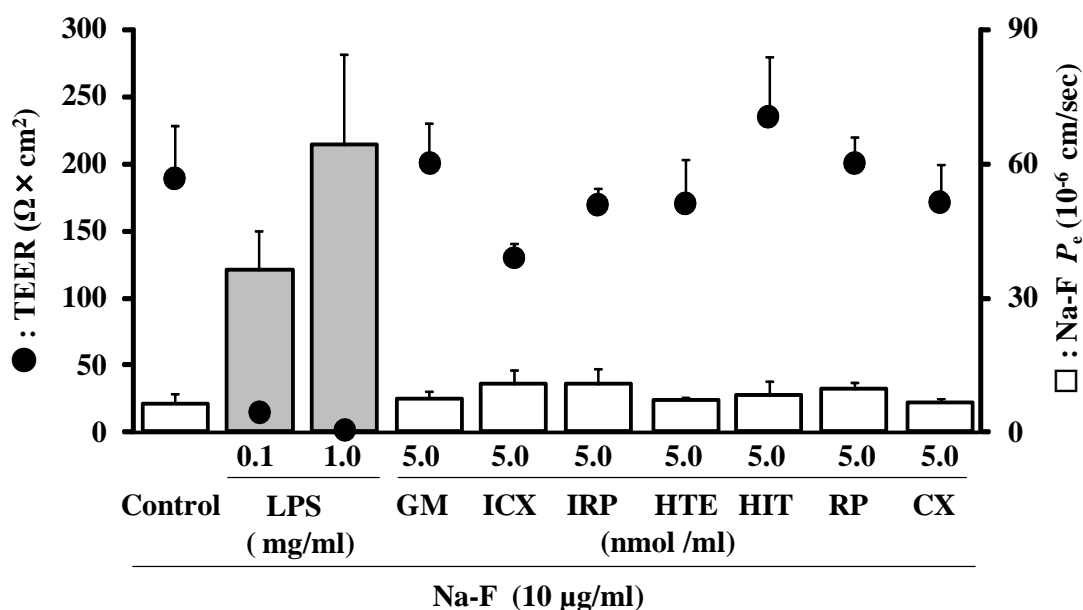


図 32 内皮細胞の TEER 値およびナトリウムフルオレセインの P_e 値に対する被検薬の効果。図中の略号を以下に示す。Na-F: ナトリウムフルオレセイン, LPS: リポポリサッカライド, GM: ガイソシジンメチルエーテル, ICX: イソコリノキセイン, IRP: イソリンコフィリン, HTE: ヒルスチン, HIT: ヒルスチン, RP: リンコフィリン, CX: コリノキセイン。各値は 3 回測定の前平均 \pm 標準誤差で示した。

2.2. GM の BBB 透過率と透過係数

表4にBBBキットで評価したUHアルカロイド7成分のBBB透過率と P_e 値を示した。GMの透過率は27.3%、 P_e 値は 97.2×10^{-6} cm/secであった。これらの値は、他の6つのアルカロイドよりも高い値であった。参照化合物として使用したカルバマゼピンは、透過率52.0%および P_e 値 157.9×10^{-6} cm/secであった。各被検物質の疎水性(XLogP3)は、2.1~3.4の範囲内でほぼ同じ値であった。

表4 UHアルカロイド7成分のBBB透過率および透過係数

Test substance	XLog P3 (NCBI library)	BBB permeability rate (%)	Permeability coefficient(P_e) (10^{-6} cm/sec)
Geissoschizine methyl ether	2.2	27.3 ± 0.2	97.2 ± 1.2
Isocorynoxetine	2.1	16.0 ± 0.9	32.7 ± 2.7
Isorhynchophylline	2.3	10.7 ± 0.8	20.7 ± 2.1
Hirsuteine	3.2	9.2 ± 0.3	26.2 ± 3.4
Hirsutine	3.4	6.3 ± 0.4	17.8 ± 2.2
Rhynchophylline	2.3	5.2 ± 0.3	7.9 ± 0.5
Corynoxetine	2.1	2.8 ± 0.1	4.2 ± 0.2
Carbamazepine	2.5	52.0 ± 3.6	157.9 ± 7.3

UHアルカロイド7成分およびカルバマゼピン(対照化合物)のBBB透過率と P_e 値は、*in vitro* BBBキットを用いて評価した。これらの被検物質はHPLC分析により測定した。データは平均 ± 標準誤差 (n=3) で示した。疎水性(XLogP3)の値はNCBI chemical compound library掲載値を記載した。

3. 小括

in vitro BBBモデルにおいてGMのBBB透過性は27.3% および P_e 値は 97.2×10^{-6} cm/secであることが判った。

考察

YKSは5-HT_{1A}受容体アゴニスト（ブスピロン）と同じようにラットの攻撃行動や社会行動を改善する²⁰⁾。この結果を契機にYKSの受容体結合試験が行われ、YKSが5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を持ち、その作用にUHが大きく寄与していることが証明された⁴⁹⁾。これらの結果から、著者は第2章の*in vitro*結合試験でUH成分のGMがYKSやUHと同様な5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニスト作用を示すことを初めて証明した。GMが活性成分であるならば、YKSを経口投与した後GMが消化管から血中に入りBBBを通過し脳に達しなければならない。この課題を解決したのが本章である。先ず第1節ではYKSエキス末中の7種のアルカロイド成分を定量した。YKSエキス中にはイソコリノキセイン(0.009%)やイソリンコフィリン(0.005%)以外は0.013から0.027%の範囲で含まれていることが判った。特に今回の標的化合物であるGMの含有量は0.014%、即ち1 gのYKS中には140 µg含まれていることを確認した。

第2節でこのようなアルカロイド成分を含有したYKS（1.0および4.0 g/kg）をラットに経口投与したところ、イソコリノキセインは血漿および脳のいずれからとも検出されなかったが、他の5成分は血漿中に用量依存的に検出された。しかし、血漿中検出成分の中でさらに脳で用量依存的に検出された成分はGMであった。ヒルステインとコリノキセインは脳では低用量では検出されず、高用量（4 g/kg）でやっと検出される程度であった。これらの結果はアルカロイド成分の血中および脳中移行性はYKS含有量には必ずしも依存しないことを示している。本試験では明らかではないが、各成分の腸管からの吸収率や代謝などが深く関与している可能性が推察される。多要因が化合物の血漿や脳内濃度に関与する中で本試験では少なくともGMが未変化体として血漿および脳中で用量依存的に検出された。血漿および脳中からのGM検出はLC-MS/MSによる化合物固有の保持時間（5.2分）と親化合物（[MH]⁺: 367）のプロトン化解離分子イオン[MH]⁺: 144によって特異的に同定検出したものである。この結果は動物レベル（*in vivo*）でYKSが経口投与されると含有成分GMが血漿で検出されBBBを透過し脳へ移行していることを示唆した。

第3節では *in vitro* BBB培養システムでGMのBBB透過性を検討した。本研究では被験化合物の透過性評価に先立ち、共培養によって形成された内皮細胞のタイトジャンクション形成状態をTEER値とP_e値で調べた。コントロール群で高いTEER値（188 Ωcm²）と低いP_e値（6 x 10⁻⁶ cm/秒）が認められた。この結果は今回の培養条件で内皮細胞のタイトジャンクションがしっかりと形成されていることを示唆した。しかし、被験物質がLPSのようにBBBを破壊するような性質を持っているとTEER値が著しく低下し、P_e値が増加

する^{150,152,153})。そこで、7種のアлкаロイドがLPS様作用を示すかどうかを明らかにするため、これら成分のTEERと P_e 値に及ぼす影響を検討した。その結果、いずれのアлкаロイドもコントロールとほぼ同様のTEERと P_e 値を示した。これらの結果は、7種アлкаロイドはLPSのようなBBB破壊あるいは機能障害を引き起こさないことを示唆した。

著者はGMがBBB破壊や機能障害を引き起こさないことを確かめた上で、GMの透過率が27.3%、 P_e 値が 97.2×10^{-6} cm/秒であることを明らかにした。一般的に、細胞膜はリン脂質から成りたっているために、疎水性や脂溶性が高い程BBBを通過し易いとされている。GMを含む各成分の疎水性(XlogP3)は、2.1~3.4の範囲で非常に類似した値であることから透過性の違いがXlogP3の違いによるものではないことを示唆した。この値は、中枢作用薬のカルバマゼピン、フェニトイン、リスペリドンとほぼ同じ値(XlogP3 = 2.0~2.7)であった。Nakagawaらは、今回使用した*in vitro* BBB透過性(P_e)が*in vivo*での結果を反映する(高い相関性がある)ことをカルバマゼピンなど19種の中枢薬で証明している¹⁴⁴)。本研究において、対照化合物として使用したカルバマゼピンの P_e 値は 157.9×10^{-6} cm/secであり、Nakagawaらの報告値 198×10^{-6} cm/secとほぼ一致した¹⁴⁴)。また、この結果は今回の実験条件がBBB透過性測定のために適切であったことも示唆している。

第2および3節の結果はUHアルカロイド成分のBBB透過性を調べた最初の報告である。特に、標的成分であるGMは、YKS経口投与後のラット血漿と脳で検出され、*in vitro* BBB透過性ではその具体的透過率が血漿中濃度の27.3%であることを示した。これらの結果は、経口投与されたYKS中のGMは、血中に移行し、BBBを通過して脳内に達することを更に支持するものである。本結果は、GMがYKSの活性化合物であるという可能性を更に支持するものである。

以上、第3章ではGMの血液脳関門透過性について検討し以下の結果を得た。

- 1) 第1節では、YKSエキス末中のアルカロイド成分を定量し、GMがYKS 1g中に140 µg含有すること実証した。
- 2) 第2節では、YKSを経口投与したラットの血漿および脳からGMを検出し脳内移行性を*in vivo*で実証した。
- 3) 第3節では*in vitro* BBBモデルを用いてGMのBBB透過性が27.3%および P_e 値 97.2×10^{-6} cm/secであることを示した。

これらの結果から著者は、経口投与されたYKS中のGMは消化管から吸収され血中に移行したBBBを通過して脳に到達しすることを明かにした。次章では、GM(YKS含有量)がYKSの活性成分としてBPSD様症状に対し効果を発揮するかどうかを検証した。

第4章

GMの薬理効果の検証

はじめに

第1章では動物モデルを用いて薬効薬理評価 (*in vivo* 試験) を行い、抑肝散 (YKS) の中核およびBPSD改善作用にチョウトウコウ(UH)が寄与していること示唆した。4
第2章では *in vitro* 試験においてUH成分のGMが5-HT_{1A}受容体パーシャルアゴニストおよび5-HT₇受容体アンタゴニスト作用を有することを示した。第3章では第1章の *in vivo* 試験と第2章の *in vitro* 試験の結果を連結するため、GMのBBB透過性を実証した。GMが活性成分ならば、YKSに含有されている濃度のGMを経口投与することにより、YKSと同様な攻撃性や社会行動の異常を改善するはずである。

そこで、本章ではYKSの攻撃性/社会性改善効果にGMが寄与している最終確認として、実際にYKSに含まれているGM濃度(前章第1節で証明)でYKS同様の効果が得られるか否かを「第1章2節」で用いた「隔離飼育マウスの攻撃性/社会性改善効果」を指標に評価した。

第 1 節

GM の薬理効果の検証

前章「第 3 章」ではチョウトウコウ (UH) アルカロイド成分の GM が YKS 経口投与後のラット血漿と脳で検出され、*in vitro* BBB 透過性ではその具体的透過率が血漿中濃度の 27.3% および P_e 値 97.2×10^{-6} cm/sec であることを示した。これらの結果は、経口投与された YKS 中の GM は、血中に吸収され、BBB を通過して脳内に達することが判った。

その YKS 含有量を動物に投与した際に YKS や UH と同じような薬理効果を示すか否かを本章では、第 1 章、第 2 節で用いた隔離飼育マウスの攻撃行動および社会行動を指標に検討した。

1. 実験方法

1.1. 薬物および試薬

YKS は第 1 章、第 1 節の実験方法「1.2. 薬物および試薬」の項に記載したエキス末を使用した。

5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 マレイン酸塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

1.2. 実験動物

動物は第 1 章、第 2 節と同様、4 週齢の ddY 系雄マウスを日本 SLC 株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入した。一週間の順化後、動物は実験期間中透明ケージ (11.5 x 31 x 15.5 cm) で個別飼育した。群飼育対照群およびソーシャルインタラクション試験の対峙動物は 1 ケージ (23 x 31 x 15.5 cm) 5 匹で飼育した。すべての動物は順化期間から試験期間を通し室温：23±2°C、相対湿度：55±10%、12 時間明暗周期 (明期：7：00 から 19：00)、飲料水：自由摂取、および食餌 (MF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)：自由摂取の条件で飼育した。全ての試験は株式会社ツムラの実験動物審査会の承認のもとで実施した。

1.3. ソーシャルインタラクション試験

ソーシャルインタラクション試験は、第1章、第2節の実験方法「2.3. ソーシャルインタラクション試験」に記載した方法に準じた。即ち、被験マウスと対峙用マウス（無処置の同週齢群飼育マウス）をオープンフィールド装置（50 x 50 x 50cm、Neuroscience, Inc., Tokyo, Japan）に入れ、両者間の行動をビデオカメラで10分間記録した。その後、対峙動物に対する被験動物の攻撃行動（aggressive grooming：攻撃的グルーミング、tail rattling：尾の威嚇的振戦、chasing：追撃行動、attacking：噛み付き行動）および社会行動（sniffing：臭い嗅ぎ行動、following：追尾行動、contacting：接近探索行動）の合計をそれぞれカウントした。活動量としてソーシャルインタラクション時の移動距離（cm）をソフトウェア（analyzing behavior system, Viewer II：Bioserve, Bonn, Germany）を用いて解析した。

1.4. 攻撃行動および社会行動に対する GM の単回投与効果

GM（75、150、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を4週間隔離飼育したマウスに単回経口投与した。コントロールとして溶媒である0.5% Tween 80（10.0 ml/kg）を同様のスケジュールで隔離飼育マウスおよび群飼育マウスに経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は薬剤投与60分後に行った。

1.5. 攻撃行動および社会行動に対する GM の反復投与効果

隔離飼育マウスにGM（150、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を隔離飼育4週目から6週目までの14日間（1日一回）経口投与した。コントロールとして0.5% Tween 80（10.0 ml/kg）を同様のスケジュールで隔離飼育マウスおよび群飼育マウスに経口投与した。この試験ではWAY-100635（0.1 mg/kg）またはその溶媒である生理食塩水（10.0 ml/kg）を14日目のGM（300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）投与の30分前に単回腹腔内投与した。ソーシャルインタラクション試験は14日目のGM投与の60分後に行った。

1.6. GM の反復投与効果に対する WAY-100635 の併用効果

隔離飼育マウスに GM (300 µg/kg) を隔離飼育 4 週目から 6 週目までの 15 日間 (1 日一回) 経口投与した。WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10.0 ml/kg) は 14 日間 (1 日一回) GM と一緒に腹腔内投与した。ソーシャルインタラクション試験日である 15 日目は、WAY-10065 を投与せず、GM だけを行動試験の 60 分前に投与した。

1.7. GM の反復投与効果の持続性

隔離飼育マウスに GM (300 µg/kg) を隔離飼育 4 週目から 6 週目まで 14 日間 (1 日一回) 経口投与し、15 日目にソーシャルインタラクション試験を行った。15 日目は GM は投与しなかった。

1.8. 統計解析

行動試験データは平均値±標準誤差で示した。攻撃性と社会性の経時的変化の評価には 2 元配置分散分析を用いた。2 群間比較は Student's-*t* 検定、複数群間比較には Dunnett's 検定を用いた。それぞれの統計解析の有意水準は $P < 0.05$ とした。

2. 実験結果

2.1. 攻撃行動および社会行動に対する GM の単回投与効果

GM の単回投与 (75–300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) は隔離飼育により誘発した攻撃行動増加に影響を与えなかったが (図 33A)、社会行動減少に対しては 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 用量で有意 ($P < 0.05$) に改善した (図 33B)。活動量は各群間で有意な差は認められなかった (図 33C)。

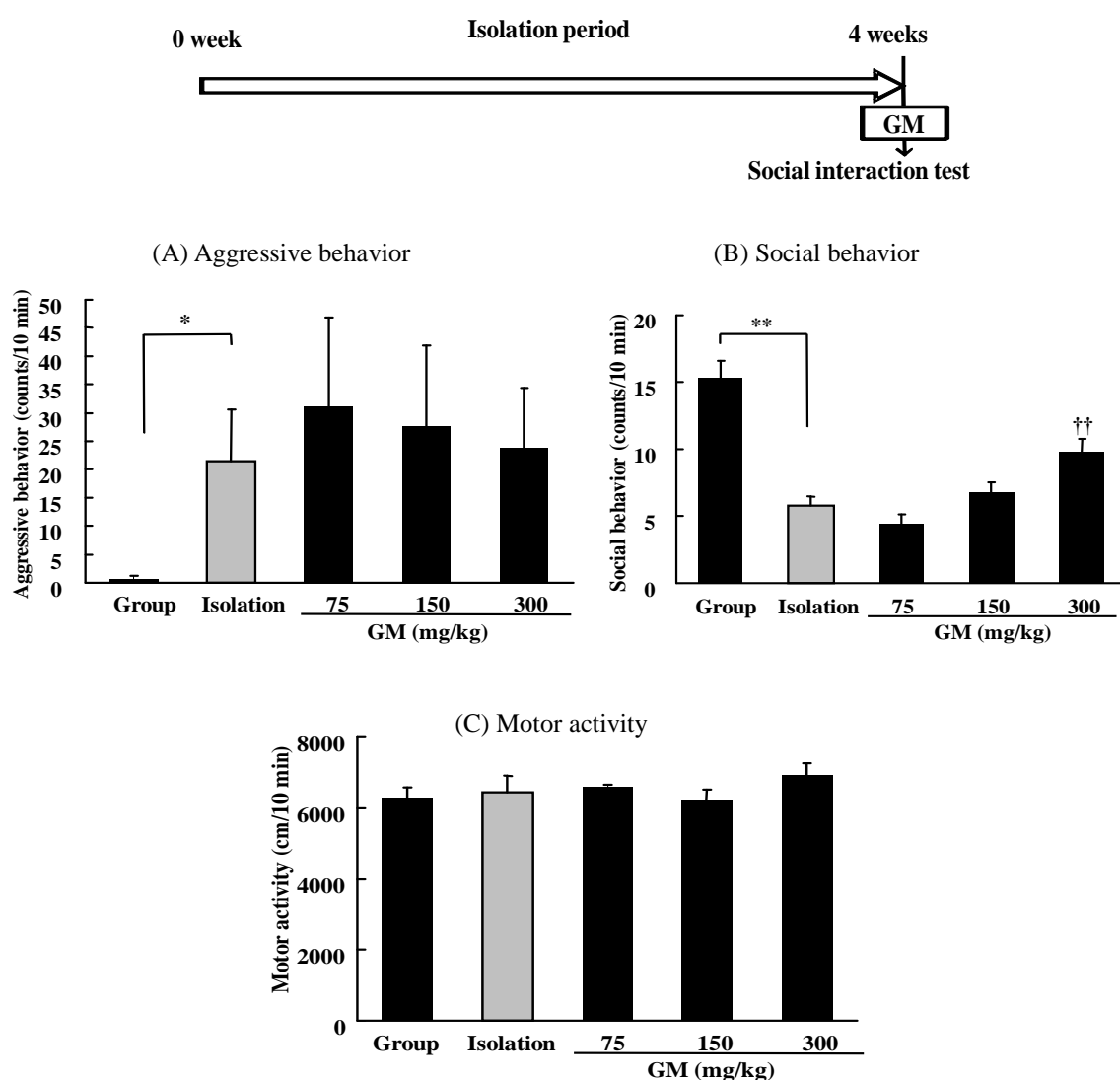


図 33 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する GM の単回投与効果。4 週目の隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または蒸留水 (10 ml/kg) を単回経口投与し、その 60 分後にソーシャルインタラクション試験を行った。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 9-10$ /群)。* $p < 0.05$ および** $p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性、†† $p < 0.01$ は隔離飼育コントロールに対する有意性を示す。

2.2. 攻撃行動および社会行動に対する GM の反復投与効果

GM (150 および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の 14 日間反復投与は攻撃行動の増加および社会行動の減少をいずれも有意 ($P < 0.01$) に改善した (図 34A、34B)。GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) のこれら改善効果は 14 日目の WAY-100635 (0.1 mg/kg) 単回投与によって相殺された (図 34A、34B)。

活動量は、各群間で有意な差は認められなかった (図 34C)。

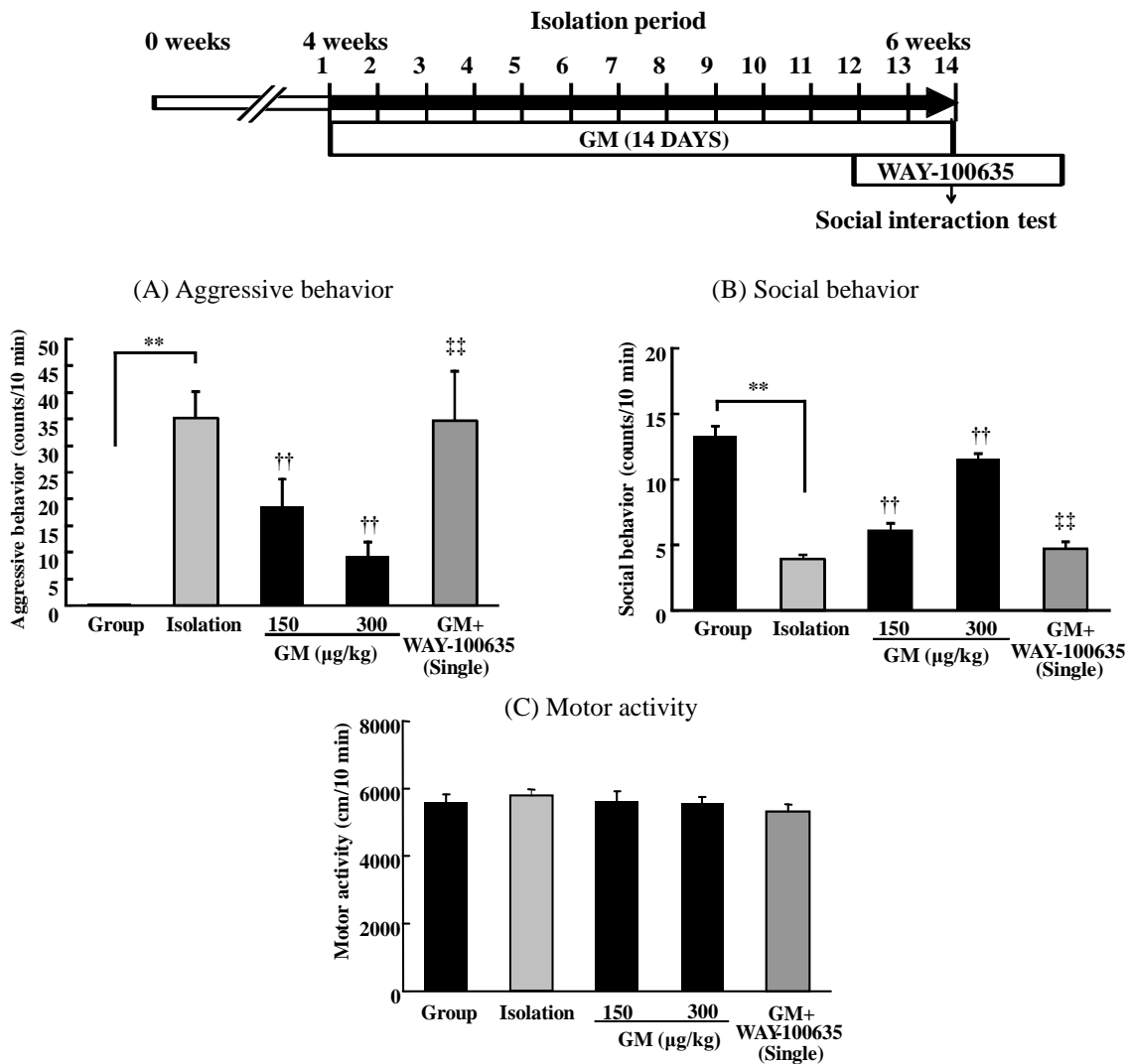


図 34 隔離飼育マウスにおける攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する GM の反復投与効果。4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスまたは群飼育マウスに GM (150 および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または蒸留水 (10 ml/kg) を毎日経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は最終日 (14 日目) の各薬液投与の 60 分後に行った。WAY-100635 (0.1 mg/kg) または生理食塩水 (10 ml/kg) はソーシャルインタラクション試験の 30 分前に腹腔内投与した。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 10-29$ /群)。 $**p < 0.01$ は群飼育コントロールに対する有意性、 $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ は隔離飼育コントロールに対する有意性、 $^{\ddagger\dagger}p < 0.01$ は GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 群に対する有意性を示す。

2.3. GM 反復投与の攻撃および社会行動改善効果に対する WAY-100635 の併用効果

GM の反復投与改善効果(攻撃と社会行動)に対する WAY-100635 の影響を調べるため、GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の 15 日間経口投与と GM+WAY-100635 (0.1mg/kg) の 14 日間併用投与を実施した(図 35)。15 日目のソーシャルインタラクション試験において、15 日間投与による GM の攻撃行動(図 35A)および社会行動(図 35B)改善効果は WAY-100635 の 14 日間の併用投与によって相殺された($P < 0.05$)。これらの群間は、活動量に有意な差は認められなかった(図 35C)。

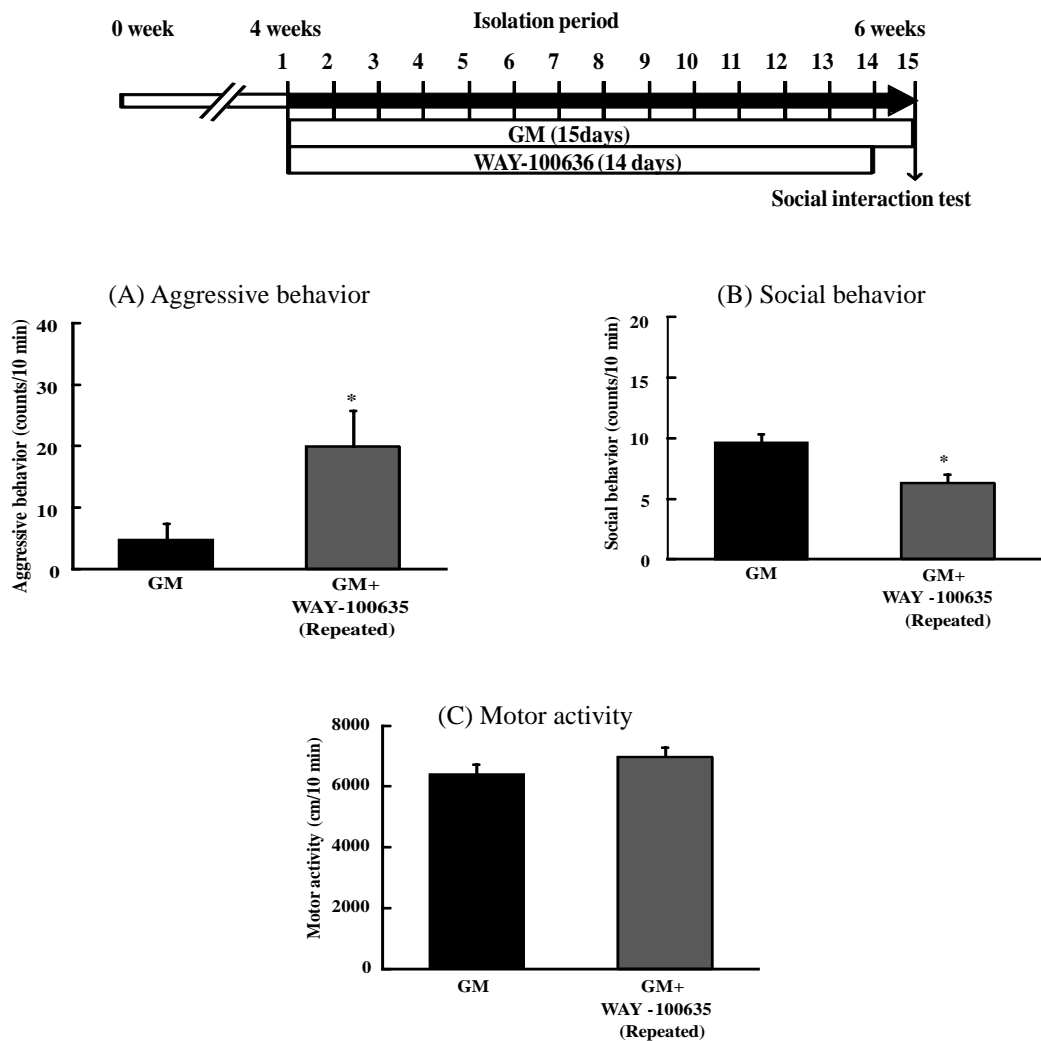


図 35 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) および活動量 (C) に対する WAY-100635 と GM の反復併用投与効果。4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスに GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + 蒸留水 (10 ml/kg) または GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + WAY-100635 (0.1 mg/kg) を毎日経口投与した。15 日目は、GM は投与したが WAY-100635 は投与しなかった。ソーシャルインタラクション試験は最終日 (15 日目) の GM 投与の 60 分後に行った。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 15/\text{群}$)。* $p < 0.05$ は GM 群に対する有意性を示す。

2.4. GM 反復投与による攻撃行動および社会行動改善の持続効果

隔離飼育マウスに GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を 14 日間経口投与し、15 日目にソーシャルインタラクション試験を行った (図 36)。GM 投与をしなかった 15 日目の行動試験においても GM の攻撃行動 ($P < 0.05$) および社会行動 ($P < 0.01$) の改善が持続して認められた (図 36A、36B)。これらの群間では活動量に有意な差は認められなかった (図 36C)。

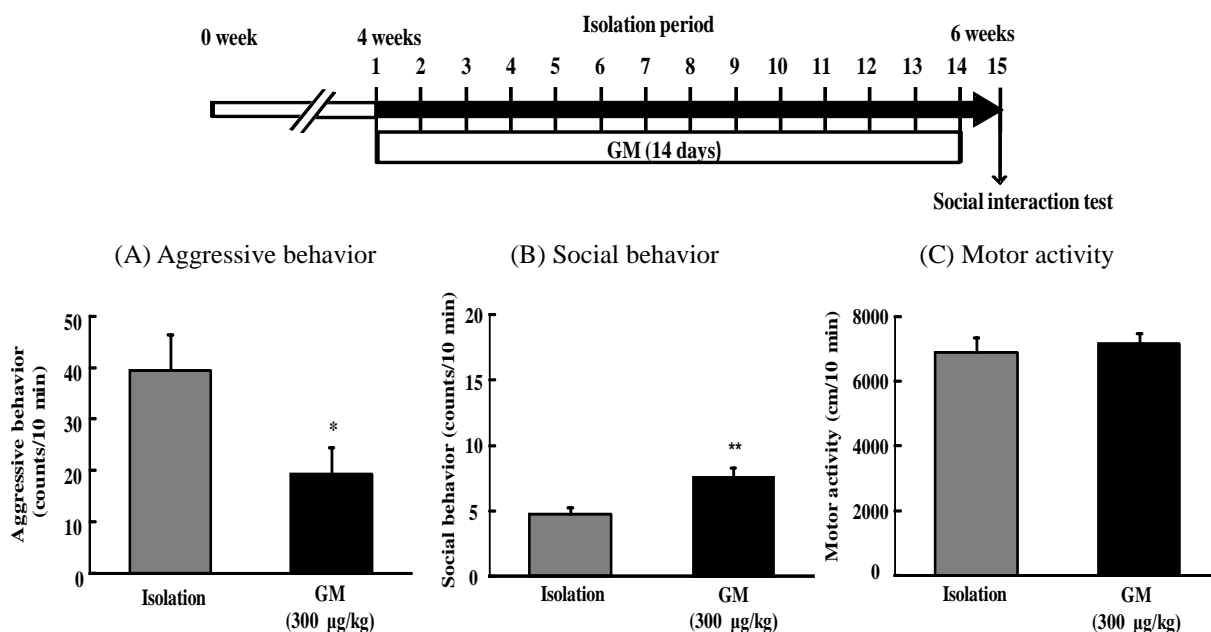


図 36 隔離飼育マウスの攻撃行動 (A)、社会行動 (B) と活動量 (C) に対する GM の反復投与効果と持続性。4 週から 6 週までの 14 日間 (1 日 1 回)、隔離飼育マウスに GM (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) または 0.5% Tween-80 (10 ml/kg) を毎日経口投与した。ソーシャルインタラクション試験は翌日 (15 日目) に何も投与せずに行った。各値は平均値 \pm 標準誤差で示した ($n = 11-14$ /群)。* $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ は隔離群 (Isolation) に対する有意性を示す。

3. 小括

GM (75-300 $\mu\text{g}/\text{g}$) は YKS や UH と同様に隔離飼育により誘発された攻撃行動の増加と社会行動の減少を用量依存的に改善した。また、この改善効果は YKS や UH と同じように 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト WAY-100635 により阻止された。これらの結果は GM が抑肝散の薬理作用の候補成分であることを強く示唆した。

考察

YKS は 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト（ブスピロン）と同じようにラットの攻撃行動や社会行動を改善する²⁰⁾。この結果を契機に YKS の受容体結合試験が行われ、YKS が 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用を持ち、その作用に UH が大きく寄与していることが証明された⁴⁹⁾。これらの結果から、著者は第 2 章の *in vitro* 結合試験で UH 成分の GM が YKS や UH と同様な 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用を示すことを初めて証明した。前章・第 3 章では、UH アルカロイド成分の BBB 透過性を調べた最初の報告である。特に、標的成分である GM は、YKS 経口投与後のラット血漿と脳で検出され、*in vitro* BBB 透過性ではその具体的透過率が血漿中濃度の 27.3%であることを示した。これらの結果は、経口投与された YKS 中の GM が消化管から血中に移行し、BBB を通過して脳内に達することを示唆した。本結果は、GM が YKS の活性化化合物であるという可能性を更に支持するものである。

本章においては、GM が活性成分であることをより確実にするために第 1 章・第 2 節で用いた隔離飼育マウスを用いて GM の攻撃性と社会性に対する効果を検証した。

第 3 章で定量した YKS 1.0g 中の GM 含有量約 140 µg をベースに投与用量を設定した。GM (150 および 300 µg/kg) は社会行動障害を YKS や UH と同じように単回投与で改善した (図 32)。しかし、攻撃性改善効果はやはり YKS や UH と同じように 14 日間の反復投与が必要であった (図 34)。同様な効果は DOI (5-HT_{2A} 受容体アゴニスト) 誘発首振り行動に対しても報告されている³⁹⁾。YKS は DOI 誘発首振り行動を単回投与では抑制しなかったが 14 日間の連投で有意に抑制し、その作用には反復投与による 5-HT_{2A} 受容体のダウンレギュレーションが関与している可能性が示唆されている。第 1 章でも考察したように 5-HT_{1A} 受容体の活性化が 5-HT_{2A} 受容体を脱感作することが報告されている^{116,117)}。このことは、5-HT_{2A} 受容体が 5-HT_{1A} 受容体により影響を受けることを示唆する。このように、YKS も 5-HT_{1A} 受容体へのアゴニスト刺激を介して 5-HT_{2A} 受容体機能（攻撃行動または首振り行動）を抑制する可能性が推察される。

GM (150 および 300 µg/kg) の 14 日間反復投与は YKS や UH と同じように攻撃行動や社会行動障害を改善した (図 34A、34B)。この改善効果は 14 日目の 5-HT_{1A} 受容体アンタゴニスト (WAY-100635) の単回投与で阻止された (図 34A、34B)。この結果は GM の

攻撃行動改善作用が YKS や UH と同様に 5-HT_{1A} 受容体を介した応答であることを示唆した。さらに、この結果は第 2 章の「GM の 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用 (*in vitro* 試験)」を強く支持する結果である。

さて、YKS、UH または GM の反復投与による攻撃行動改善作用には 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用が関わっているのだろうか？この課題を明らかにするために、本研究では、活性成分である GM を用いて検討した。図 35 で示したように、15 日間の GM 投与による攻撃性改善作用は 14 日間の WAY-100635 の併用により阻止された。この結果は GM の反復投与による攻撃性改善作用に 5-HT_{1A} 受容体の持続的なアゴニスト刺激が関与していることを示唆した。これ以上の詳細は本試験では明確にできないが、5-HT_{1A} 受容体への慢性的アゴニスト刺激が、例えば 5-HT_{2A} 受容体のダウンレギュレーションのようなホメオスタシス的な神経適応を誘発している可能性が推察される。また、図 36 に示したように、14 日間の反復投与による GM の改善作用は GM を投与しない翌日も確認された。このような持続効果なども神経適応が関与している可能性が推察される。

GM にはこれまでに自発運動¹⁵⁴⁾、痙攣¹⁵⁵⁾、首振り行動¹⁰⁷⁾を抑制することが報告されている。しかし、これらの生体 (*in vivo*) での反応は YKS 含有される量の 100 から 1000 倍高い濃度 (数十 mg から数百 mg) での報告である。本章第 3 節で示した GM の攻撃行動および社会行動改善作用は YKS に実際に含まれる濃度での証明であり YKS の同効果を GM が担っている可能性を強く示唆するものである。

YKS の改善作用の詳細なメカニズムを明らかにするためには更なる研究が必要であるが、既に第 1 章でも考察したように YKS は 2 種類の異なった作用、即ち社会性に対する単回投与作用と攻撃性に対する反復投与作用を持つことが GM でも検証された。

以上の結果から著者は GM が YKS の活性成分であると判断した。経口投与された YKS 中の GM は血中に移行後 BBB を通過して脳に到達し、第 2 章で示したような 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用や 5-HT₇ 受容体アンタゴニスト作用を介し第 1 章で示したような中核および BPSD 様症状の改善に寄与していることが明かとなった。

総括

現代社会の抱える問題の一つに高齢化があり、それに伴う代表的疾患に認知症がある。わが国の認知症患者は現在 400 万人を超え、65 歳以上の 4 人に 1 人が認知症とその予備軍と言われている。認知症の症状には記憶・学習障害などの中核症状と、幻覚・妄想、暴言・暴力、攻撃性、不安、徘徊、うつ症状など様々な周辺症状（BPSD）がある。BPSD は中核症状にもまして介護者へ大きな負担を強いることなどから社会的な問題となっている。臨床では様々な薬物が対症療法的に用いられている。その中でこれまで BPSD 治療に主に用いられていた抗精神病薬には錐体外路系症状などの副作用が知られている。2005 年、FDA が「これら薬物が認知症患者の死亡率を高める」ことを勧告して以来、同様な報告が相次ぎ、副作用の少ない新しい治療薬が探し求められていた。このような背景において、神経過敏で興奮しやすい、イライラする、眠れないなどの精神症状に効果を持つ抑肝散が抗精神病薬のような副作用がなく、BPSD に有効であることが報告された。これを契機に三大認知症と言われているアルツハイマー型、レビー小体型、血管性認知症患者などを対象とした抑肝散の多施設臨床試験が実施され現在その有効性が集積されている。その一方で、このような改善効果を有する抑肝散の作用機序の解明が求められている。

著者は抑肝散の BPSD 改善効果とその作用機序を明らかにするため *in vivo* および *in vitro* 実験を実施し、その作用機序の一つにセロトニン神経系に対する是正作用があり、その活性を釣藤鈎アルカロイド成分が担っていることを見出した。本論文はその成果を 4 章に分けてまとめたものである。

第 1 章

抑肝散が攻撃性、社会性、不安および過活動などの BPSD 症状および記憶学習障害などの中核症状を改善することを AD 認知障害モデル動物（APP-Tg マウス）および隔離飼育マウスを用いて客観的に実証した。更に、これらの効果には構成生薬であるチョウトウコウが寄与していることを明らかにした。

第 2 章

抑肝散の 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト作用の活性成分がチョウトウコウのアルカロイド成分・ガイソシジンメチルエーテル (GM) であることを CHO-h5-HT1A 細胞膜を用いた *in vitro* 受容体結合試験で明らかにした。更に GM が 5-HT₇ 受容体に対しアンタゴニスト作用を示すことを HEK293-h5-HT₇ 細胞を用いて明らかにし、両作用の相乗効果が抑肝散の BPSD 改善効果に関与している可能性を示唆した。

第 3 章

第 1 章での抑肝散の薬効 (*in vivo*) と第 2 章での活性成分 GM の作用機序 (*in vitro*) を一体化ないし連結させるため、抑肝散を経口投与したラットの血漿および脳からの GM 検出を試み、抑肝散を経口投与すると GM が消化管から血中に移行し脳に到達することを明らかにした。また、*in vitro* BBB 透過性試験の結果から、GM の BBB 透過性が 27.3% および P_e 値 97.2×10^{-6} cm/sec であることを示した。

第 4 章

抑肝散含有量の GM が抑肝散と同じように隔離飼育マウスにおける攻撃性および社会性を改善したことから、GM が抑肝散の活性成分の一つであることをより強く支持した。

著者は、以上の結果を図 37 のようにまとめた。すなわち、「抑肝散が服用されるとその成分である GM が血中に移行し、BBB を通過し脳内に達する。脳内に達した GM はセロトニン神経の機能異常に対し 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニストおよび 5-HT₇ 受容体アンタゴニストとして作用し、興奮、攻撃性、社会性などの BPSD を改善する」という一連の作用機序を総括として提唱した。

また、抑肝散にはセロトニン神経系に対し細胞興奮性受容体である 5-HT_{2A} 受容体のダウンレギュレーション作用があることを既に福岡大学薬学部の岩崎教授の研究グループが報告している³⁹⁾。これらの作用と著者らの見出した作用が相まって神経細胞の異常興奮を抑えている可能性が示唆される。

抑肝散のもう一つの大きな作用機序として興奮性アミノ酸神経であるグルタミン酸神経系の過剰な興奮伝達を是正する作用が知られている^{45,46,48)}。これはアストロサイトのグルタミン酸トランスポーターの賦活作用を介してグルタミン酸のシナプス濃度の上昇を

是正し、神経細胞の過剰興奮を抑えるという機序である。この機序の活性成分がカンゾウ成分グリチルリチン酸の代謝物 18β-グリチルレチン酸であることが報告されている⁴⁸⁾。著者はこの活性成分に関しても3章と同様な方法で脳内移行性/BBB透過性を証明している⁵⁴⁾。

抑肝散を含む漢方薬は、現代社会において、あらためてその価値が認められるようになってきた。それは、西洋薬では解決できない特異的効果が見出されているためである。本論文内容が最新の科学的エビデンスとして医師をはじめとする多くの医療関係者に理解され、抑肝散が BPSD で難渋している多くの認知症患者の手元に届き、治療に役立つことを著者は切に願っている。

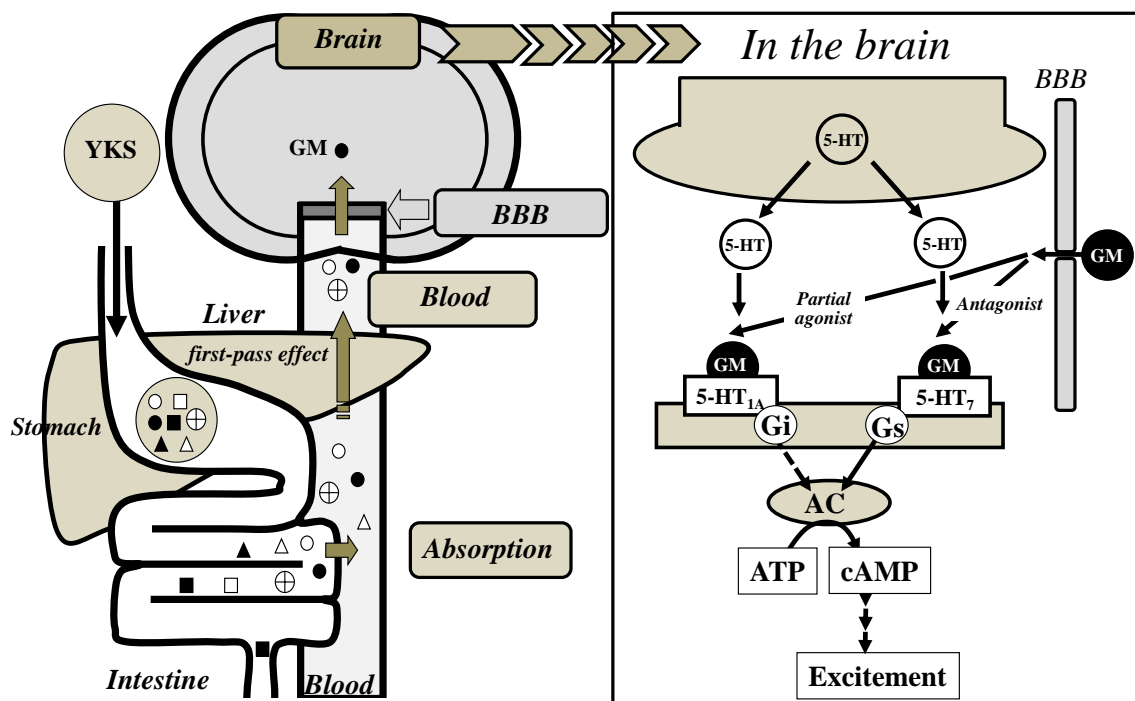


図 37 抑肝散のインドールアルカロイド成分・ガイソシジンメチルエーテル (GM) の血液脳関門 (BBB) 透過性と脳内セロトニン (5-HT) 神経系に及ぼす作用。抑肝散が服用されるとその成分である GM が血中に移行し、BBB を通過し脳内に達する。脳内に達した GM は 5-HT 神経の機能異常に対し 5-HT_{1A} 受容体パーシャルアゴニスト (アデニルサイクラーゼ(AC)抑制性 Gi 蛋白を活性) および 5-HT₇ 受容体アンタゴニスト (AC 促進性 Gs 蛋白を抑制) として作用し、いずれも AC 活性を抑制する。AC 活性の抑制によりセカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP の産生が抑制されリン酸化の抑制を経て細胞の神経興奮が抑制される。この作用により攻撃性などの興奮性行動が改善される。

引用文献

- 1) 岩崎 鋼 (2008)「保嬰撮要」から考える抑肝散の新しい展開. *老年医学* 46(3):225–227.
- 2) 秋葉 哲生 (2010) 医療用漢方製剤の歴史. *日東医誌* 61(7):881–888.
- 3) Arai T (2007) Practical clinical use of therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Folia Pharmacol Jpn* 130:494–498.
- 4) Beier MT (2007) Pharmacotherapy for behavioral and psychological symptoms of dementia in the elderly. *Am J Health Syst Pharm* 64:S9–17.
- 5) Food and Drug Administration. FDA public health advisory: Deaths with antipsychotics in elderly patients with behavioral disturbances. <http://www.fda.gov/cder/drug/advisory/antipsychotics.htm>.
- 6) Wang PS, Schneeweiss S, Avorn J, Fischer MA, Mogun H, Solomon DH, Brookhart MA (2005) Risk of death in elderly users of conventional vs. atypical antipsychotic medications. *N Engl J Med* 353:2335–2341.
- 7) Schneider LS, Tariot PN, Dagerman KS, Davis SM, Hsiao JK, Ismail MS, Lebowitz BD, Lyketsos CG, Ryan JM, Stroup TS, Sultzer DL, Weintraub D, Lieberman JA; CATIE-AD Study Group (2006) Effectiveness of atypical antipsychotic drugs in patients with Alzheimer's disease. *N Eng J Med* 355:1525–1538.
- 8) 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 (2005a) 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.
- 9) Iwasaki K, Maruyama M, Tomita N, Furukawa K, Nemoto M, Fujiwara H, Seki T, Fujii M, Kodama M, Arai H (2005b) 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.
- 10) Mizukami K, Asada T, Kinoshita T, Tanaka K, Sonohara K, Nakai R, Yamaguchi K, Hanyu H, Kanaya K, Takao T, Okada M, Kudo S, Kotoku H, Iwakiri M, Kurita H, Miyamura T, Kawasaki Y, Omori K, Shiozaki K, Odawara T, Suzuki T, Yamada S, Nakamura Y, Toba K (2009) A randomized cross-over study of a traditional Japanese medicine (kampo), yokukansan, in the treatment of the behavioural and psychological symptoms of dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 12(2):191–199.
- 11) 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 (2010) Treatment of behavioral and psychological symptoms of Alzheimer-type dementia with yokukansan in clinical practice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(3):541–545.
- 12) Iwasaki K, Kosaka K, Mori H, Okitsu R, Furukawa K, Manabe Y, Yoshita M, Kanamori A, Ito N, Wada K, Kitayama M, Horiguchi J, Yamaguchi S, Fukuhara R, Ouma S, Nakano S, Hashimoto M, Kinoshita T (2011) Open label trial to evaluate the efficacy and safety of yokukansan, a traditional Asian medicine, in dementia with Lewy bodies. *J Am Geriatr Soc* 59(8):936–938.
- 13) Iwasaki K, Kosaka K, Mori H, Okitsu R, Furukawa K, Manabe Y, Yoshita M, Kanamori A, Ito N, Wada K, Kitayama M, Horiguchi J, Yamaguchi S, Takayama S, Fukuhara R, Ouma S, Nakano S, Hashimoto M, Kinoshita T (2012) Improvement in delusions and hallucinations in patients with dementia with Lewy bodies upon administration of yokukansan, a traditional Japanese medicine. *Psychogeriatrics* 12(4):235–241.
- 14) Monji A, Takita M, Samejima T, Takaishi T, Hashimoto K, Matsunaga H, Oda M, Sumida Y, Mizoguchi Y, Kato T, Horikawa H, Kanba S (2009) Effect of yokukansan on the behavioral and psychological symptoms of dementia in elderly patients with Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(2):308–311.
- 15) Okahara K, Ishida Y, Hayashi Y, Inoue T, Tsuruta K, Takeuchi K, Yoshimuta H, Kiue K, Ninomiya Y, Kawano J, Yoshida K, Noda S, Tomita S, Fujimoto M, Hosomi J, Mitsuyama Y (2010) Effects of yokukansan on behavioral and psychological symptoms of dementia in regular treatment for Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34(3):532–536.
- 16) Nagata K, Yokoyama E, Yamazaki T, Takano D, Maeda T, Takahashi S, Terayama Y (2012) Effects of yokukansan on behavioral and psychological symptoms of vascular dementia: an open-label trial. *Phytomedicine* 19(6):524–528.
- 17) Matsuda Y, Kishi T, Shibayama H, Iwata N (2013) Yokukansan in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Psychopharmacol* 28(1):80–86.
- 18) Ikarashi Y, Iizuka S, Imamura S, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Kanno H, Kawakami Z, Yuzurihara M, Kase Y, Takeda S (2009) Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on memory disturbance and behavioral and psychological symptoms of dementia in thiamine-deficient rats. *Biol Pharm Bull* 32(10):1701–1709.
- 19) Iizuka S, Kawakami Z, Imamura S, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Kanno H, Ueki T, Kase Y, Ikarashi Y (2010) Electron-microscopic examination of effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on degeneration of cerebral cells in thiamine-deficient rats. *Neuropathol* 30:524–536.

- 20) Kanno H, Sekiguchi K, Yamaguchi T, Terawaki K, Yuzurihara M, Kase Y, Ikarashi Y (2009) Effect of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on social and aggressive behaviour of *para*-chloroamphetamine-injected rats. *J Pharm Pharmacol* 61(9):1249–1256.
- 21) Sekiguchi K, Yamaguchi T, Tabuchi M, Ikarashi Y, Kase Y (2009) Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on aggressiveness induced by intracerebroventricular injection of amyloid β protein into mice. *Phytother Res* 23(8):1175–1181.
- 22) Sekiguchi K, Imamura S, Yamaguchi T, Tabuchi M, Kanno H, Terawaki K, Kase Y, Ikarashi Y (2011) Effects of yokukansan and donepezil on learning disturbance and aggressiveness induced by intracerebroventricular injection of amyloid β protein in mice. *Phytother Res* 25(4):501–507.
- 23) Takeda A, Itoh H, Tamano H, Yuzurihara M, Oku N (2008a) Suppressive effect of yokukansan on excessive release of glutamate and aspartate in the hippocampus of zinc-deficient rats. *Nutr Neurosci* 11(1):41–46.
- 24) Takeda A, Tamano H, Itoh H, Oku N (2008b) Attenuation of abnormal glutamate release in zinc deficiency by zinc and yokukansan. *Neurochem Int* 53(6-8):230–235.
- 25) Takeda A, Iwaki H, Ide K, Tamano H, Oku N (2012) Therapeutic effect of yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient and pair-fed mice. *Brain Res Bull* 87(6):551–555.
- 26) Tamano H, Kan F, Oku N, Takeda A (2010) Ameliorative effect of yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient young mice. *Brain Res Bull* 83(6): 351–355.
- 27) Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, Imamura S, Ikarashi Y, Kase Y (2009) Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol* 122(1): 157–162.
- 28) Fujiwara H, Takayama S, Iwasaki K, Tabuchi M, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Kase Y, Arai H, Yaegashi N (2011) Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid β proteins in amyloid precursor protein transgenic mice. *Neuroscience* 180:305–313.
- 29) 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 (2009) Yokukansan inhibits social isolation-induced aggression and methamphetamine-induced hyperlocomotion in rodents. *Biol Pharm Bull* 32(3):372–375.
- 30) Egashira N, Nogami A, Iwasaki K, Ishibashi A, Uchida N, Takasaki K, Mishima K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M (2011) Yokukansan enhances pentobarbital-induced

- sleepin socially isolated mice: possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor complex. *J Pharmacol Sci* 116(3):316–320.
- 31) Nishi A, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Imamura S, Tabuchi M, Kanno H, Nakai Y, Hashimoto K, Ikarashi Y, Kase Y (2012) Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in *Uncaria hook*, is a potent serotonin_{1A} receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by yokukansan. *Neuroscience* 207:124–136.
 - 32) Tanaka Y, Mizoguchi K (2009) Influence of aging on chondroitin sulfate proteoglycan expression and neural stem/progenitor cells in rat brain and improving effects of a herbal medicine, yokukansan. *Neuroscience* 164:1224–1234.
 - 33) Mizoguchi K, Tanaka Y, Tabira T (2010) Anxiolytic effect of a herbal medicine, yokukansan, in aged rats: involvement of serotonergic and dopaminergic transmission in the prefrontal cortex. *J Ethnopharmacol* 127(1):70–76.
 - 34) Mizoguchi K, Shoji H, Tanaka Y, Tabira T (2011) Ameliorative effect of traditional Japanese medicine yokukansan on age-related impairments of working memory and reversal learning in rats. *Neuroscience* 177:127–137.
 - 35) Uchida N, Takasaki K, Sakata Y, Nogami A, Oishi H, Watanabe T, Shindo T, Egashira N, Kubota K, Katsurabayashi S, Mishima K, Fujiwara M, Nishimura R, Iwasaki K (2013) Cholinergic involvement and synaptic dynamin 1 expression in yokukansan-mediated improvement of spatial memory in a rat model of early Alzheimer's disease. *Phytother Res* 27(7):966–972.
 - 36) Nogami A, Sakata Y, Uchida N, Yamaguchi K, Kawasaki C, Shindo T, Kubota K, Katsurabayashi S, Takasaki K, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K (2011) Effects of yokukansan on anxiety-like behavior in a rat model of cerebrovascular dementia. *J Nat Med* 65(2):275–281.
 - 37) Yamaguchi T, Tsujimatsu A, Kumamoto H, Izumi T, Ohmura Y, Yoshida T, Yoshioka M (2012) Anxiolytic effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, via serotonin 5-HT_{1A} receptors on anxiety-related behaviors in rats experienced aversive stress. *J Ethnopharmacol* 143(2):533–539.
 - 38) Kamei J, Miyata S, Ohsawa M (2009) Involvement of the benzodiazepine system in the anxiolytic-like effect of yokukansan (Yi-gan san). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33(8):1431–1437.
 - 39) Egashira N, Iwasaki K, Ishibashi A, Hayakawa K, Okuno R, Abe M, Uchida N, Mishima K, Takasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M (2008) Repeated administration of yokukansan inhibits DOI-induced head-twitch response and decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(6):1516–1520.

- 40) Makinodan M, Yamauchi T, Tatsumi K, Okuda H, Noriyama Y, Sadamatsu M, Kishimoto T, Eanaka A (2009) Yi-Gan San restores behavioral alterations and a decrease of brain glutathione level in a mouse model of schizophrenia. *J Brain Dis* 1:1–6.
- 41) Sekiguchi K, Kanno H, Yamaguchi T, Ikarashi Y, Kase Y (2012) Ameliorative effect of yokukansan on vacuous chewing movement in haloperidol-induced rat tardive dyskinesia model and involvement of glutamatergic system. *Brain Res Bull* 89(5–6):151–158.
- 42) Suzuki Y, Mitsuhata H, Yuzurihara M, Kase Y (2012) Antiallodynic effect of herbal medicine yokukansan on peripheral neuropathy in rats with chronic constriction injury. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:953459.
- 43) Nakagawa T, Nagayasu K, Nishitani N, Shirakawa H, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kase Y, Kaneko S (2012) Yokukansan inhibits morphine tolerance and physical dependence in mice: the role of α_2A -adrenoceptor. *Neuroscience* 227:336–49.
- 44) Kawakami Z, Kanno H, Ueki T, Terawaki K, Tabuchi M, Ikarashi Y, Kase Y (2009) Neuroprotective effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on glutamate-mediated excitotoxicity in cultured cells. *Neuroscience* 159:1397–1407.
- 45) Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y (2010) Glycyrrhizin and its metabolite 18 β -glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes. *Eur J Pharmacol* 626(2-3):154–158.
- 46) Kawakami Z, Kanno H, Ikarashi Y, Kase Y (2011a) Yokukansan, a traditional Japanese medicine, protects glutamate-induced cytotoxicity via oxidative stress in PC12 cells. *J Ethnopharmacol* 134(1):74–81.
- 47) Tateno M, Ukai W, Ono T, Saito S, Hashimoto E, Saito T (2008) Neuroprotective effects of Yi-Gan San against beta amyloid-induced cytotoxicity on rat cortical neurons. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(7):1704–1707.
- 48) Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y (2011b) Isoliquiritigenin is a Novel NMDA Receptor Antagonist in kampo medicine yokukansan. *Cell Mol Neurobiol* 31(8):1203–1212.
- 49) Terawaki K, Ikarashi Y, Sekiguchi K, Nakai Y, Kase Y (2010) Partial agonistic effect of yokukansan on human recombinant serotonin 1A receptors expressed in the membranes of Chinese hamster ovary cells. *J Ethnopharmacol* 127(7):306–312.
- 50) Ueki, Nishi A, Imamura S, Kanno H, Mizoguchi K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kase Y (2013) Effects of geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid in *Uncaria hook*, a constituent of yokukansan, on human recombinant serotonin₇ receptor. *Cell Mol Neurobiol* 33(1):129–135.
- 51) Hiratsuka T, Matsuzaki S, Miyata S, Kinoshita M, Kakehi K, Nishida S, Katayama T, Tohyama M (2010) Yokukansan inhibits neuronal death during ER stress by regulating the unfolded protein response. *PloS One* 5(10):e13280.

- 52) Fujiwara H, Iwasaki K, Furukawa K, Seki T, He M, Maruyama M, Tomita N, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Ohizumi Y, Arai H (2006) Uncaria rhynchophylla, a Chinese medicinal herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's β -amyloid proteins. *J Neurosci Res* 84(2):427–433.
- 53) Imamura S, Tabuchi M, Kushida H, Nishi A, Kanno H, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kase Y (2011) The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan. *Cell Mol Neurobiol* 31(5):787–793.
- 54) Tabuchi M, Imamura S, Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y (2012) The blood-brain barrier permeability of 18 β -glycyrrhetic acid, a major metabolite of glycyrrhizin in *Glycyrrhiza* root, a constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan. *Cell Mol Neurobiol* 32(7):1139–1146.
- 55) Tanji H, Ootsuki M, Matsui T, Maruyama M, Nemoto M, Tomita N, Seki T, Iwasaki K, Arai H, Sasaki H. (2005). Dementia caregiver's burdens and use of public services. *Geriatrics and Gerontology International* 5:94–98.
- 56) Findeis MA, (2007) The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 116(2):266–286.
- 57) Shinno H, Utani E, Okazaki S, Kawamukai T, Yasuda H, Inagaki T, Inami Y, Horiguchi J (2007) Successful treatment with Yi-Gan San for psychosis and sleep disturbance in a patient with dementia with Lewy bodies. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31(7): 1543–1545.
- 58) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, A β elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274 (5284):99–102.
- 59) Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K, (2003) Transgenic mice expressing the APP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res* 977(1):38–45.
- 60) Stackman RW, Eckenstein F, Frei B, Kulhanek D, Nowlin J, Quinn JF (2003) Prevention of age-related spatial memory deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by *Ginkgo biloba* treatment. *Exp Neuro*. 184(1):510–520.
- 61) Ognibene E, Middei S, Daniele S, Adriani W, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G (2005) Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 156(2):225–232.
- 62) Dong HD, Csernansky CA, Martin MV, Bertchume A, Vallera D, Csernansky JG (2005) Acetylcholinesterase inhibitors ameliorate behavioral deficits in the Tg2576 mouse

- model of Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* 181(1):145–152.
- 63) Adrian W, Ognibene E, Heuland E, Ghirardi O, Caprioli A, Laviola G (2006) Motor impulsivity in APP-SWE mice: a model of Alzheimer's disease. *Behav Pharmacol* 17(5-6):525–533.
- 64) Quinn JF, Bussiere JR, Hammond RS, Montine TJ, Henson E, Jones RE, Stackman RW Jr (2007) Chronic dietary alpha-lipoic acid reduced deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 28(2):213–225.
- 65) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21(2):372–381.
- 66) Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ (1992) Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 13(4):461–468.
- 67) Halliday GM, McCann HL, Pamphlett R, Brooks WS, Creasey H, McCusker E, Cotton RG, Broe GA, Harper CG (1992) Brain stem serotonin-synthesizing neurons in Alzheimer's disease: a clinicopathological correlation. *Acta Neuropathol* 84(6):638–650.
- 68) Yamamoto T, Hirano A (1985) Nucleus raphe dorsalis in Alzheimer's disease: neurofibrillary tangles and loss of large neurons. *Ann Neurol* 17(6):573–577.
- 69) Lai MK, Tsang SW, Francis PT, Esiri MM, Keene J, Hope T, Chen CP (2003) Reduced serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease. *Brain Res* 974(1-2):82–87.
- 70) Nichols DE (2004) Hallucinogens. *Pharmacol Ther* 101(2):131–181.
- 71) Ando RD, Benko A, Ferrington L, Kirilly E, Kelly PA, Bagdy G (2006) Partial lesion of the serotonergic system by a single dose of MDMA results in behavioural disinhibition and enhances acute MDMA-induced social behaviour on the social interaction test. *Neuropharmacology* 50(7):884–896.
- 72) Bjork JM, Dougherty DM, Moeller FG, Cherek DR, Swann AC (1999) The effects of tryptophan depletion and loading on laboratory aggression in men: time course and a food-restricted control. *Psychopharmacology (Berl)* 142(1):24–30.
- 73) Keele NB (2001) Phenytoin inhibits isolation-induced aggression specifically in rats with low serotonin. *Neuroreport* 12(6):1107–1112.
- 74) Vergnes M, Depaulis A, Boehrer A, Kempf E (1988) Selective increase of offensive behavior in the rat following intrahypothalamic 5,7-DHT-induced serotonin depletion. *Behav Brain Res* 29(1-2):85–91.
- 75) Sheard MH, Davis M (1976) p-Chloroamphetamine: short and long term effects

- uponshock-elicited aggression. *Eur J Pharmacol* 40(2):295–302.
- 76) Winslow JT, Miczek KA (1983) Habituation of aggression in mice: pharmacological evidence of catecholaminergic and serotonergic mediation. *Psychopharmacology (Berl)* 81(4):286–291.
- 77) Rilke O, Freier D, Jähkel M, Oehler J (1998) Dynamic alterations of serotonergic metabolism and receptors during social isolation of low- and high-active mice. *Pharmacol Biochem Behav* 59(4):891–896.
- 78) Schiller L, Jähkel M, Kretzschmar M, Brust P, Oehler J (2003) Autoradiographic analyses of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors after social isolation in mice. *Brain Res* 980(2):169–178.
- 79) Sánchez C, Arnt J, Hyttel J, Moltzen EK (1993) The role of serotonergic mechanisms in inhibition of isolation-induced aggression in male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 110(1-2):53–59.
- 80) Sánchez C, Hyttel J (1994) Isolation-induced aggression in mice: effects of 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors and involvement of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 264(3):241–247.
- 81) Sánchez C, Meier E (1997) Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? *Psychopharmacology (Berl)* 129(3):197–205.
- 82) Sakaue M, Ago Y, Sowa C, Sakamoto Y, Nishihara B, Koyama Y, Baba A, Matsuda T (2002) Modulation by 5-HT_{2A} receptors of aggressive behavior in isolated mice. *Jpn J Pharmacol* 89(1):89–92.
- 83) Pinna G, Dong E, Matsumoto K, Costa E, Guidotti A (2003) In socially isolated mice, the reversal of brain allopregnanolone down-regulation mediates the anti-aggressive action of fluoxetine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(4):2035–2040.
- 84) Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K (2009) Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. *Behav Brain Res* 202(1):114–121.
- 85) Wegiel J, Wang KC, Imaki H, Rubenstein R, Wronska A, Osuchowski M, Lipinski WJ, Walker LC, LeVine H (2001) The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APPSW mice. *Neurobiol Aging* 22(1):49–61.
- 86) Barnes P, Hale G, Good M (2004) Intramaze and extramaze cue processing in adult APPSWE Tg2576 transgenic mice. *Behav Neurosci* 118(6):1184–1195.
- 87) Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D (2007) Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 178(1):18–28.
- 88) Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K (2004) Exploratory activity, anxiety, and motor

- coordination in biogenic APP^{sw} + PS1/ DeltaE9 mice. *Neurosci Lett* 369(2):156–161.
- 89) King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ (1999) Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP^{sw} transgenic mouse for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 103(2):145–162.
- 90) Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, Carlson GA, Younkin SG, Ashe KH (2002) The relationship between A β and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22(5):1858–1867.
- 91) Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE (2006) Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13):5161–5166.
- 92) Fujiwara H, Iwasaki K, Furukawa K, Seki T, He M, Maruyama M, Tomita N, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Ohizumi Y, Arai H (2006) Uncaria rhynchophylla, a Chinese medical herb, has potent antiaggregation effects on Alzheimer's β -amyloid proteins. *J Neurosci Res* 84(2):427–433.
- 93) Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219(4589):1184–1190.
- 94) Davies P, Maloney AJ (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 2(8000):1403.
- 95) Davis BM, Mohs RC, Greenwald BS, Mathé AA, Johns CA, Horvath TB, Davis KL (1985) Clinical studies of the cholinergic deficit in Alzheimer's disease. I. Neurochemical and neuroendocrine studies. *J Am Geriatr Soc* 33(11):741–748.
- 96) Ikarashi Y, Harigaya Y, Tomidokoro Y, Kanai M, Ikeda M, Matsubara E, Kawarabayashi T, Kuribara H, Younkin SG, Maruyama Y, Shoji M (2004) Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APP^{sw} mice. *Neurobiol Aging* 25(4):483–490.
- 97) Auerbach JM, Segal M (1994) A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol* 72(4):2034–2040.
- 98) Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G (1998) Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur J Neurosci* 10(9):3020–3023.
- 99) Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G. (1999) Activation of M1-like muscarinic receptors is required for the induction of corticostriatal LTP. *Neuropharmacology* 38(2):323–326.
- 100) Harkany T, Lengyel Z, Soós K, Penke B, Luiten PGM, Gulya K (1995) Cholinotoxic effects

- of β -amyloid(1-42) peptide on cortical projections of the rat nucleus basalis magnocellularis. *Brain Res* 695(1):71–75.
- 101) Fitzjohn SM, Morton RA, Kuenzi F, Rosahl TW, Shearman M, Lewis H, Smith D, Reynolds DS, Davies CH, Collingridge GL, Seabrook GR (2001) Age-related impairment of synaptic transmission but normal long-term potentiation in transgenic mice that overexpress the human APP695SWE mutant form of amyloid precursor protein. *J Neurosci* 21(13):4691–4698.
- 102) Harkany T, O'Mahony S, Keijsers J, Kelly JP, Kónya C, Borostyánkői ZA, Görös TJ, Zarándi M, Penke B, Leonard BE, Luiten PG (2001) β -Amyloid (1-42) - induced cholinergic lesions in rat nucleus basalis bidirectionally modulate serotonergic innervation of the basal forebrain and cerebral cortex. *Neurobiol Dis* 8(4):667–678.
- 103) Kubota K, Sano K, Shiraishi A, Beppu N, Nogami A, Uchida N, Takasaki K, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M, Iwasaki K (2013) Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, promotes neurite outgrowth in PC12 cells through the activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Trad Med* 30(3):102–113.
- 104) Hatip-Al-Khatib I, Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Iwasaki K, Kurauchi K, Inui K, Ikeda T, Fujiwara M (2004) Determination of the effectiveness of compounds of herbal medicine Toki-Shakuyaku-San and fractions of *Angelica acutiloba* in improving the scopolamine-induced impairment of rat's special cognition in eight-armed radial maze test. *J Pharmacol Sci* 96(1):33–41.
- 105) Matsumoto K, Morishige R, Murakami Y, Tohda M, Takayama H, Sakakibara I, Watanabe H (2005) Suppressive effects of isorhynchophylline on 5-HT_{2A} receptor function in the brain: behavioural and electrophysiological studies. *Eur J Pharmacol* 517(3):191–199.
- 106) Zhao Q, Murakami Y, Tohda M, Watanabe H, Matsumoto K (2005) Preventive effect of Chotosan, a Kampo medicine, on transient ischemia-induced learning deficit is mediated by stimulation of muscarinic M1 but not nicotinic receptor. *Biol Pharm Bull* 28 (10):1873–1878.
- 107) Pengsuparp T, Indra B, Nakagawasai O, Tadano T, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y, Kisara K (2001) Pharmacological studies of geissoschizine methyl ether, isolated from *Uncaria sinensis* Oliv., in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 425(3):211–218.
- 108) Shimada Y, Goto H, Kogure T, Shibahara N, Sakakibara I, Sasaki H, Terasawa K (2001) Protective effect of phenolic compounds isolated from hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Am J Chin Med* 29(1):173–180.

- 109) Kang TH, Murakami Y, Matsumoto K, Takayama H, Kitajima M, Aimi M, Watanabe H (2002) Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Eur J Pharmacol* 455(1):27–34.
- 110) Kang TH, Murakami Y, Takayama H, Kitajima M, Aimi N, Watanabe H, Matsumoto K (2004) Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. *Life Sci* 76(3):331–343.
- 111) Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *Bioessays* 28(5):495–503.
- 112) Takahashi A, Quadros IM, de Almeida RM, Miczek KA (2011) Brain serotonin receptors and transporters: initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology (Berl)* 213(2-3):183–212.
- 113) Rilke O, Will K, Jahkel M, Oehler J (2001) Behavioral and neurochemical effects of anpirtoline and citalopram in isolated and group housed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25(5):1125–1144.
- 114) Liao JF, Jan YM, Huang SY, Wang HH, Yu LL, Chen CF (1995) Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active chinese herbal drugs. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 19(3):151–158.
- 115) Cooper JR, Bloom FE, Roth RH (1991) Amino acid transmitters. In: *The biochemical basis of neuropharmacology* (sixth edition), (Cooper JR, Bloom FE, Roth RH, eds), p 135. New York: Oxford University Press.
- 116) Carrasco GA, Van de Kar LD, Jia C, Xu H, Chen Z, Chadda R, Garcia F, Muma NA, Battaglia G (2007) Single exposure to a serotonin_{1A} receptor agonist, (+)8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, produces a prolonged heterologous desensitization of serotonin_{2A} receptors in neuroendocrine neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 320(3):1078–1086.
- 117) Wieland S, Fischette CT, Lucki I (1993) Effect of chronic treatments with tandospirone and imipramine on serotonin-mediated behavioral responses and monoamine receptors. *Neuropharmacology* 32(6):561–573.
- 118) Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Hondoh A, Shimada S (2009) Development of generic calcium imaging assay for monitoring Gi-coupled receptors and G-protein interaction. *J Biomol Screen* 14(7):781–788.
- 119) Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Shimada S (2011) Geissoschizine methyl ether has third-generation antipsychotic-like actions at the dopamine and serotonin receptors. *Eur J*

Pharmacol 671(1-3):79–86.

- 120) Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:461–480.
- 121) Exton JH (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:481–509.
- 122) Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR (1993) Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem* 268(24): 18200–18204.
- 123) Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ Jr, Shen Y, Meltzer HY, Sibley DR (1994) Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-₇ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 268(3):1403–1410.
- 124) Marsischky G, LaBaer J (2004) Many paths to many clones: a comparative look at high-throughput cloning methods. *Genome Res* 14(10B):2020–2028.
- 125) Liang F, Udayakumar M, Parvizi B, Yen J, Duan D, Mirchandani J, Hashima S, Nguyen U, Ubil E, Loewenheim J, Yu X, Sipes S, Williams W, Wang L, Bennett R, Carrino J (2004) ORFDB: an information resource linking scientific content to a high-quality Open Reading Frame (ORF) collection. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue):D595–D599.
- 126) Shultz S, Worzella T, Gallagher A, Shieh J, Goueli S, Hsiao K, Vidugiriene J (2008) Miniaturized GPCR signaling studies in 1536-Well format. *J Biomol Tech* 19(4):267–274.
- 127) Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349–400.
- 128) Newman-Tancredi, A., Chaput, C., Verrielle, L., Millan, M.J., 1996. Clozapine is a partial agonist at cloned, human serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology* 35:119–121.
- 129) Jordan S, Chen R, Koprivica V, Hamilton R, Whitehead RE, Tottori K, Kikuchi T (2005) In vitro profile of and the antidepressant candidate OPC-14523 at rat and human 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol* 517(3):165–173.
- 130) Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE (2000) 5-HT₇ receptors: current knowledge and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 21(2):70–77.
- 131) Hedlund PB, Sutcliffe JG (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25(9):481–486.
- 132) Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW (1997) Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing :species differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem* 68(4):1372–1381.

- 133) Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Levy FO (2001) The cloned human 5-HT₇ receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function, and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363(6):620–632.
- 134) Bonaventure P, Nepomuceno D, Kwok A, Chai W, Langlois X, Hen R, Stark K, Carruthers N, Lovenberg TW (2002) Reconsideration of 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptor distribution using [³H]5-carboxamidotryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline: analysis in brain of 5-HT_{1A} knockout and 5-HT_{1A/1B} double-knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1):240–248.
- 135) Pittala V, Pittala D (2011) Latest advances towards the discovery of 5-HT₇ receptor ligands. *Mini Rev Med Chem* 11(13):1108–1121.
- 136) Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL (1993) Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem* 268(31):23422–23426.
- 137) Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA, Foye PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW (1993) A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11(3):449–458.
- 138) Gannon RL (2001) 5-HT₇ receptors in the rodent suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 16(1): 19–24.
- 139) Eglén RM, Jasper JR, Chang DJ, Martin GR (1997) The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends Pharmacol Sci* 18(4):104–107.
- 140) Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB (2011) Serotonin 5-HT₇ receptor agents: Structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther* 129(2):120–148.
- 141) Yuzurihara M, Ikarashi Y, Goto K, Sakakibara I, Hayakawa T, Sasaki H (2002) Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncaria Ramulus et Uncus*, is a potent vaso-relaxant of isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol* 444(3):183–189.
- 142) Shinno H, Kamei M, Nakamura Y, Inami Y, Horiguchi J (2008) Successful treatment with Yi-Gan San for rapid eye movement sleep behavior disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32(7):1749–1751.
- 143) Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoka R, Kataoka Y, Niwa M (2007) Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol* 27(6):687–694.
- 144) Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel Á, Tanaka K, Niwa M (2009) A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells,

- pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 54(3-4):253–263.
- 145) Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M (2005) Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 25(1):59–127.
- 146) Joó F (1996) Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similarities and differences. *Prog Neurobiol* 48(3):255–273.
- 147) Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41–53.
- 148) Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L (2007) Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6(8):650–661.
- 149) Kis B, Deli MA, Kobayashi H, Abrahám CS, Yanagita T, Kaiya H, Isse T, Nishi R, Gotoh S, Kangawa K, Wada A, Greenwood J, Niwa M, Yamashita H, Ueta Y (2001) Adrenomedullin regulates blood–brain barrier functions in vitro. *Neuroreport* 12(18): 4139–4142.
- 150) Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TK, Niwa M, Abrahám CS, Deli MA (2007) Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem Int* 50(1):219–228.
- 151) Dehouck MP, Jolliet-Riant P, Brée F, Fruchart JC, Cecchelli R, Tillement JP (1992) Drug transfer across the blood–brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. *J Neurochem* 58(5):1790–1797.
- 152) de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, de Boer AG, van Berkel TJ, Breimer DD, Kuiper J (1996) Effect of endotoxin on permeability of bovine cerebral endothelial cell layers in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 277(3):1418–1423.
- 153) Gaillard PJ, de Boer AB, Breimer DD (2003) Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood–brain barrier in vitro. *Microvasc Res* 65(1):24–31.
- 154) Sakakibara I, Terabayashi S, Kubo M, Higuchi M, Komatsu Y, Okada M, Taki K, Kamei J (1999) Effect on locomotion of indole alkaloids from the hooks of uncaria plants. *Phytomedicine* 6(3):163–168.
- 155) Mimaki Y, Toshimizu N, Yamada K, Sashida Y (1997) Anti-convulsion effects of choto-san and chotoko (*Uncariae Uncis cam Ramlus*) in mice, and identification of the active principles. *Yakugaku Zasshi* 117(12):1011–1021.

論文審査主査および副査

本学位論文は、2013年2月福岡大学薬学部において審査された。

主査 岩崎 克典 教授

副査 高野 行夫 教授

副査 片岡 泰文 教授

副査 金城 順英 教授

公表論文目録

本論文の内容は以下の科学雑誌に公表した。

- 1) Tabuchi M, Yamaguchi T, Iizuka S, **Imamura S**, Ikarashi Y, Kase Y (2009) Ameliorative effects of *yokukansan*, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol* 122:157-162 (IF: 2.322)
- 2) **Imamura S**, Tabuchi M, Kushida H, Nishi A, Kanno H, Yamaguchi T, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kase Y (2011) The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in *Uncaria hook*, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine *yokukansan*. *Cell Mol Neurobiol* 31:787-793 (IF:2.423)
- 3) Tabuchi M, **Imamura S**, Kawakami Z, Ikarashi Y, Kase Y (2012) The blood-brain barrier permeability of 18 β -glycyrrhetic acid, a major metabolite of glycyrrhizin in glycyrrhiza root, a constituent of the traditional Japanese medicine *yokukansan*. *Cell Mol Neurobiol* 32:1139-1146 (IF:2.423)
- 4) Nishi A, Yamaguchi T, Sekiguchi K, **Imamura S**, Tabuchi M, Kanno H, Nakai Y, Hashimoto K, Ikarashi Y, Kase Y (2012) Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in *Uncaria hook*, is a potent serotonin_{1A} receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by *yokukansan*. *Neurosci* 207:124-136 (IF:3.215)
- 5) Ueki T, Nishi A, **Imamura S**, Kanno H, Mizoguchi K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kase Y (2013) Effects of geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid in *Uncaria hook*, a constituent of *yokukansan*, on human recombinant serotonin₇ receptor. *Cell Mol Neurobiol* 33:129-135 (IF:2.423)

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導および御高閲を賜り、また論文審査の主査を務めて頂いた福岡大学薬学部、岩崎克典教授、副査を努めて頂いた薬学部、高野行夫教授、薬学部、片岡泰文教授および薬学部、金城順英教授に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さり御支援を賜りました株式会社ツムラ製品戦略本部ツムラ研究所長、加瀬義夫博士および製品戦略本部長、高崎隆次取締役役に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、直接の御指導と御鞭撻を賜りました株式会社ツムラ製品戦略本部ツムラ研究所・育薬2グループ長、五十嵐康博士に深く感謝致します。

多種多様な研究に多大なる御協力を賜りましたツムラ研究所育薬2グループ・抑肝散研究スタッフ一同、田淵雅宏博士、関口協二博士、山口琢児博士、川上善治博士、溝口和臣博士、植木俊之博士、西明紀博士および菅野仁美研究員に深く感謝致します。

また、本研究に必要な多数の生薬および成分を御提供して頂いた株式会社ツムラ生薬本部生薬研究部・生薬品質グループ長、橋本和則博士および中井洋一郎博士、生産本部漢方製剤開発センター漢方品質設計部・生薬品質設計グループ長、西村浩昭博士に深く感謝致します。

最後に、終始温かく見守り励ましてくれた家族に心から感謝致します。