

繰り返し脳虚血ラットの空間記憶障害と周辺症状様行動に対する 抑肝散の効果と作用機序解明

野上 愛

福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室 〒814-0181 福岡市城南区七隈8-19-1

Elucidation of the mechanism of action and effects of yokukansan on spatial memory impairment and BPSD-like behavior in rats with cerebral ischemia

Ai Nogami

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University,
8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD) are commonly seen in patients with dementia. Current pharmacological approaches to treatment are insufficient, despite the availability of serotonergic agents to ameliorate anxiety, one of the symptoms of BPSD. The herbal medicine Yokukansan (YKS) has been demonstrated to improve BPSD in a randomized, single-blinded, placebo-controlled study. However, the mechanisms of the anxiolytic effect of YKS have not been clarified. There are also no reports on the anxiolytic effect of YKS in cerebrovascular ischemia models. Moreover, the effect of YKS on the impairment of spatial memory is still unknown. In this study, we examined whether rats subjected to repeated cerebral ischemia exhibited anxiety-like behavior in a plus-maze task, a light/dark box test and an open-field task. We then investigated the effect of YKS on the anxiety-like behavior and impairment of spatial memory in eight-arm radial maze task in rats with cerebral ischemia.

The ischemic rats showed anxiety-like behavior in all three tasks, suggesting that this rat may be a good model for anxiety in cerebrovascular dementia. YKS exhibited anxiolytic effects on the anxiety-like behavior in rats subjected to repeated cerebral ischemia, and exerted antagonistic effects on the wet-dog shakes induced by 1-(2,5-dimethoxy 4-indophenyl)-2-amino propane (DOI), a serotonin receptor (5-HT_{2A}) agonist. This study revealed YKS shows anxiolytic effects in cerebrovascular model rats.

YKS and Toki, which is one of the component of YKS, improve spatial memory with augment of acetylcholine (ACh) release from the dorsal hippocampus and with improvement of hippocampal apoptosis following repeated cerebral ischemia.

These results suggest that YKS could improve the anxiety-like behavior via 5-HT_{2A} signal and that YKS could improve the impaired spatial memory with improvement of apoptosis and ACh release from dorsal hippocampus. YKS thought to be effective not only BPSD but also a core symptom such as memory loss in the cerebrovascular dementia patients.

Keywords : Yokukansan, dementia, spatial memory impairment, BPSD, ischemia

【緒言】

脳血管障害やアルツハイマー病に代表される認知症の症状は、中核症状である記憶障害（dementia）と、幻覚、不安、抑うつ、興奮、攻撃的言動、徘徊などの行動・心理症状（Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia : BPSD）の2つに代表される¹。認知症に対する治療戦略はこの両者の改善に尽きるところではあるが、疾患の発症メカニズムが未だ不明であることと相まって有効な治療薬が無いのが現状である。近年、BPSDに関しては行動学上の同一性から対症療法として定型あるいは非定型の抗精神病薬が用いられるようになった。しかしながらこれらはBPSDの発症メカニズムに由来する治療法ではない上に、抗精神病薬特有の錐体外路系副作用を呈し、患者はこれに苦しめられ、最終的には使用をやめることになり症状の緩解にはつながらない²。このような状況の中、漢方方剤である抑肝散がBPSDを改善することが臨床試験で確認され報告された³。しかしながら、これらはすべてアルツハイマー病の患者での知見で、脳血管性認知症については効果が不明であった。脳血管性認知症に対する抑肝散の効果を科学的根拠に基づいて示すことが臨床ひいては患者への貢献になると考えられることから、できるだけ患者の病態に近い脳血管性認知症の動物モデルを作製し、抑肝散の効果さらにはその機序を明らかにすることにした。

【周辺症状（BPSD）に関する検討】

認知症患者では自発運動量の亢進やうつなど様々なBPSDが発現する。特に不安症状を呈する患者が多く、脳血管性認知症患者での発現頻度が高いことが報告されている⁴。これらを実験動物に再現するために、脳血管障害を想定した繰り返し脳虚血ラット（RIラット）を用いて、BPSD様行動として自発運動量と不安様行動を解析し、RI処置による影響を検討した。次に、RIラットを用いて抑肝散の効果と作用機序を5-HT神経系に着目して検討した。

RIラットは8週齢のWistarラットに10分間の全脳虚血を1時間間隔で2回行い作製した。行動評価は、空間記憶障害が発現する虚血後7日目に行なった。抑肝散は1日1回14日間反復経口投与し、最終投与1時間後に行動評価を行った。

1. 自発運動量に関する検討

自発運動量は新奇環境下を想定してOpen fieldを用い、10分間の運動量を測定した。またホームケージにおける24時間の運動量を放出赤外線検出型センサーで測定した。その結果、RIラットの運動量はOpen fieldによる測定では偽手術（Sham）ラットと有意な差はなかったが（図1）、放出赤外線センサーによる測定ではShamラットよりも有意に増加していた（図1-A）。これより、RIラットはShamラットよりも24時間の自発運動量が増加していることが明らかになった。さらに、24時間の自発運動量の増加が明期（7:00～19:00）で顕著だったことより（図1-B）、RIラットでは夜行性動物の夜に相当する明期を中心とするサーカディアンリズム障害もしくは睡眠障害が起きている可能性が示唆された。

この変化に対し、抑肝散（1000 mg/kg）は対照群と比較して放出赤外線検出型センサーによる自発運動量を有意に減少した（図1.A, B）。このことから、抑肝散に鎮静作用があることが明らかになった。加えて、抑肝散はSham群が示す運動量以下にまでは抑制しなかったことから、過度な鎮静作用を示さないことが明らかになった。臨床において活動過多や興奮に伴う攻撃性の発現は対応が困難なBPSDの一つであるが、既存の治療薬は過鎮静によるふらつきが発現することが多く、治療を困難にさせている。このことを考えると抑肝散が過度な鎮静作用を示さないことは非常に有用である。

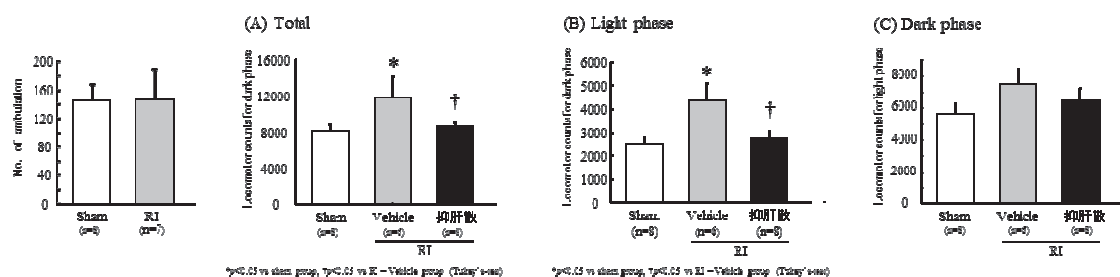


図1. RI処置による自発運動量の増加と抑肝散の効果

2. 不安様行動に関する検討

不安様行動は明暗箱課題と高架式十字迷路課題, Open fieldの3種の方法を用いて検討した。その結果, RIラットは明暗箱課題で暗箱滞在時間が延長し, 高架式十字迷路課題ではenclosed arm滞在時間が延長した。また, Open fieldでは外側滞在率が増加した。このようにラットが暗くて狭い所に留まることや, 壁に寄り添って行動することは不安を感じていることに他ならず, このことより, RIラットはShamラットよりも不安閾値が低下していることが明らかになった。これらRIラットの不安行動に対し, 抑肝散(100, 300, 1000 mg/kg)を投与すると, 用量依存的に改善した。

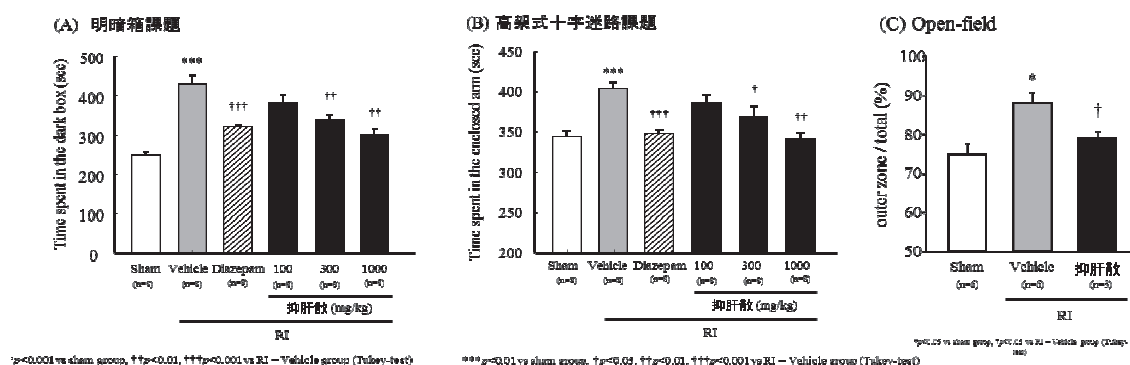


図2. RI処置による不安様行動の発現と抑肝散の抗不安効果

3. 5-HT_{2A} 受容体 agonist を用いた抑肝散と 5-HT_{2A} 受容体の関与に関する検討

RIラットが不安を感じやすくなっていることが分かったので, この場合の脳内機序を探ることにした。脳内5-HT受容体の中でも前頭葉皮質の5-HT_{2A}受容体は不安症状や活動量の調節に関連が高いことが報告されている⁵。そこで, 抑肝散の効果に5-HT_{2A}受容体が関与しているか否かを明らかにすることを目的に, 5-HT_{2A}受容体 agonist である1-(2,5-dimethoxy 4-indophenyl)-2-amino propane (DOI) による wet dog shake 行動に対する作用を検討した。DOI (5mg/kg) は抑肝散 (1000 mg/kg) を最終投与した1時間後に腹腔内投与し, 投与直後から10分間の wet dog shake 回数を測定した。また, DOIに対するRIラットとShamラットの反応性の違いも検討した。その結果, RIラットはShamラットよりも wet dog shake 回数が有意に増加した。これより, RIラットでは5-HT_{2A}受容体機能が亢進している可能性が示唆された。さらに抑肝散は対照群と比べて wet dog shake 回数を有意に減少させたことから, 抑肝散は5-HT_{2A}受容体 antagonist 作用を有することが明らかになった。

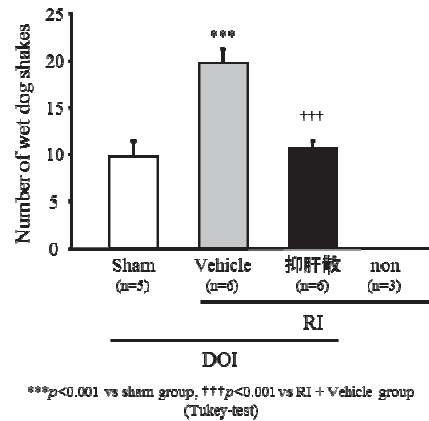


図3. RI処置による5-HT_{2A}受容体機能の亢進と、抑肝散の5-HT_{2A}受容体 antagonist 作用

4. 抑肝散の抗不安効果と5-HT_{2A}受容体の関与に関する検討

次に、抑肝散にDOIを併用投与した場合の不安様行動を検討した。不安様行動は明暗箱課題と高架式十字迷路課題, Open field を用いて検討した。DOIはwet dog shake行動を評価した場合と同様に投与した。その結果、抑肝散の投与によって得られた抗不安効果はDOIの投与によって消失した。これより、抑肝散は5-HT_{2A}受容体の抑制を介して抗不安効果を示すことが明らかになった。

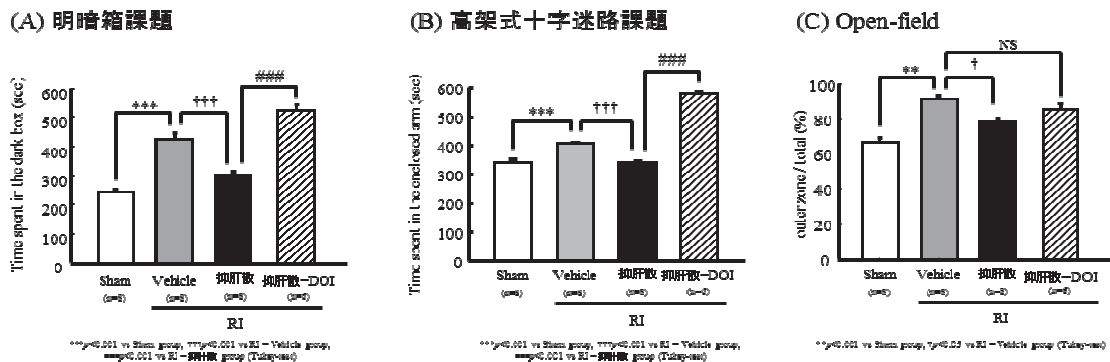


図4. 5-HT_{2A}受容体 antagonist 作用を介した抑肝散の抗不安効果

5. 前頭前野における5-HT遊離量に対するRI処置の影響

5-HT_{2A}受容体機能が亢進する理由の一つとして5-HT遊離量の低下が関与することが明らかにされており、認知症患者の死後脳でも同様の変化が観察されている⁶。そこで、5-HT_{2A}受容体の機能変化に前頭前野の5-HT遊離量の変化を伴うか否かをin vivo micro dialysis法を用いて検討した。その結果、RIラットはShamラットよりも5-HTの自然遊離量、およびhigh-K⁺刺激による強制遊離量が有意に減少していることが明らかになった。また、抑肝散は対照群よりも5-HTの自然遊離量、およびhigh-K⁺刺激による強制遊離量をともに増加させた。

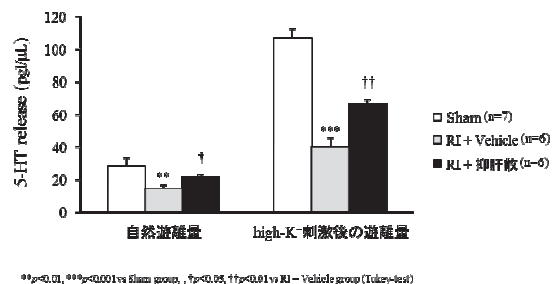


図5. RI処置による前頭前野5-HT遊離量の減少と、抑肝散の改善作用

6. 小括

脳血管性認知症の動物モデルであるRIラットは、夜行性動物の夜に相当する明期の自発運動量を有意に増加させ、明暗箱や高架式十字迷路課題でも不安閾値を低下させることが分かった。これらは脳血管性認知症患者の夜間徘徊や不安行動などBPSD症状を外挿したものと考えられた。これに対して抑肝散は有意な抑制作用を示し、しかも従来の対症薬のような錐体外路系の副作用を呈することはなかった。さらに抑肝散のBPSD抑制作用には亢進した5-HT_{2A}受容体の抑制（正常化）ならびに機能低下をきたした脳内5-HT神経伝達の活性化がその機序である可能性が示唆された。

【中核症状に関する検討】

認知症患者では、中核症状として記憶障害や見当識障害が発現する。これには現在、ドネペジルが唯一の治療薬として臨床応用されている⁷。そこで、BPSDを抑制することを明らかにした抑肝散が中核症状の改善作用を併せ持つか否かについて検討した。ここではRIラットを用いて8方向放射状迷路課題における空間記憶障害に対する抑肝散の効果と作用機序を検討した。行動評価は虚血後7日目に行なった。対照薬として塩酸ドネペジルの効果も検討した。

1. 8方向放射状迷路課題を用いた空間記憶障害に対する抑肝散の効果

抑肝散（100, 300, 1000 mg/kg）を1日1回14日間反復経口投与したところ、RI処置によって増加した誤選択数が対照群と比較して用量依存的に減少した。このことから、抑肝散は空間記憶障害を改善することが明らかになった。

加えて、抑肝散（1000 mg/kg）は7日間の反復投与によっても誤選択数を減少させた。これより、抑肝散は発症後の治療効果を有することが示唆された。対照群としてドネペジル（10 mg/kg）を7日間反復投与した場合でも空間記憶の改善は認められた。従って抑肝散はドネペジルとほぼ同等の効果を有することが確認された。

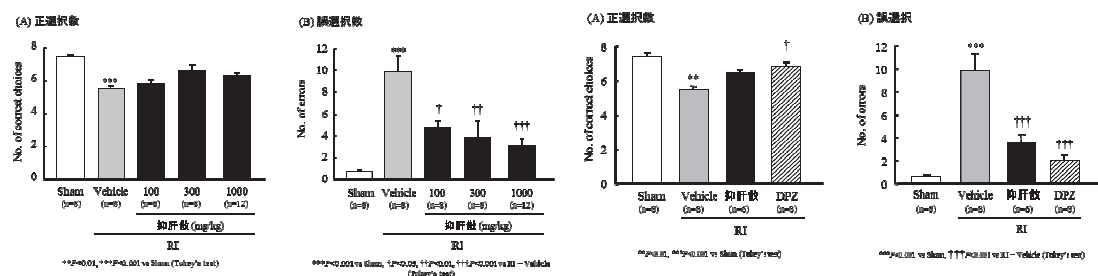


図6. 空間記憶障害に対する抑肝散の効果

2. 背側海馬におけるACh遊離量に対する抑肝散の効果

空間記憶とコリン神経系の機能は、密接に関係することが知られている⁸。そこで抑肝散の空間記憶障害改善作用にコリン神経系が関与するか否かを、in vivo micro dialysis法を用いて背側海馬におけるacetylcholine (ACh) 遊離量を測定することにより検討した。RIラットではAChの自然遊離量およびhigh-K⁺による強制遊離量の両者共に減少するが、抑肝散（1000 mg/kg）を14日間、もしくは7日間反復投与することでこれらの減少が有意に回復した。このようなAChの遊離促進作用は、ドネペジル（10 mg/kg）を7日間反復投与した場合でも観察された。このことから抑肝散はドネペジルと同様にACh神経を賦活することが明らかになった。しかしながら抑肝散にはドネペジルの様な著明なコリンエステラー

ゼ阻害作用は報告されていないので、同じACh神経賦活作用でもその機序は異なると考えられた。また興味深いことに、抑肝散を最終投与する前のACh自然遊離量が対照群よりも増加していたのに対し、ドネベジル投与群では増加していなかった。すなわち抑肝散はゆるやかながらもAChの自然遊離を増加させる特徴を有することを明らかにした。このことから抑肝散は投与後すぐに表れるACh賦活作用だけでなく、ACh遊離を持続的に保持する効果を有する可能性が示唆された。

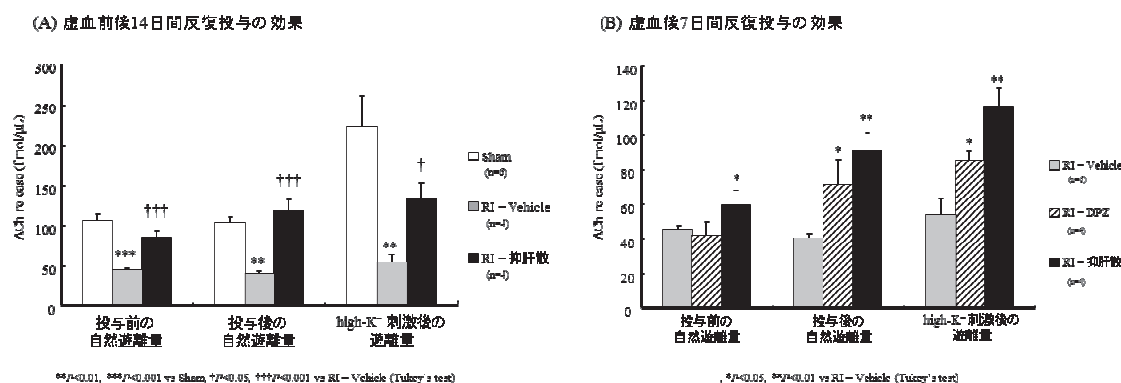


図7. 背側海馬におけるACh遊離量の減少に対する抑肝散の効果

3. RI処置による海馬CA1領域の神経細胞死に対する抑肝散の効果

抑肝散がACh遊離能を保持させた理由として、海馬の神経細胞を保護した可能性がある。そこで海馬CA1領域の神経細胞死に対する効果を、組織の形態を観察するHE染色法と、アポトーシスを検出するTUNEL染色法を用いて検討した。その結果、HE染色像から海馬CA1領域ではRIによって神経細胞の脱落や空包化、核の濃縮が観察され、TUNEL染色像からアポトーシス陽性細胞数の増加が観察された。しかし、抑肝散(100, 300, 1000 mg/kg)を14日間もしくは7日間反復投与することにより神経細胞が保持され、アポトーシス陽性細胞数は減少した。これに対し、ドネベジル(10 mg/kg)投与による改善はなかった。これより、海馬CA1領域において、抑肝散はアポトーシスからの神経細胞保護作用を有するが、ドネベジルはこれを有さないことが明らかになった。

4. 抑肝散の構成生薬である当帰の効果と作用機序の検討

抑肝散のRIラットの認知症類似症状に対する有効性を明らかにしたが、次に7種の生薬で構成される抑肝散のどの構成生薬がその本体なのかが問題になる。これについては、抑肝散と共通する構成生薬が多い当帰芍薬散が中核症状に対して改善作用を示し、抑肝散にも含まれる当帰がこの中心的役割を担っていることをすでに見いだしている^{9, 10}。そこで、中核症状に対する抑肝散の改善作用に、当帰が重要であるか否かを検討した。当帰は抑肝散1000mg/kgに対して配合比で約150mg/kg含まれるため、150mg/kgの用量を虚血後7日間反復経口投与して検討を行った。その結果、当帰はRI処置によって増加した8方向放射状迷路課題における誤選択数を有意に減少させた。加えて、当帰を最終投与する前のACh自然遊離量、投与後の自然遊離量、high-K⁺による強制遊離量をいずれも増加させた。さらに、海馬CA1のアポトーシスによる神経細胞死を抑制した。これらより、当帰は空間記憶障害を改善し、その作用機序として細胞保護作用による海馬のACh遊離能の保持や、ACh神経の賦活作用を有することが明らかになった。

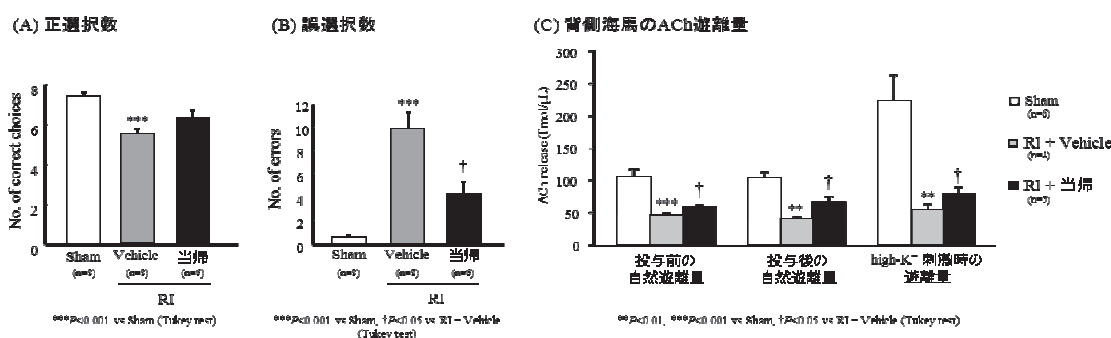


図8. 空間記憶障害ならびに背側海馬におけるACh遊離量の減少に対する当帰の効果

【総括・結論】

RIラットは、明期で顕著にみられる24時間の自発運動量の増加や不安様行動が確認され、BPSD様の行動変化を呈することが明らかになった。また、BPSDの発症要因の一つとして報告される5-HT_{2A}受容体の機能亢進や、前頭前野における5-HT遊離量の低下など中枢5-HT神経系の異常も確認された。これらの知見はRIラットの行動異常が脳血管性認知症患者のBPSDに類似しており薬理的に外挿可能であることを意味する。さらにRIラットのBPSD様行動が抑肝散で有意に改善されること、さらにはその機序に前頭前野の5-HT神経系が深く関わり、抑肝散は5-HT遊離量の増加を介して5-HT_{2A}受容体の機能亢進を抑制することを明らかにした。

一方、抑肝散はRIラットの空間記憶障害を改善し、その作用には海馬のACh神経の賦活作用が深く関わり、抑肝散は、海馬からのACh遊離を回復させることにより空間記憶障害を改善したことが考えられた。さらに抑肝散は、海馬からのACh自然遊離も増加させることや海馬のアポトーシスを著明に抑制するなどドネペジルとは全く異なる機序を有することも突き止めた。その作用機序として神経細胞保護作用による海馬のACh遊離能の保持や、ACh神経の賦活作用を有することが明らかになった。中核症状に対する既存の治療薬であるドネペジルは細胞保護作用を示さなかったことから、抑肝散は中核症状に対する新たな治療薬となる可能性が示唆された。また、これらの作用は抑肝散の7つの構成生薬のうち、特に当帰によることが大きいことも見いだした。これらのことから、抑肝散は空間記憶障害などの中核症状にも有効である可能性が示唆された。以上のことから、抑肝散は、脳血管性認知症患者のBPSDだけでなく中核症状に対しても有用な幅広い用途を備えた新たな認知症治療薬となる可能性が示された。

【参考文献】

1. Finkel SI, Costa e Silva J, Cohen G, Miller S, Sartorius N. Behavioral and psychological signs and symptoms of dementia: a consensus statement on current knowledge and implications for research and treatment. *Int Psychogeriatr.* 1996 ; 8 Suppl 3 : 497-500.
2. Jeste DV, Caliguri MP, Paulsen JS. Risk of tardive dyskinesia in older patients: a prospective longitudinal study of 266 outpatients. *Arch Gen Psychiatry* 1995;52:756-765.
3. Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M, Monma Y, Nemoto M, Tomita N, et al. 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.* 2005 ; 66 : 248-52.
4. Seignourel PJ, Kunik ME, Snow L, Wilson N, Stanley M (2008) Anxiety in dementia: a critical review. *Clin Psychol Rev* 28:1071-1082.

5. Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, Gonzalez-Maeso J, Hornung JP, et al. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*. 2006 ; 313 : 536-40.
6. Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res*. 1995 ; 688 : 121-33.
7. Roman GC, Salloway S, Black SE, Royall DR, Decarli C, Weiner MW, et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of donepezil in vascular dementia: differential effects by hippocampal size. *Stroke*. 2010 ; 41 : 1213-21.
8. Terry AV, Jr., Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 ; 306 : 821-7.
9. Hatip-Al-Khatib I, Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Kurauchi K, Inui K, et al. Determination of the effectiveness of components of the herbal medicine Toki-Shakuyaku-San and fractions of *Angelica acutiloba* in improving the scopolamine-induced impairment of rat's spatial cognition in eight-armed radial maze test. *J Pharmacol Sci*. 2004 ; 96 : 33-41.
10. Pu F, Mishima K, Egashira N, Akiyoshi Y, Liu AX, Sano K, et al. Post-ischemic treatment with toki-shakuyaku-san (tang-gui-shao-yao-san) prevents the impairment of spatial memory induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Am J Chin Med*. 2005 ; 33 : 475-89.

【謝辞】

本稿を終わるにあたり、終始温かい御指導、御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室の藤原道弘教授、ならびに岩崎克典教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり終始多大なる御助言と御指導を賜りました三島健一准教授、高崎浩太郎助教、桂林秀太郎助教、窪田香織助教に深く感謝し、御礼申し上げます。また本論文提出にあたって、福岡大学薬学部薬学部生体機能制御学教室の高野行夫、ならびに同大学教授生薬学教室の金城順英教授から貴重な御助言と御示唆を賜りました。ここに深く感謝し、御礼申し上げます。

また公私ともに多大な御指導、御助言ならびに御協力頂いた入江圭一氏、渡辺拓也氏、早川和秀氏、佐野和憲氏に深く感謝致します。また共同研究者として多くの議論をし、ともに実験をして下さった内田直樹氏、大石博史氏、安倍由起子女史、阪田有理女史、道脇裕子女史、安達和宏氏、山口加寿子女史、川崎千尋女史、藤川理沙子女史、中村和哉氏に心より御礼申し上げます。さらには本研究を遂行するにあたり、終始ご協力を頂いた福岡大学臨床疾患薬理学教室の皆様にも深く感謝致します。また、学生生活を通じ始終精神的、経済的支援を賜りました家族をはじめ、多くの方々に深く感謝致します。最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物緒霊に深く感謝致します。