

当帰芍薬散の実験的空間記憶障害ならびに 神経細胞死の抑制作用に関する神経薬理的研究

劉 安信

福岡大学薬学部 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Pharmacological evidences of Toki-shakuyaku-san for
neuroactive and neuroprotective actions

Anxin liu

Department of Neuropharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

In the present study, the neuroactive and neuroprotective effects of Tokishakuyakusan (TSS) were investigated in animal model of Alzheimer's disease and cerebrovascular dementia. Single administration of TSS dose-dependently improved the scopolamine-induced impairment of spatial memory in the 8-arm radial maze. We found that a beta-carboline derivative, Ang-S-1 (1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid), which is a partial inverse agonist of benzodiazepine, was active component of TSS. Moreover, single administration of TSS increased acetylcholine (ACh) release in the dorsal hippocampus. These results suggested that TSS may enhance cholinergic neuron through the benzodiazepine receptor in the dorsal hippocampus. In the animal model of cerebrovascular dementia, the post ischemic treatment of TSS prevented the impairment of spatial memory, neuronal death and TUNEL positive cells in rats subjected to repeated ischemia (2 x 10 minutes, 1 hour interval). Moreover, TSS inhibited the decrease of GluR2 flop mRNA on the 3rd day after the repeated cerebral ischemia. These results suggested that the neuroprotective effect of TSS may play an important role on the inhibition of Ca²⁺ influx through the GluR2 subunit of AMPA receptor. In conclusion, the present findings show that TSS prevents the memory deficits not only through enhancing ACh release but also through protecting neuronal damage. Thus TSS may be useful in the treatment of AD and cerebrovascular dementia.

Key words

Toki-shakuyaku-san (TSS), beta-carboline derivative, acetylcholine, cerebral ischemia, neuroprotection

結言

当帰芍薬散は、「金匱要略，婦人妊娠病脈証並治」に妊娠中の腹中疼痛を治すと記載されている。本剤は，当帰，芍薬，川芎，茯苓，蒼朮，沢瀉の6種類の生薬で構成されており，当帰，芍薬，川芎などが瘀血に有効なことから，卵巣機能不全，不妊症，子宮内膜症などの婦人病の他に貧血，倦怠感，更年期障害，動悸，慢性胃炎，心臓弁膜症および半身不随など広く適用されている（図1）。また，閉経後にみられる認知症に有効であり，衣類の脱着の改善，短期記憶などの知的機能の改善および摂食状態，失禁，徘徊などの問題行動を改善している（1，2）。しかしながら，当帰芍薬散の学習・記憶障害改善作用の有効成分の検索や認知症に対する改善作用の機序追求はいまだ不明である。そこで，本研究では，抗コリン薬の scopolamine による空間記憶障害に対する当帰芍薬

散の改善作用の有効成分の探索ならびにそれに関わるコリン作動性神経系の役割について検討した。次に，認知症の病態モデルであり，我々

が考案した繰り返し脳虚血モデルによる空間記憶障害ならびに神経細胞死に対する当帰芍薬散の改善機序について検討した。

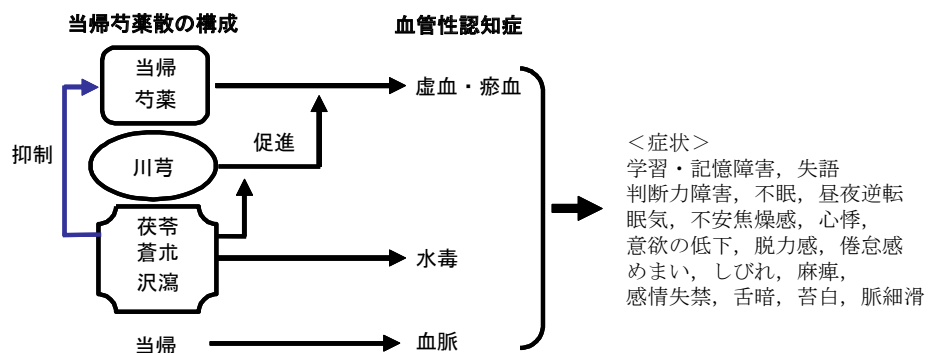


図1 漢方方剤の原則に基づいた当帰芍薬散の仕組み

A) 8 方向放射状迷路課題での抗コリン薬，scopolamine による空間記憶障害に対する当帰芍薬散の作用本体の探索

1) 当帰芍薬散および6つの構成生薬による空間記憶障害改善作用：当帰

当帰芍薬散は，scopolamine による空間記憶障害に対して，100-200 mg/kg の用量で改善した（図2）。当帰芍薬散の6つの構成生薬の中で，当帰は0.1-1 mg/kg，川芎は1 mg/kg，蒼朮は500 mg/kg，茯苓と沢瀉は50 mg/kg の用量で改善作用を示した。一方，芍薬はいずれの用量（5-50 mg/kg）でも改善作用がみられなかった。以上のことから，当帰芍薬散の改善作用の中心は当帰であることがわかった（図3）。

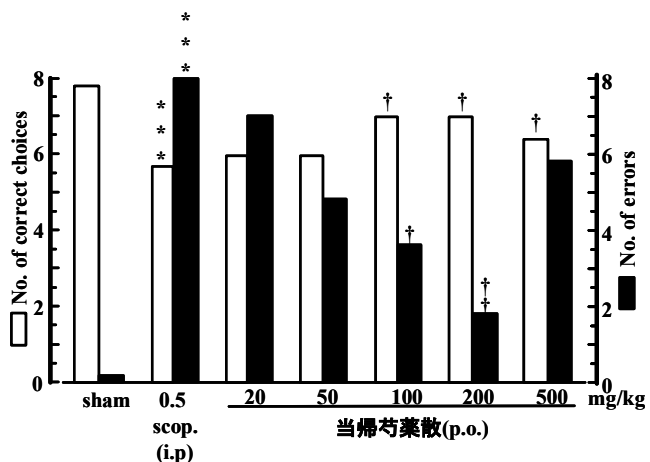


図2 Scopolamineによる空間記憶障害に対する当帰芍薬散の影響

2) 当帰の各分画による空間記憶障害改善作用 : BuOH 分画

当帰を6つに分画し, scopolamine による空間記憶障害に対して当帰の分画の影響を検討した結果, BuOH層は1-2 mg/kg, Internal 溶液は0.05 mg/kg, External 溶液は0.1 mg/kgの用量で改善作用がみられた. しかしながら, BuOH層に比べると, Internal 溶液とExternal 溶液の低用量による改善作用は弱く, 用量曲線も安定していなかった. 一方, Hexane 層およびMeOH層はいずれの用量でも改善作用がみられなかった. したがって, 当帰の改善作用の中心はBuOH層であると判断した(図4).

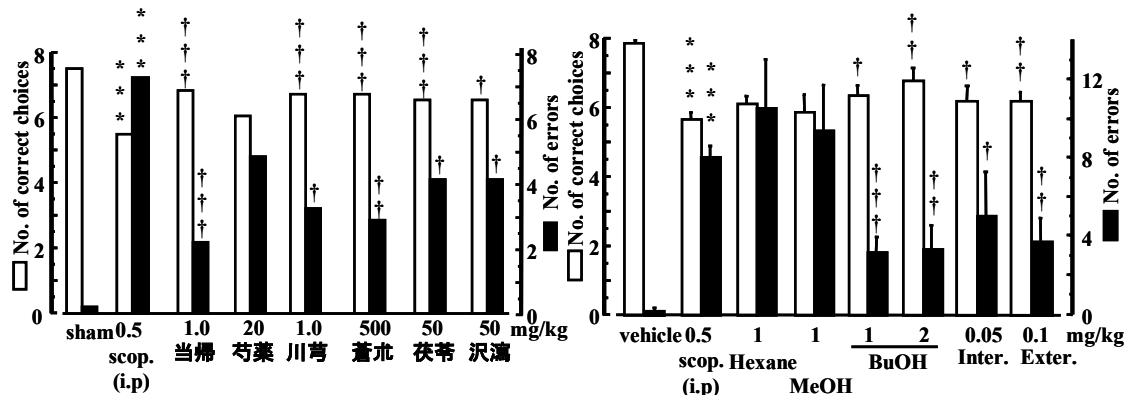


図3 Scopolamineによる空間記憶障害に対する当帰芍薬散の各構成生薬の影響

図4 Scopolamineによる空間記憶障害に対する当帰分画のまとめ

3) 当帰 BuOH 層中の有効成分の探索 : β -カルボリン誘導体, Ang-S-1

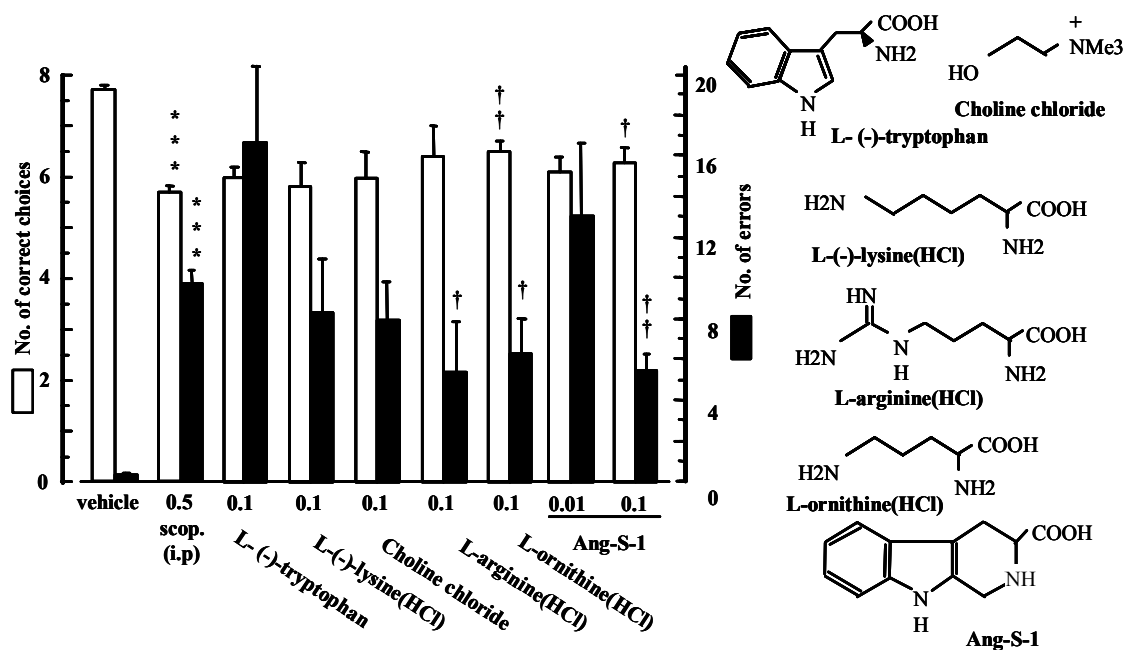


図5 Scopolamineによる空間記憶障害に対する当帰ブタノール層中の6種類の成分の影響とその構造式

当帰の BuOH 層中には, Ang-S-1, L-(-)-tryptophan, L-arginine (HCl), L-(-)-lysine (HCl),

L-ornithine(HCl), choline chloride の6種類の塩基性アミノ酸が含まれている。その中で、L-ornithine(HCl)とAng-S-1は0.1 mg/kgの用量で改善効果を示し、Ang-S-1はL-ornithine(HCl)に比べて、誤選択数の改善効果が強かった。このことから、BuOH層中のβ-カルボリン誘導体のAng-S-1が改善作用の中心であることが明らかになった(図5)。

4) 当帰芍薬散の背側海馬からのアセチルコリン遊離促進作用

当帰芍薬散のアセチルコリン遊離作用に対する影響を調べるために、高速液体クロマトグラフィ-電気化学検出器(HPLC-ECD)とマイクロダイアリシス法を用いた。その結果、当帰芍薬散は背側海馬からのアセチルコリン遊離を促進した(図6)。

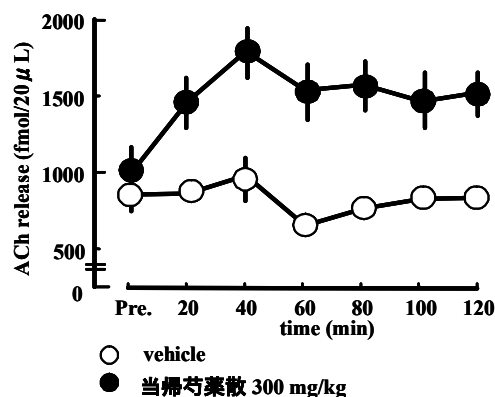


図6 正常動物の背側海馬からのアセチルコリン遊離量に対する当帰芍薬散の影響

以上の結果から、当帰芍薬散の scopolamine による空間記憶障害の改善作用の中心は、β-カルボリン誘導体の Ang-S-1 (1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid) であった。このβ-カルボリン誘導体は、コリン作動性神経終に存在するベンゾジアゼピン受容体を介してアセチルコリン遊離を促進(3,4)し、scopolamine による空間記憶障害を改善していることがわかった(図7)。

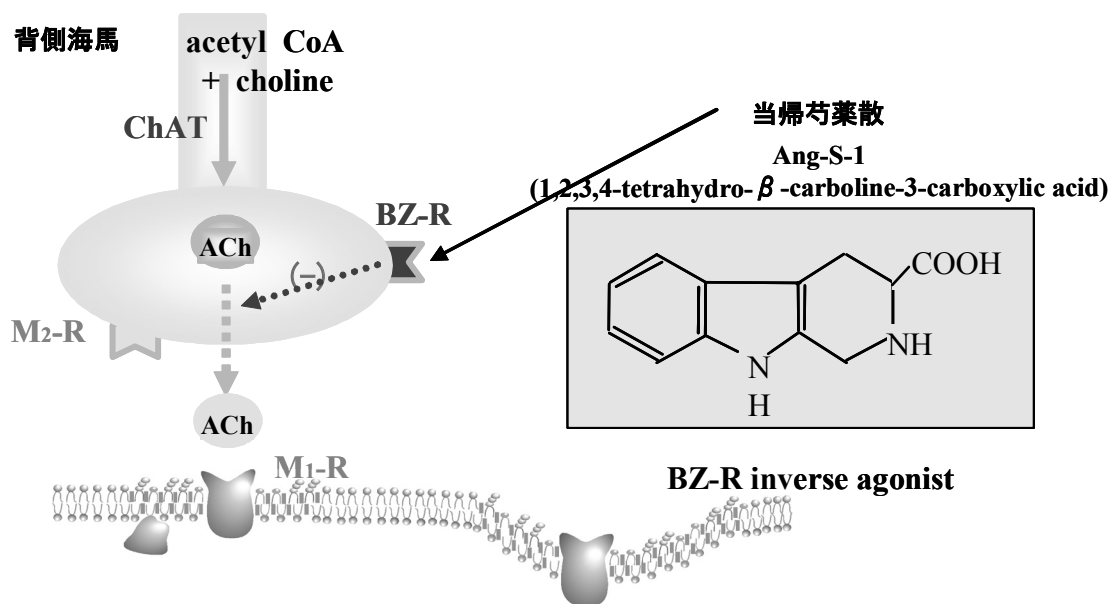


図7 当帰芍薬散のコリン作動性神経における作用機序

B) 繰り返し脳虚血による空間記憶障害に対する当帰芍薬散の影響

1) 当帰芍薬散の抗酸化作用

当帰芍薬散の抗酸化作用を調べるために、DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ラジカルに対する消去作用及び正常動物脳内の抗酸化酵素 SOD (superoxide dismutase) と過酸化脂質 (malondiadehyde) に対する当帰芍薬散の影響を検討した結果、当帰芍薬散は濃度依存的に DPPH ラジカルを抑制し、脳内の過酸化脂質を抑制した。

2) 当帰芍薬散の背側海馬の脳血流の増加作用

背側海馬内の脳血流を調べるために、ラットの背側海馬 CA1 にプラスチックファイバーを慢性的に埋め込み、レーザードップラー法で当帰芍薬散の脳血流量を測定した。その結果、当帰芍薬散 300 mg/kg の投与によって正常動物の背側海馬の脳血流は増加した。

3) 当帰芍薬散の脳保護作用

① 当帰芍薬散の投与開始時間

臨床では脳梗塞の治療タイミングは重視される。当帰芍薬散の治療効果の時間領域を確定するため、脳虚血処置後 30 分からの投与開始群、脳虚血処置後 3 時間からの投与開始群、脳虚血処置 7 日後の 8 方向放射状迷路課題の試行 1 時間前の単回投与群の 3 種類の投与スケジュールを検討した。その結果、当帰芍薬散の脳虚血処置 30 分後からの 7 日間連続投与では、繰り返し脳虚血による空間記憶障害を用量依存的に改善した。一方、脳虚血後 3 時間からの 6 日間連続投与

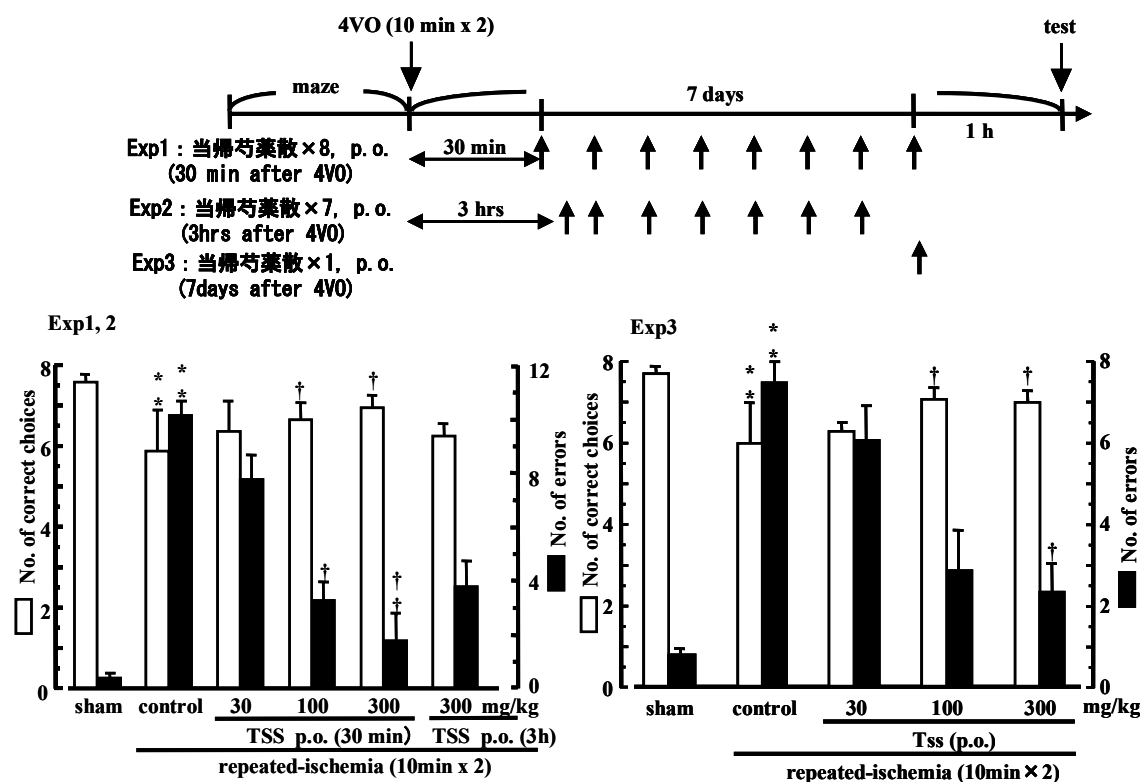


図8 繰り返し脳虚血による空間記憶障害に対する当帰芍薬散の虚血後投与の影響

では改善効果は認められなかった (図 8, Exp1, 2). さらに, 神経細胞死の進行がある程度停止した脳虚血7日目の8方向放射状迷路課題の試行 1 時間前の単回投与は用量依存的に繰り返し脳虚血による空間記憶障害を改善した (図 8, Exp3). つまり, 当帰芍薬散には脳虚血処置後 30 分からの投与開始タイミングと脳虚血処置 7 日後での単回投与による治療タイミングがあることがわかった.

② 神経細胞死に対する抑制作用

痴呆症の主な病理変化の一つは神経細胞の脱落である. 当教室で考案した繰り返し脳虚血モデルは, Pulsinelli らの 4 血管結紮モデル法 (5) を利用して, 10 分間の全脳虚血を 1 時間間隔で 2 回処置するによ

って, 海馬 CA1 領域に遅発性神経細胞死を伴う空間記憶障害を発現する. この発現には, 血流再開の早期に認められるネクローシスと 7 日後をピークとして発現するアポトーシスが関わっていることを明らかにしている. 当帰芍薬散の脳虚血処置 30 分後からの 7 日間連続投与では, 神経細胞死に対して用量依存的な保護効果が認められた. 一方, 脳虚血処置 3 時間後からの 6 日間投与では, 当帰芍薬散は神経細胞死を抑制できなかった (図 9). また, 脳虚血処置 7 日後での単回投与においても神経細胞死は抑制できなかった.

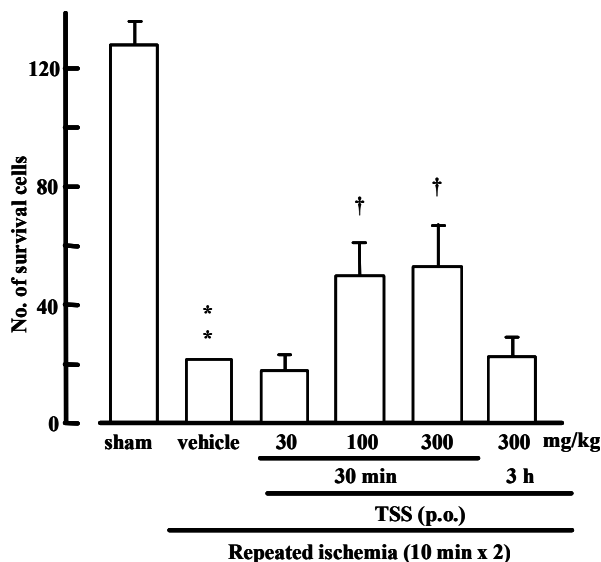


図9 繰り返し脳虚血による海馬CA1細胞死に対する当帰芍薬散の虚血後投与の影響

③ グルタミン酸受容体, AMPA 受容体サブユニットに対する抑制作用

脳虚血による空間記憶障害と神経細胞死はグルタミン酸受容体の AMPA 受容体が重要であることを我々は明らかにしている (6). この AMPA 型受容体は,

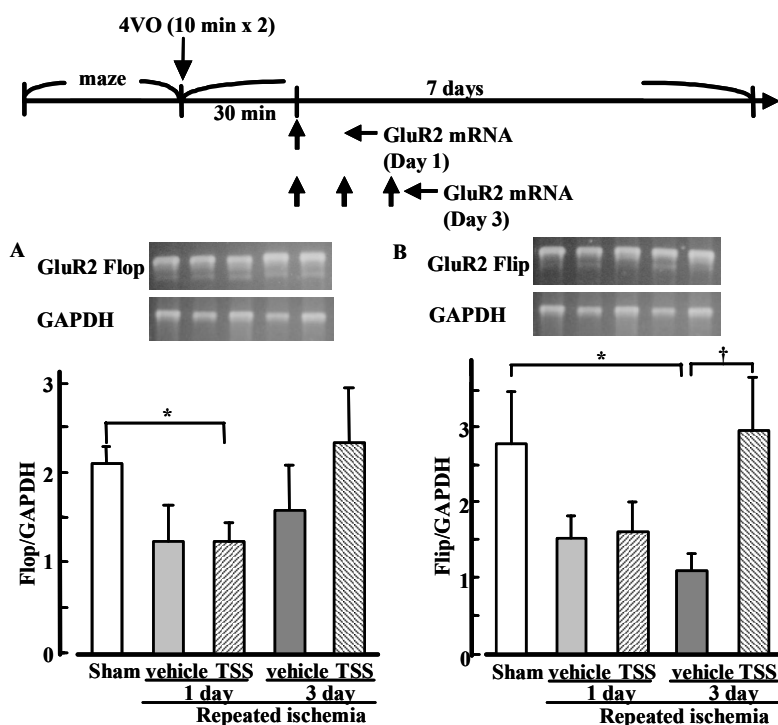


図10 繰り返し脳虚血による背側海馬でのAMPA受容体サブユニットmRNAの変化に対する当帰芍薬散の虚血後投与の影響

GluR1-GluR4 の 4 種類のサブユニットの組み合わせで構成され、GluR2 サブユニットが細胞内へのカルシウム透過性を調節している。そのため、脳虚血になると GluR2 サブユニットの発現が低下し、細胞内へ大量のカルシウムが流入することで神経細胞死を導くことになる (7)。我々が用いた繰り返し脳虚血によっても、脳虚血処置 1 日目と 3 日目に GluR2 サブユニット mRNA が低下した。この繰り返し脳虚血による GluR2 mRNA の低下を抑制するためには、脳虚血処置 30 分後の単回投与では効果がなく、3 日間の連続投与が必要であった。よって、当帰芍薬散は虚血 30 分後に投与を開始し、3 日間の連続投与によって GluR2 mRNA の低下を阻止し、アポトーシスを抑制して空間記憶障害を改善できることが示唆された (図 10)。

④ 背側海馬からのアセチルコリン遊離促進作用

学習・記憶に関係する神経伝達物質の中で最も重要な役割をはたすのはアセチルコリンである (8, 9)。そこで、8 方向放射状迷路課題を行う繰り返し脳虚血 7 日後の背側海馬からのアセチルコリン遊離量をマイクロダイアリシス法を用いて測定した結果、背側海馬からのアセチルコリン遊離は有意に低下した。これに対して当帰芍薬散 300 mg/kg を投与すると低下したアセチルコリン遊離は増加した。また、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の E2020 10 mg/kg もアセチルコリン遊離を上昇させたが、その作用は当帰芍薬散より強かった (図 11)。

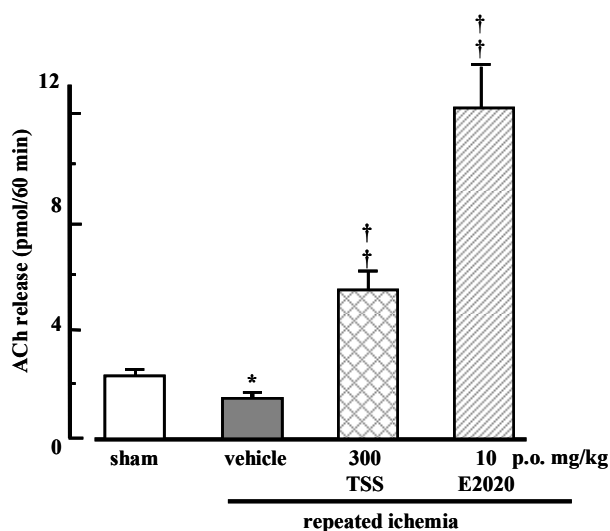


図11 繰り返し脳虚血7日後の背側海馬からのアセチルコリン遊離に対する当帰芍薬散の影響

以上の結果から、当帰芍薬散は、虚血 30 分後からの 3 日間の連続投与と試行前の単回投与で改善効果を示すことがわかった。このことは、繰り返し脳虚血後の急性期では、川芎や芍薬などの抗酸化作用や AMPA 受容体を抑制することによって、また、処置 7 日後の慢性期ではコリン作動性神経を活性化させる当帰が作用することで、繰り返し脳虚血による空間記憶障害を改善している可能性が考えられた (図 12)。

結論及び考察

当帰芍薬散の学習・記憶障害改善作用の有効成分の検索や認知症に対する改善作用の機序追求はいまだ不明であるため、8 方向放射状迷路課題での scopolamine による空間記憶障害を用いて検討した。その結果、当帰芍薬散の scopolamine による空間記憶障害の改善作用の中心は、 β -カルボリン誘導体の Ang-S-1 (1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid) であった。この β -カルボリン誘導体は、背側海馬のコリン作動性神経終末に存在するベンゾジアゼピ

ン受容体を介してアセチルコリン遊離を促進し, scopolamine による空間記憶障害を改善していることが示唆された。

脳虚血を治療するにあたって, 薬物の therapeutic time window (治療可能時間閾) は重要である。現在, plasiminogen activator による血栓溶解剤は, 発症 3 時間以内に投与することが米国で推奨されている (10)。また, ハイドロラジカル消去剤のエダラボンは発症 24 時間以内に投与することで日本のみ認可されている脳梗塞のための抗酸化剤である (11)。脳虚血による脳損傷は, 虚血直後に生じるグルタミン酸の過剰遊離やラジカルの発生から始まり, 細胞内のカルシウムの過剰な蓄積や NO によるラジカル発生, 炎症反応, 細胞膜の破綻, アポトーシスに関連する遺伝子の活性化などがドミノ式に生じることが知られている (12)。我々もこの点を確認し, 繰り返し脳虚血による空間記憶障害には, 最終的に背側海馬にアポトーシスが生じ, アセチルコリン遊離が低下していることで発現していることを明らかにしている (図 12)。このような連鎖的に生じる病態にはカクテル療法が最適であると考えられるが, 現段階では低体温療法と脳保護作用の薬物を併用処置することが行なわれている程度である。よって, 漢方薬の多くは, いくつかの方剤を組み合わせたものであるため, このような連鎖的におきる病態に最適な方剤を組み合わせることで最大の治療効果を得る可能性が十分に考えられる。そこで, 当帰芍薬散の治療可能時間閾について, 特に虚血後投与に着目して 3 つの実験スケジュールを検討した。繰り返し脳虚血によって過剰なグルタミン酸遊離が停止した虚血 30 分後から 7 日間連続投与した結果, 処置 7 日後に発現する空間記憶障害を改善した。さらに, 繰り返し脳虚血による GluR2mRNA の低下は処置 30 分後の単回投与では効果がなく, 3 日間の連続投与によって抑制された。しかしながら,

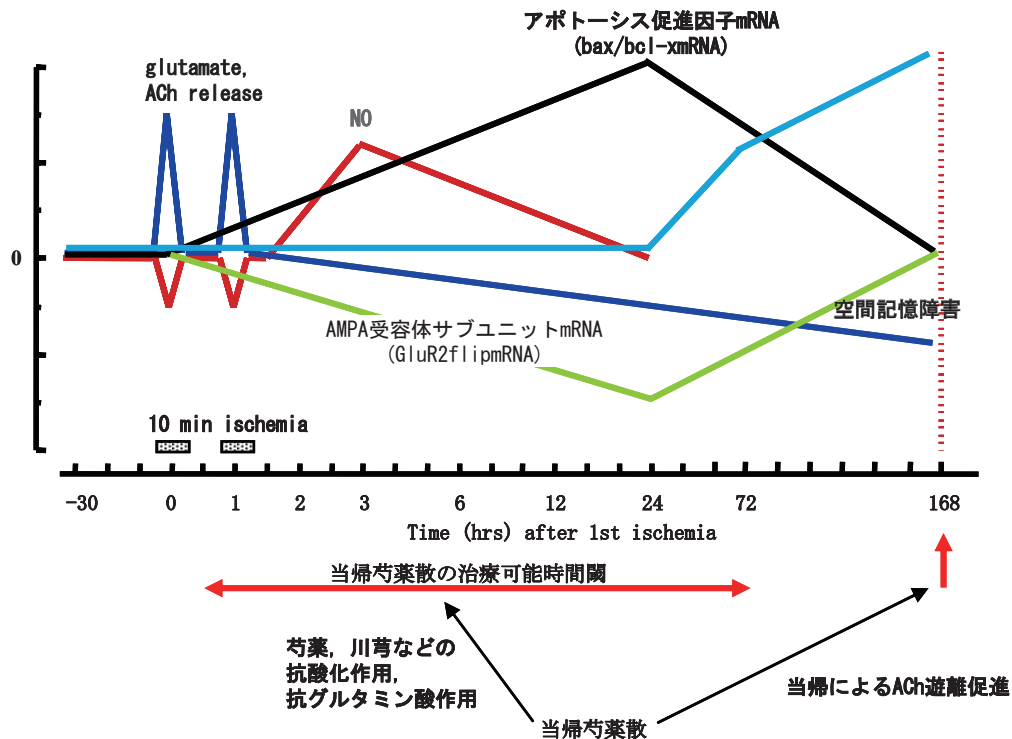


図12 繰り返し脳虚血によるドミノ式に生じる細胞傷害機序に対する当帰芍薬散の作用点

背側海馬からの NO 量が上昇する虚血 3 時間後 (13) に当帰芍薬散の投与を開始し、試行前の投与を行わない 6 日間の連続投与では効果はなかった。つまり、当帰芍薬散は虚血 30 分後に投与を開始し、3 日間の連続投与によってアポトーシスを伴う空間記憶障害を改善できることが明らかとなった。次に、神経細胞死の進行がある程度終了した脳虚血 7 日目において、当帰芍薬散を単回投与すると、繰り返し脳虚血によって低下した背側海馬からのアセチルコリン遊離を抑制し、空間記憶障害を改善した。しかし、神経細胞死は抑制できなかった。このことは、当帰芍薬散に含まれる 6 種類のそれぞれの方剤が、繰り返し脳虚血によって生じるドミノ式の細胞障害機序をタイミングよく改善している可能性が示唆される (図 12)。このように中医薬は君、臣、佐、使を配合して単一の作用点ではなく、多くのターゲットを調節して、異常な状態から正常な状態へ回復させることができると考えられる。

謝辞

本稿を終わるにあたり、本研究に終始御指導と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有益な御助言と御校閲を賜りました金城順英教授、岩崎克典教授に深謝します。また、本研究の随行にあたり終始御指導と御協力を頂いた三島健一准教授に深く感謝します。また、本研究に終始御指導と御助言を頂いた江頭伸昭准教授に深く感謝します。本研究を着手して頂いた尾形建彦氏、岩崎貴代女史に深く感謝します。また、本研究を遂行して頂いた藤満尚美女史、嶋崎尚美女史、井本有紀女史、田中加奈子女史、林香織女史、藤井恵女史に深く感謝します。また、御指導と御助言を頂いた入江圭一氏に深く感謝します。公私とも御助言を頂いた野矢正紀氏、高崎浩太郎氏、蒲風玲女史に深く感謝します。

参考文献

- 1) 水島 宣昭, アルツハイマー型痴呆 —治療とケア— 「アルツハイマー型痴呆と当帰芍薬散」, 現代医療学, (1), 87-92 (1996)
- 2) 高德義, 当帰芍薬散治療老年性痴呆 36 例臨床研究, Chinese general practice 7, 782-783 (2004)
- 3) Claustre Y, Rouquier L, Desvignes C, Leonetti M, Montegut J, Aubin N, Allouard N, Bougault I, Oury-Donat F, Steinberg R. Effects of the vasopressin (V1b) receptor antagonist, SSR149415, and the corticotropin-releasing factor 1 receptor antagonist, SSR125543, on FG7142-induced increase in acetylcholine and norepinephrine release in the rat. Neuroscience. 141(3), 1481-1488 (2006).
- 4) Sarter M, Bruno JP, Berntson GG. Psychotogenic properties of benzodiazepine receptor inverse agonists. Psychopharmacology (Berl). 156(1), 1-13 (2001). Review.
- 5) Pulsinelli W. A., and Brierley J.B., A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat, Stroke, 10, 267-272, 1979

- 6) Iwasaki K., Hee E., and Egashira N. Izzettin H.A.K., Mishima K., Egawa T., Irie K. Fujiwara M. Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res.* 995: 131-139 (2004).
- 7) Mangiavacchi S, Wolf ME. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors, AMPA receptors or metabotropic glutamate receptors leads to rapid internalization of AMPA receptors in cultured nucleus accumbens neurons. *Eur J Neurosci.* ,20(3), 649-57. 2004.
- 8) Pepeu G, Giovannini MG. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. *Learn Mem.* 11(1), 21-27 (2004).
- 9) Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem.* 11(1), 43-49 (2004).
- 10) Reed SD, Cramer SC, Blough DK et al., Treatment with tissue plasminogen activator and in patient mortality rates for patients with ischemic stroke treated in community hospitals. *Stroke* 32, 1832-1840 (2001)
- 11) Edaravone Acute Infarction Study Group, Effect of a novel free radical scavenger, edaravone (MCI-186), on acute brain infarction. Randomized, placebo-controlled, double-blind study at multicenters. *Cerebrovasc Dis* 15, 222-229 (2003)
- 12) 田中耕太郎 脳梗塞急性期, -脳保護療法のあり方-, 神経治療, 22, 179-189 (2005) 27) Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us *Stroke.* 35(6):1482-1489. (2004)
- 13) Mishima K, Pu F, Kaneko T, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Post-ischemic administration but not pre-ischemic administration of NG-nitro-L-arginine prevents spatial memory impairments and apoptosis by an inhibition of a delayed increase in NOx- in the hippocampus following repeated cerebral ischemia. *Neuropharmacology.* 44(4), 533-540 (2003).