

氏名・(本籍)	吉良健太郎(福岡県)		
学位の種類	博士(医学)		
報告番号	甲第1546号		
学位授与の日付	平成27年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(課程博士)		
学位論文題目	The Effects of Sansoninto on the Insomnia in Socially Isolated Mice (単独隔離ストレスマウスの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果)		
論文審査委員	(主査)	福岡大学	教授 西村良二
	(副査)	福岡大学	教授 井上隆司
		福岡大学	教授 岩本隆宏
		福岡大学	教授 安元佐和

## 内容の要旨

### 目的

酸棗仁湯は主薬である酸棗仁と、その他の茯苓、川芎、知母、甘草の5つの生薬から構成されている漢方の睡眠薬の代表である。臨床では心身が疲労し気が高ぶって眠れないヒトに用いられている。一方、動物モデルを用いた研究の報告は少なく、ストレス負荷動物において正向反射消失時間を延長することは分かっているが、睡眠解析を行った報告はない。本研究では実験動物を長期間、単独隔離飼育することによって一種の社会心理的なストレスを与え、誘発される行動変化や睡眠障害、及びそれらに対する酸棗仁湯の効果、睡眠解析を行うことで検討した。

### 対象と方法

4週齢のICR系雄性マウス(体重30-35g)を使用した。集団飼育群ではマウスをプラスチックケージ(大)に10~12匹収容し、単独隔離飼育群ではプラスチックケージ(小)の中に1匹ずつ収容し、隣のマウスの姿が見えないよう黒い板で仕切った状態で9週間隔離飼育した。12時間の明暗サイクル(AM7:00点灯/PM7:00消灯)で、餌および水は自由に摂取できる環境とした。9週間の単独隔離飼育後、酸棗仁湯群には酸棗仁湯エキス剤を730mg/kgの濃度で7日間飲水投与した。7日間の投与後、行動変化や睡眠障害を評価するため、24時間の自発運動量、脳波/筋電図、および血漿中corticosterone濃度の測定を行った。実験動物の取り扱いについては、福岡大学動物実験委員会による動物実験倫理規定に準じた。

### 結果

24時間の自発運動量：明期の自発運動量は、暗期の自発運動量よりも少なかった。単独隔離飼育し

たマウスは集団飼育したマウスと比較し、明期の自発運動量が有意に増加した。この明期の自発運動量の増加は酸棗仁湯の投与によって有意に抑制された。暗期の自発運動量には集団飼育群、単独隔離飼育群、単独隔離飼育+酸棗仁湯群の間に有意な差を認めなかった。

覚醒／睡眠サイクル：単独隔離飼育したマウスの WAKE 時間は集団飼育したマウスと比較し、明期、暗期ともに有意に延長した。単独隔離飼育群のこの WAKE 時間の延長は、酸棗仁湯の投与によって明期、暗期ともに有意に短縮された。単独隔離飼育群の NREM 睡眠の時間は集団飼育群と比較し、明期、暗期ともに有意に短縮した。単独隔離飼育群のこの NREM 睡眠の時間の短縮は、酸棗仁湯の投与によって明期、暗期ともに有意に延長された。単独隔離飼育群の REM 睡眠時間は、集団飼育群と比較して明期、暗期ともに有意な差がなく、酸棗仁湯の投与後も変化はみられなかった。また NREM 睡眠時間中の睡眠脳波をさらに解析し、周波数帯ごとの占有率を比較した結果、集団飼育群、単独隔離飼育群、単独隔離飼育+酸棗仁湯群の3群に有意な差を認めなかった。

血漿中 corticosterone 濃度：単独隔離飼育したマウスは集団飼育したマウスと比較し、血漿中 corticosterone 濃度が有意に増加した。酸棗仁湯の投与はこの増加を有意に低下させた。

#### 結論

本研究では9週間の単独隔離飼育後、明期の自発運動量の増加に加え、脳波／筋電図による睡眠解析で WAKE 時間の増加、NREM 睡眠時間の減少を認めた。

以前より隔離飼育ストレス動物において不安や抑うつ、攻撃性のような行動変化が報告されており、本研究でも自発運動量の増加という行動変化が検出された。本研究ではさらに脳波／筋電図の解析を行うことにより、隔離飼育ストレス動物において睡眠障害が生じていることを明らかとした。睡眠障害の特徴をより明確にするため NREM 睡眠脳波に解析を加えた結果、各周波数帯の占有率には変化がないことから単独隔離飼育による睡眠障害は睡眠の質の障害というよりも量の障害であると考えられた。したがって24時間自発運動量が増加したという行動変化はマウスの活動時間に依存している可能性が高い。また本研究では単独隔離飼育後の血漿中 corticosterone 濃度が増加しており、本研究における行動変化や睡眠障害はストレス負荷による影響であると考えられる。

酸棗仁湯の投与は、単独隔離飼育によって増加した自発運動量を減少させ、増加した WAKE 時間を短縮し、減少した NREM 睡眠時間を延長させた。また増加していた血漿中 corticosterone 濃度を集団飼育群と同じレベルにまで減少させた。これらのことから酸棗仁湯は社会心理的なストレスによる行動変化や睡眠障害を改善する作用があることが示唆された。

不眠症に対して一般的に用いられるベンゾジアゼピン系睡眠薬はレム睡眠や徐波睡眠を抑制することが指摘されているが、本研究では睡眠脳波の占有率に有意な差を認めていない。現段階で酸棗仁湯の睡眠障害に対するメカニズムははっきりとは解明されていないが、今回の結果から酸棗仁湯はベンゾジアゼピン受容体を介さずに睡眠障害を改善すると考えられる。

#### 審査の結果の要旨

本論文は、漢方の睡眠薬の代表である酸棗仁湯の睡眠改善作用について、単独隔離飼育ストレスマウスを用いて研究したものである。酸棗仁湯が心理社会的なストレスによるマウスの行動変化や睡眠障害を改善する作用があることが示唆された。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、審査委員との質疑応答は以下の通りである。

#### 1. 斬新さ

酸棗仁湯の動物モデルを用いた研究の報告としては、ストレス負荷動物において正向反射消失時間を延長することは分かっているが、睡眠解析を行った報告はない。本研究では実験動物を長期間、単独隔離飼育することによって一種の社会心理的なストレスを与え、睡眠解析を行うことによって、酸棗仁湯に睡眠改善作用があることを示唆した最初の研究である。

#### 2. 重要性

心理社会的なストレスによる睡眠障害に対して改善作用を示したことから、酸棗仁湯は睡眠障害の治療薬を選択する場合の選択肢の一つになりえる。

#### 3. 実験方法の正確性

本研究では実験動物の作成方法として単独隔離飼育ストレス負荷を用いた。ストレス負荷の方法として、このモデルはすでに多くの論文に掲載されている。また睡眠障害の評価方法として脳波を用いた。睡眠を評価する方法の一つとして、脳波を測定することは確立されている方法である。実験目的に応じて適切に確立された実験手技を用いて証明しており、十分な確実性があると考えられる。

#### 4. 表現の明確さ

本論文は福岡大学医学紀要に2014年10月6日付けで採択されている。明確な表現による質の高い論文である。

#### 5. 主な質疑応答

Q：酸棗仁湯の副作用には下痢症状などがあるので、セロトニン系を活性化させる作用があるのではないか。またメラトニンは測らなかったのか。

A：セロトニン活性化の可能性はある。メラトニンは今回の研究では測定していない。

Q：コルチコステロンを測定している時間が朝の10時であるが、その根拠はあるのか。

A：どの時間が適しているのか検討は行った。休息期での睡眠を評価しようと考えた。

Q：Figure 1A について、繰り返しのある検定は行わなかったのか。

A：マウスは数分置きに寝たり起きたりするので、1時間ごとには検定を行っていない。12時間ごとに検定をし、Figure 1B,1C は12時間の積算で検定を行った。

Q：REM睡眠時間に有意差が出ていないが、エラーバーが大きく、個体ごとにばらつきがあったのではないか。

A：個体差がある可能性は否定できないが、出来るだけ個体差が少なくなるように同じ系統のマウスを同じ条件で飼育した。

Q：Figure 3 について、占有率に差がなくても、それぞれの持続時間や出てくる順番などは測定していないのか。質的な評価を今回の占有率の結果だけで行うのは言い過ぎなのではないか。

A：今回の研究ではそこまでの解析は行っていない。今後改めて検討する必要がある。

Q：メラトニンやセロトニン受容体に作用している可能性はあるか。ベンゾジアゼピン系も含めて、複合的に作用している可能性はあるのではないか。

A：酸棗仁の主要成分であるスピノシンにはセロトニン系に作用しているという報告がある。酸棗仁湯

は5つの生薬から成り立っており、複合的に作用している可能性は高い。しかし明確な作用機序を解明するには至っていない。

Q：睡眠障害のモデルとして、他に何かあるのか。

A：確立されたものはない。急性ストレスなのか慢性ストレスなのかによってもまた違ってくると考えられる。

Q：筋電図や脳波はテレメトリーなのか。

A：有線コードを使用した。

Q：酸棗仁湯には抗めまい作用もあるが、脳血流増加などの作用はないのか。

A：本研究では検討していない。

Q：マウスのNREM睡眠はどうやって判定をしたのか。

A：脳波と筋電図から判定を行った。

Q：9週間という期間や酸棗仁湯の投与量に関して、どのように決定したのか。また投与量を増やすとどうなるのか。

A：隔離する期間に関しては基礎検討を行い、判断した。施設によって隔離する期間は若干異なるが、飼育されている環境の影響と考えられる。用量依存性に関しては現在検討しているところである。

Q：Figure ごとのnの数が違うのかなぜなのか。再現性をどのようにしているのか。

A：脳波を測定した3群、血漿中コルチコステロン濃度を測定した3群は、それぞれに研究を行っているためにnの数が違う。それぞれの研究では自発運動量をみることによってストレスが負荷されているかを確認している。

Q：NREM睡眠が障害されることによって学習障害が起こるといえるが、酸棗仁湯は学習障害を改善するといった報告はないのか。

A：知る限り、報告はない。

Q：臨床では酸棗仁湯の効果発現にどの程度かかるのか。

A：人にもよるが、2週間程度は使用してから効果判定を行うことが多い。

Q：人で睡眠潜時などの睡眠脳波を調べた報告はないのか。

A：健常人で脳波を調べた報告はあるが、催眠作用があるといった報告にとどまっている。

Q：ペントバルビタールと酸棗仁湯の相互作用はどのようになっているのか。

A：現段階では、はっきりしたことはわかっていない。

Q：臨床ではベンゾジアゼピン系がREM睡眠を抑えるというような印象があるか。

A：臨床でREM睡眠とNREM睡眠を区別することは難しい。

Q：マウスにセロトニン症候群はおきるのか。

A：用量によると考えられる。

Q：遺伝子改変された睡眠障害マウスはないのか。

A：存在しない。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者はそれらの質問に適切に回答した。以上の審査の結果、本論文は酸棗仁湯が睡眠障害に有効であることを証明した研究であり、学位論文に値すると判定された。