

氏 名・(本籍)	なが お まさ き 長 尾 昌 紀 (福岡県)		
学 位 の 種 類	博 士 (薬 学)		
報 告 番 号	甲第1563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	脳血管性認知症モデル動物の睡眠障害に対する抑肝散の効果		
論文審査委員	(主 査)	福岡大学	教 授 岩 崎 克 典
	(副 査)	福岡大学	教 授 金 城 順 英
		福岡大学	教 授 三 島 健 一

内 容 の 要 旨

《背景・目的》

認知症の症状は記憶障害や見当意識障害などの中核症状と、睡眠障害、不安、抑うつ、妄想と言った周辺症状に分類される。周辺症状の中でも睡眠障害の有病率は20.7%と最も多くを占める。既存の睡眠障害治療薬であるベンゾジアゼピン系薬物は、ふらつき、日昼の眠気、および筋弛緩作用による転倒などの副作用を伴う事が多いため、現状では睡眠障害に対する治療満足度は決して高いとは言えない。アルツハイマー型認知症の治療薬として使用されるコリンエステラーゼ阻害薬の donepezil にも不眠、悪夢を惹起する場合があることから、これを服用している患者に睡眠障害治療薬を処方される確率が増加する。中核症状の悪化やせん妄・徘徊の出現が睡眠障害に起因すると考えられるため睡眠障害の早期改善が強く求められているが、その発症メカニズムは良く解っておらず、これまでに認知症を意識した睡眠障害モデル動物も存在しない。近年臨床において、漢方方剤の抑肝散が認知症患者の周辺症状に対して有効であると報告されており、認知症の睡眠障害に対しても改善効果が認められている。しかしながら抑肝散の睡眠障害に対する動物モデルの報告はなく、睡眠障害への基礎薬理学的エビデンスや詳しいメ

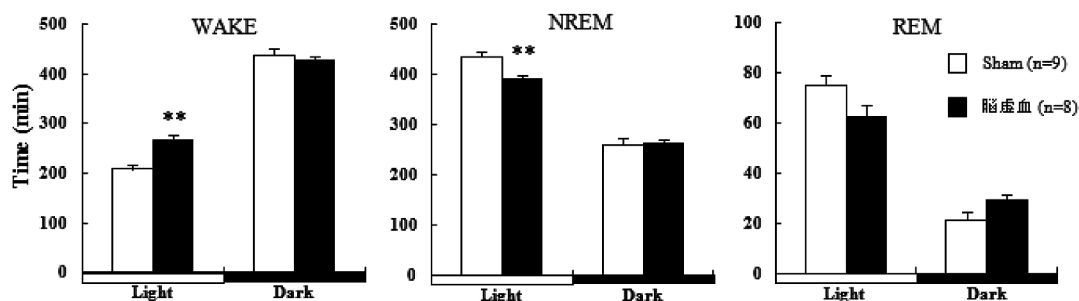


図1 脳虚血ラットの睡眠覚醒時間の評価 2

カニズムは全くもって不明である。認知症患者の睡眠障害に対する適切な対応および本態性の睡眠障害に対する薬物治療への発展に貢献するため、適切な認知症を伴う睡眠障害のモデル動物の探索および抑肝散の睡眠障害に対する効果とその機序を明らかにすることを目的とした。

1. 繰り返し脳虚血ラットの睡眠障害の検討

認知症に出現する主な睡眠障害は、夜間における睡眠時間、特に Non-rapid eye movement (NREM) 睡眠の短縮、中途覚醒の増加、入眠時間の延長、また熟眠障害といった不眠症や概日リズム障害などがあげられる。当研究室ではこれまでに、脳血管性認知症モデル動物として繰り返し脳虚血ラット (RI ラット) を作出しており、このラットは空間記憶障害と周辺症状の一つである不安様行動を併せ持つ。従って、この RI ラットの睡眠障害を明らかにすることで、脳血管性認知症患者の睡眠障害モデル動物となり得る可能性がある。RI ラットは8週

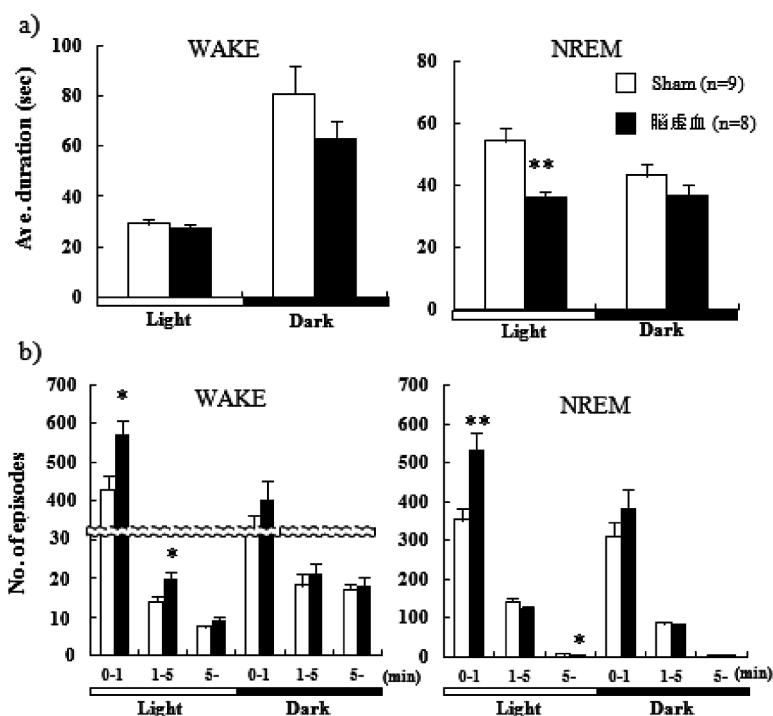


図2 脳虚血ラットの睡眠覚醒の平均持続時間とエピソード出現頻度の評価

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。睡眠障害の評価は、RI ラットの頭部に特定の脳波および筋電図の電極ソケットを挿入して脳波および筋電図を24時間測定し、覚醒と NREM睡眠、Rapid eye movement (REM) 睡眠の3つのステージに分類して行った。脳波および筋電図の測定は、空間記憶障害が発現する脳虚血後7日目から行った。覚醒睡眠の各ステージの積算時間や平均持続時間、連続して現れる一続きのステージ群 (エピソード) 出現頻度、脳波周波数帯占有率を解析した。

《結果・考察》

RI ラットは sham ラットと比べ、明期において覚醒時間の増加を示し、NREM睡眠時間の減少を示した (図1)。ラットなどのげっ歯類は夜行性であるため、この結果は脳血管性認知症患者の夜間における NREM睡眠時間の減少を反映していると考えられる。さらに RI ラットは明期における平均 NREM睡眠持続時間の減少や比較的短時間 (0-1 分間) 持続する覚醒および NREM睡眠エピソードが増加し、さらに比較的長時間の覚醒エピソードが増加、また長時間の NREM睡眠エピソードが減少していた (図2a, b)。これらの結果は脳血管性認知症患者の中途覚醒の増加を反映している事が考えられた。また脳波周波数帯の結果からは熟眠障害の指標である NREM睡眠の δ 波領域占有率の低下は観察されなかった

め、RI ラットにおいて熟眠障害は発現していないものと考えられた。以上の結果から RI ラットでは熟眠障害を除く、NREM 睡眠時間の短縮および中途覚醒の増加といった脳血管性認知症に伴う主な睡眠障害を確認することが出来た。従って、RI ラットは脳血管性認知症に伴う睡眠障害のモデル動物として応用できる可能性があることが示された。

2. RI ラットの睡眠障害に対する抑肝散の効果

これまでに当研究室において、抑肝散は認知症患者の周辺症状に有効との臨床報告がされており、これまでに当研究室では抑肝散 (1000 mg/kg) の脳虚血前後 7 日間投与が RI ラットの空間記憶障害および不安様行動に対して改善効果を示すことを報告している。そこで、脳血管性認知症に伴う睡眠障害モデル動物として可能性が示された RI ラットを用いて、抑肝散の睡眠障害への改善効果を検討した。

抑肝散は 1 日 1 回脳虚血前後 7 日間 (計 14 日間) の反復経口投与を行った。また RI ラットの空間記憶障害に対して改善効果を示す donepezil を対象薬として 1 日 1 回虚血後 7 日間の反復経口投与使用した。同様に覚醒睡眠の各ステージの積算時間や平均持続時間、エピソード出現頻度、脳波周波数帯占有率を解析した。

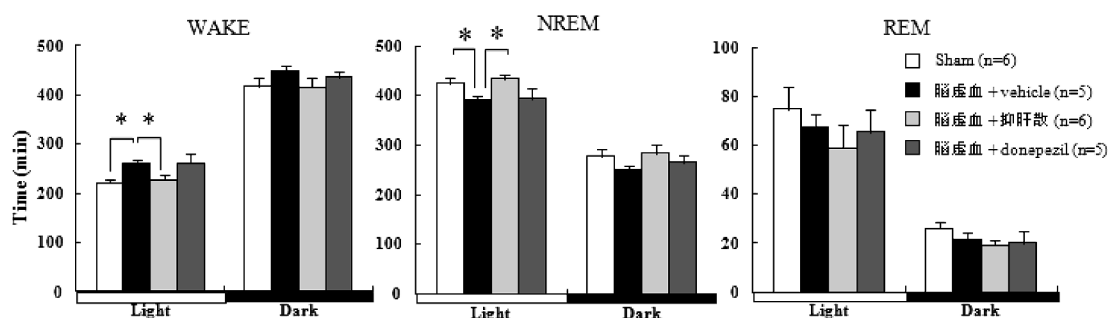


図3 脳虚血ラットの睡眠覚醒時間に対する抑肝散の効果

《結果・考察》

抑肝散の脳虚血前後 7 日間投与によって、RI ラットの明期における覚醒時間の増加および NREM 睡眠時間の減少は有意に改善した (図 3)。

また抑肝散は RI ラットの NREM 睡眠の平均持続時間に対して明暗期共に改善傾向を示し、比較的長時間 (1-5 分間) 持続する NREM 睡眠のエピソード出現頻度の減少を有意に改善した (図 4a, b)。しかし抑肝散は RI ラットの脳波周波数帯占有率に対しては影響を示さなかった。これらの結果から、抑肝散による RI ラットの覚醒および NREM 睡眠時間変化に対する効果は、

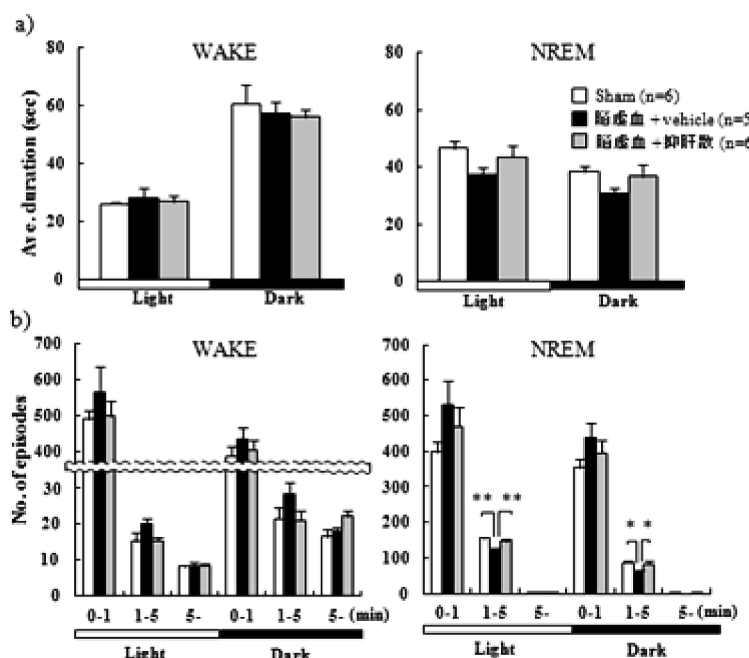


図4 脳虚血ラットの睡眠覚醒の平均持続時間とエピソード出現頻度に対する抑肝散の効果の効果

脳虚血により短縮した NREM 睡眠を正常化もしくは延長させることにより改善したと考えられた。従って、抑肝散は NREM 睡眠時間を延長することによって、RI ラットの睡眠障害を改善することが明らかとなった。

3. 抑肝散の RI ラットにおける睡眠障害改善メカニズムの検討

覚醒と睡眠の調節には脳視床下部にある2つの中心となる部位が存在し、覚醒中枢である結節乳頭核 (tuberomammillary nucleus: TMN) と睡眠中枢の腹側外側視索前野 (ventrolateral preoptic area: VLPO) である。覚醒はオレキシン神経系が投射しているヒスタミン神経系の TMN が活性し、大脳皮質のヒスタミン H_1 受容体を介して誘発される。睡眠の誘発には GABA、ガラニン系の VLPO 神経系が活性化し、TMN の活動を抑制する事で引き起こされる。また脳脊髄液中のプロスタグランジン (PG) E_2 は TMN に存在する EP4 受容体を活性化して覚醒を誘発させ、PGD₂ はクモ膜付近に存在する DP 受容体を刺激して睡眠が誘発する。抑肝散の RI ラットにおける睡眠障害改善メカニズムを検討するために、視床下部におけるオレキシンの前駆物質である prepro-orexin および前頭前野における H_1 受容体の mRNA 発現量を、また視床下部および前頭前皮質における EP4 と DP 受容体の mRNA 発現量を検討した。さらに前頭前皮質における神経細胞の形態変化および、アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 mRNA 発現量に対する抑肝散の効果を検討した。

《結果・考察》

RI ラットにおいて視床下部 prepro-orexin および前頭前皮質ヒスタミン H_1 受容体の mRNA 発現の変化は認められず、特に前頭前皮質において EP4 および DP 受容体 mRNA 発現量の増加が認められた。また RI ラットのの前頭前皮質において神経細胞死および caspase-3 mRNA 発現量の増加が認められた (図3)。これらの結果から、RI ラットの睡眠障害は覚醒睡眠中枢の直接的なシグナルの関与ではなく、脳虚血時の種々の炎症反応により睡眠覚醒機構バランスが崩壊したことで引き起こされたと考えられた。また抑肝散は脳虚血により増加した EP4 および DP mRNA 発現を有意に抑制し (図3)、前頭前皮質の神経細胞脱落などの形態変化に対する保護および caspase-3 mRNA 発現量の増加に対する抑制を示した。従って、今回の結果から抑肝散は脳虚血による前頭前皮質の PGE₂、PGD₂ が関与する炎症反応を脳保護的に抑制して、RI ラットの睡眠障害を改善したと考えられる。

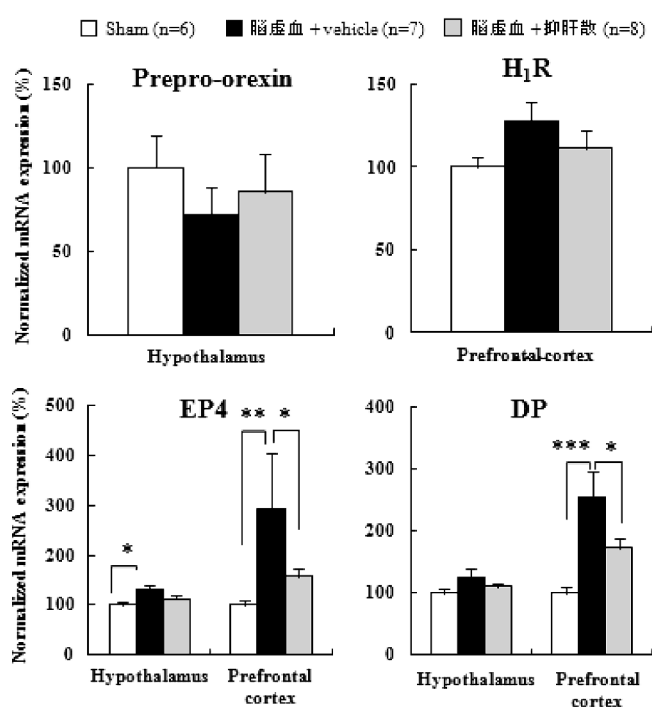


図5 脳虚血ラットの覚醒睡眠シグナルに対する抑肝散の効果

《総括・結論》

RI ラットは明期において、脳血管性認知症患者の睡眠障害にみられるような NREM 睡眠時間の短縮および中途覚醒の増加が確認され、脳血管性認知症を伴う睡眠障害の良いモデル動物になる可能性が示された。この脳血管性認知症を伴う睡眠障害モデルの作製は数少ない知見であり、今後の新規薬物開発への発展が期待される。また抑肝散は NREM 睡眠時間の正常化もしくは延長することによって、RI ラットの睡眠障害を改善することが示された。さらに抑肝散が脳虚血による神経細胞死を伴う炎症性反応に対して保護効果を示すことで RI ラットの睡眠障害を改善するという知見は、抑肝散の基礎研究において新たなエビデンスであり、今後の脳血管性認知症を伴う睡眠障害により広く臨床適応される可能性を示した。従って、抑肝散は脳血管性認知症患者に対して、認知機能障害のみならず睡眠障害に対しても有効な治療薬になり得る事が示された。

審査の結果の要旨

認知症の症状は記憶障害や見当意識障害などの中核症状と、睡眠障害、不安、抑うつ、妄想などの周辺症状に分類される。周辺症状の中でも睡眠障害の有病率は 20.7% と最も多くを占める。既存の睡眠障害治療薬であるベンゾジアゼピン系薬物は、ふらつき、日昼の眠気、および筋弛緩作用による転倒などの副作用を伴う事が多いため、現状では睡眠障害に対する治療満足度は決して高いとは言えない。近年臨床において、漢方方剤の抑肝散が認知症患者の周辺症状に対して有効であると報告され、一部の漢方専門医の中では認知症の睡眠障害に対しても改善効果が認められることが報告されるようになった。しかしながら抑肝散の睡眠障害に対する動物モデルを用いた実験薬理学的研究はなく、睡眠障害への基礎薬理学的エビデンスや詳しいメカニズムは全く不明である。そこで本研究では、認知症患者の睡眠障害に対する適切な薬物治療へ貢献するため、適切な認知症を伴う睡眠障害のモデル動物の探索および抑肝散の睡眠障害に対する効果とその機序を明らかにすることにした。

認知症患者にみられる主な睡眠障害は、夜間における睡眠時間、中途覚醒の増加、入眠時間の延長、また熟眠障害といった不眠症や概日リズム障害などである。本研究では、まず、空間記憶障害と周辺症状の一つである不安様行動を併せ持つ脳血管性認知症モデルラットを用いて、本モデルが睡眠障害を併発するか、またその睡眠障害にはどのような特徴があるかを検討した。その結果、脳虚血ラットは夜行性動物の睡眠期である明期において覚醒時間の増加を示し、NREM 睡眠時間の減少を示すことが分かった。さらに脳虚血ラットは明期における平均 NREM 睡眠持続時間の減少や比較的短時間（0-1 分間）持続する覚醒および NREM 睡眠エピソードが増加し、さらに比較的長時間の覚醒エピソードが増加、また長時間の NREM 睡眠エピソードが減少することから、中途覚醒の増加を反映するモデルであり、今後のことが分かった。

次に、認知症患者の周辺症状に用いられ、我々がその作用機序の一端を明らかにした抑肝散が果たしてこのモデルラットの周辺症状のみならず睡眠障害に対しても有効か否かを検討した。その結果、抑肝散の脳虚血前後 7 日間投与によって、脳虚血ラットの明期における覚醒時間の増加および NREM 睡眠時間の減少が有意に改善した。また、抑肝散は脳虚血ラットの NREM 睡眠の平均持続時間に対して明暗期共に改善傾向を示し、比較的長時間（1-5 分間）持続する NREM 睡眠のエピソード出現頻度の減少を有意に改善した。これらのことから、抑肝散による脳虚血ラットの覚醒および NREM 睡眠時間変化に対する効果は、脳虚血により短縮した NREM 睡眠を正常化もしくは延長させることにより改善したと考えられた。

最後に抑肝散の脳虚血ラットの睡眠障害の改善機序について検討した。まず、視床下部におけるオレキシンの前駆物質である prepro-orexin および前頭前野における H_1 受容体の mRNA 発現量を、また視床下部および前頭前皮質における EP4 と DP 受容体の mRNA 発現量を検討した。さらに前頭前皮質における神経細胞の形態変化および、アポトーシスの最終実行因子である caspase-3 mRNA 発現量に対する抑肝散の効果を検討した。その結果、脳虚血ラットにおいて前頭前皮質において EP4 および DP 受容体 mRNA 発現量の増加が認められた。また脳虚血ラットの前頭前皮質において神経細胞死および caspase-3 mRNA 発現量の増加が認められた。これらの結果から、脳虚血ラットの睡眠障害は覚醒睡眠中枢の直接的なシグナルの関与のみならず、脳虚血時の種々の炎症反応により睡眠覚醒機構バランスが崩壊したことで引き起こされたと考えることができる。また抑肝散は脳虚血により増加した EP4 および DP mRNA 発現を有意に抑制し、前頭前皮質の神経細胞脱落などの形態変化に対する保護および caspase-3 mRNA 発現量の増加に対する抑制を示した。従って、今回の結果から抑肝散は脳虚血による前頭前皮質の PGE_2 、 PGD_2 が関与する炎症反応を脳保護的に抑制して、脳虚血ラットの睡眠障害を改善したと考えられる。

以上の内容に関して、その独創性・新規性、論文投稿、さらには公聴会での質疑に対する能力を鑑み、本論文は本学薬学研究科の博士学位論文として認定出来ると判断した。