

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

長尾 昌紀

福岡大学 薬学部 臨床疾患薬理学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Effect of Yokukansan on sleep disturbance in a rat model of cerebrovascular dementia

Masaki Nagao

Dept. Neuropharmacol. Fukuoka Univ. Sch. Pharm. Sci.
8-19-1 Nanakuma, Jonanku, Fukuoka 814-0180, Japan

Abstract

Patients with dementia are classified into cognitive dysfunction and behavioral and psychological symptoms of dementia, including sleep disturbance. Yokukansan (YKS), a traditional Japanese herbal medicine, is effective for sleep disturbance in patients with dementia, but the mechanisms are still unclear. In this study, we evaluated sleep disturbance in rats with cerebral ischemia as an animal model of cerebrovascular dementia. We investigated the effect of YKS on sleep disturbance in cerebral ischemia-treated rats. In electroencephalographic studies, rats with cerebral ischemia showed a higher total wakefulness time and lower total non-rapid eye movement (NREM) sleep time during the light phase compared with sham-operated rats. These changes were ameliorated by YKS (1000 mg/kg, orally) treatment for 14 days during pre- and post-ischemia, but not by donepezil (3 mg/kg, orally) treatment for 7 days after ischemia. YKS treatment normalized the reduction in longer NREM sleep episodes in rats with cerebral ischemia. Neurochemical and molecular pharmacological studies showed that mRNA expression levels of the prefrontal cortical prostaglandin (PG) E₂ receptor EP4 and the PGD₂ receptor DP were increased by cerebral ischemia, but there was no change in hypothalamic prepro-orexin and prefrontal cortical histamine H₁ receptor mRNA levels. The elevated prefrontal cortical EP4 and DP receptor mRNA expression was reduced by YKS treatment. These results indicated that rats with cerebral ischemia showed NREM sleep disturbance and an increased number of awakenings. YKS recovered this sleep disturbance through preventing neuroinflammation, and this was mediated by the EP4 and DP receptors in the prefrontal cortex. Therefore, YKS may be effective in treating sleep disturbance in patients with cerebrovascular dementia.

Key words : Sleep disturbance, Cerebrovascular dementia, Yokukansan, EP4, DP

【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⁽¹⁾。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⁽²⁾、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、悪夢を惹起する可能性があることから、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⁽³⁾。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。我々の研究室では、脳血管性認知症のモデル動物として繰り返し脳虚血モデルを考案し、様々な薬効評価に用いてきた。このモデル動物は脳虚血7日目において、海馬CA1領域での神経細胞死と、8方向放射状迷路課題における空間記憶障害^(4,5)や、高架式十字迷路課題および明暗箱課題における周辺症状の一つの不安様行動が確認されており⁽⁶⁾、脳血管性認知症の臨床像と相関する事が分かっている。従って、この繰り返し脳虚血を施した脳血管性認知症モデル動物の睡眠障害を明らかとすることで、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。近年、認知症患者の周辺症状に対して漢方方剤である抑肝散が有効であると報告されている。抑肝散は古くから小児の夜泣きや神経症、不眠に用いられる漢方方剤であり、蒼朮(4.0)、茯苓(4.0)、川芎(3.0)、釣藤鈎(3.0)、当帰(3.0)、柴胡(2.0)、甘草(1.5)の7種の生薬から構成される。Shinnoらは、抑肝散の服用は認知症患者の総睡眠時間の減少や中途覚醒回数の増加といった睡眠障害にも有効であると報告をしている⁽⁷⁾。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的エビデンスや詳しいメ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とすることを目的とした。

【実験方法】

繰り返し脳虚血モデルの作製

繰り返し脳虚血(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。偽手術(Sham)群は両側椎骨動脈と総頸動脈を露出するだけの操作を行った。

脳波電極取り付け手術手順

電極の留置手術は大阪バイオサイエンス研究所の方法⁽⁸⁾を参考にした。頭蓋骨を露出させた後、左前頭葉皮質および右頭頂葉皮質(A:-3.6, L:+2.0)に電動ドリルで穴を開け、脳波電極ネジ(AN-3;エイコム)を1回転分の深度で設置した。続いて、筋電図コード(ユニークメディカル)を左頸部筋に2本挿入した。各電極は電極ソケット(バイオテックス)にハンダ付けをして接続し、歯科用セメント(松風)で頭蓋骨に固定した。

脳波測定装置

実験動物をチャンバー内のケージで飼育し、有線コードを通して脳波および筋電図を、また同時に測定時の動物の挙動を示す画像を記録した。外界からの音による影響を軽減させるために、常時ノイズを発生させるホワイトノイズをチャンバー内に発生させた。また、一秒毎の測定回数をあらかず Sampling rateを256 Hzに、検出感度をあらかず Sensitiveを100 V/ μ Vに設定した。測定はAM7:00から翌日のAM7:00までの24時間行った。実験動物の脳波測定及び映像撮影は、脳波解析研究用ソフト Sleep Sigh® Ver2.0(KISSEI COMTEC)に付属する Viral Recorder及びVideo option を使用した。なお、測定中の餌および水は自由に摂取できるようにした。

脳波解析の手順

測定した24時間の脳波および筋電図の解析は、Sleep Sign® Ver2.0 (KISSEI COMTEC) を用いて行った。脳波及び筋電図のフィルタ処理はHigh passフィルタ値を60 Hzに、Low passフィルタ値を0.5 Hzに設定した。24時間の測定データを4秒ごとに解析し、それぞれWAKE, NREM, REMの3つのステージに判定した。判定は各ステージに特徴的な脳波周波数帯の占有率と筋電図の活動から行い、同時に動画で確認した。それぞれ、 α 波や θ 波の低振幅速波と大きな筋電図が観察されるステージをWAKE、spindle波形や δ 波の低振幅徐波と中程度の筋電図が観察されるステージをNREM、また θ 波の優位な出現とおよび小さな筋電図の変動が観察されるステージをREMとした (Table 1)。

Table 1. Typical EEG and EMG in WAKE, NREM and REM stage.

判定ステージ	脳波 (EEG)	筋電図 (EMG)
WAKE	α 波 (8-13 Hz) θ 波 (4-8 Hz)	大
NREM	spindle波形 (12-16 Hz) δ 波 (0.5-4 Hz)	中
REM	θ 波 (4-8 Hz)	小

睡眠障害の評価

各ステージ (WAKE, NREM, REM) の1時間毎の推移と積算時間 (Total time), 平均持続時間 (Duration), 各エピソードの出現頻度 (No. of total episodes) および周波数帯分布 (EEG power density %) を算出しこれらを sham 群と RI 群とで比較した。

使用薬物と調整及び投与方法

抑肝散 (ツムラ株式会社 : Lot No. 2060054010) および donepezil (エーザイ株式会社 : Lot No. 17092101) は、投与用量をそれぞれ 1000 mg/kg, 3 mg/kg とし、精製水に溶解させた。抑肝散は虚血前後7日間の計14日間、donepezilは虚血後7日間、10 mL/kgの投与容量で1日1回反復経口投与した。なお、両薬物共に虚血日の投与は虚血1時間後に投与し、それ以外の日にはAM 10:00からPM 12:00の間に投与した。

RT-PCR法

脳虚血後8日目のAM 11:00-PM 1:00間でラットの脳を摘出し、速やかに前頭前皮質、視床下部を分画した。それぞれの組織にTRIzol® Reagent 1 mLを加えてホモジナイズし、RNAを抽出した。TURBO DNA-free Kit (Invitrogen) を用いてDNase処理をした後、RNA濃度 1 μ g/ μ Lに調整したサンプルをReverTra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて逆転写反応させた。生成したcDNAをTHUNDERBIRDTM SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) と各種プライマーを用いて増幅させ、リアルタイム定量PCRシステム (Mxpro : Agilent Technologies) を用いてPCR増幅過程を観察した。Sham群に対する各々のmRNA発現率 (%) を $F(x) = 100 \times 2^{-(\text{shamのサイクル数} - \text{sampleのサイクル数})}$ の式に基づき算出した。

[primer] (Loading controlとしてGAPDHを用いた)

Prepro-orexin (191 bp)

Prepro-orexin-F (19 mer) 5'-CTCTGCCCGACTGCTGTTCG-3'

Prepro-orexin-R (18 mer) 5'-GCCCATGGTCAGGATGCC-3'

H₁ receptor (133 bp)

H₁ receptor-F (21 mer) 5'-CATCTTCTTCATGGTCATTGC-3'

H₁ receptor-R (19 mer) 5'-CTTGAAGTTCTCGTTGCAC-3' ;

EP4 receptor (173 bp)

EP4 receptor-F (22 mer) 5'-GAGATCCAGATGGTCATCTTAC-3'

EP4 receptor-R (20 mer) 5'-AGGATGGGGTTCACAGAAGC-3'

DP receptor (193 bp)

DP receptor-F (23 mer) 5'-GCGCCCAGTCAGGCTCAGACTAC-3'

DP receptor-R (20 mer) 5'-CGCAAGGCTTGGAGGTCTTC-3' ;

GAPDH (158 bp)

GAPDH-F (21 mer) 5'-GCTGCCAAGGCTGTGGGCAAG-3'

GAPDH-R (18 mer) 5'-GCCTGCTTCACCACCTTC-3'

【結果・考察】

1. 繰り返し脳虚血ラットの睡眠障害の検討

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 (Fig. 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 (Fig. 2)。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。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。今回の結果から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。

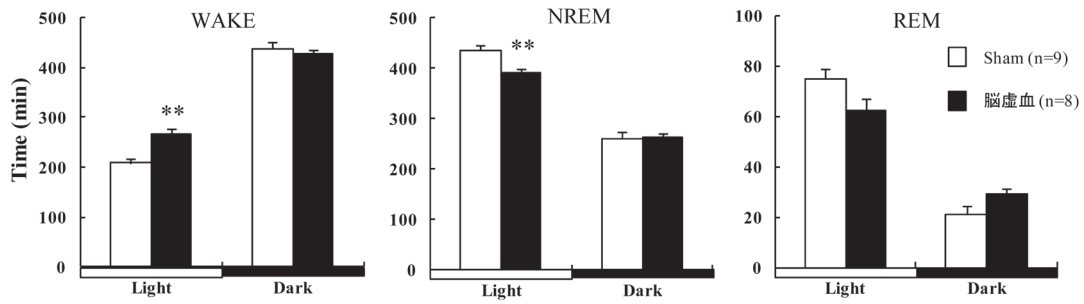


Fig.1 The total time of each sleep-wakefulness state following cerebral ischemia.
The times of wakefulness, NREM sleep, and REM sleep in cerebral ischemia-treated rats during the light/dark phase.

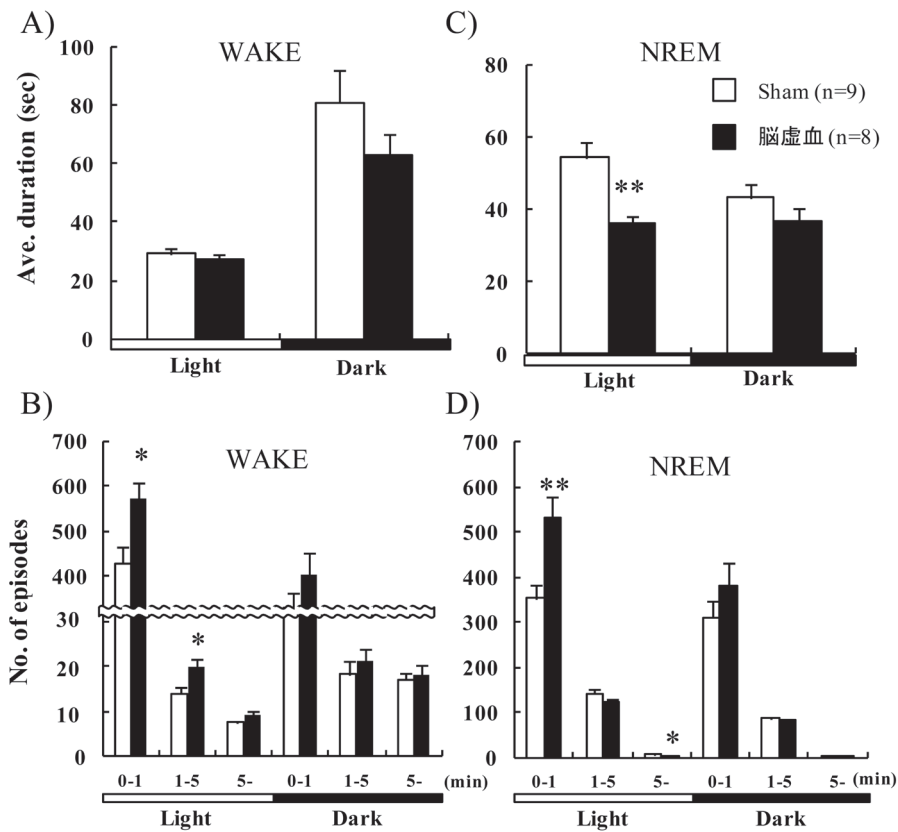


Fig.2 The average duration and number of each sleep-wakefulness state episode following cerebral ischemia. (A, B) The average duration and number of wakefulness episodes, and (C, D) NREM sleep in cerebral ischemia-treated rats during the light/dark phase.

2. RIラットの睡眠障害に対する抑肝散の効果

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 (Fig. 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 (Fig. 4)。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、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。

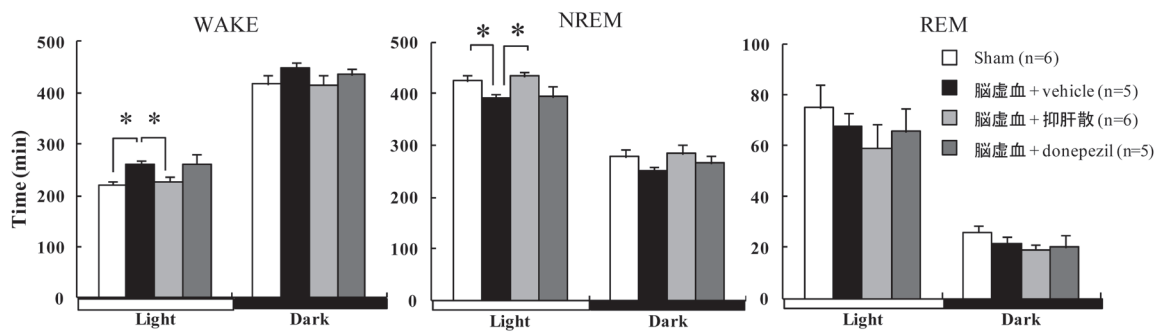


Fig. 3 Effect of 14-day pre- and post-ischemic treatment with YKS, and post-ischemic treatment with donepezil on the total time of each sleep-wakefulness state following cerebral ischemia. The times of wakefulness, NREM sleep, and REM sleep in cerebral ischemia-treated rats during the light/dark phase.

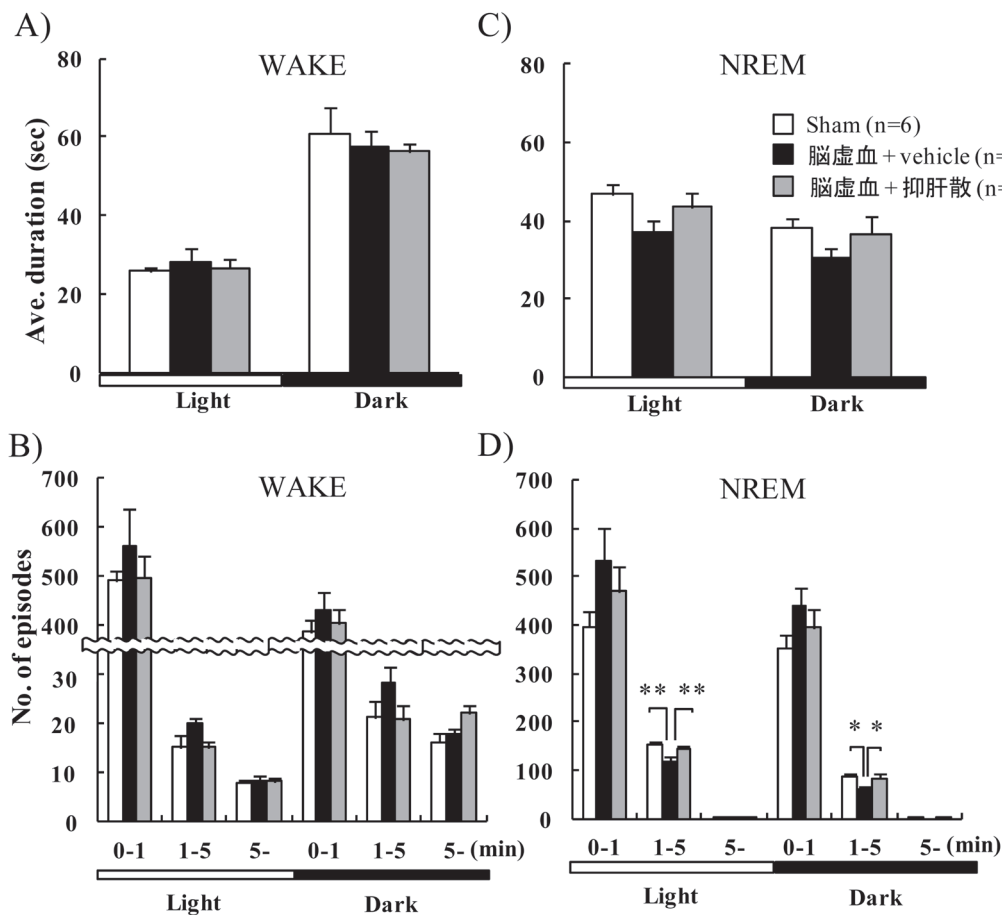


Fig. 4 Effect of YKS treatment on the average duration and number of each sleep-wakefulness state episode following cerebral ischemia. (A, B) The average duration and number of wakefulness episodes, and (C, D) NREM sleep in cerebral ischemia-treated rats during the light/dark phase.

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

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、視床下部と前頭前皮質において、覚醒誘発に関与するオレキシンの前駆物質のprepro-orexin⁽⁹⁾、ヒスタミンH₁受容体、プロスタグランジン (PG) E₂受容体 (EP4)⁽¹⁰⁾ および睡眠誘発に関与するPGD₂受容体 (DP)⁽¹¹⁾ 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。

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H₁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 (Fig. 5)。またRI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、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 (Fig. 5)、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。

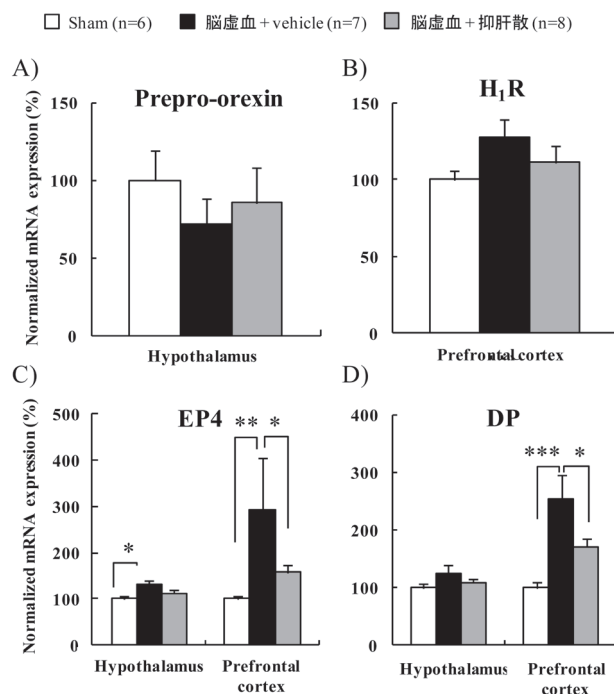


Fig. 5 Effect of YKS treatment on the molecular mechanism of regulation of sleep-wakefulness following cerebral ischemia. (A) Expression levels of prepro-orexin mRNA in the hypothalamus, (B) H₁ receptor mRNA in the prefrontal cortex, (C) EP 4 receptor mRNA, and (D) DP receptor mRNA in the hypothalamus and the prefrontal cortical of cerebral ischemia-treated rats.

【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。

【参考文献】

- 1) 東京都老人総合研究所精神医学研究室: 東京都における在宅ほけ老人の社会精神医学的実態. 東京都老人総合研究所, 1981.
- 2) Guo Z, Wills P, et al: Cognitive impairment, drug use, and the risk of hip fracture in persons over 75 years old: a community-based prospective study. *AM J Epidemiolo.* 1998; **148**: 887-92.
- 3) Stahl SM, Markowitz JS, et al: Cause of donepezil and hypnotics among Alzheimer's disease patients living in the community. *J Clin Psychiatry.* 2003; **64**: 466-72.
- 4) Chung E, Iwasaki K, et al: Repeated cerebral ischemia induced hippocampal cell death and impairments of spatial cognition in the rat. *Life Sci.* 2002; **72**: 609-19.
- 5) Iwasaki K, Chung EH, et al: Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res.* 2004; **995**: 131-9.
- 6) Nogami A, Sakata Y, et al: Effects of yokukansan on anxiety-like behavior in a rat model of cerebrovascular dementia. *J Nat Med.* 2011; **65**: 275-81.
- 7) Shinno H, Inami Y, et al: Effect of Yi-Gan San on psychiatric symptoms and sleep structure at patients with behavioral and psychological symptoms of dementia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2008; **32**: 881-5.
- 8) Huang ZL, Qu WM, et al: Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**: 9965-70.
- 9) Sherin JE, Elmquist JK, et al: Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. *J Neurosci.* 1998; **18**: 4705-4721.
- 10) Huang ZL, Sato Y, et al: Prostaglandin E2 activates the histaminergic system via the EP4 receptor to induce wakefulness in rats. *J Neurosci.* 2003; **23**(14): 5975-83.
- 11) Urade Y, Hayaishi O: Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. *Sleep Med Rev.* 2011; **15**: 411-418.