

アルツハイマー病モデルラットを用いた酸棗仁湯の睡眠障害
および空間記憶障害改善作用

森山 博史

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

**Ameliorative effect of sansoninto on sleep disturbance and spatial memory impairment
in an Alzheimer's disease rat model**

Hiroshi Moriyama

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

Abstract

Aim: Alzheimer's disease (AD) is associated with a high incidence of sleep disturbance, and several studies have reported that sansoninto (SNT), a Kampo medicine, ameliorates sleep disturbance. The effects of SNT on sleep disturbance and spatial memory impairment, however, have not been investigated in animal models of AD, therefore the aim of the current study was to carry out these investigations using a rat AD model.

Methods: Combined intracerebroventricular injections of aggregated beta-amyloid (A β) and cerebral ischemia (CI) were used to induce a rat model of AD. The quantity and quality of sleep in these rats were determined on electroencephalography and electromyography. Spatial memory impairment was examined using the water maze task. Triazolam, a hypnotic, and donepezil, approved for treating AD, were used as positive controls. We examined hippocampal choline acetyltransferase (ChAT) level using western blot and prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid (GABA) level using ELISA.

Results: Compared with sham-operated rats, the AD model rats had decreased total non-rapid eye movement sleep time, more frequent nocturnal awakening in the light phase, and poorer quality of non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep on electroencephalography and electromyography. The AD rats also took longer than sham-operated rats to pass the platform area in the water maze retention test. Oral SNT 1000 mg/kg improved those impairments. SNT tended to increase GABA level in A β + CI-treated rats in prefrontal cortex GABA. Treatment with SNT ameliorated the reduction of ChAT level in A β + CI-treated rats in hippocampal ChAT.

Conclusion: AD model rats had sleep disturbances, including decreased time spent in NREM sleep, frequent nocturnal awakening, and poor quality of sleep, as well as memory impairment. This sleep disturbance phenotype is similar to that observed in patients with AD. SNT ameliorated these sleep disturbances and improved the memory impairment observed in these rats. The mechanism of the ameliorative effect of SNT on sleep disturbance may be due, to the increasing of GABA level in prefrontal cortex. The mechanism of the ameliorative effect of SNT on spatial memory impairment due, at least in part, to the improved ChAT level in hippocampus. These suggest that SNT is useful for treating sleep disturbance and cognitive dysfunctions in AD.

Keywords: Alzheimer's disease, Kampo medicine, memory impairment, sansoninto, sleep disturbance

【緒言/目的】

認知症患者数は2012年の時点で全国に約462万人と推計されており、2025年には700万人を超えることが厚生労働省によって推計されている。認知症患者の約50%はアルツハイマー型認知症 (Alzheimer-type dementia: ATD) 患者であり、ATD患者の約40%において夜間の睡眠障害が認められる。また、大規模コホート研究では睡眠障害が認知症発症リスクの増加と相関することが報告されており⁽¹⁾、睡眠障害が認知症のリスクファクターになることが示唆されている。これらのことから、睡眠障害の改善が認知症の予防・治療に繋がることが期待される。しかしながら、従来型の睡眠薬は前向き健忘を招くことが多いことから⁽²⁾、ATD患者への睡眠薬使用は認知機能障害増悪のリスク増加が危惧される。また、ATD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ドネペジルにも不眠、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改善薬を処方される確率が増加する。従って、このようなケースでは転倒・骨折の危険度もさらに増加する危険性がある⁽³⁾。以上のことから、ATD患者の睡眠障害に対する治療満足度は低く、ATD患者の認知機能を増悪させない睡眠障害改善薬を探索する必要がある。認知機能への悪影響を回避し睡眠障害を改善するという観点から漢方方剤の応用が考えられる。その中でも著者は酸棗仁湯に着目した。酸棗仁湯は不眠症に用いられる代表的な漢方方剤であり、本品7.5 g、酸棗仁 (10.0 g)、茯苓 (5.0 g)、知母 (3.0 g)、川芎 (3.0 g)、甘草 (1.0 g) の割合の混合生薬の乾燥エキス3.25 gを含有している。臨床・非臨床研究において酸棗仁湯が睡眠障害に対して有効であることが示されており^(4,6)、さらにラットの睡眠剥奪ストレスによる空間記憶障害に対しても改善効果を示すことが報告されている⁽⁶⁾。これらのことから、酸棗仁湯は、睡眠障害改善に加え、認知機能改善作用を有することが考えられ、酸棗仁湯はATDの睡眠障害と認知機能障害に対して効果が期待されるが、その検討は未だされていない。ATD患者脳では、amyloid- β ($A\beta$) の蓄積が顕著に認められることから、 $A\beta$ がその病因物質として考えられている。また、ATD患者の多くは脳血管障害を併発していることから⁽⁷⁾、当研究室ではATD動物モデルとして $A\beta$ を脳室内投与と全脳虚血処置 (CI: Cerebral Ischemia) を組み合わせた $A\beta$ + CI モデルを作製し、薬効評価に用いてきた⁽⁸⁾。しかし、このモデルが睡眠障害を呈するかは明らかではない。そこで、本研究では、ATDモデル動物の睡眠障害の特性を明らかにし、睡眠障害および認知機能障害に対する酸棗仁湯の効果とその作用機序を検討した。

【実験方法】

実験動物ならびに飼育方法

実験動物は、8週齢のWistar系雄性ラット (体重300-350 g; 九動) を用いた。ラットはプラスチックケージ (30 × 35 × 17 cm) 中に4-5匹収容し、室温23 ± 2°C、絶対湿度60 ± 2%、および12時間の明暗サイクル (AM7:00点灯/PM7:00消灯) の環境で飼育した。なお、餌 (CE-2; 日本クレア) および水は自由に摂取できるようにした。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 (Experimental animal care and use committee) による動物実験倫理規定に準じた (承認番号: 1303643, 1503812)。

脳虚血モデル作製方法

Pulsinelli and Bireleyらの方法⁽⁹⁾に従い、pentobarbital sodium (東京化成) 50 mg/kgの腹腔内投与による麻酔下で、ラットを背位に固定し腹側頸部の皮膚を切開し、両側総頸動脈を露出した。後日に血管をクリップで挟むため、周囲の組織から血管を剥離し、糸を輪状に装着後、皮膚を縫合した。続いて、脳定位固定装置 (Narishige Scientific Instrument Lab: SR-5R) に腹位に固定し、背側頸部の皮膚および筋肉層を切開して、第一頸椎を露出した。双極性凝固器 (MICRO-CD: 瑞穂医科工業製) を用い第一頸椎の両側にあ

る alar foramina から脳底部へ上行している頸骨動脈を両側性に電気焼灼切断し、その後皮膚を縫合した。偽手術群は両側椎骨動脈を電気焼灼し、総頸動脈を露出するだけの操作を行った。

ガイドカニューレ埋め込み手術

脳虚血モデル作製に引き続き、Paxinos and Watson の脳図譜⁽¹⁰⁾に従い側脳室 (A : -0.8, L : ± 1.3, D : +3.8) に長さ 13 mm の内径 22 ゲージのステンレススチール製のガイドカニューレを埋め込み、これを歯科用セメント (クイックレジン, 松風) で固定した。歯科用セメントが完全に乾いた後、頭皮を縫合した。ガイドカニューレには、13 mm の内径 28 ゲージのダミーカニューレをはめ込んだ。

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⁽¹¹⁾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 2 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。

A β 凝集体の調整方法

β -amyloid 1-42 (MW=4515.1, ANASPEC Inc) 0.5 mg を 111 μ L の HEPES buffer saline (Fluka) に溶解し (1 mM), 37°C の incubator に入れて 7 日間静置した。その後、HEPES buffer saline で希釈し (1 mM \rightarrow 30 μ M), -80°C で保存した。使用時に解凍し実験に用いた。

A β + CI モデルラット作製手順

ATD では、amyloid- β (A β) の脳内蓄積が認められ、患者の大多数が脳循環障害を併発していることから⁽¹²⁾、A β の脳室内投与と一過性脳虚血処置 (CI: cerebral ischemia) を組み合わせた A β + CI ラットを ATD モデル動物として作製した。両側総頸動脈にかけてある糸を使って、血管を露出し、クリップで血管を挟み、10 分間の脳虚血を行った。正向反射消失を示したラットのみ、虚血されたものとして、以後の実験に使用した。血流再開直後に 1 回目の A β の投与を行った。翌日からは 1 日 1 回、計 7 回 (7 日間) の投与を行った。ガイドカニューレの先端より 1 mm 長くした内径 28 ゲージのステンレスカニューレをはめ込み、ポリエチレンチューブ (427406 (PE20) : Becton Dickinson) に接続したマイクロシリンジ (25 μ L : HAMILTON) で、マイクロインジェクションポンプ (CMA/100) を用いて 1 μ L/min の流速で A β 投与を行った。A β は、1 回につき 10 μ L ずつ両側の脳室内に計 20 μ L (600 pmol) を投与した。

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、それぞれ覚醒、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、Alfa: α 波 (8-13 Hz) やTheta: θ 波 (4-8 Hz) の低振幅速波と大きな筋電図が観察されるステージを覚醒、Spindle波形 (12-13 Hz) やDelta: δ 波 (0.5-4 Hz) 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。

睡眠障害の検出および酸棗仁湯の効果

A β 投与開始から、28日目に脳波ならびに筋電図の記録を行った(図1)。ATD患者の睡眠障害では、夜間睡眠時間の短縮、中途覚醒の増加、NREM睡眠持続時間の減少および熟眠障害が認められる。そこで、A β + CIラットの脳波解析を行い、睡眠時間や中途覚醒、熟眠の指標である δ 波、REM睡眠時の θ 波について検討した。また、睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果を評価した。

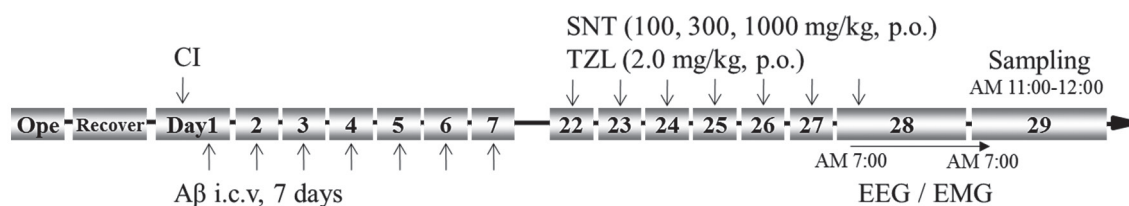


Fig.1 Protocol of EEG and EMG recording.

水迷路課題

水迷路課題はモリス水迷路課題⁽¹³⁾を参考にA β + CIラットの空間記憶を評価した。水迷路課題の装置は直径150 cm、高さ45 cm、の容器に23℃の水を32 cmの高さまで注いだ。プラットホームは直径12 cm、高さ30 cmの透明なアクリル製のものを使用した。プラットホームの位置は容器の中心から南東の領域に23 cmとした。ラットの遊泳軌跡をCCDカメラで録画し、解析用ソフトを使用して空間記憶を検討した。水面に光点が当たらないように照明を設置し、試行の30分前にラットをケージごと実験環境に置き、馴化させた。空間記憶獲得の試行は1日3回(各試行でスタート地点A, B, Cにする)5日間行った。試行時間の上限を120秒とし、ラットが時間内にプラットホームに到達しなかった場合には、ラットをプラットホームに誘導した。プラットホーム到達後30秒間は、ラットをプラットホーム上に放置し、プラットホームの位置を認知させた。各試行間隔は30分とした。空間記憶の獲得試行5日目のプラットホーム到達の平均時間が20秒以下のラットをプラットホームの位置を記憶したとみなし、以降実験に使用した。空間記憶保持の評価ではプラットホームを取り除いた。再生試行は薬剤投与後1時間後に行った。評価時間を180秒とし、初回プラットホーム通過時間、プラットホーム通過回数、遊泳速度を評価した(図2)。

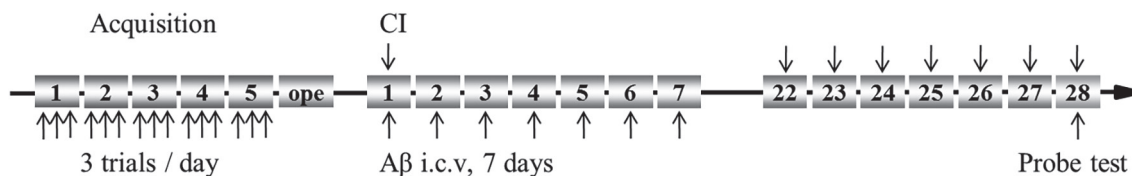


Fig.2 Protocol of water maze task.

使用薬物と調製および投与方法

当研究室では、これまでにAβ + CI ラットの脳虚血後7日目時点における空間記憶障害など⁽⁸⁾を明らかにしてきた。この脳虚血後7日目時点で認知機能評価は予防的な観点から薬効評価を行っていた。そこで、本節ではより臨床に則した薬剤投与時期での酸棗仁湯の睡眠障害に対する作用について検討するため、脳虚血後28日目時点における睡眠記憶障害を検討した。酸棗仁湯（ツムラ株式会社：Lot No. 2120103010）の投与用量を100, 300, 1000 mg/kg とし、精製水に溶解した。また、TZL（和光：Lot No. ALE1263）の投与用量を2 mg/kg とし、0.5% カルボキシメチルセルロース（東京化成：Lot No. GC01）に溶解した。酸棗仁湯およびTZLは脳虚血後22日目から28日目まで1日1回、7日間経口投与した（図1, 2）。両薬剤の投与時間帯はAM 10:00からAM 11:00とした。

サンプリングおよびタンパク質量の算出

脳虚血後28日目のAM 10:00-11:00間に酸棗仁湯 1000 mg/kg を経口投与し、投与1時間後に脳を摘出し、速やかに前頭前野を分画した。それぞれの組織にTRIzol® Reagent (Invitrogen) 200 μLを加え、ホモジナイズした。ラットの脳サンプリングまでの実験スケジュールを図3に示した。タンパク質量は、BCA Protein Assay Kitを用いて測定した。スタンダードとして4000 mg/mL Bovine serum albumin (Sigma)を希釈して、2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 mg/mLに調整した。96 well assay plateにWRを200 μL入れ、各wellにスタンダードおよびサンプルを10 μLずつ加えた。30秒間Plate Shakerで振盪し、室温で30分間放置した。570 nmの波長でプレートリーダーを用いて吸光度を測定した。スタンダードの値から検量線を描き、タンパク濃度を算出した。

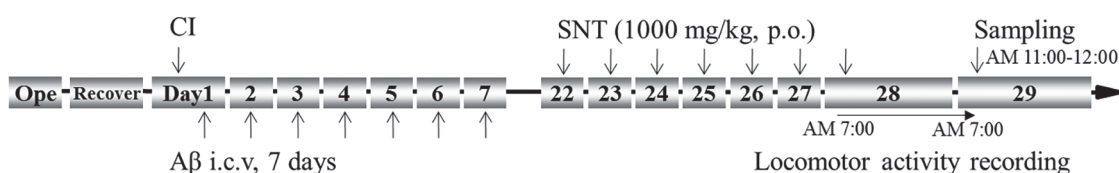


Fig.3 Protocol of sampling for prefrontal cortex in rats.

ELISA 法

タンパク濃度が0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように1 × PBS (pH7.2) で希釈した。Rat Gamma Aminobutyric Acid ELISA Kit (My Bio Source) を用いて測定波長450 nm, 参照波長570 nmの吸光度を測定し, GABA 発現量を算出した。

Western blotting 法

タンパク質度が30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように1 × PBS (pH7.2) で希釈し, 2 × SDS sample buffer (2-メルカプトエタノールを含む) を等量加え, 最終的に4.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ の濃度に調整した。その後, 95°C, 5分間インキュベートし-20°Cで保存した。Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD) 泳動槽の上槽(陰極側)と下槽(陽極側)に1 × running bufferを注入し, wellにsampleおよびmaker (Prestained SDS-PAGE Standards, BIO-RAD) を注入した。定電圧 100 Vで90分間泳動した。ブロッティング装置の陽極面に transfer buffer を十分塗布し, 下からブロッティング用濾紙 (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD), PVDF 膜 (Immun-blot™ PVDF membrane, BIO-RAD), ゲル, 濾紙の順に気泡が入らないように重ねた。ゲルの面積1 cm^2 あたり 2 mA の定電流で90分間ブロッティングを行った。ブロッティング終了後, PVDF膜をブロッキング液 (2% Gelatin from cold water fish skin/ water, SIGMA) に浸し, 4°Cで一晩振盪した。ブロッキング終了後, PVDF膜をナイロンバッグに入れ三辺をポリシーラーで閉じた。一次抗体を含むブロッキング液 (Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 1) 1 mLをナイロンバッグに注入し, 空気を追い出した後, 残りの一辺をポリシーラーで閉じ, 4°Cで一晩振盪した。ナイロンバッグからPVDF膜を取り出し, TBS-tで洗浄した (10 min × 3)。PVDF膜をナイロンバッグに入れ, 三辺をポリシーラーで閉じた。二次抗体を含むブロッキング液 (Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution 2) 1 mLをナイロンバッグに注入し, 空気を追い出した後, 残りの一辺をポリシーラーで閉じた。ガラス板で挟み, 室温で2時間振盪した。ナイロンバッグからPVDF膜を取り出し, TBS-tで洗浄した (10 min × 3)。発色液 (ImmunoStar® LD) を Solution A: Solution B= 1:1となるよう調整した。PVDF膜から水分を取り, 室温で5分間発色液に浸した。PVDF膜を反応させた後ナイロンバッグに入れ, Fluor Chem™ 8900 (Alpha Innotech) で撮影した。

一次抗体

ChAT抗体: Anti-Choline Acetyltransferase antibody (abcam)

TBS-T: Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1の混合液で1000倍希釈して用いた (1:1000)。

β -actin抗体: Rabbit polyclonal to beta Actin (abcam)

TBS-T: Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1の混合液で500倍希釈して用いた (1:500)。

二次抗体

bovine anti-rabbit IgG-HRP (CST ジャパン株式会社)

TBS-T: Blocking One (ナカライテスク株式会社) =4:1の混合液で10000倍希釈して用いた (1:10000)。

統計処理

結果は平均値 ± 標準誤差で示した。統計処理には, one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's testを使用した。なお, 危険率が5%以下だった場合を統計学的に有意差が有るものとみなし, 危険率が10%以下だった場合を差のある傾向とみなした。

【結果・考察】

1. A β + CIラットの睡眠障害に対する酸棗仁湯の効果

A β + CIラットは覚醒時間増加とNREM睡眠時間減少を示し、酸棗仁湯はその変化を抑制した(図4)。また、A β + CIラットは覚醒出現回数増加を示し、酸棗仁湯はその増加を抑制した(図5)。これらのことから、A β + CIラットでは覚醒と睡眠間のswitchingの増加により中途覚醒が増加し、NREM睡眠時間減少を引き起こすことが考えられ、酸棗仁湯はそのswitchingに作用することが示唆された。

さらに、A β +CIラットはNREM睡眠時の δ 波占有率減少とREM睡眠時の θ 波占有率減少を示し、酸棗仁湯はその変化を抑制したが、ベンゾジアゼピン系作動薬であるトリアゾラム(Triazolam: TZL)は、 δ 波占有率減少に対してのみ抑制効果を示した(図6)。これらのことから、酸棗仁湯はベンゾジアゼピン系作動薬と同様にGABA神経系亢進を介して δ 波を誘導するが、 θ 波に対する効果はGABA神経系を介したのではないことが示唆された。中隔野コリン神経系の活性は海馬の θ 波を誘導することから⁽¹⁴⁾、酸棗仁湯はコリン神経系に作用し、 θ 波占有率減少を改善したことが考えられた。

以上の結果から、酸棗仁湯はA β + CIラットの睡眠障害に対して改善効果を有することが明らかとなった。酸棗仁湯はGABA神経系を亢進し、 δ 波領域のNREM睡眠を促進することで、覚醒—睡眠のswitchingの回数を減少させ、中途覚醒増加を抑制したと考えられた。

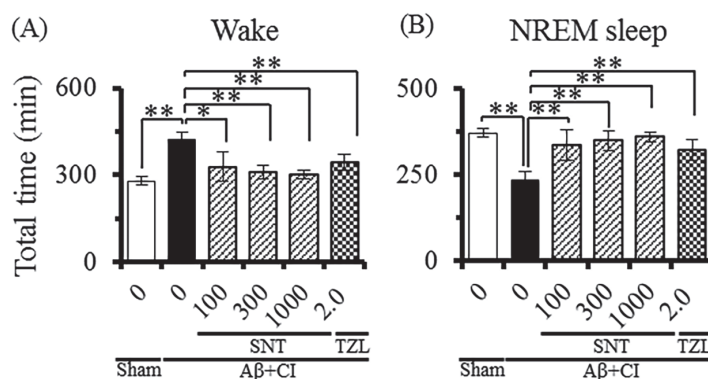


Fig. 4 Effect of sansoninto on total wake and NREM sleep time during 12 h light phase in A β + CI rats. (A) wake, (B) NREM sleep. Sham (n=10), vehicle (n=11), SNT (mg/kg) 100 (n=7), 300 (n=7), 1000 (n=8), triazolam (TZL, n=7). * p <0.05, ** p <0.01 vs vehicle, Dunnett's test.

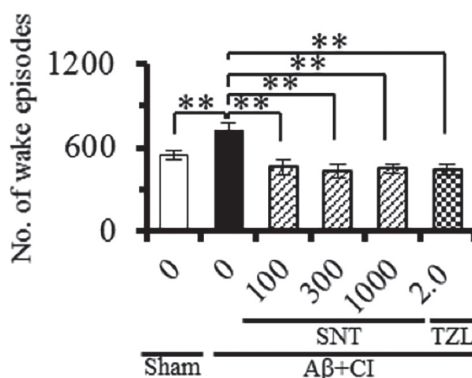


Fig. 5 Effect of sansoninto on number of wake episodes during 12 h light phase in A β + CI rats. Sham (n=10), vehicle (n=11), SNT (mg/kg) 100 (n=7), 300 (n=7), 1000 (n=8), triazolam (TZL, n=7). ** p <0.01 vs vehicle, Dunnett's test.

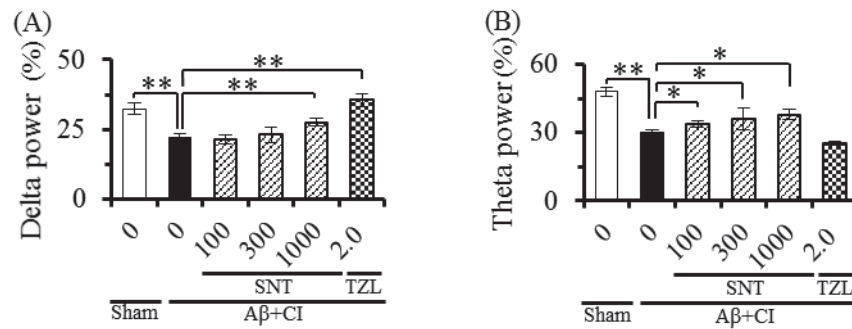


Fig. 6 Effect of sansoninto on delta power density in NREM sleep and theta power density in REM sleep during 12 h light phase in Aβ + CI rats.

Sham (n=10), vehicle (n=11), SNT (mg/kg) 100 (n=7), 300 (n=7), 1000 (n=8), triazolam (TZL, n=7). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle, Dunnett's test.

2. Aβ + CIラットの空間記憶障害に対する酸棗仁湯の効果

Aβ + CIラットでは、プラットホームのあった位置を通過した時間は延長しており、通過回数は減少していた。酸棗仁湯はこの変化を減弱させた(図7)。これらの結果から、酸棗仁湯はAβ + CIラットの空間記憶障害改善作用を有することが明らかとなった。水迷路課題における空間記憶は中隔野から海馬へ投射したコリン神経系に依存しており、海馬のθ波も中隔野コリン神経系の調節を受けることから、Aβ + CIラットでは中隔野コリン神経系が障害されていることが考えられた。また、酸棗仁湯はコリン神経系障害を改善することで、空間記憶障害を改善することが示唆された。一方、δ波領域の脳波が認められる徐波睡眠は海馬依存的な記憶を増強することが報告されており、徐波睡眠の誘導にはGABA神経の活性化が必要である。また、ATD患者のδ波・θ波強度は認知機能を評価するMini-Mental State Examination (MMSE) スコアと相関することから⁽¹⁵⁾、睡眠時δ波・θ波レベルの減弱は認知機能障害に悪影響を及ぼすことが示唆されている。以上のことから、酸棗仁湯はGABA神経系ならびにコリン神経系に作用することで記憶障害を改善することが示唆された。

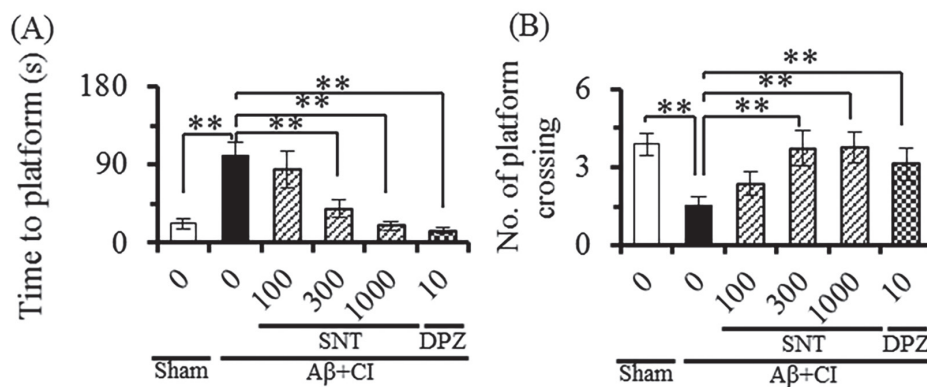


Fig. 7 Effect of sansoninto on time to platform (A) and number of platform crossing (B) for probe test in Aβ + CI rats.

Sham (n=8), vehicle (n=11), SNT (mg/kg) 100 (n=8), 300 (n=7), 1000 (n=8), triazolam (TZL, n=7). ** $p < 0.01$ vs vehicle, Dunnett's test.

3. 酸棗仁湯の睡眠障害・空間記憶障害改善機序の検討

これまでの検討から、酸棗仁湯の睡眠障害・空間記憶障害改善作用には、GABA神経系とコリン神経系が関与することが示唆された。δ波は脳皮質の神経活動の指標であり、酸棗仁湯はトリアゾラムと同様にδ波の占有率減少を改善したことから、酸棗仁湯は脳皮質のGABA神経系を活性化したことが考えられた。そこで、脳皮質の一部である前頭前野のGABA量に対する酸棗仁湯の効果をELISA法により検討した。Aβ+CIラットではGABA量の変化は認められなかったが、酸棗仁湯はGABA量の増加傾向を示した(図8A)。また、酸棗仁湯のθ波や空間記憶障害改善作用の結果から、酸棗仁湯が中隔野から海馬へのコリン神経系に影響することも示唆された。そこで、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ(choline acetyltransferase: ChAT; コリン神経のマーカー)に着目し、western blot法により海馬のChAT発現量に対する酸棗仁湯の効果を検討した。Aβ+CIラット海馬ではChAT発現量が減少しており、酸棗仁湯はその減少を抑制した(図8B)。以上の結果から、酸棗仁湯はGABA合成を促進すること、Aβ+CIラットのコリン神経細胞減少を改善することが示唆された。また、アルツハイマー病モデルマウスでは海馬GABA回路のアンバランスがおり、新生ニューロンの減少が認められ⁽¹⁶⁾、睡眠によりニューロンの新生が促されるとの報告がある⁽¹⁷⁾。したがって、酸棗仁湯はGABA神経系亢進により睡眠を誘導することで海馬のコリン神経をはじめとする神経新生を促し、認知機能低下を改善したことが考えられた。

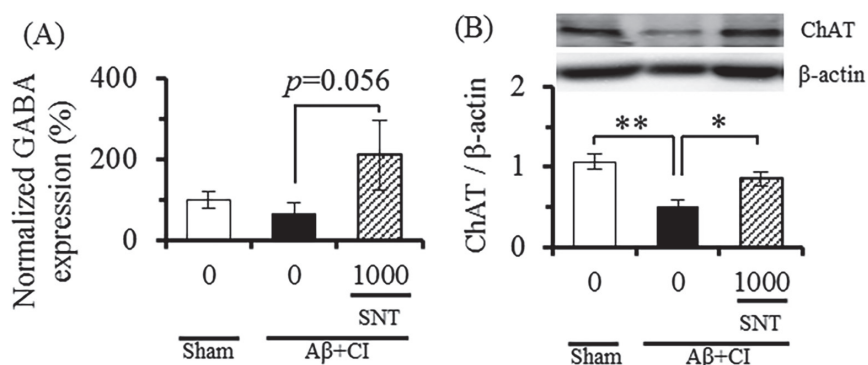


Fig. 8 Effect of sansoninto on GABA expression in prefrontal cortex (A) and ChAT (B) expression in hippocampus using Aβ + CI rats.

(A) Sham (n=9), vehicle (n=12), SNT 1000 mg/kg (n=7). (B) Sham (n=6), vehicle (n=7), SNT 1000 mg/kg (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehicle, Dunnett's test.

【総括・結論】

酸棗仁湯はATDモデルラットの睡眠障害ならびに空間記憶障害を改善することが明らかとなった。また、その改善機序には、GABA神経系亢進とコリン神経障害改善が関与することが示唆された。本研究の成果により、酸棗仁湯はδ波・θ波レベルを正常化し、ATD患者の睡眠障害と認知機能障害の治療に有用であることが期待される。また、軽度認知症患者においても睡眠時のδ波・θ波レベルの減少が認められていることから、酸棗仁湯はATD発症予防に対しても有効な薬となる可能性がある。

【参考文献】

1. Lim AS, Kowgier M, Yu L et al. Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer's Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep*. 2013; **36**: 1027-1032.
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; **887**: 148.
3. Stahl SM, Markowitz JS, et al. Couse of donepezil and hypnotics among Alzheimer' s disease patients living in the community. *J Clin Psychiatry*. 2003; **466**: 64.
4. Miyaoka T, Kawano K, Furuya M et al. Efficacy and Safety of Sansoninto in Insomnia with Psychiatric Disorder: An Open-Label Study. *Altern Integr Med*. 2015; **4**: 1-6.
5. 平田和美, 有光潤介, 小川恵子. 認知症の行動・心理症状 (BPSD) に対する酸棗仁湯の効果. *老年精神医学雑誌* 2016; **27 (増刊-2)** : 164 -164.
6. 牧野利明. 酸棗仁湯. *脳21* 2015; **18 (4)** : 313-316
7. Liu W, Wong A, Law AC, Mok VC. Cerebrovascular disease, amyloid plaques, and dementia. *Stroke*. 2015; **46 (5)** : 1402-1407
8. Iwasaki K, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I et al. Cerebral ischemia combined with β -amyloid impairs spatial memory in the eight-arm radial maze task in rats. *Brain Res*. 2006; **1097**: 216-223.
9. Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*. 1982; **11**: 491-498.
10. Pulsinelli WA, Brierley JB: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979; **10**: 267-272.
11. Salzman C: Clinical geriatric psychopharmacology-3rd edition-. *Baltimore*. 1998.
12. Liu W, Wong A, Law AC, Mok VC. Cerebrovascular disease, amyloid plaques, and dementia. *Stroke*. 2015; **46 (5)** : 1402-1407
13. Morris. R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv*. 1981; **12**: 239-260.
14. Vandecasteele M, Varga V, Berényi A et al. Optogenetic activation of septal cholinergic neurons suppresses sharp wave ripples and enhances theta oscillations in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; **111**: 13535-13540.
15. Knott V, Mohr E, Mahoney C, Ilivitsky V. Quantitative electroencephalography in Alzheimer's disease: comparison with a control group, population norms and mental status. *J Psychiatry Neurosci*. 2001; **26**: 106-116.
16. Sun B, Halabisky B, Zhou Y, Palop JJ, Yu G, Mucke L, et al. Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. 2009; **5 (6)** : 624-633.
17. Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, et al. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*. 2012; **489 (7414)** : 150-154.