漢方薬理・最前線

抑肝散・抑肝散加陳皮半夏 2

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 准教授　牧野 利明

精神・神経系疾患

1. 亜鉛欠乏餌モデル

Takedaら[1, 2]は、亜鉛欠乏餌で28日間飼育したラットで医療用抑肝散エキス原末(YKS)の作用を検討した。亜鉛欠乏餌を開始後19日目から28日目までYKSを300mg/kg/日(ヒト1日量の約5倍量)経口投与した。29日目に海馬CA3領域の細胞外液に含まれるアミノ酸濃度を測定したところ、KClで刺激したときのグルタミン酸、アスパラギン酸濃度の増加が、YKS投与群では有意に抑制された。また、29日目の脳スライス標本を作製し、無刺激時と電気刺激時の苔状線維末端におけるグルタミン酸の開口放出を評価したところ、亜鉛欠乏餌ラットではいずれもグルタミン酸の放出亢進が認められたが、YKS投与群では有意に回復した。

また、Tamanoら[3, 4]は、隔離飼育したマウスに2週間亜鉛欠乏餌を与え、隔離ストレスに対するYKSの作用を検討した。YKSは300mg/kg/日(ヒト1日量の約5倍量)を飲水投与した。居住者－侵入者テストによる攻撃行動の評価では、通常餌群と比較して、亜鉛欠乏餌群では攻撃行動スコアが顕著に増加したが、YKSはこれを有意に抑制した。また、このときのストレス負荷により血清中コルチコステロン濃度の増加がみられ、亜鉛欠乏餌群ではその増加の割合が低下したが、YKS投与群では有意に回復した。脳組織を摘出し、神経伝達物質の濃度を測定したところ、通常餌群と比較して亜鉛欠乏餌群ではグルタミン酸、GABA、ドパミンの濃度が増加したが、YKS投与群では回復していた。

以上のことから、YKSによる攻撃性の改善作用には、脳内における神経伝達物質の過剰な放出の抑制が関与している可能性が示唆された。

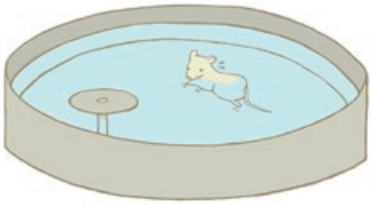
2. PCA投与モデル

Kannoら[5]は、ラットにセロトニン神経系作動薬であるパラクロロアンフェタミン(PCA)を腹腔内投与し、その後YKS 1.0g/kg/日(ヒト1日量の約15倍量)を14日間連続経口投与または14日目に単回投与したときの社会的行動試験での行動を観察した。対照群と比較してPCA投与ラットでは社会的行動頻度が有意に減少したが、YKSは連続投与、単回投与いずれにおいても有意に回復した。また、攻撃行動はPCA投与により有意に増加したが、YKSは連続投与でのみ有意に回復した。これらのYKSの作用は、セロトニン1A受容体拮抗薬との併用で阻害された。自発運動量には変化は認められなかった。以上のことから、YKSの作用にはセロトニン1A受容体刺激作用が関与していることが推測された。

3. Tg2576[APP-Tg(＋)]マウス

Tabuchiら[6]はアルツハイマー型認知症モデルマウスであるAPP-Tg(＋)マウスに対して、YKS 0.5%および1.0%混合餌(ヒト常用量の約13倍および25倍量)で5～15ヵ月齢まで飼育した。7ヵ月齢と10ヵ月齢に行われた高架式十字迷路試験での不安行動の評価では、コントロール群のTg(－)マウスと比較してTg(＋)マウスでは有意な不安状態を示す行動の増加が認められた。YKS投与群では7ヵ月齢で用量依存的な改善が認められたが、10ヵ月齢になると改善効果は認められなかった。11ヵ月齢で行われたモリス水迷路試験での空間記憶の評価では、Tg(－)マウスと比較してTg(＋)マウスでは空間記憶獲得の低下が認められたが、YKS投与群では用量依存的に有意な改善が認められた。7、10、14ヵ月齢に行われたオープンフィールド試験による自発運動量の評価では、Tg(－)と比較してTg(＋)マウスではいずれも有意に増加して過剰活動が認められたが、YKS投与群では14ヵ月齢で有意な改善が認められた。15ヵ月齢の脳組織切片におけるアミロイドβ(Aβ)の沈着を免疫組織染色で評価したところ、Tg(－)と比較してTg(＋)マウスでは顕著に増加していたが、YKS投与群での変化は認められなかった。

モリス水迷路試験



一方、Fujiwaraら[7]は、Tg(＋)マウスにYKS 0.3%および1.0%混合餌(ヒト常用量の約8倍または25倍量)で10～15ヵ月齢まで飼育した。11ヵ月齢から毎週1回、明暗箱を用いた受動回避学習試験を行ったところ、Tg(－)マウスと比較してTg(＋)マウスでは13ヵ月齢以降で有意な記憶・学習障害が認められたが、YKS投与群では有意な改善が認められた。15ヵ月齢に評価した社会的行動試験では、Tg(－)マウスと比較して

Tg(+)マウスでは有意な攻撃行動の増加と社会的行動頻度の低下が認められたが、YKS投与群では用量依存的に有意な改善が認められた。その後大脳皮質を摘出してAβの濃度を測定したところ、YKS投与群は$A\beta_{1-40}$では差は認められなかったのに対し、$A\beta_{1-42}$では用量依存的に有意な減少が認められた。

以上の結果から、YKSのAPP-Tg(+)マウスにみられる空間記憶や学習障害および過剰活動などの改善作用には、Aβの沈着抑制が関与していることが示唆された。

4. MPTP投与モデル

Dooら[8]は、ドパミン神経系の神経毒性物質であるメチルフェニルテトラヒドロピリジン(MPTP)を投与することによる、パーキンソン病モデルマウスを用いた評価を行っている。MPTPをマウスに1日1回5日連続で腹腔内投与し、抑肝散はその構成生薬(朮は白朮を使用)を80%エタノールで沸騰させて抽出したエキス200、400、800mg/kg(ヒト1日量の約5、10、20倍量)を、1日1回12日間連続経口投与した。ロータロッドを用いた協調運動・運動学習試験では、MPTP投与群で有意な機能低下が認められたが、抑肝散投与群では有意な回復が認められた。脳組織標本において、中脳黒質ニューロンのチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性細胞数、p-Akt陽性細胞数および大脳基底核線条体のTH陽性線維の密度は、MPTP投与群で顕著に低下したが、抑肝散投与群では用量依存的に有意に回復した。以上のことから、抑肝散はパーキンソン病モデルマウスにおいてドパミン神経系を保護することにより症状を回復させることが示唆された。

5. ハロペリドール投与モデル

Sekiguchiら[9]は、ハロペリドールに誘発されたラット遅発性ジスキネジアモデルにおける咀嚼様顎運動に対するYKSの作用を検討した。ハロペリドールを4週間毎に4回(0、4、8、12週目)筋肉内投与して咀嚼様顎運動を呈したラットを使用し、YKS 0.1または0.5g/kg/日(ヒト1日量の約1.5または7.5倍)を12週目から3週間連続経口投与した。その後15週目の咀嚼様顎運動は、YKS投与群で用量依存的に有意に減少した。また15週目に大脳基底核線条体から採取した細胞外液中に含まれるグルタミン酸の量は、正常ラットと比べてハロペリドール投与群で有意に増加したが、YKSにより用量依存的に改善した。線状体におけるグルタミン酸トランスポーター1(GLT1)のmRNA発現量は、YKS投与群で用量依存的に有意に増加した。

6. DOI投与モデル

Egashiraら[10]は、セロトニン2A受容体アゴニストである2,5-ジメトキシ-4-ヨードアンフェタミン(DOI)を用いた幻覚・妄想モデルに対するYKSの作用を報告している。マウスにDOIを腹腔内投与する5分前にYKS 0.3g/kg(ヒト1日量の約5倍)を単回経口投与しても、その後出現する首振り行動には変化が認められなかったが、YKS同用量を1日1回14日間連続経口投与したマウスでは首振り行動の有意な減少が認められた。このときのマウスの前頭前皮質におけるセロトニン2A受容体発現量は有意に減少していた。このことから、YKSはセロトニン受容体を直接刺激するのではなく、神経可塑性を介するメカニズムによってセロトニン神経系に作用することが推測された。

7. 各種記憶障害モデル

Egashiraら[11]は、各種記憶障害動物モデルに対する抑肝散加陳皮半夏の作用を検討した。ラットに抑肝散加陳皮半夏エキス原末を、8方向放射線状迷路を用いた空間学習・作業記憶試験の実施60分前に単回投与し、スコポラミンまたはテトラヒドロカンナビノール(THC)をそれぞれ30分、60分前に腹腔内投与した。スコポラミンまたはTHC投与により顕著な学習記憶の機能低下を認めたが、抑肝散加陳皮半夏エキスはそれを用量依存的に有意に改善し、スコポラミンのときは10mg/kg(ヒト1日量の0.2倍量)で、THCのときは100mg/kg(同2倍量)でもっとも強い作用を認めた。ラットに電気けいれん刺激を与えて無動時間を測定する試験では、30または100mg/kg(同0.6、2倍量)の抑肝散加陳皮半夏エキスを45分前に単回投与することで有意に減少した。ムスカリン受容体刺激薬であるオキソトレモリンをマウスに腹腔内投与し5〜20分後に出現する振戦は、30または100mg/kgの抑肝散加陳皮半夏エキスを50分前に経口投与することで有意に減少した。

以上のことから、抑肝散加陳皮半夏の記憶障害改善作用には、コリン作動神経系の間接的な刺激によると推測された。

8. モルヒネ耐性に対する作用

Nakagawaら[12]は、モルヒネを4日間連続皮内投与し、尾圧法による鎮痛作用に耐性を生じさせたマウスに対するYKSの作用を報告している。YKS 0.5または1.0g/kg/日(ヒト1日量の約7.5または15倍量)を3週間連続経口投与したマウスでは、モルヒネを連続皮内投与した後の鎮痛作用の減弱が用量依存的に回復した。また、身体的依存症を起こしたマウスに

麻薬拮抗剤のナロキソンを投与して生じる離脱症候に対するYKSの効果を評価したところ、3週間連続経口投与で用量依存的な改善を認めた。その離脱症候の改善は、アドレナリンα_1受容体拮抗薬であるプラゾシンの併用では変化がなかったが、α_2受容体拮抗薬であるヨヒンビンの併用で拮抗された。脳幹における橋の髄質から調製した膜画分のα_{2A}受容体発現量は、モルヒネ投与群では有意に減少したが、YKS投与群では有意に回復した。YKSの構成生薬では、甘草と釣藤鈎で同様の作用が認められ、それぞれの含有成分であるグリチルリチンおよびゲイソシジンメチルエーテル(GM)でも同様の作用が認められた。

9. 神経障害性疼痛モデル

Suzukiら[13]は、神経障害性疼痛モデルを用いてYKSの抗アロディニア作用を報告している。ラットの坐骨神経を部分結紮して絞扼性神経損傷(CCI)状態にすると、足蹠にフォンフライフィラメントを押しつける機械的刺激と、有機溶媒であるアセトンを足蹠に吹き付ける冷覚刺激に対する反応閾値は悪化し、アロディニアを生じていることが確認された。これらの反応閾値の悪化は、YKS 0.3または1.0g/kg(ヒト1日量の約5または15倍量)を単回投与した1～3時間後に用量依存的に有意に回復した。これらの作用は、グルタミン酸トランスポーター阻害剤との併用で拮抗した。YKSの抗アロディニア作用は、脊髄でのグルタミン酸トランスポーターの活性化を介したグルタミン酸作動性神経伝達の阻害に関係していることが示唆された。

アトピー性皮膚炎モデル

Taharaら[14]は、社会心理的ストレスによって増強されるIgE介在性三相性皮膚反応に対するYKSの拮抗作用を報告している。マウスに抗DNP-IgE抗体を静脈内投与し、その24時間後に抗原であるジニトロフルオロベンゼン(DNFB)を耳介に塗布することで誘導される耳介浮腫は、塗布後1、24時間後および8日後と三相の反応を示すが、あらかじめ14日間の隔離ストレスを負荷したマウスでは、それぞれの反応の悪化が認められた。YKSを1.0g/kg/日(ヒト1日量の約15倍量)をDNFB塗布の6日前から2日前までと塗布2日後から6日後まで連続経口投与したとき、通常マウスの三相性皮膚反応に対する作用は認められなかったが、隔離ストレス負荷で悪化した第一相の皮膚反応に対して有意な改善作用が認められた。

Jiangら[15]は、自然発症するアトピー性皮膚炎モデルであるNC/Ngaマウスを用いてYKSの作用を報告している。個別飼育することで社会的隔離状態にしたNC/NgaマウスにYKS 0.6または1.2g/kg/日(ヒト1日量の約9または18倍量)を12週間混合餌投与すると、皮膚の損傷、引っ掻き行動、毛づくろい行動に有意な改善を認めた。12週後の血清中コルチコステロン濃度はYKSにより用量依存的に減少し、皮膚コンダクタンスは増加した。皮膚組織切片での評価では、皮膚へ浸潤した肥満細胞数と好酸球数はYKSにより用量依存的に減少した。

Funakushiら[16]も同様の評価を行い、個別飼育して社会的隔離ストレス状態にしたNC/NgaマウスにYKS 1.0g/kg/日(ヒト1日量の約15倍量)を飲水として6週間投与すると、皮膚の損傷、引っ掻き行動、経表皮水分蒸散量の有意な改善と、皮膚に浸潤した肥満細胞数の有意な減少、皮膚のNMDA受容体発現量の減少、さらにGLT1発現量の増加が認められた。以上のことから、YKSはグルタミン酸シグナルを介してアトピー性皮膚炎に対する改善作用を示すことが示唆された。

アジュバント関節炎モデル

Hondaら[17]は、アジュバント関節炎モデルに対するYKSの作用を報告している。完全フロイントアジュバントをラットの足底に注射し、YKS 3%混合餌(ヒト1日量の約40倍量)で7日間飼育した。アジュバント投与群(対照群)では熱刺激に対する痛覚閾値の低下、活性化ミクログリアの指標であるIba-1の脊髄L4での発現量の増加、精神的ストレスマーカーの一つである唾液中クロモグラニンA濃度の上昇が認められたが、それらはYKSにより有意に改善された。

眼圧に対する作用

山田[18]は、ウサギを用いて緑内障に有用である可能性を報告している。ウサギにYKS 325mg/kg(ヒト1日量の約5倍)を単回経口投与すると、眼圧が徐々に降下し、3～6時間後にはトラフに達し、以後、徐々に回復した。また3～7日後には心拍数と短後毛様動脈の血流速度の有意な上昇が認められた。これらのことは、YKSが正常眼圧緑内障に有効であることを示唆した。

体内動態試験

Imamuraら[19]は、釣藤鈎に含まれる7種のアルカロイド化合物の血液脳関門(BBB)の透過作用を、*in vitro*と*in vivo*の試験で評価している。ラットにYKS 1.0g/kgを経口投与し1時間後の脳に含まれる7種のアルカロイドを測定したところ、GMのみが1.6ng/gで検出された。*in vivo*の試験では、GMがもっとも高いBBB透過作用を示した。GMは*in vitro*試験でセロトニン1A受容体への結合能が認められていることから、これが抑肝散のセロトニン神経系に対する有効成分である可能性が推測された。

表　各種モデルに対する試験結果(まとめ)

		著者	使用動物	投与量 (最高用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)
精神・神経系疾患	亜鉛欠乏餌モデル (攻撃性モデル)	Takedaら[1,2]	Wistarラット(♂) (4週齢、n = 6)	YKS 0.3g/kg/日 連続経口投与(10日間)	海馬のグルタミン酸とアスパラギン酸(↓) 脳内グルタミン酸開口放出(↓)
		Tamanoら[3,4]	ddYマウス(♂) (4週齢、n = 4～15)	YKS 0.3g/kg/日 連続経口投与(14日間)	攻撃行動(↓) 脳内グルタミン酸、GABA、ドパミン(↓)
	PCA投与モデル (攻撃性モデル)	Kannoら[5]	Wistarラット(♂) (7週齢、n = 4～12)	YKS 1.0g/kg/日 単回&14日間連続経口投与	セロトニン神経系作動薬による 攻撃性増加と社会的行動低下の改善
	APP-Tg(+)モデル (アルツハイマー型認知症モデル)	Tabuchiら[6]	APP-Tg(+)マウス(♀) (5～15ヵ月齢、n = 7～10)	YKS 1.0% 混合餌投与(10ヵ月)	空間記憶能力(↑) 過剰活動、Aβ沈着(↓)
		Fujiwaraら[7]	APP-Tg(+)マウス(♂) (5～15ヵ月齢、n = 7～11)	YKS 1.0% 混合餌投与(5ヵ月)	記憶学習能力、社会的行動(↑) 攻撃行動、Aβ沈着(↓)
	MPTP投与モデル (パーキンソン病モデル)	Dooら[8]	C57BL/6マウス(♂) (12週齢、n = 6)	YKS 0.8g/kg/日 (80%エタノール抽出) 連続経口投与(12週間)	ドパミン神経系神経毒性物質による 協調運動・運動学習機能低下の改善 p-Akt陽性細胞数(↑)
	ハロペリドール投与モデル (遅発性ジスキネジアモデル)	Sekiguchiら[9]	Wistarラット(♂) (5週齢、n = 4～8)	YKS 0.5g/kg/日 連続経口投与(3週間)	ハロペリドール誘発咀嚼様顎運動(↓) 線条体におけるGLT1のmRNA(↑)
	DOI投与モデル (幻覚・妄想モデル)	Egashiraら[10]	ddYマウス(♂) (4週齢、n = 6～11)	YKS 0.3g/kg/日 連続経口投与(14日間)	セロトニン2A受容体刺激薬による 首振り行動(↓)
	各種記憶障害モデル	Egashiraら[11]	Wistarラット(♂) (200～250g、n = 7～10)	抑肝散加陳皮半夏エキス 0.1g/kg 単回経口投与	スコポラミンおよびTHCによる 空間認知記憶障害改善 電気刺激による不動状態改善
			ddYマウス(♂) (20～25g、n = 10)	抑肝散加陳皮半夏エキス 0.1g/kg 単回経口投与	ムスカリン受容体刺激薬による振戦(↓)
	モルヒネ耐性モデル	Nakagawaら[12]	ddYマウス(♂) (20～24g、n = 5～9)	YKS 1.0g/kg/日 連続経口投与(3週間)	モルヒネ耐性と依存性の改善 α_{2A}受容体発現量(↑)
	神経障害性疼痛モデル	Suzukiら[13]	SDラット(♂) (250～300g、n = 6～10)	YKS 1.0g/kg 単回経口投与	抗アロディニア作用 機械的刺激と冷覚刺激の閾値(↑)
アトピー性皮膚炎モデル		Taharaら[14]	BALB/cマウス(♂) (4週齢、n = 3～5)	YKS 1.0g/kg/日 連続経口投与(5+5日間)	隔離ストレス負荷で悪化した 第1相皮膚反応を改善
		Jiangら[15]	NC/Ngaマウス (10週齢、n = 5～6)	YKS 1.2g/kg/日 混合餌投与(12週間)	引っ掻き行動(↓) 血清中コルチコステロン(↓) 浸潤肥満細胞数、好酸球数(↓)
		Funakushiら[16]	NC/Ngaマウス(♂) (10週齢、n = 5～6)	YKS 1.0g/kg/日 混合餌投与(6週間)	引っ掻き行動(↓) 浸潤肥満細胞数、NMDA受容体発現量(↓) GLT1発現量(↑)
アジュバント関節炎モデル		Hondaら[17]	Wistarラット(♂) (7週齢、n = 5～7)	YKS 3.0% 混合餌投与(7日間)	痛覚閾値(↑) 精神的ストレスマーカー(↓)
眼圧に対する作用 (正常ウサギ)		山田[18]	Dutch種家兎(♀) (体重2.4±0.3g、n = 16)	YKS 325mg/kg 単回経口投与	眼圧(↓) 心拍数、短後毛様動脈血流量(↑)
体内動態試験		Imamuraら[19]	SDラット(♀) (7週齢、n = 4)	YKS 1.0g/kg 単回経口投与	ゲイソシジンメチルエーテルの 血液脳関門透過を確認

【参考文献】

1) Takeda A, et al.: Suppressive effect of Yokukansan on excessive release of glutamate and aspartate in the hippocampus of zinc-deficient rats, Nutr Neurosci, 11(1): 41-46, 2008
2) Takeda A, et al.: Attenuation of abnormal glutamate release in zinc deficiency by zinc and Yokukansan, Neurochem Int, 53(6-8): 230-235, 2008
3) Tamano H, et al.: Ameliorative effect of Yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient young mice, Brain Res Bull, 83(6): 351-355, 2010
4) Takeda A, et al.: Therapeutic effect of Yokukansan on social isolation-induced aggressive behavior of zinc-deficient and pair-fed mice, Brain Res Bull. 87(6): 551-555, 2012
5) Kanno H, et al.: Effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on social and aggressive behaviour of para-chloroamphetamine-injected rats, J Pharm Pharmacol, 61(9): 1249-1256, 2009
6) Tabuchi M, et al.: Ameliorative effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, on learning and non-cognitive disturbances in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease, J Ethnopharmacol, 122(1): 157-162, 2009
7) Fujiwara H, et al.: Yokukansan, a traditional Japanese medicine, ameliorates memory disturbance and abnormal social interaction with anti-aggregation effect of cerebral amyloid beta proteins in amyloid precursor protein transgenic mice, Neuroscience, 180: 305-313, 2011
8) Doo AR, et al.: Neuroprotective effects of an herbal medicine, Yi-Gan San on MPP+/MPTP-induced cytotoxicity in vitro and in vivo, J Ethnopharmacol, 131(2): 433-442, 2010
9) Sekiguchi K, et al.: Ameliorative effect of yokukansan on vacuous chewing movement in haloperidol-induced rat tardive dyskinesia model and involvement of glutamatergic system, Brain Res Bull, 89(5-6): 151-158, 2012
10) Egashira N, et al.: Repeated administration of Yokukansan inhibits DOI-induced head-twitch response and decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)2A receptors in the prefrontal cortex, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 32(6): 1516-1520, 2008
11) Egashira N, et al.: Cholinergic involvement in the improving effects of Yoku-kan-san-ka-chimpi-hange (Yi-Gan-San-Jia-Chen-Pi-Ban-Xia) on the disruption of spatial cognition and the electroconvulsive shock-induced immobilization, J Trad Med. 18(2): 71-80, 2001
12) Nakagawa T, et al.: Yokukansan inhibits morphine tolerance and physical dependence in mice: the role of alpha-2A-adrenoceptor, Neuroscience, 227: 336-349, 2012
13) Suzuki Y, et al.: Antiallodynic effect of herbal medicine yokukansan on peripheral neuropathy in rats with chronic constriction injury, Evid Based Complement Alternat Med, 2012: 953459, 2012
14) Tahara E, et al.: Psychosocial stress enhances IgE-mediated triphasic cutaneous reaction in mice: Antagonism by Yokukan-san (a Kampo medicine) and diazepam, Allergology International, 50(3): 211-222, 2001
15) Jiang J, et al.: Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice, J Dermatol Sci, 56(1): 37-42, 2009
16) Funakushi N, et al.: Ameliorating effect of Yokukansan on the development of atopic dermatitis-like lesions and scratching behavior in socially isolated NC/Nga mice, Arch Dermatol Res, 303(9): 659-667, 2011
17) Honda Y, et al.: Analgesic and anti-stress effects of yokukansan in rats with adjuvant arthritis, 日東医誌, 64(2): 78-85, 2013
18) 山田利津子: 抑肝散内服後の家兎短後毛様動脈の血流動態の検討, 漢方と最新治療, 20(2): 175-178, 2011
19) Imamura S, et al.: The blood-brain barrier permeability of geissoschizine methyl ether in Uncaria hook, a galenical constituent of the traditional Japanese medicine yokukansan, Cell Mol Neurobiol. 31(5): 787-793, 2011