

糖尿病モデルマウスの認知機能低下 および神経障害性疼痛に対する 人參養栄湯の有用性検討



クラシエ製薬株式会社 漢方研究所

金田 真理彩、尾山 真菜実、張 群、道原 成和、韓 立坤、藤田 日奈、高橋 隆二

はじめに

現在、国内の糖尿病患者は1000万人に達しており¹⁾、生活習慣や社会環境の変化に伴い、今後ますます増加すると推定されている。糖尿病はインスリン作用の不足による慢性の高血糖状態を特徴とする代謝疾患²⁾であり、発症初期は無症状だが進行すると全身に様々な合併症状を伴う。合併症状の多くは高血糖に伴う血管障害に起因するが、その中でも患者の生活に深刻な問題を与える症状の中に認知機能低下と神経障害性疼痛がある。

漢方補剤の人參養栄湯は、臨床で認知機能の低下³⁾、足のしびれや冷感⁴⁾に対して改善作用を示すことが報告されている。また、基礎研究においても、人參養栄湯がスコラミン投与により誘発した記憶障害モデルマウスの認知機能を改善する⁵⁾ことや、神経障害性疼痛モデルラットの痛覚過敏を改善する⁶⁾ことが明らかになっている。近年では、本処方の一部の糖尿病モデルマウスで血糖値のコントロールに寄与する⁷⁾という知見も得られていることから、糖尿病に伴う合併症状に対しても改善作用を示す可能性が考えられた。そこで本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて糖尿病に伴う認知機能低下および神経障害性疼痛に対する人參養栄湯の有用性を検討した。実験には、糖尿病研究に広く用いられるストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルマウスを用いた。STZは膵臓β細胞の迅速かつ不可逆的な細胞壊死を引き起こすβ細胞毒であり、この実験動物モデルではSTZを投与することによって膵臓からのインスリン分泌が著しく低下し糖尿病が誘発される。

試験方法と結果

【試験 1】

判断力や思考を含む認知機能の評価として、Y字型迷路試験および新奇物体探索試験を行った。Y字型迷路試験には3本のアームからなるY字型装置を使用し、マウスが新たなアームに進入しようとする習性を利用して作業記憶を評価した。新奇物体探索試験にはプラスチックケージおよびオブジェクトを使用し、マウスが新奇性を好む習性を

利用して視覚的認知記憶を評価した。

【方 法】 7週齢のC57BL/6系雄性マウスを日本SLC株式会社より購入し、8週齢時にクエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解した50mg/kg B.W.のSTZを合計5回 (連続5日間、1回/日) 腹腔内投与することで糖尿病を誘発した。5回目の投与から14日後に、血糖値300mg/dL以上の個体を糖尿病発症とみなして選別し、未治療群 (MF固型飼料)、NYT1%群 (人參養栄湯エキス1%含有MF固型飼料)、NYT3%群 (人參養栄湯エキス3%含有MF固型飼料) に分け混餌投与を開始した。なお、同様の方法でクエン酸緩衝液 (pH4.5) のみを腹腔内投与したマウスを健常群 (MF固型飼料) とし、計4群で検討を行った。13週齢時にY字型迷路試験、17週齢時に新奇物体探索試験を実施した。Y字型迷路試験はマウスをY字型迷路の特定のアームの先端に置き、8分間迷路内を自由に探索させた。マウスが測定時間内に各アームに進入した合計回数 (総進入回数) および連続して異なる3本のアームに進入した組み合わせの数 (交替行動数) を記録し、下記の式より交替行動率 (%) を算出した。

$$\text{交替行動率 (\%)} = \text{交替行動数} \div (\text{総進入回数} - 1) \times 100$$

新奇物体探索試験ではマウスをプラスチックケージ内に入れ、2つの同一のオブジェクトを設置し10分間自由に探索させた (訓練試行)。その2時間後、オブジェクトの片方を新奇物体に置き換えて10分間自由に探索させた (保持試行)。2つのオブジェクトに対する総探索時間に占める新奇物体への探索時間の割合を算出した。

【結 果】 Y字型迷路試験の結果を図1 (次頁参照) に示す。健常群と比較して未治療群では交替行動率が有意に低下し、作業記憶が低下していた。また、未治療群と比較してNYT3%群では有意な上昇がみられ、人參養栄湯の投与によって作業記憶の低下が抑制された。一方、総進入回数は群間差がみられず、STZ投与による自発運動量の変化はないと考えられた。新奇物体探索試験の結果を図2 (次頁参照) に示す。健常群では既知物体に対して新奇物体の探索割合が有意に増加していたが、未治療群では各物体の探索割合に変化はみられず、視覚的認知記憶が低下していた。一方、NYT1%群およびNYT3%群ではいずれもマウ

図1 Y字型迷路試験の結果

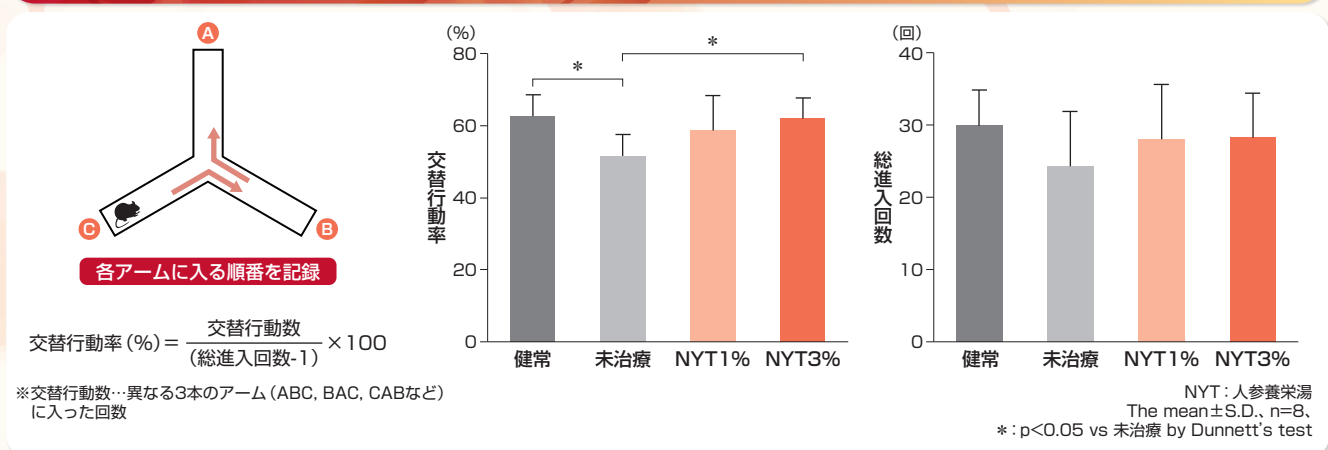
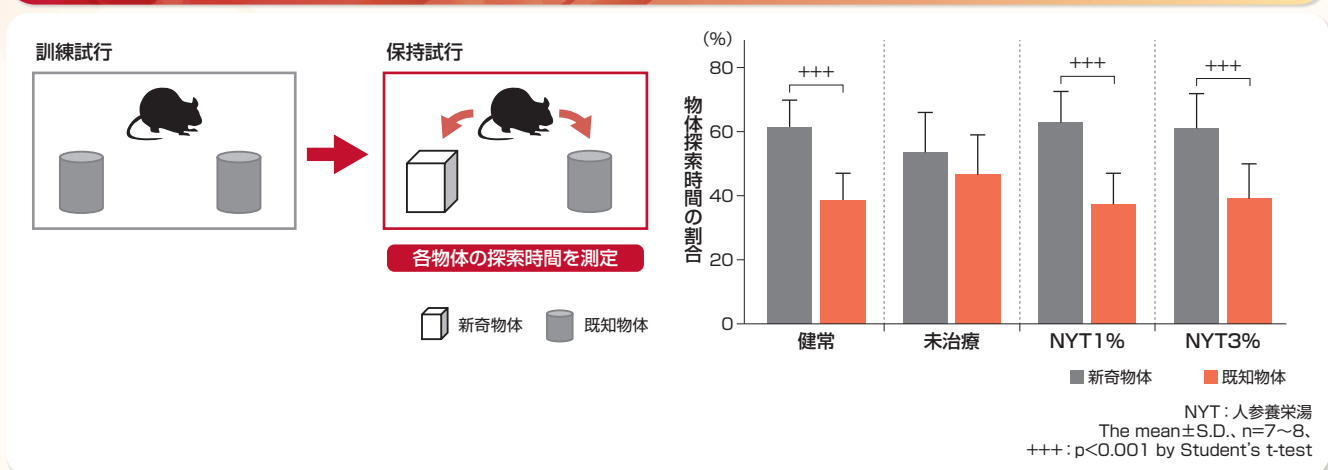


図2 新奇物体探索試験の結果



スの新奇物体の探索割合が有意に増加しており、視覚的認知記憶の維持が認められた。

【試験 2】

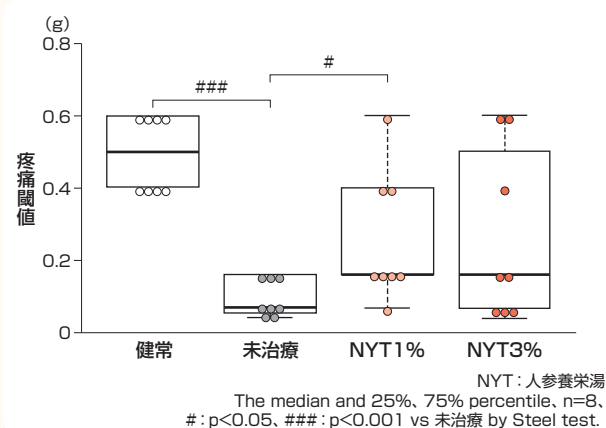
疼痛の評価としてvon Frey試験を実施した。von Frey試験では、段階的に太さの異なるフィラメントをマウスの足趾部に押し当て、逃避反応の有無によって痛みに対する反応閾値を評価した。

【方 法】 試験1の実験動物を用いて16週齢時にvon Frey試験を実施した。測定当日、金網ケージ内にマウスを入れ3時間馴化させた。試験には一定の圧力を与えるための太さの異なるフィラメント (Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical, Inc., Morgan Hill, CA) を使用し、金網ケージの下からマウスの右肢底に垂直に10回押し当てた。段階的にフィラメントを太くしていき、逃避反応を示した最小負荷サイズを疼痛閾値として記録した。

【結 果】 von Frey試験の結果を図3に示す。健常群と比

較して未治療群では疼痛閾値が有意に低下しており、糖尿病性神経障害の症状を呈した。NYT1%群においては、未治療群に対して疼痛閾値が有意に上昇しており、症状の改善が認められた。

図3 von Frey試験の結果



考察とまとめ

本試験では、糖尿病による合併症状の中でも特に患者の生活に深刻な問題を与えるものとして、認知機能低下と神経障害性疼痛に焦点をあて、人參養栄湯投与の影響を検討した。その結果、人參養栄湯は糖尿病モデルにおける認知機能低下および神経障害性疼痛の両方に対して有効性を示した。

臨床において糖尿病に伴う認知機能の低下では、アミロイド β の蓄積に代表されるアルツハイマー病理や血管性病変が認められる場合とそうでない場合があり、認知症発症因子は混在していることが多い。STZ誘発糖尿病モデルマウスにおいても、認知機能低下のメカニズムには脳内アミロイド β の沈着や脳内炎症⁸⁻¹⁰⁾など種々の先行報告がある。先行報告において人參養栄湯に含まれる有効成分が記憶障害モデル動物の認知機能を改善すること(ギンセノシド、ノビレチン)¹¹⁻¹³⁾や、COS-7細胞でアミロイド β の分泌を抑制する(テヌイフォリン)¹⁴⁾ことが報告されている。そのため、本研究で認められた人參養栄湯投与による認知機能の改善についてもこれら作用機序が関与していることが期待される。また、近年では中枢神経系におけるインスリンシグナル異常が認知機能の低下に関与する¹⁵⁾ことが報告されている。本モデルマウスにおいても、インスリンシグナルの標的因子であるGSK-3 β のリン酸化が海馬内で増進し、人參養栄湯の投与によってリン酸化増進が抑制される傾向が認められた(データ未発表)。今後は作用機序解明に向けたさらなる検討が必要である。

神経障害性疼痛は糖尿病早期から症状が現れることが多く、糖尿病合併症の中でも発症割合が最も高いことが知られている。初期症状としてしびれや痛みといった感覚異常(アロディニア)から始まり、症状が進行すると感覚低下をきたすことで怪我や熱傷の危険性が増える。本研究では、STZ誘発糖尿病モデルマウスの神経障害性疼痛に対して人參養栄湯が改善作用を示す結果が得られた。糖尿病性神経障害の主な発症機序としては、高血糖の持続による末梢組織での血流低下および神経伝達異常が挙げられる。本モデルマウスの神経障害性疼痛に関する先行報告では、末梢神経の脱髄やC線維面積の減少が報告されているほか、中枢神経においては脊髄中の炎症性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、TGF- β)の増加が報告されている¹⁶⁾。人參養栄湯はミエリン鞘の修復作用(陳皮)による脱髄抑制および抗炎症・免疫調節作用¹⁷⁾を有することが報告されているため、今後、糖尿病性神経障害による痛みの制御にこれら因子が関与しているのかを検証していく。

冒頭に述べた通り、糖尿病の合併症状は多岐にわたり、糖尿病患者の生活の質(QOL)や寿命を著しく低下させる。血糖コントロールのみでは糖尿病を完全に治療することが難しい現状にあることから、QOLや寿命の低下につながる合併症状の緩和を目的とした治療は不可欠となる。本試験により、人參養栄湯は糖尿病に伴う複数の神経関連症状に対して有用であることが示唆された。本処方が糖尿病合併症状の治療において複合的な効果を有する可能性について、今後は詳細な機序解明に加え、糖尿病に伴う他の合併症状にも焦点を当てて検討を行いたい。

【参考文献】

- 1)厚生労働省: 国民健康・栄養調査, 2016
- 2)日本糖尿病学会: 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン, 2016
- 3)Kudoh C, et al.: Effect of ninjin'yoeito, a Kampo (traditional Japanese) medicine, on cognitive impairment and depression in patients with Alzheimer's disease: 2 years of observation. *Psychogeriatrics* 16: 85-92, 2016
- 4)相磯嘉孝 ほか: 糖尿病神経障害に対する人參養栄湯の効果 - 新規皮膚赤外線体温計「サーモフォーカス(R)」による検討 - . *新薬と臨床* 56: 2028-2032, 2007
- 5)Egashira N, et al.: Ninjin-yoei-to (Ren-Shen-Yang-Rong-Tang) and Polygalae radix improves scopolamine-induced impairment of passive avoidance response in mice. *Phytomedicine* 10: 467-473, 2003
- 6)鈴木俊章 ほか: Oxaliplatin による末梢神経障害性疼痛に対する人參養栄湯の有効性の検討. 第136回日本薬学会年会要旨集(CD-ROM): LO914B, 2016
- 7)Hosogi S, et al.: Improvement of Diabetes Mellitus Symptoms by Intake of Ninjin'yoeito. *Front. Nutr.* 5: 112, 2018
- 8)Liu LP, et al.: Pioglitazone ameliorates memory deficits in streptozotocin-induced diabetic mice by reducing brain β -amyloid through PPAR γ activation. *Acta. Pharmacol. Sin.* 34: 455-463, 2013
- 9)Liu ZH, et al.: Flos Puerariae Extract Ameliorates Cognitive Impairment in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Evid Based Complement Alternat. Med.* 873243, 2015
- 10)Juan José Ramos-Rodríguez, et al.: Increased Spontaneous Central Bleeding and Cognition Impairment in APP/PS1 Mice with Poorly Controlled Diabetes Mellitus. *Mol. Neurobiol.* 53: 2685-2697, 2016
- 11)Yan X, et al.: Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha. *Life Sci.* 1: 168: 16-23, 2017
- 12)Zhang Y, et al.: Ginsenosides attenuate d-galactose- and AIC3-induced spatial memory impairment by restoring the dysfunction of the neurotransmitter systems in the rat model of Alzheimer's disease. *J Ethnopharmacol.* 194: 188-195, 2016
- 13)Onozuka H, et al.: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 326: 739-744, 2008
- 14)Lv J, et al.: Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid-beta secretion in vitro. *Acta Physiol (Oxf).* 196: 419-425, 2009
- 15)Wei Wang, et al.: Serine Phosphorylation of IRS1 Correlates with A β -Unrelated Memory Deficits and Elevation in A β Level Prior to the Onset of Memory Decline in AD. *Nutrients.* 11: 1942, 2019
- 16)Afrânio Ferreira Evangelista, et al.: Bone marrow-derived mesenchymal stem/stromal cells reverse the sensorial diabetic neuropathy via modulation of spinal neuroinflammatory cascades. *J Neuroinflammation.* 15: 189, 2018
- 17)川喜多卓也: 漢方薬の免疫薬理作用 - 慢性疾患の改善作用の主要機序として - . *日薬理誌* 132: 276-279, 2008