

## 2. 社会性ストレス誘発精神行動異常に対する漢方薬の効果

伊藤 直樹

北里大学 東洋医学総合研究所 臨床研究部

Key words : 香蘇散, 漢方薬, 社会性ストレス, うつ, 脳内炎症

### 緒言

長期間にわたる過剰なストレスは、うつ病などの精神疾患の発症並びに増悪因子になり得ることがよく知られている。その背景には、ストレスによりあらゆる物事をネガティブに捉える思考、所謂ネガティブ思考 (negative cognitive bias: NCB) が誘導され、精神疾患の病状の悪化や再燃・再発と深く関わることが示唆されている。

うつ病の治療は抗うつ薬などの薬物療法が主流であるが、漢方薬も抑うつ症状の改善を目的に臨床でよく用いられている。その中で、香蘇散という漢方処方、香附子、蘇葉、陳皮、甘草、生姜の5種の生薬から構成されており、虚弱体質者や高齢者、妊婦の風邪の初期症状や不眠、食餌性蕁麻疹、食欲不振、便秘、慢性疲労症候群など多岐にわたる症状に対して処方されるが、それらの症状の背後に存在する抑うつ症状に対しても一定の臨床効果をあげている。しかし、香蘇散の有効性を示す科学的なエビデンスは充分とは言えない。これまでに我々は環境ストレス誘発うつ様モデル動物を用いた検討において香蘇散の抗うつ様効果を確認しており、その作用機序として視床下部-下垂体-副腎系の過剰亢進の抑制、orexin/neuropeptide Y 神経系およびグルタミン酸神経系の制御等が香蘇散の抗うつ様効果に深く関与していることを明らかとしている<sup>1-4)</sup>。

そこで本研究では、これまでの我々のストレスモデルとは異なる社会性ストレスモデルを用いて、香蘇散の抗うつ様効果の検証並びにNCBに対する効果について検討し、その作用機序については社会性ストレスで誘発される脳内炎症反応に着目し解析した。

### 方法

#### 1. 社会性ストレスモデルマウスを用いた行動薬理的評価

本モデルマウスは、社会性ストレスとして頻用されている chronic social defeat stress (CSDS) 負荷により作製した。試験動物である C57BL/6J (B6) マウス (8週齢, 雄性) を攻撃性が強い aggressor マウス (ICR, リタイア, 雄性) の飼育ケージに入れ (1対1)、10分間/日、10日間 social defeat stress を負荷した (Day1-10)。香蘇散 (1 g/kg/日) は、ストレス負荷開始日から12日間経口投与した (Day1-12)。うつ様行動は自動行動解析装置 EthoVision を用いて social interaction (SI) 試験で示される忌避行動により評価した (Day11)。また、NCBは FreezeFrame システムを用いて改良型 fear conditioning 試験 [ambiguous-cue fear conditioning (ACFC) 試験] で示されるすくみ行動により評価した (Day13-14)。

#### 2. 社会性ストレス誘発脳内炎症反応の評価

脳内炎症反応は脳内に存在する免疫担当細胞である microglia の反応性に注目し、免疫組織化学染色法を用いた Iba1 (microglia のマーカー) 陽性細胞数による評価および試験マウス脳から単離した microglia を用いた LPS 刺激時の炎症性サイトカイン IL-6 産生量による評価を行った。

## 結果

### 1. 香蘇散の抗うつ様効果およびNCBに対する効果の検討

SI試験においてCSDS負荷マウスでは、非ストレス群と比べて有意にSI ratioが低下した(図1)。香蘇散(KS)投与群では、CSDS負荷マウスで低下したSI ratioの有意な回復が認められた。また、SI試験時に行った自発運動能試験では運動量に差は認められなかったことから、香蘇散のSI ratio改善効果は自発運動量の差によるものではないことが示された。

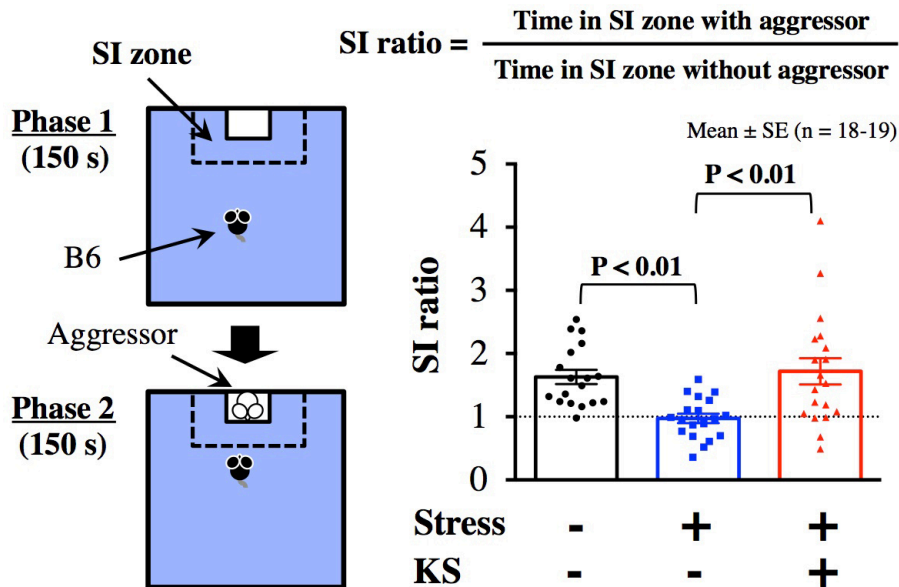


図1. CSDS誘発うつ様行動に対する香蘇散の効果

SI試験において、CSDS負荷マウスで認められたSI ratio低下による忌避行動は、香蘇散(KS)投与によって有意に抑制された。略図はSI試験の様子を示し、aggressor非存在(Phase 1)又は存在下(Phase 2)におけるB6マウスのSI zone滞在時間を計測し、それらを基にSI ratioを算出した。統計処理は、Bonferroniの多重検定により行った。

ACFC試験のtraining phaseでは、すくみ行動を指標にした嫌悪刺激(foot shock)に対する恐怖記憶の獲得に群間の差は認められなかった(図2A)。翌日のtesting phaseにおいては、非ストレス群では曖昧な手掛かりであるpartial cueと完全な手掛かりであるperfect cueのすくみ行動に有意な差が認められたのに対して、CSDS負荷マウス並びに香蘇散投与マウスではpartial cueとperfect cueの間にすくみ行動の差は認められなかった(図2B)。

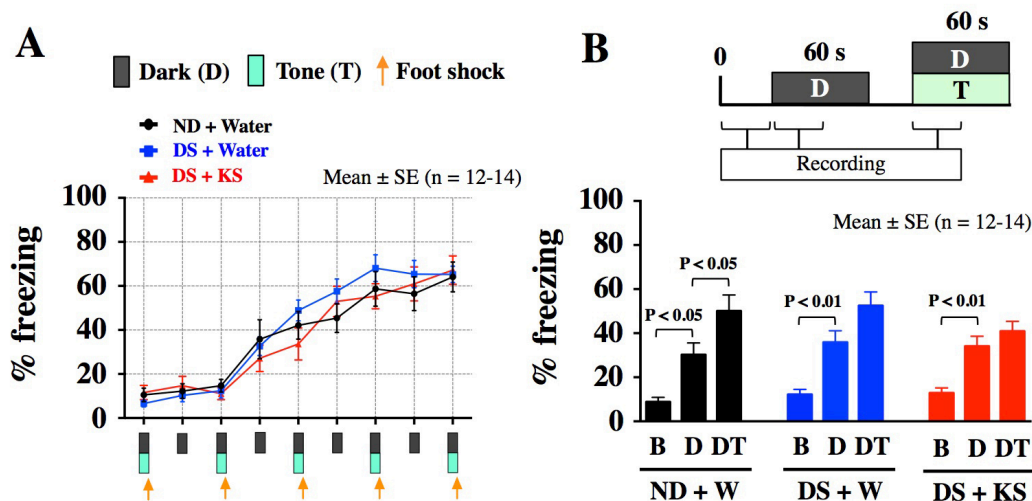


図2. CSDS 誘発 NCB 行動に対する香蘇散の効果

A) ACFC 試験の training phase。Training phase では、条件刺激として消灯 (D) と音 (T、3000 Hz、20 s) の 2 種類を用い、消灯と音の共提示後は必ず無条件刺激として foot shock (0.7 mA、1 秒) を受ける状況 (perfect cue) と、消灯だけの提示後は foot shock を受けたり受けなかったりする状況 (partial cue) をマウスに学習させた。すくみ行動を指標にした嫌悪刺激 (foot shock) に対する恐怖記憶の獲得には、群間の差は認められなかった。B) ACFC 試験の testing phase。略図は testing phase のスケジュールを示し、baseline (B)、partial cue (D) および perfect cue (DT) 提示における 30 秒間のすくみ行動を計測した。非ストレス群では partial cue と perfect cue 間に有意なすくみ行動の差が認められたのに対して、CSDS 負荷マウス並びに香蘇散投与マウスでは partial cue と perfect cue の間に差は認められなかった。統計処理は、Bonferroni の多重検定により行った。ND, non-defeat stress; DS, defeat stress; KS, kososan; W, water.

## 2. CSDS 誘発脳内炎症反応亢進に対する香蘇散の効果

Microglia の免疫組織化学染色法による検討で、CSDS 負荷マウスでは非ストレス群と比べて海馬歯状回領域における Iba1 陽性細胞およびその活性化の指標となる凝集体の有意な増加が認められた (図 3A)。その増加は、香蘇散投与によって有意に減少した。

初代培養 microglia の検討では、LPS 刺激により非ストレス群と比べて CSDS 負荷マウス由来 microglia からの有意な IL-6 産生量の増加が認められた (図 3B)。またその増加は香蘇散投与マウス由来 microglia で抑制された。

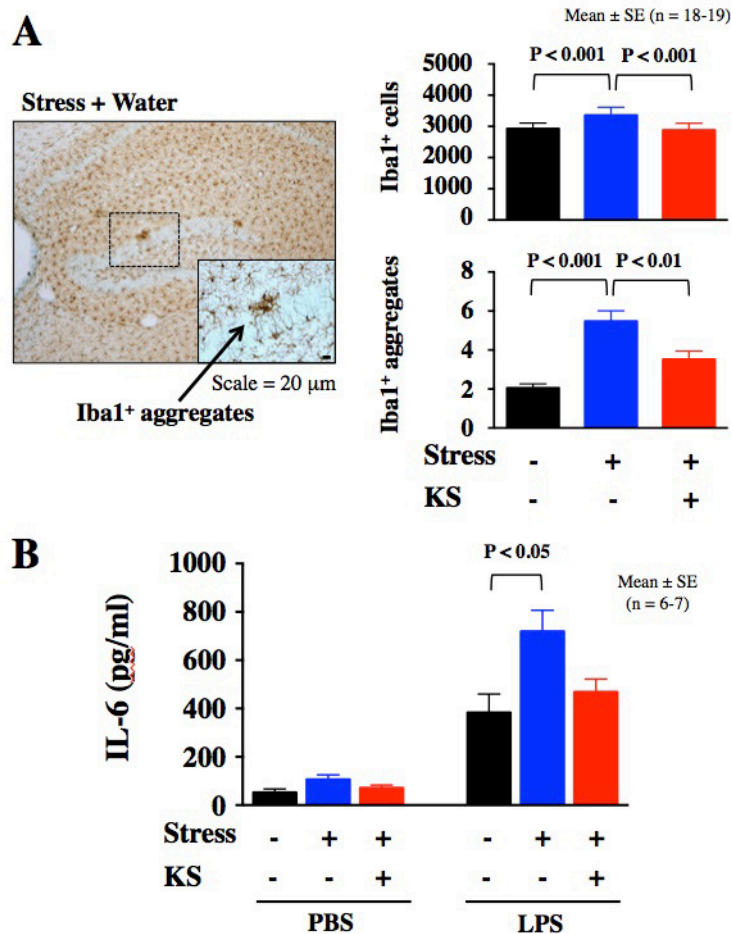


図3. CSDS 誘発脳内炎症反応亢進に対する香蘇散の効果

A) 写真は、海馬歯状回に存在する Iba1 陽性 microglia およびその凝集体 (拡大図) を示す。CSDS 負荷マウスで認められた Iba1 陽性 microglia およびその凝集体数の増加は、香蘇散投与によって有意に減少した。B) CSDS 負荷マウス由来 microglia に対して LPS (100 ng/ml) 刺激したところ IL-6 産生量の有意な増加が認められたが、その増加は香蘇散投与マウス由来 microglia では抑制された。統計処理は、Bonferroni の多重検定により行った。

## 考 察

CSDS モデルマウスは、社会性ストレスによるうつ様行動などの行動異常並びにその病態解析を進める上で非常に有用なモデルとして広く利用されている。本研究ではこのモデルマウスを使用し、香蘇散の抗うつ様効果およびその作用メカニズムの可能性に迫った。香蘇散は、SI 試験において CSDS で誘導された SI ratio 低下による忌避行動を有意に抑制した一方で、ACFC 試験における NCB 行動 (partial cue と perfect cue の区別が出来ない行動) には影響を及ぼさなかった。この結果は、香蘇散は CSDS ストレスで誘導される NCB には作用しないながらも、抑うつ症状の一つである忌避行動に対して効果を発揮することを示しており、本モデル系における抗うつ様効果発現には必ずしも NCB の改善効果は必要ではないことが示唆された。また本研究では社会性ストレスによる脳内炎症反応に注目し、香蘇散の抗うつ様作用メカニズムの一つとして、CSDS 誘発 microglia 活性化の抑制による脳内炎症反応の制御が深く関与していることが見出された。以上の成果から、社会性ストレスによる行動障害に対する香蘇散の有効性、並びにその作用機序の一端が明らかになった。今後は、香蘇散による脳内炎症反応抑制のメカニズムの解析、既存の抗うつ薬との薬効比較、本研究で示された香蘇散の薬効に関与する活性成分の探索研究が必要であり、これらの検討を通して精神疾患領域における香蘇散の役割とその有用性がさらに示されることを期待する。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、北里大学東洋医学総合研究所の花輪壽彦、小田口浩、及川哲郎、北里大学大学院感染制御科学府の清原寛章、永井隆之および北里大学薬学部の小林義典である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Ito N, Nagai T, Yabe T, Nunome S, Hanawa T, Yamada H. Antidepressant-like activity of a Kampo (Japanese herbal) medicine, Koso-san (Xiang-Su-San), and its mode of action via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Phytomedicine*. 2006;13(9-10):658-67. doi: 10.1016/j.phymed.2006.01.002. PubMed PMID: 16516452.
- 2) Ito N, Yabe T, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, Hanawa T. A possible mechanism underlying an antidepressive-like effect of Kososan, a Kampo medicine, via the hypothalamic orexinergic system in the stress-induced depression-like model mice. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(10):1716-22. PMID: 19801833.
- 3) Ito N, Hori A, Yabe T, Nagai T, Oikawa T, Yamada H, et al. Involvement of neuropeptide Y signaling in the antidepressant-like effect and hippocampal cell proliferation induced by kososan, a Kampo medicine, in the stress-induced depression-like model mice. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(10):1775-83. PMID: 23037167.
- 4) Nagai T, Hashimoto R, Okuda SM, Kodera Y, Oh-Ishi M, Maeda T, et al. Antidepressive-like effect of a Kampo (traditional Japanese) medicine, kososan (Xiang Su San) in a stress-induced depression-like mouse model: Proteomic analysis of hypothalamus. *Trad & Kampo Med*. 2015;2:50-9. doi: 10.1002/tkm2.1018.