

細胞への付着が目立ち、内膜下での平滑筋細胞増生に加え CD8 リンパ球の浸潤が観察された。脳動脈では中大脳動脈や脳底動脈内皮細胞に CD8 リンパ球が多く付着し少数の CD4 リンパ球の付着がみられた (図 4, 5)。

それらの芍薬エキス、当期芍薬 (以上図 3)、桂枝茯苓丸、七物降下湯投与例では胸大動脈、腹大動脈付着細胞パターンに顕著な差異はみられ無かったが脳動脈での CD4 リンパ球の付着が殆ど消失していた。抗ラット ICAM-1 抗体にて免疫組織化学染色を行ったそれら接着因子の脳動脈内皮細胞での発現を比較検討したが漢方薬投与例・非投与例共に発現がみられた。他方、血圧の上昇は漢方薬投与例でも差は無く上昇の抑制は飼育経過と共にみられた。

D. 考察

以上今回の所見のみで芍薬エキス/当期芍薬散/桂枝茯苓丸/七物降下湯など 駆瘀血薬の脳動脈内皮生理活性機能への関与を検討するには血管内皮機能のみならず脳血管で自律神経成分の関与など未解決の問題も多く、考察を試みるのは早計であるが、CR 例 SHRSP 例共に脳血管内皮細胞表面での CD8/CD4 リンパ球の接着に関しては抑制がみられ、それに続く、単球・マクファージ付着-泡沫細胞・アテローム形成の病態進行に抑制的に働くことが予測され、後藤ら文献 2) の芍薬含有タンニンの血管内皮機能保護効果と併せ、それら 駆瘀血薬の動脈内皮機能の活性化効果が期待されるものであった。

E. 結論

駆瘀血薬 (芍薬エキス・当期芍薬散・桂枝茯苓丸・七物降下湯) の血管内皮保護作用及び血管内皮病変進行抑制効果について高 cholesterol 血症モデルラット、高血圧ラットモデルを対象に微細形態学的、免疫組織学的検索を試みた。それら 駆瘀血薬の内皮細胞への直接影響を検討するには解析データは不十分であるが、それらモデル動物での脳血管での動脈硬化初期 CD8 リンパ球の内皮付着発現に遅発または抑制がみられ、内皮機能保護に作用していることが示唆された。

(参考文献)

- 1) 木村通郎：脳卒中易発症高血圧ラット脳動脈早期病変進行抑制に対する漢方薬の効果、平成 9 年度長寿科学研究報告書、1998, p131-133
- 2) 後藤博三、嶋田豊、木村通郎、草野義弘、楊 喬、谷川聖明、寺澤捷年：芍薬含有タンニンの血管内皮におよぼす影響、和漢医薬学雑誌、1997, 14, p257-260
- 3) 木下隆之 他：摘出ラット胸部大動脈の血管機能に対する高コレステロール血症の影響、日薬理誌、1992, 99, p181-190
- 4) 樋口行人 他：七物降下湯の脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP) の脳卒中予防とフリーラジカル関連酵素活性に関する効果、日薬理誌、1996, 108, p12-22
- 5) 北 徹、山田信博、宮園浩平：血管の分子医学、実験医学・増刊 1998, 16, p16-76

- 6) Komatu S. et al. : Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced inter cellular adhesion molecule-1 expression in vivo. Hypertension, 1997, 29, p 683-689
- 7) McCarron RM et al. : Monocyte adhesion to cerebromicrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rats. Am. J. Physiol., 1994, 267, p2491-2497

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 後藤博三、嶋田豊、木村通郎、草野義弘、楊 喬、谷川聖明、寺澤捷年：芍薬タンニンの血管内皮におよぼす影響、和漢医薬雑誌、14, 257-260, 1997

2. 学会発表

- ① 木村通郎、後藤博三、寺澤捷年：脳卒中易発症高血圧自然発症ラット脳動脈病変にみる芍薬エキス・桂枝茯苓丸投与の影響－免疫組織化学的検索－、第49回日本東洋医学会学術総会、熊本、1998

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 2. 実用新案登録
特になし

图 1

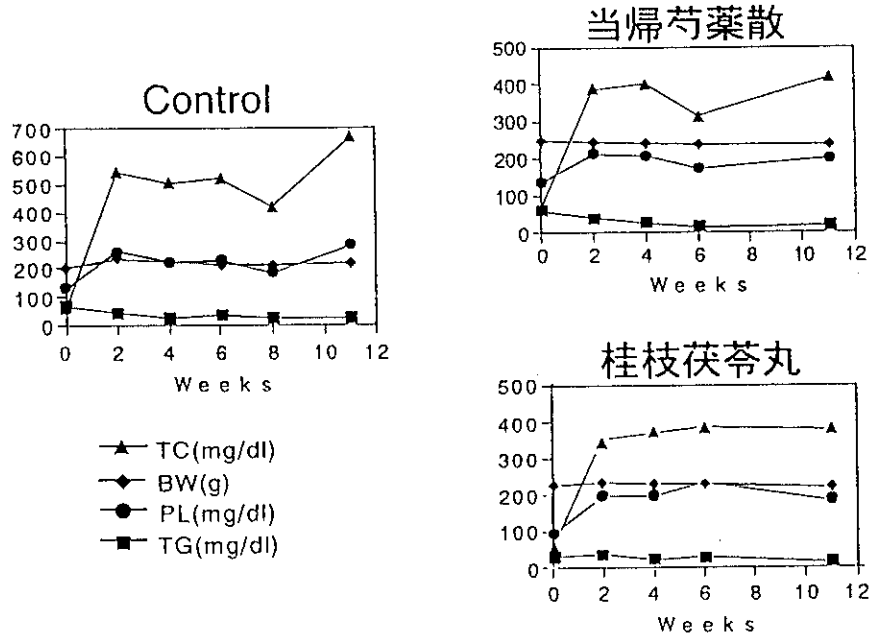


图 2

抗体名 / 抗体名	阳性率	总细胞数	阳性细胞数	阴性细胞数
CD3	68.0%	3,877	2,636	1,241
CD4	69.6%	3,897	2,712	1,185
CD8	27.9%	4,295	1,198	3,097

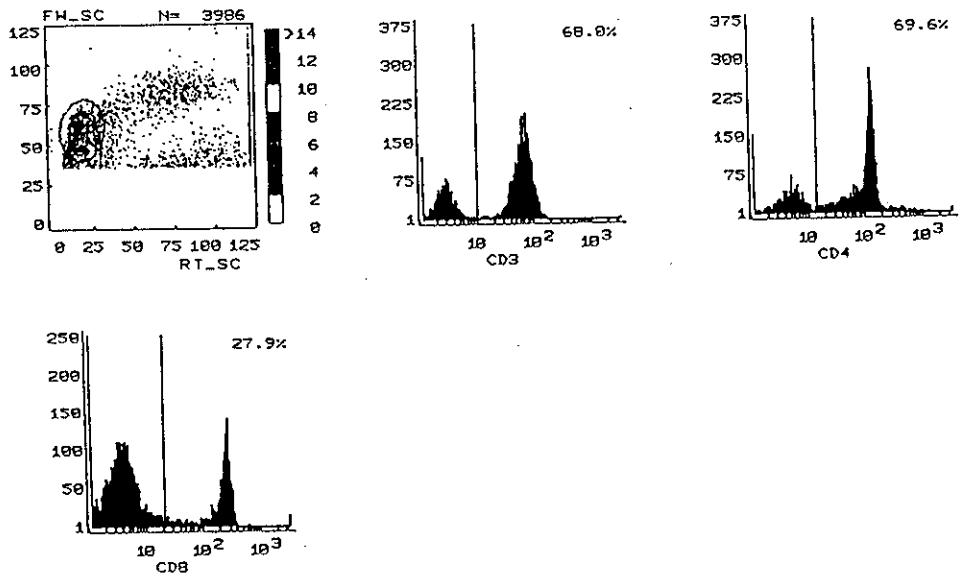


図 3

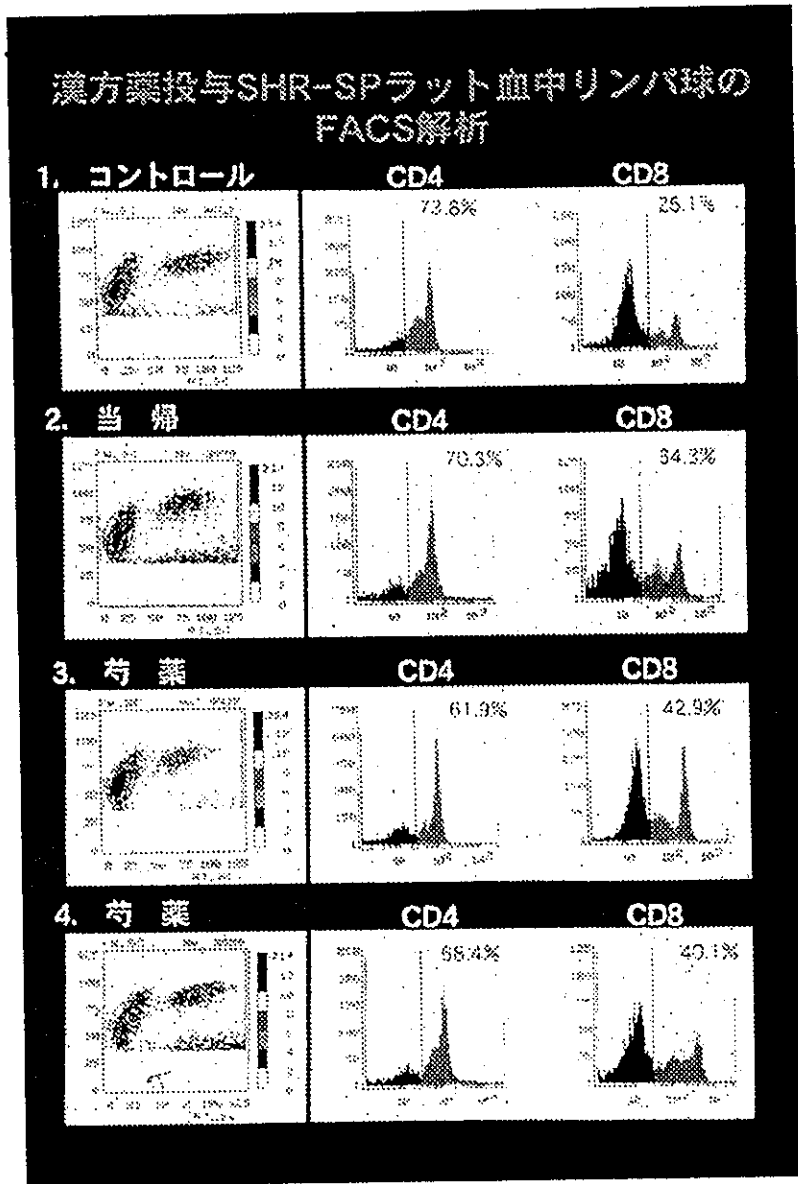


図 4

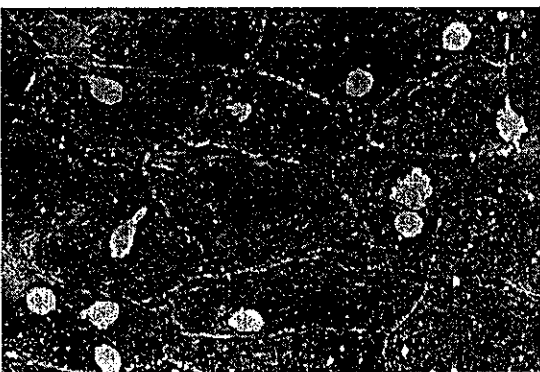
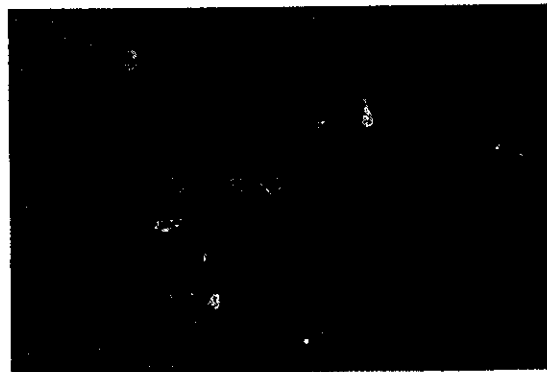


図 5



グルタミン酸誘導神経細胞死に対する 釣藤散および釣藤鈎の保護作用に関する研究

分担研究者 嶋田 豊 富山医科薬科大学附属病院和漢診療部講師

培養ラット小脳顆粒細胞を用いて、グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤散およびその構成生薬エキスの効果を検討した。釣藤鈎エキス (10^{-5} ~ 10^{-4} g/ml) は、MTT法によるcell viabilityの実験でグルタミン酸誘導神経細胞死を有意に抑制し、かつグルタミン酸誘導 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 細胞内流入を有意に阻害した。以上より、釣藤鈎はグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウム流入阻害を介して抑制することが示唆された。

キーワード：釣藤散、釣藤鈎、グルタミン酸、神経細胞死

A. 研究目的

近年、日本では高齢化社会が急速に進行しているが、その中で高齢者の脳血管障害さらにはそれに付随する痴呆症が治療上ならびに社会的な大きな問題となってきた。我々は脳血管性痴呆に対する釣藤散の臨床効果を、プラセボを対照とした封筒法ならびに二重盲検試験にて検討し、その有用性について報告してきた。

一方、グルタミン酸は中枢神経系における重要なトランスマITTERの一つであり、記憶や学習に重要な役割りを果たしている。しかし、高濃度のグルタミン酸は神経細胞傷害性に作用することも明らかになってきている。例えば、脳梗塞や一過性の脳虚血の状態では、過剰なグルタミン酸が脳内に放出され、これがNMDA受容体などのグルタミン酸受容体を過剰に刺激するとカルシウムの多量の細胞内流入を生じ、これが複数のカスケードを介して細胞を死に導くと考えられている。また、このようなグルタミン酸の神経毒性は、マグ

ネシウムやNMDA受容体のアンタゴニストであるAP5で抑制されることも知られている。

以上を背景として、釣藤散の虚血性の中枢神経障害に対する有効性を検討する目的で、*in vitro*の実験として培養ラット小脳顆粒細胞を用いたグルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤散およびその構成生薬の保護作用について検討した。併せて、保護作用の機序を検討するため、グルタミン酸によるカルシウムの細胞内流入量をアイソトープ・ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いて検討した。

B. 研究方法

小脳顆粒細胞の培養は、常法に従って7~8日齢のWistar系ラットの小脳を摘出し、35mm dishに 1.25×10^6 cells/mlで培養した。実験は培養7~8日目に行った。

生薬エキスは、生薬100g（枳実天海堂）を500mlの水で50分間煎じたものを凍結乾燥して作成した。なお、釣藤鈎は中国広西産の*Uncaria sinensis* (OLIV.) HAVIL.を用いた。

Cell viabilityの評価はMTT法を用いて行った。MTT法は細胞内のミトコンドリアの還元能を測定する方法で、cell viabilityを評価する方法として広く用いられている。VehicleとしてMg²⁺-free Locke's solutionを用い、それにグルタミン酸(100 μM)を加えたものをcontrolとした。また、グルタミン酸にNMDA受容体のアンタゴニストであるAP5(100 μM)を加えたものをpositive controlとして用いた。さらに、グルタミン酸に生薬エキスを加えたものを作成し、これらを培養小脳顆粒細胞に添加し1時間インキュベートした。その後、MTT(500 μg/ml)を添加し30分インキュベートした後、細胞を0.04N HClを含んだisopropanolで溶解し、発色した色素の強度を吸光度計で測定しvehicleに対するパーセントでcell viabilityを表示した。

カルシウムの細胞内流入量の測定は、⁴⁵Ca²⁺を用いて行った。各種の試薬に1 μCi/mlの⁴⁵Ca²⁺を加えたものを培養小脳顆粒細胞に添加し1時間インキュベートした後、細胞を1N NaOHで溶解し、それを液体シンチレーションカウンターを用いて細胞内への⁴⁵Ca²⁺流入量を測定しvehicleに対する倍数で表示した。

C. 研究結果

グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤散およびその構成生薬エキスの効果をMTT法によって検討した結果を図1に示した。Vehicleに対してグルタミン酸を含んだcontrolは、cell viabilityが約40%に低下した。また、グルタミン酸にNMDA受容体のアンタゴニストであるAP5を加えると、cell viabilityは100%近くまで回復した。次に、

グルタミン酸に釣藤散またはその構成生薬エキスを10⁻⁴g/mlの濃度で加えたところ、釣藤散エキスはcontrolに比べてcell viabilityが若干高い傾向がみられた。個々の構成生薬エキスについては、釣藤鈎のみにグルタミン酸誘導細胞死に対する強い保護作用が認められたが、他の生薬についてはそのような作用はみられなかった。

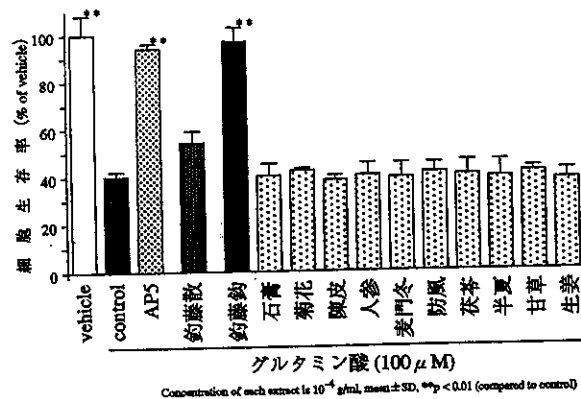


図1. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤散及び構成生薬エキスの効果

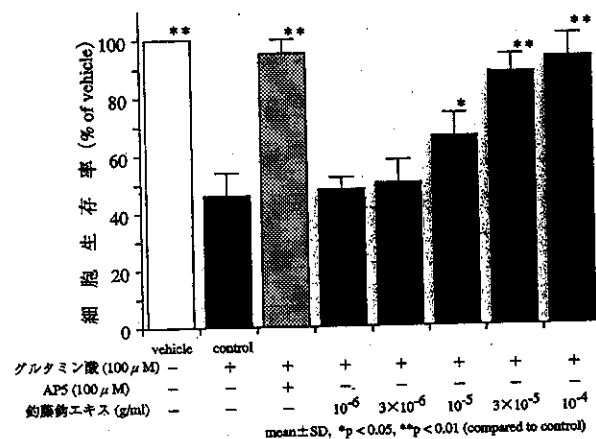


図2. グルタミン酸誘導神経細胞死に対する釣藤鈎エキスの効果

次に、釣藤鈎エキスの濃度を振ってグルタミン酸誘導神経細胞死に対する効果をMTT法によって検討した。その結果、グルタミン酸に釣藤鈎エキスを加えることにより濃度依存的にcell viabilityは上昇し、10⁻⁵から

10⁻⁴g/mlの濃度においてはcontrolに比べて有為に高い値を示した。即ち、釣藤鈎エキスは濃度依存的にグルタミン酸神経細胞死を抑制する効果があることが示された(図2)。

釣藤鈎は天然の生薬であるので、ある程度のマグネシウムが含まれていることが予想される。マグネシウムは神経細胞のNMDA受容体に対して拮抗作用を有するため、釣藤鈎に含まれるマグネシウムが今回みられた釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用の要因である可能性も考えられた。そこで、今回用いた釣藤鈎エキスのマグネシウム含量を測定し、それに相当するマグネシウムをMg²⁺-free Locke's solutionに加えその効果を検討した。その結果、釣藤鈎エキスの最大有効濃度10⁻⁴g/mlに含まれるマグネシウム1.89×10⁻²mMでは保護作用はみられず、その100倍濃度の1.89mMの濃度でようやく保護作用が認められた(図3)。このことから、今回の実験でみられた釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用は、釣藤鈎中に含まれるマグネシウムによるものではないことが示唆された。

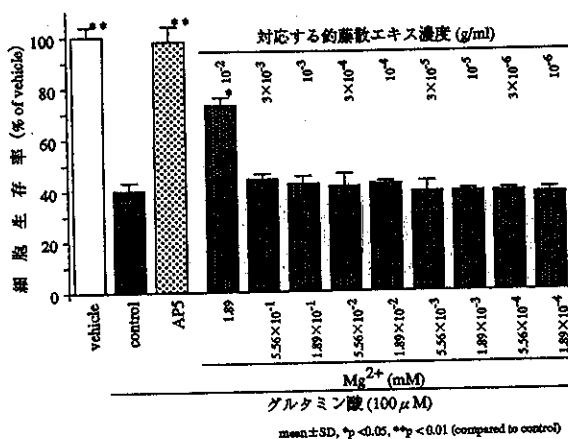


図3. グルタミン酸誘導神経細胞死に対するマグネシウムの効果
釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死に対

する保護作用の機序を検討するため、⁴⁵Ca²⁺を用いてグルタミン酸によるカルシウムの細胞内流入に対する釣藤鈎の効果を検討した。その結果、vehicleに対してcontrolであるグルタミン酸のみを添加したものではカルシウムの流入量は約10倍に増加した。AP5と同様に10⁻⁵から10⁻⁴g/mlの濃度の釣藤鈎エキスはグルタミン酸によるカルシウムの細胞内流入を有意に抑制し、しかもその効果は濃度依存的であった(図4)。このことから、釣藤鈎のグルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用には、カルシウムの流入阻害が機序として関与していることが示唆された。

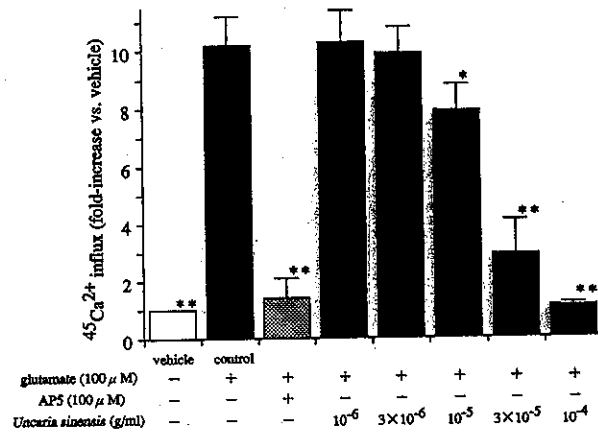


図4. グルタミン酸誘導⁴⁵Ca²⁺細胞内流入に対する釣藤鈎エキスの効果

D. 考察

今回の実験により、釣藤鈎は培養小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウム流入阻害を介して抑制することが明らかとなった。

グルタミン酸は中枢神経系における重要なトランスミッターの一つであり、記憶や学習に重要な役割を果たしている。しかし、脳虚血は脳内の過剰なグルタミン酸の放出につながり、細胞内へのカルシウム流入を介して神

神経細胞死を導くことも知られている。神経細胞は、異なったタイプのイオンチャンネル型グルタミン酸受容体、即ちNMDA型受容体と非NMDA型受容体（AMPA型受容体、カイニン酸型受容体）を有する。NMDA型受容体は高いカルシウム透過性が特徴である。他方、非NMDA型受容体はカルシウム透過性は低い、膜の脱分極を介してカルシウムの透過性に関与している。さらに、神経細胞には代謝調節型グルタミン酸受容体や電位依存性カルシウムチャンネル、カルシウム貯蔵が存在する。

Mimakiらは、釣藤鈎エキスおよびそれに含まれるインドールアルカロイドである geissoschizine methyletherやhirsteineのマウスへの経口投与が、グルタミン酸によって誘発される痙攣を抑制したと報告している。この報告は釣藤鈎のグルタミン酸毒性に対する保護作用を*in vivo*の実験で示したもので、我々の*in vitro*での結果を支持する成績と考えられる。また、釣藤鈎には降圧および血管拡張作用があることが知られており、さらに含有アルカロイドのhirsutine、rhynchophylline、isorhynchophylline、corynoxineが摘出ラット大動脈においてカルシウムチャンネル阻害活性を示すことも報告されている。

今後は、グルタミン酸誘導神経細胞死に対する保護作用における釣藤鈎の活性成分の検索、さらには分子生物学的なより詳細な作用機序の解明が必要と考える。

E. 結論

培養ラット小脳顆粒細胞を用いて、グルタミン酸誘導急性神経細胞死に対する釣藤散およびその構成生薬エキスの効果を検討した。

その結果、MTT法によるcell viabilityの実験では釣藤鈎エキス (10^{-5} ~ 10^{-4} g/ml) はグルタミン酸による細胞死を有意に抑制した。また、釣藤鈎エキス (10^{-5} ~ 10^{-4} g/ml) はグルタミン酸による $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入を有意に阻害した。これらの効果はいずれも濃度依存的であった。以上より、釣藤鈎はラット培養ラット小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸誘導神経細胞死をカルシウム流入阻害を介して抑制することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 後藤博三、嶋田豊、他：芍薬含有タンニンの血管内皮におよぼす影響。和漢医薬学会雑誌 14: 257-260, 1997.
- ② Shimada Y.: Efficacy of Choto-san on vascular dementia. J. Trad. Med. 15: 14-21, 1998.
- ③ Shimada Y., et al.: Extract prepared from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* prevents glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells. J. Trad. Med. 15: 141-146, 1998.
- ④ 嶋田豊、他：ラット培養小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸誘導急性神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用。和漢医薬学雑誌 15: 241-244, 1998.
- ⑤ 後藤博三、嶋田豊、他：自然発症高血圧ラットにおける釣藤鈎の血管内皮機能に及ぼす影響。和漢医薬学雑誌 15: 410-411, 1998.
- ⑥ 楊喬、嶋田豊、他：微小循環および血液レオロジーに対する釣藤散の効果：釣藤散長期投与による検討。和漢医薬学雑誌 15: 412-413, 1998.

2. 学会発表

- ① 後藤博三、嶋田豊、他：芍薬含有タンニンの血管内皮に及ぼす影響。第14回和漢医薬学会大会、大阪、8月、1997.
- ② 嶋田豊：脳血管性痴呆に対する釣藤散の臨床効果。第14回和漢医薬学会大会、大阪、8月、1997.
- ③ 楊喬、嶋田豊、他：循環系および血液レオロジーに対する釣藤散の効果：釣藤散急性負荷試験による検討。第14回和漢医薬学会大会、大阪、8月、1997.
- ④ 嶋田豊、他：ラット培養小脳顆粒細胞におけるグルタミン酸誘導急性神経細胞死に対する釣藤鈎の保護作用。第15回和漢医薬学会大会、富山、8月、1998.
- ⑤ 後藤博三、嶋田豊、他：自然発症高血圧ラットにおける釣藤鈎の血管内皮機能に及ぼす影響。第15回和漢医薬学会大会、富山、8月、1998.
- ⑥ 楊喬、嶋田豊、他：微小循環および血液レオロジーに対する釣藤散の効果：釣藤散長期投与による検討。第15回和漢医薬学会大会、富山、8月、1998.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

コリン作動性神経細胞株および嗅覚障害動物を用いた当帰芍薬散の作用の研究

主任研究者：鳥居塚和生（北里研究所 東洋医学総合研究所
臨床研究部副部長）

培養神経細胞株を用い当帰芍薬散の中枢コリン作動性神経への作用についてエストロゲンとの関連から検討した。当帰芍薬散エキスは培養コリン作動性神経細胞株のアセチルコリン合成酵素（ChAT）活性を増強した。その増強作用は生薬単独ではみられず複合作用が示唆された。またカテコールエストロゲンのコリン作動性神経への作用はprotein kinase Aやtyrosine kinaseを介して関与すると考えられた。

感覚器異常による高次機能の変化と当帰芍薬散の記憶学習能への作用を嗅覚障害（OL）マウスを用いて検討した。OL処置による学習障害には嗅球DA神経の変性以外の要因も関与し、OL処置直後に脳内でのドーパミン（DA）遊離の低下が起こるなどの原因で二次的変化が生じ、学習障害の要因になっている可能性が考えられた。また当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用により、特に記憶の形成過程に効果を示すと考えられた。

キーワード：コリン作動性神経細胞株、カテコールエストロゲン、当帰芍薬散、アセチルコリン合成酵素、嗅覚障害

A. 研究目的

今までに卵巣摘出動物やメス老齢動物で記憶学習能の低下や大脳皮質や海馬でのアセチルコリン合成酵素（ChAT）活性の減少がおり、当帰芍薬散の投与で改善することを報告した。更年期には精神的、情緒的变化が起こることや、更年期以降老化に伴って痴呆発症のリスクが高くなることが知られてきているが、当帰芍薬散のこのようなChAT活性の改善作用は、高齢者の高次中枢機能低下に対して有効な処方の一つと考えられる。この作用の発現にはステロイドホルモンを介した機構も推定されるが、しかしながら、ステロイドホルモン自体の神経細胞および高次機能に対する調節機構については現在のところ詳細は明かとされていない。そこで本年度は神経細胞株を用いて当帰芍薬散およびステロイド類のコリン作動性神経への作用機序について検討した。

また臨床的に痴呆患者では匂いを感じなくなったり、Alzheimer病の初期症状として嗅覚障

害が知られている。嗅球-嗅内野-海馬という伝達系も明かにされていることから、ヒトにおいても「かおり」が情緒や記憶など高次中枢機能に対して影響を与えていることが推定されている。昨年度は *in vivo* の実験として硫酸亜鉛の点鼻によりマウスにおいて著明な受動的回避学習の獲得・保持障害が現れ、これが当帰芍薬散の慢性投与により減弱する事を報告した。本年度は当帰芍薬散単回投与の効果について抗コリン薬 scopolamine (SCO) による学習障害に対する効果と比較検討した。また本学習障害モデルについてコリンエステラーゼ阻害薬 physostigmine (PHY) およびドーパミン再取り込み阻害剤 nomifensine などを用いて詳細を検討した。

B. 研究方法

実験1：

マウス中隔野由来神経細胞株SN49 (Dr. Bruce H. Wainer: Emory University, USAより供与) を用

いた。

漢方方剂： 当帰芍薬散は(株)ツムラより供与されたTJ-23 (lot240023020) 原末を用いた。また生薬エキスは市販の生薬を常法に従って煎じ、濾過後に凍結乾燥し作成した。

培養神経細胞中のChAT活性およびChAT-mRNAの測定： 2×10^5 /wellとなるように24穴のプレートに播種した中隔野由来神経細胞株SN49に各種ステロイドホルモン (17β -estradiol, estriol, estrone, 2-hydroxy-estradiol, 4-hydroxy-estradiol, testosterone, progesterone, corticosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, pregnenolone, cholesterol) を48時間作用させた後に、細胞を回収しChAT活性をFonnumの方法により測定した。細胞はPBSで洗浄した後に1% Triton-X100を含む5mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)で可溶化し酵素材料とした。可溶化液に50mM K-ph buffer (pH 6.5), 0.2M NaCl, 8mM choline chloride, 1mM EDTA, 0.1mM eserine, 0.5% Triton-X100, $25 \mu\text{M}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetyl CoAを含む反応液を加え 37°C , 30minインキュベーションした。反応終了後 $300 \mu\text{l}$ の50mM K-ph buffer - 1mM EDTA (pH 6.5)を加え、直ちに5mg/mlのKaliborを含むアセトニトリル1mlと2mlのトルエンを加え1分間攪拌した後、 3000rpm で10min遠心した。有機溶媒層1mlをトルエン系シンチレーターと混合し放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。ChAT活性は、 $\mu\text{mol Ach}/\text{min}/\text{mg protein}$ として表わした。ChAT-mRNAはRT-PCR法により検討を行なった。また各種阻害剤による阻害実験を行なった。

実験2：

実験動物および処置： 雄性C57BL/6マウス(7週齢)にエーテル麻酔下で5%硫酸亜鉛 $20 \mu\text{l}$ (片側 $10 \mu\text{l}$ づつ)を鼻腔内に滴下し(OL処置)、対照群には生理食塩水を滴下した。投与期間中食餌は自由摂取させた。また記憶学習試験を施行し、体重の変化を測定した。実験終了後、脳および血液を採取した。モノアミン類はHPLC-ECDにて測定し、神経成長因子

(NGF)はELISAで測定した。

強制水泳試験： 15分間予備水泳を行なった後にOL処置をし、その3日後に5分間試験水泳を行ない、そのうちの無動時間を測定した。

受動的回避学習試験： ステップスルー型受動的回避学習装置を用いて行なった。電気刺激は3.2mA, 3秒間とした。獲得試行はOL処置の3日後に1回行ない、翌日の再生試行での潜時を測定した。保持試行では完全に記憶が成立したマウスに対してOL処置をし、翌日に再生試行を行なった。排泄物の匂いによる影響を防ぐため、試行毎に装置の洗浄を行なった。回避時間の測定は最大300秒とし、300秒以上回避したマウスの潜時は300秒とした。測定は9:00~12:00に行なった。

漢方方剂： 当帰芍薬散(TJ-23)は給水瓶にて自由摂取させ投与開始後1, 2, 3, 4および8週間後に脳および血液を採取した。また当帰芍薬散(TJ-23)単回投与の実験では、記憶獲得能試験はOL処置3日後に獲得試行を1回行ない、その翌日の再生試行での潜時を測定した。physostigmine (PHY)、sco-polamine (SCO)は獲得試行の30分前に腹腔内投与し、当帰芍薬散は獲得試行の1時間前に経口投与した。記憶保持能試験では1回の獲得試行で潜時が300秒に達したマウスに対してOL処置をし、翌日の再生試行での潜時を測定した。このときPHYは再生試行の30分前に腹腔内投与し、当帰芍薬散は再生試行の1時間前もしくは硫酸亜鉛点鼻の1時間前に経口投与した。Nomifensine maleate (5 mg/kg)の実験ではOL処置の30分前に腹腔内投与した。

C. 研究結果

実験1：

ステロイド類の作用： 昨年度に12種類のステロイドについて検討したところ、エストラジオールなどにはChAT活性増強作用は認められなかったが、A環が水酸化された2-hydroxy-estradiolおよび4-hydroxy-estradiol(カテコール

エストロゲン)に濃度依存的に有意なChAT活性の増加が認められた。この増強作用は培地への添加20時間後から観察され48時間後でプラトーに達した。ChAT-mRNA発現量もコントロールに比べ明らかな増加が観察された。

モノアミン類の作用： 2-Hydroxy-estradiolおよび4-hydroxy-estradiolはカテコール骨格をもつことからカテコールエストロゲンとして呼称されている。そこでカテコールアミン類のアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンを用いて検討したが、これらにはChAT活性の上昇は認められなかった。

各種阻害剤による影響： 抗エストロゲン剤tamoxifenでは阻害されなかった。ついで特異的protein kinase阻害剤を用いてカテコールエストロゲンの作用に関与するprotein kinaseの同定を行なった。カテコールエストロゲンによるChAT活性亢進作用はprotein kinase A阻害剤であるH-89により濃度依存的に抑制された。それに対してH-89の対照薬であるH-85ではその抑制作用が認められなかった (Fig.-1)。またprotein kinase C阻害剤H-7やCa²⁺/CaM kinase阻害剤KN-62およびそれぞれの対照薬であるHA-1004、KN-04ではカテコールエストロゲンの作用に影響を及ぼさなかった。カルモジュリン阻害剤であるW-7、その対照薬のW-5では影響されなかったが、tyrosine kinase阻害剤であるherbimycin Aにより阻害された。

生薬のChAT活性に対する作用： 当帰芍薬散の影響： SN49細胞に当帰芍薬散を添加して検討したところ、1,200 μg/ml, 1,600 μg/mlの濃度でChAT活性を上昇させた。この濃度での細胞毒性は認められなかった。そこで当帰芍薬散の構成生薬を含む生薬単独の熱水抽出エキスを作成し、1,000 μg/ml, 100 μg/mlの濃度で検討したが、生薬単独 (黄耆、黄芩、乾姜、甘草、桂皮、柴胡、山梔子、酸棗仁、地黄、芍薬、生姜、川キユウ、蒼朮、大棗、澤瀉、釣藤鈎、陳皮、当帰、人參、半夏、朮、茯苓、附子、防風) では直接的にはChAT活性に影響を与えな

かった。

実験2：

強制水泳試験での無動時間は対照群では72.5±9.1秒であるのに対し、OL処置群では112.1±11.7秒と有意な無動時間の延長がみられた。受動的回避学習試験においてはOL処置マウスでは獲得試行並びに保持試行において有意な潜時の短縮および300秒に達するマウスの割合の減少がみられた。また体重はOL処置により減少した。行動ではOL処置後、若干後背部を丸めたすくみ足歩行が見られるが、その他は対照群と比べ違いは見られなかった。

嗅球内モノアミンの定量の結果、OL処置後ではDOPAC, HVA, epinephrineはOL処置翌日から著明に減少しており、7日目では更に減少した。DAも7日目で減少した。NE, MHPG, NM, 5HT, 5HIAAに有意な変化はなかった。経日的変化を検討したところドーパミン量は3週間目に最も少なくなり、その後漸次回復するものの8週間後においてもコントロール群の値までは回復しなかった。当帰芍薬散を継続して投与した群 (250 mg/kg) では、OL処置群と比較して記憶保持能の低下を抑制し、体重の低下を改善することが示された。嗅球のモノアミン類についてはドーパミン系 (DA, DOPAC, HVA) の低下を改善していることが示された。またNGFに対しては2週間目でNGFの増加を増強することが観察された。

OL処置による獲得障害に対しphysostigmine (PHY) は低用量の30 μg/kgで有意な改善効果を示したが、それよりも高用量および低用量では有意な効果は見られなかった。一方、PHYは500 μg/kgのときに保持障害に対して見かけ上有意な効果を示したが顕著な鎮静・運動障害が観察された。

当帰芍薬散の単回投与は、OL処置による獲得障害に対しては125mg/kgで有意な改善効果を示した (Fig.-2)。一方、scopolamine (SCO) 誘発獲得障害に対しては250mg/kgで有意な改善効果を示したが、それ以外の用量では無効で

あった (Fig. 3)。記憶獲得後のOL処置による記憶保持障害に対しては、当帰芍薬散 (250mg/kg) は再生試行の前、あるいはOL処置前のいずれに投与しても影響を与えなかった。

DA再取り込み阻害剤 nomifensine 前処置では獲得試行では短縮した潜時および300秒に達するマウスの割合の減少に対し明らかな保護効果を示した (Fig. 4)。保持試行では300秒に達するマウスの割合の減少に対し nomifensine 前処置は抑制したが、潜時の値には有意な影響を及ぼさなかった。また嗅球DAおよび代謝物の減少に対して nomifensine 前処置は保護効果を示さなかった。

これらの結果は 1) 嗅覚欠損による学習障害にコリン作動性神経系が関与すること、2) 当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用によりOL処置による学習障害を回復させる可能性を示唆した。またOLによる学習障害には嗅球DA神経の変性以外の要因も関与し、OL処置直後に脳内でのDA遊離の低下が起こるなどの原因で二次的変化が生じ、学習障害の要因になっている可能性が考えられた。

D. 考察

伝統的な漢方処方や生薬のあるものは更年期障害や全身的な機能低下を伴う老化に対して臨床的に一定程度の成績を挙げていることに着目して検討を行ない当帰芍薬散などの漢方処方があるが痴呆などの高次中枢機能の低下に有用と考えられる成績を示してきた。本年度は神経細胞株を用いてコリン作動性神経への作用と、ステロイドの関与および嗅覚障害による学習障害動物を用いてコリン作動性神経系への作用を検討した。

マウス中隔野由来コリン作動性神経株SN49を用いた成績で、当帰芍薬散は比較的高濃度であるがSN49細胞のChAT活性増強作用が確認されたことから直接的な作用も有することが推定された。そこで当帰芍薬散の構成生薬である当帰、芍薬、川キユウ、沢瀉、朮、茯苓をはじめ各種の生薬単味での作用を検討した。当帰芍薬

散が1,200 μ g/mlで作用したことから、100および1,000 μ g/mlの濃度で試験したがChAT活性へ影響を与えなかった。このことは当帰芍薬散として複合してはじめて作用を現すことを示唆する。またステロイド類の作用としてはカテコールエストロゲンにのみSN49細胞でのChAT活性およびChAT-mRNA発現量が増加することが認められ、更に各種阻害剤による検討を行なったところ、Fig. 5に示したような結果であった。カテコールエストロゲンによるChAT活性亢進作用にはprotein kinase Aやtyrosine kinaseが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。脳内ではエストロゲンの代謝は、エストリオールというよりはむしろカテコールエストロゲンが主であると言われていることから、コリン作動性神経に対しprotein kinase Aやtyrosine kinaseを介して作用することが考えられた。

鼻粘膜に位置する嗅細胞はシナプスを経ずに嗅球に直接軸索を投射している。嗅球内モノアミンの定量の結果、ドーパミン (DA) 系が著明に障害されることが示された。このことからOL処置は一次嗅覚神経に器質的障害を与え、投射先の嗅球DA細胞に選択的二次的障害を与えると考えられた。嗅球DAおよび代謝物の減少が翌日より7日目の方が顕著だったことから、この障害が遅発性であることも明らかになった。

そこで6-OHDAの様な神経毒が生じてDA神経終末に取り込まれる可能性も考えられたのでDA再取り込み阻害剤の影響を検討した。その結果 nomifensine 前処置では獲得試行では短縮した潜時および300秒に達するマウスの割合の減少に対し明らかな保護効果を示した。保持試行では300秒に達するマウスの割合の減少に対し nomifensine 前処置は抑制したが、潜時の値には有意な影響を及ぼさなかった。また嗅球DAおよび代謝物の減少に対して nomifensine 前処置は保護効果を示さなかった。

このことは 1) OLによる学習障害には嗅球DA神経の変性以外の要因も関与し、2) OL処置直後に脳内でのDA遊離の低下が起こるなど

の原因で二次的変化が生じ、学習障害の要因になっている可能性が考えられた。3) また学習試験の獲得能並びに保持能の著明な低下には中枢コリン作動性神経の機能低下が関与することが示された。事実PHYは保持障害よりも獲得障害に対し低用量で有効性が認められたことから、OL処置による獲得障害にコリン作動性神経が深く関わりと考えられた。これは嗅細胞からの求心性入力在中枢コリン作動性神経の機能維持に必須である可能性を示唆する。しかしPHYの作用に用量依存性は見られなかったため、コリン作動性神経以外の機能の変化も関与すると考えられた。

一方、当帰芍薬散はこれまでにラット受動的回避学習において記憶獲得後のSCOによる再生障害を改善することが報告されており、臨床的にもAlzheimer型痴呆に対する有用性が報告されている。本実験で、当帰芍薬散の獲得前投与はOL処置による獲得障害並びにSCOによる獲得障害に対して弱いながらも有意な改善効果を示したことより、当帰芍薬散はコリン作動性神経を介した作用によりOL処置による学習障害を回復させる可能性が示された。一方、OL処置による獲得障害に対して有効であった用量の当帰芍薬散は、記憶獲得後のOL処置による再生障害に対しては全く無効であり、またOL処置前に投与しても再生障害に対する保護効果が見られなかったことから、当帰芍薬散は記憶の形成過程に有効と思われた。

E. 結論

培養神経細胞株を用いコリン作動性神経への作用をアセチルコリン合成酵素活性を指標として検討を行なった。当帰芍薬散の中枢コリン作動性神経の関与についてエストロゲンとの関連から検討し、当帰芍薬散の直接的なChAT活性増強作用が認められた。またその作用は生薬単独では作用がみられず複合作用と考えられた。また脳内ではエストロゲンの代謝は、エストジオールというよりはむしろカテコールエストロ

ゲンが主であると言われている。これらのコリン作動性神経への作用はprotein kinase Aやtyrosine kinaseを介して関与すると推定された。

OL処置による学習障害には嗅球DA神経の変性以外の要因も関与し、OL処置直後に脳内でのDA遊離の低下が起こるなどの原因で二次的変化が生じ、学習障害の要因になっている可能性が考えられた。また当帰芍薬散はコリン作動性神経賦活作用により記憶の形成過程に効果を示すと考えられた。これらの成績は当帰芍薬散が更年期以降の痴呆や、老化に伴う痴呆などに試みてよい処方の一つであることを示している。

研究協力者：矢部武士、溝脇万帆、朴正福（北里研究所）

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 鳥居塚和生：現代社会におけるストレスと漢方の役割：更年期モデル動物におけるストレス負荷の影響と漢方薬、*Progress in Medicine*, 17(4): 915-918 (1997)
- ② Kobayashi T, Iijima K, Song Q-H, Toriizuka K, Cyong J-C: The effects of Kampo formulae on the differentiation of intrathymic T lymphocytes in autoimmune mice. *J Traditional Med*. 15, 89-96, 1998
- ③ M. Mizowaki, K. Toriizuka: Protective effect of L-carnosine on olfactory lesion-induced impairment of passive avoidance task in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 76 (suppl), 115p, 1998
- ④ 鳥居塚和生：ストレスと漢方薬、*JAMA*、1998年9月号（別冊）、22-23, 1998
- ⑤ Mizowaki M, Toriizuka K: Pretreatment with nomifensine protects from the impairment of passive avoidance task induced by intranasal irrigation with zinc sulfate in mice. *Brain Research Bulletin*, (submitted)
- ⑥ 鳥居塚和生、石毛敦、木村通郎、佐竹元吉、嶋田豊、丸山悠司、渡邊裕司：老化に伴う

高次中枢機能の低下に対する漢方薬の効果に関する基礎的研究、Advances in Aging and Health Research 1998, p105-115, (財)長寿科学振興財団、愛知、1999/2

2. 学会発表

- ⑦ 朴正福、矢部武士、鳥居塚和生：中隔野由来コリン作動性神経株 SN49 細胞の ChAT 活性に対するステロイドホルモンの影響、日本神経精神薬理学雑誌、17, 259, 1997
- ⑧ 溝脇万帆、鳥居塚和生：嗅覚阻害マウスの受動的回避学習障害に対するドパミン再取り込み阻害剤前処置の効果、日本神経精神薬理学雑誌、17, 258, 1997
- ⑨ 鳥居塚和生、溝脇万帆、矢部武士、花輪壽彦：嗅覚阻害マウスの受動的回避学習障害に対するフィゾスチグミンおよび当帰芍薬散の効果、日本神経精神薬理学雑誌、17, 333, 1997
- ⑩ 宋清華、鳥居塚和生ほか：嗅覚阻害による脳内神経伝達物質と神経栄養因子の変動および漢方方剤の影響、第48回日本東洋医学会学術大会、大阪、一般、1997, 5
- ⑪ 溝脇万帆、鳥居塚和生：マウス嗅覚障害による受動的回避学習障害発現に対する L-carnosine の保護作用、第71回日本薬理学会年会、京都、1998/3/23-26
- ⑫ 朴正福、矢部武士、鳥居塚和生：Catechol-estrogen の SN49 細胞に対する ChAT 活性誘導作用の検討、第118回日本薬学会年会、京都、1998/3/31-4/2
- ⑬ 鳥居塚和生、渡辺裕司、佐竹元吉、丸山悠司、嶋田豊、木村通郎、石毛 敦：老化に伴う高次中枢機能の低下に対する漢方薬の効果に関する基礎的研究（シンポジウム）、第15回和漢医薬学会大会、富山、1998/8/29-30
- ⑭ 鳥居塚和生：漢方薬の抗ストレス効果の基礎的研究（シンポジウム）、第14回日本ストレス学会学術総会、東京、1998/11/6-7

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

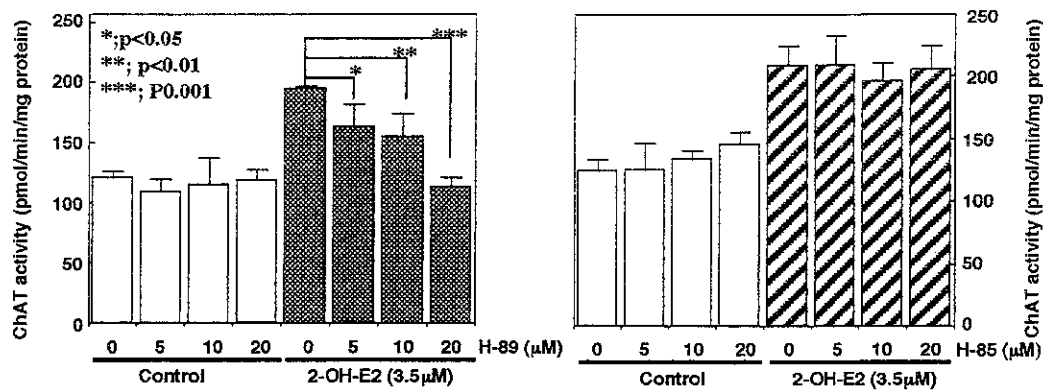


Fig-1: Effects of H-89 and H-85 on 2-hydroxyestradiol-induced ChAT activity in SN49 cells

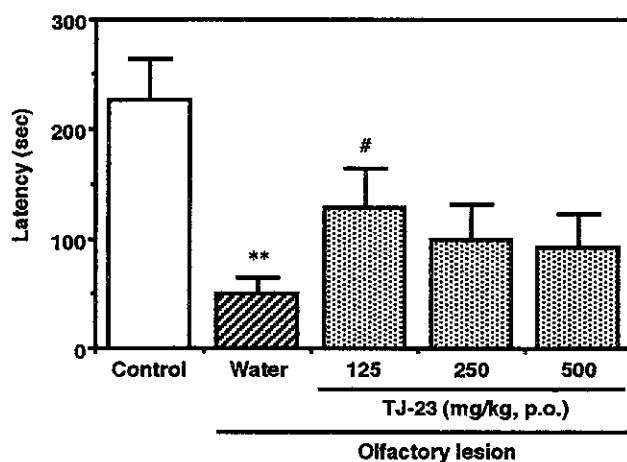


Fig-2: Effect of Toki-shakuyaku-san (TJ-23) on impairment of passive avoidance acquisition test produced by olfactory lesion in mice. Each data was expressed as mean \pm SE (n = 9-11). ** p < 0.01 vs control, # p < 0.05 vs olfactory lesion plus water

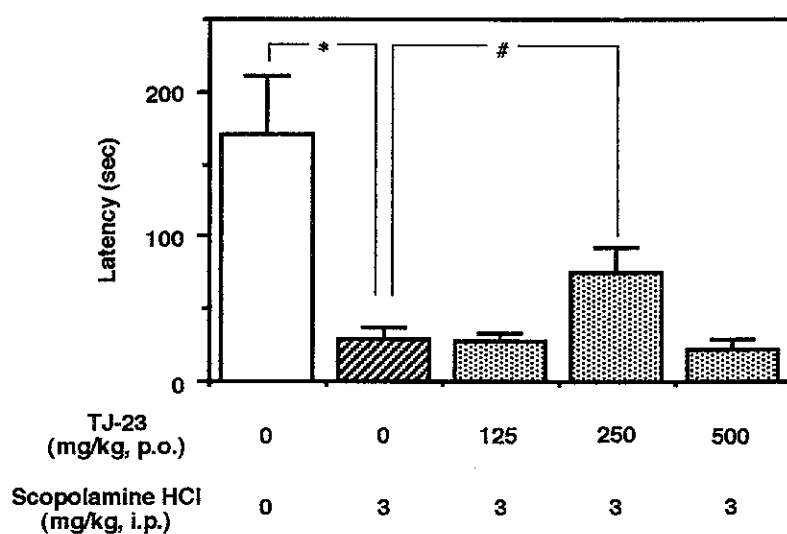


Fig-3: Effect of Toki-shakuyaku-san (TJ-23) on scopolamine-induced impairment of passive avoidance acquisition test in mice. Each data was expressed as mean \pm SE (n = 8-11). * p < 0.05 vs control, # p < 0.05 vs scopolamine

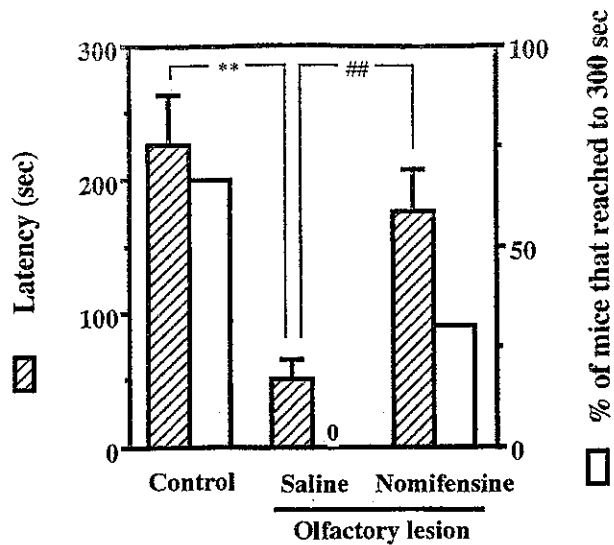


Fig.-4: Effect of nomifensine pretreatment on impairment of passive avoidance acquisition task caused by peripheral olfactory lesion in mice. Each data was expressed as mean \pm SE. ** $p < 0.01$ vs control # $p < 0.01$ vs saline + olfactory lesion

Inhibitors	ChAT activity
Tamoxifen	→
H-89	↓
H-85	→
Herbimycin A	↓
SQ 22,536	→
H-7	→
HA-1004	→
W-7	→
W-5	→
KN-62	→
KN-04	→

Fig.-5: Effects of various inhibitors on 2-hydroxyestradiol-induced ChAT activity in SN49 cells

分担研究者 石毛 敦（株式会社ツムラ中央研究所 漢方薬理研究部 部長）

研究要旨

これまでに、卵巣摘出による更年期睡眠障害モデル及びストレス等に対して易興奮性である EI マウスを用いての睡眠障害モデルに対する当帰芍薬散の有効性を報告してきた。更年期睡眠障害モデルに対しては estrogen も改善作用を示すが、今回の検討により当帰芍薬散には estrogen 様作用は認められず、当帰芍薬散の作用は phytoestrogen に起因するものではないと推定された。CRF 脳室内投与によって誘導される Pentobarbital Na 睡眠持続時間の短縮に対して、卵巣摘出による影響及び当帰芍薬散の作用は認められず、当帰芍薬散の作用機序には慢性的なストレスにより卵巣摘出群に起こる何らかの変化が深く関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

これまでに、卵巣を摘出したマウスは電撃ストレスに対する感受性が増大することを報告した。さらに、視床下部でのノルアドレナリン代謝回転が偽手術群の動物に電撃ストレスを与えた群（偽手術群）よりも卵巣を摘出し更にストレスを負荷した群（卵巣摘出群）で有意に亢進すること、あるいは Pentobarbital Na 睡眠持続時間が偽手術群のそれに対し卵巣摘出群では有意に短縮するという結果を見いだした。これに対し当帰芍薬散は、卵巣摘出群の亢進したノルアドレナリン代謝回転を抑制し、また、短縮した Pentobarbital Na 睡眠持続時間を改善するが、卵巣摘出もストレスも負荷していない所謂正常動物群にはほとんど影響を与えないことを報告した。これらの結果から、当帰芍薬散は卵巣機能低下によってストレス感受性が増大する機構に働く可能性を示唆しているものと考えられた。さらに、易興奮性を示す EI 系雄性 マウスを用いた検討では、明期における EI マウスの対照群（ddY 系雄性 マウス）と比較しての Pentobarbital Na 睡眠持続時間の短縮に対して当帰芍薬散は改善作用を示すが、卵巣摘出動物ストレス負荷群で得られた改善作用よりは弱い作用であったことを示した。この結果は、当帰芍薬散が卵巣機能が低下したことにより起こるストレス感受性の増大に対してより顕著に作用し得るものであることを支持する結果である。当帰芍薬散の作用機序を解明するために、以下の2つの検討を行った。

1. CRF 脳室内投与の誘導する反応に対する卵巣摘出の影響及び当帰芍薬散の作用

ストレスによって誘導される Pentobarbital Na 睡

眠持続時間の短縮は、CRF のアンタゴニストである α -helical CRF (9-41) の脳室内投与によって有意に抑制される。また、CRF 脳室内投与により Pentobarbital Na 睡眠持続時間の有意な短縮が誘導されることが報告されており、脳内 CRF がストレスによるこの睡眠持続時間の短縮に深く関与していると考えられている。卵巣摘出群のストレス感受性の増大のメカニズムの一つとして、CRF に対する感受性の変化が考えられる。そこで、CRF 脳室内投与によって誘導される Pentobarbital Na 睡眠持続時間の短縮及び自発運動量の亢進を指標として、卵巣摘出が CRF 感受性に与える影響を検討した。さらには、CRF 脳室内投与によって誘導されるこれらの反応に対する当帰芍薬散の作用を検討した。

2. luciferase assay 法を用いての当帰芍薬散の estrogen 様作用の検討

卵巣摘出マウスに電撃ストレスを負荷することにより誘導された Pentobarbital Na 睡眠持続時間の短縮に対して、当帰芍薬散は改善作用を示したが、この改善作用は 17β -estradiol 投与によっても認められた。この結果から、当帰芍薬散の作用はその処方中に存在する estrogen 様作用を有する phytoestrogen に由来する可能性も十分に考えられる。そこで、今回の実験で我々はレポーター遺伝子として転写調節機構の解析において感度の高さと測定の簡便さから汎用されているホタル luciferase を用い、その上流に estrogen レセプター結合配列 (estrogen responsive element; ERE) を挿入したプラスミドを構築した。このプラスミドを estrogen レセプターを豊富にもつ細胞であるヒトガン細胞 MCF-7 に導入

し、estrogenによってluciferaseが誘導を受ける細胞株を作成し、当帰芍薬散のestrogen活性を測定した。

B. 研究方法

実験1：CRF脳室内投与の誘導する反応に対する卵巣摘出の影響及び当帰芍薬散(TJ-23; Tsumura & CO. Tokyo, Japan)の作用

・実験動物

SD系雌性ラット9週齢(日本チャールズリバー)を用いた。

・卵巣摘出

動物をPentobarbital Na(大日本製薬)で麻酔後、左右の卵巣を電気メスで切除し卵巣摘出モデル(OVX)動物とした。また、開腹のみで卵巣を摘出しない偽手術(SHAM)群を対照群とした。これらの動物は手術3週間後に実験に用いた。

・カニューレ挿入

手術はPentobarbital Na麻酔下で脳定位固定装置を用いて行われた。ガイドカニューレ(エイコム)は、0.8 mm posterior to bregma, 1.2mm lateral to the midline, 3.8mm ventral to the skullの位置で挿入された。カニューレはデンタル・セメント(ネオ製薬工業)で固定された。

(i) Pentobarbital Na睡眠持続時間(PBT)に対する作用

・薬物投与

TJ-23はg/10mlとなるように蒸留水に溶解された。TJ-23(1g/kg)は一週間強制経口投与された。対照群には蒸留水を投与した。

・Pentobarbital Na睡眠持続時間(PBT)の測定

PBS or CRF(0.05, 0.1, 0.5 nmol/head)を脳室内投与(5 μ l/5min, Free moving)して1時間後に、Pentobarbital Na(30 mg/kg)を腹腔内投与し、被験動物の正向反射消失から正向反射回復(上体だけでも可)までの時間をSleeping timeとした。

(ii) 自発運動量に対する作用

・薬物投与

TJ-23はそれぞれ0.1, 0.3, 1 g/10mlとなるように蒸留水に溶解された。TJ-23(0.1, 0.3, 1g/kg)は一週間強制経口投与された。対照群には蒸留水を投与した。

・自発運動量(Locomotor activity)の測定

PBS or CRF(0.1 nmol/head)を脳室内投与

(5 μ l/5min, Free moving)して30分後に、被験動物を測定ケージに入れ、測定開始3時間後までの自発運動量(Locomotor activity)をANIMEX(MK-110, 室町機械)を用いて測定した。

実験2：luciferase assay法を用いての当帰芍薬散(TJ-23)のestrogen様作用の検討

プラスミドの構築：プラスミドpMSG(Pharmacia Biotech)のMMTV-LTRを含む1.4Kb断片をBamHIとHindIIIで切り出し、プラスミドpYume(Nippon Gene)にサブクローニングした。このプラスミドからMMTV-LTRをBamHIとKpnIの二重切断で再び切り出し、BgIIIとKpnIの二重切断で直線化したPGV-B2(Nippon Gene)に挿入した(PGL-ERE, PGL- Δ ERE)。その後、MMTV-LTR内に二箇所存在するGREをTable.1に示すEREあるいは Δ EREへKunkelの方法により変換させた(PGL-EREbsd, PGL- Δ EREbsd)。安定形質転換体作成のため、pUCSV-BSD(Funakoshi)からBamHIでbsd発現単位を含む1.4Kb断片を切り出し、BamHIで直線化したPGL-ERE, PGL- Δ EREに挿入した(PGL-EREbsd, PGL- Δ EREbsd)(Fig. 7)。遺伝子導入、発現のポジティブコントロールとしてPGV-C2を、ネガティブコントロールとしてPGV-B2(Nippon Gene)を用いた。

細胞：MCF-7は10%FBS(Gibco)、ピルビン酸ナトリウム、antibiotic-antimycotic reagent(Sigma)を含むEagle MEM培地(Gibco)でメンテナンスした。安定形質転換体の選択と増殖には上記培地に5~8 μ gのBlasticidin Sを加えた。estrogen活性の測定には培地中のestrogenの影響を極力除くため、Phenol red free MEMを基本培地に用い、10%FBSの代わりに5%透析FBS(Sigma)を用いた。

形質転換：形質転換法にはliposome法を用いた。90mm dishにsubconfluentにプレATINGされたMCF-7細胞を用い、各プラスミドDNA 10 μ gと20 μ lのLipofectine(Gibco BRL)をOpti-MEM 600 μ l(Gibco BRL)中で混合し作成したリポソームをEagle MEMで5倍希釈して加え6時間形質導入を行った。形質導入2日後に細胞を150mm dishにまき直してプラスチジンによる選択を開始し、約2週間後、安定形質転換体のコロニーを回収した。このうちestrogenの反応性により形質転換に用いたそれぞれのプラスミドあたり1個の安定形質転換体

を選抜して実験に用いた。

薬物： β -estradiol 3-benzoate (Sigma) はエタノールに溶解希釈し終濃度で0.1%エタノールになるよう加えた。TJ-23 は水で10mg/ml とし、6時間室温で振とうした後、3000rpm 10min 遠心した上清を濾過滅菌して用いた。一過性発現では形質導入の24時間後に細胞をプレーティングし直した後、薬物を加えさらに24時間後に luciferase assay を行った。また安定形質転換体を用いた場合は細胞をプレーティングした後、24時間後に薬物を加え、さらに24時間後に luciferase assay を行った。

luciferase assay：細胞は細胞溶解液 (Pica Gene™ cell lysis reagent Luc：Nippon Gene) で溶解させ一回あたり10 μ l のライセートを発光反応に用いた。発光基質は137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄, 1.4mM KH₂PO₄, 20mM Tricine, 1.07mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂ · 5H₂O, 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 470 μ M Luciferin, 530 μ M ATP, 270 μ M Coenzyme A 混合液を1 sample あたり100 μ l Auto injection にて加えた。発光は Lumat LB9501 (EG&G Belthold) を用いて15秒間測定した。

C. 研究結果

実験1：CRF 脳室内投与の誘導する反応に対する卵巣摘出の影響及び当帰芍薬散 (TJ-23) の作用

(i) Pentobarbital Na 睡眠持続時間 (PBT) に対する作用

CRF-i.c.v. によ PBT の短縮を指標として SHAM 群と OVX 群との CRF に対する感受性の相異を比較した。Fig.1 に示すように、SHAM 群及び OVX 群ともに CRF 0.5 nmol/head で有意な PBT の短縮が認められ、CRF 0.05, 0.1 nmol/head では有意な短縮は認められなかった。感受性に関しては、両群の間に差異は認められなかった。

次に、CRF-i.c.v. によって誘導される PBT の短縮に対する TJ-23 の作用を検討した (Fig.2)。CRF 0.5 nmol/head-i.c.v. により PBT は有意な短縮が認められた。この短縮に対して TJ-23 は影響を与えなかった。

(ii) 自発運動量に対する作用

CRF 脳室内投与による運動量の変化を指標として、SHAM 群及び OVX 群の CRF に対する感受性を検討した。測定開始30~40分後以降に運動量の亢進が認められ、この CRF-i.c.v. による運動量の亢進は OVX 群において顕著に認められた (Fig. 3, 4)。

この OVX 群に認められた CRF に対する感受性の亢進に対する TJ-23 (0.1, 0.3, 1 g/kg) の作用を検討したところ、有意な作用は認められなかった (Fig. 5)。また一週間の蒸留水投与により、Fig.3、4で認められた SHAM 群と OVX 群との反応性の相異が認められなくなった。卵巣摘出動物を用いての TJ-23 の作用の検討結果では、1 g/kg 投与群で有意ではないが若干の抑制が認められた。そこで、SHAM 群に対してもこの用量で TJ-23 の作用を検討した。Fig.6 に示したように、TJ-23 は OVX 群同様 SHAM 群に対しても、CRF-i.c.v. の誘導する運動量の亢進に作用を及ぼさなかった。

実験2：luciferase assay 法を用いての当帰芍薬散 (TJ-23) の estrogen 様作用の検討

一過性発現細胞での estrogen による誘導

PGV-B2, PPGV-C2, PGL-ERE, PGL- Δ ERE を一過性に形質導入した結果、PGV-B2 を導入したものでは luciferase 活性がほとんど認められず、PGV-C2, PGL-ERE, PGL- Δ ERE の順に高い luciferase 活性が測定された (Fig. 8B)。10⁻⁶M の β -estradiol 3-benzoate の添加により PGL-ERE は luciferase 活性が15倍にまで誘導された。PGL- Δ ERE, PGV-C2, PGV-B2 では β -estradiol 3-benzoate の添加により大きな変化は見られなかったが、高濃度 (10⁻⁸-10⁻⁶M) でわずかに誘導が見られた (Fig. 8C)。

安定形質導入細胞の選抜と estrogen による誘導

PGL-ERE を安定形質導入したクローンの内、luciferase 活性が認められた48個のクローンの特徴づけしたところ、45個のクローンで estrogen による誘導が認められた。これらより、基礎発現量が少なく10⁻¹⁰mol/l 程度の誘導がかかり、また高濃度 (10⁻⁷M) の estrogen で誘導がプラトーに達しないクローン EK18 を選抜し以降の実験に用いた。また PGL- Δ ERE を安定形質導入した24個のクローンの特徴づけし、estrogen による誘導が認められずかつ基礎発現量が検出可能なクローン Δ K2 を選抜し以降の実験に用いた。それぞれのクローンはゲノム DNA を抽出し PCR による MMTV-LTR 部分の増幅により実験系に対して必要な配列が導入されていることを確認した。

処方中の estrogen 活性

TJ-23 のエキス末を終濃度12.5~100 μ g/ml になるよう EK18 に加えたところ、luciferase 活性の上昇