

は認められなかった。また、 $\Delta K2$ に終濃度12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ でTJ-23を加えたものでも誘導は認められなかった (Fig. 9)。

## D. 考察

### 実験1

これまでの検討結果から、OVX群ではストレスに対する感受性が高まっている可能性を報告してきた。そこで、ストレスに対する感受性の相異を検討するために、まず、ストレス時に放出されることが知られているCRF (Corticotropin-releasing factor)に着目した。CRFを脳室内投与することによって、ストレス時に類似した様々な反応 (Freezing behaviorの増強、高架式十字迷路でのopen arm滞在時間の短縮、摂食抑制、自発運動量の亢進、Pentobarbital Na睡眠持続時間の短縮、conflict testにおける不安の増強など)が起ることが知られている。CRFによって誘導されるこの反応は、CRFの末梢投与では起こらず、また下垂体切除及びDexamethasoneの末梢投与によって影響を受けないため、視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamus-pituitary-adrenal gland: HPA) 軸とは独立した反応であると考えられている。また、ストレスによって起こるこれらの反応はCRFのantagonistである $\alpha$ -helical CRF (9-41)の脳室内投与によって有意に抑制される。ゆえに、ストレスによって起こってくるこれらのような反応は脳内CRFが深く関与していると考えられている。

CRF-i.c.v.によらず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ところ、感受性に関しては差異は認められなかった。この結果から、PBTの短縮を指標とした場合、卵巣摘出はCRFに対する感受性には影響を与えないことが示された。また、CRF 0.5 nmol/head-i.c.v.により誘導されるPBTの有意な短縮に対してTJ-23は影響を与えなかったことから、TJ-23の作用機序には、単回ストレス時のCRF放出以降の反応は関与していないことが示唆された。また、これまでに報告してきた電撃ストレスによるPBTの有意な短縮は最終ストレスから24時間後の結果であり、ストレスによるCRF放出量よりもむしろ慢性的ストレスによる脳内の変化 (脳内CRF含量、GABA系など)に起因している可能性が考えられた。

CRF-i.c.v.によって誘導される自発運動量の亢進を指標とした検討結果では、OVX群でCRFに対する感受性の亢進が認められた。しかし、この感受性

の亢進は、一週間の蒸留水投与により認められなくなった。これは、一週間のハンドリングによるものであるか否かは今後の課題である。いずれにせよTJ-23はSHAM群においてもOVX群においても、CRF-i.c.v.によって誘導される自発運動量の亢進を抑制しなかったことから、PBTでの検討結果同様、TJ-23の作用機序には、単回ストレス時のCRF放出以降の反応は関与していないことが示唆された。

自発運動量に関しては課題を残すが、今回の結果から、卵巣摘出群によるストレス感受性の増大はCRFに対する感受性の亢進によるものではなく、ストレス時のCRF放出量あるいはストレスにより起こる脳内の変化が重要であると考えられた。TJ-23の作用部位は、CRF放出以降の反応ではなく、それ以前かあるいはストレスによる卵巣摘出群における脳内変化が重要であると考えられる。

### 実験2

雌性生殖系に対しestrusを引き起こす物質の総称であるestrogenは動物界での内分泌系において重要な生体内物質の一つであるが、植物界にもestrogen活性を示す物質、phytoestrogenが存在する。生体物質としてのestrogenはステロイドホルモンであるが、植物にはステロイドを含めisoflavon、cumestrolなど化学的に多様な物質にestrogen活性が認められており、estrogenレセプターへの結合も確認されている。主に植物をその原料とした漢方薬にはこのようなphytoestrogenが含まれている可能性は高く、例えば生薬として用いられるカッコンやカンゾウにはdaizein、genisteinといったphytoestrogenが認められている。estrogenの欠乏が第一の原因と考えられる更年期症状に用いられる処方であるTJ-23の中に人体に対し効果を示すphytoestrogenが含まれ、薬効の一部を担っていることは十分考えられる。また婦人科領域においては乳癌、子宮筋腫、子宮癌等の既往歴からestrogenの投与が禁忌の患者もおり、投与する漢方薬中のestrogen活性の有無は非常に重要であると考えられる。今回のluciferase assay法を用いての検討結果では、TJ-23は終濃度12.5~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でluciferase活性の上昇は認められなかった。ゆえに、TJ-23はphytoestrogenを含まない処方と考えられ、その作用メカニズムはestrogen様作用に起因するものではないと示唆された。

## E. 結論

当帰芍薬散の薬理作用を3年に渡り調べてきた。

当帰芍薬散は、脳の興奮状態を緩和させるが、卵巣摘出時に認められるストレス反応に対し、より強力に作用することがわかった。また、これらの作用は、estrogenでも認められるが、当帰芍薬散にはestrogen作用はないことが判明した。さらに、作用機序を検討する目的で、卵巣摘出動物に対するCRFの影響を検討した。卵巣摘出をすることによりストレス反応は増強されるが、CRFを脳室内投与することによっては、卵巣摘出動物と卵巣未摘出動物の間に有為な差は認められなかった。CRF-i.c.v.により短縮したPentobarbital Na睡眠持続時間には、TJ-23は影響を与えなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

S. Iizuka, A. Ishige, Y. Komatsu, T. Matsumiya, M. Inazu and H. Takeda, Effects of Toki-shakuyaku-san on Electric Footshock Stress in Ovariectomized Mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1998, 20(1): 39-46

S. Iizuka, A. Ishige, Y. Komatsu, T. Matsumiya, M. Tsuji and H. Takeda, Effects of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on Irritable Characteristics in El Mice in. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 1998, 20(1): 39-46

A. Ishige, S. Iizuka and Y. Komatsu, Normalizing Effect of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on Hyper Activity in El mice. *Progress in Medicine* 1997, 17(4): 861-867

K. Shiizaki, K. Goto, A. Ishige, Y. Komatsu, Bioassay of Phytoestrogen in Herbal Medicine for Post-menopausal Disorder using transformed MCF-7 Cells. *Phytotherapy Research*, inpress

### 2. 学会発表

第18回産婦人科漢方研究会学術集会(1998.9.13・岐阜) 飯塚進、江頭伸昭、石毛敦、小松靖弘「卵巣摘出モデルにおけるストレス負荷の影響および当帰芍薬散、加味逍遙散の作用」

The Second International Symposium on Natural Medicine and Microflora (2nd ISNMM, 1998.10.24-26, Tokyo) S. Iizuka, A. Ishige, H. Sasaki and Y.

Komatsu, Comparative Study Of Toki-shakuyaku-san, Kami-shoyo-san and Keishi-bukuryou-gun on Sodium Pentobarbital Induced Sleeping Time in Stress Exposed Ovariectomized Mice : Experimental Climacteric Model.

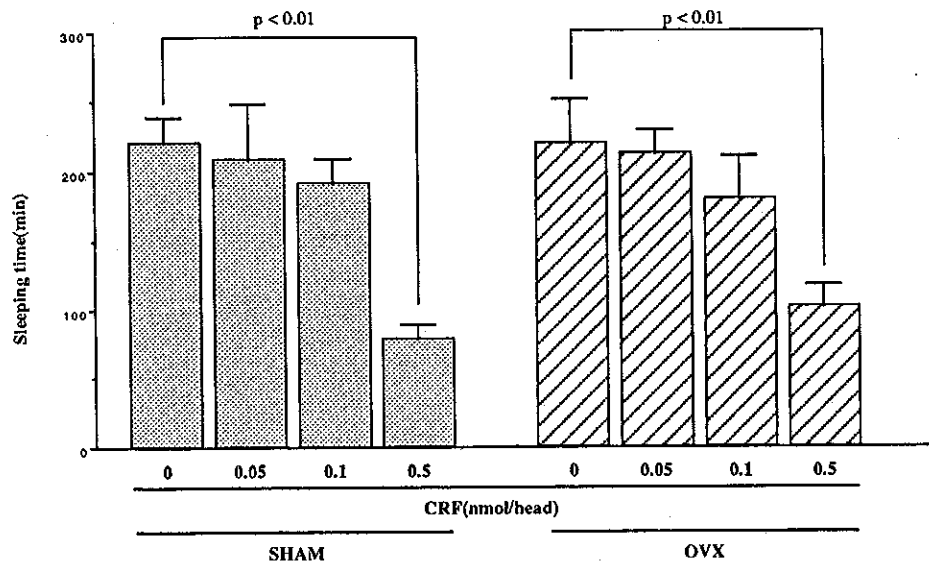


Fig.1 Effects of doses of CRF-i.c.v. administration on pentobarbital-induced sleeping time in sham-operated and ovariectomized rats. PbNa (30mg/kg) was intraperitoneally injected 60 min after i.c.v. administration of CRF(0.05, 0.1, 0.5) or PBS.

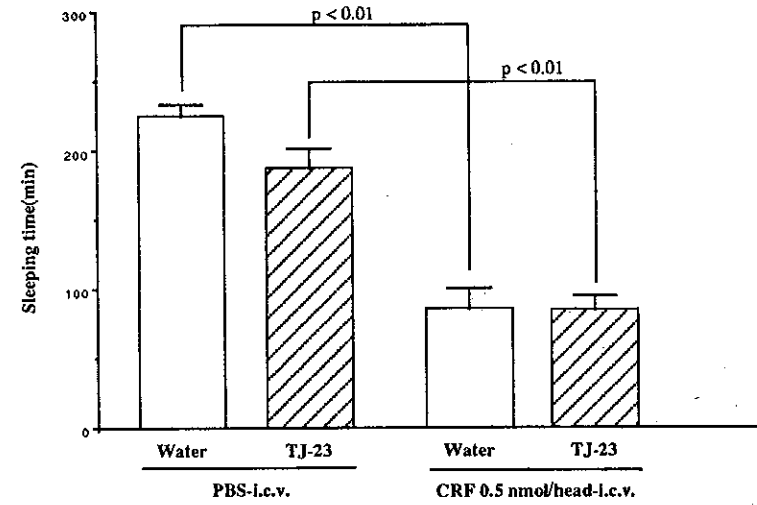


Fig.2 Effects of TJ-23 orally administered for a week on shortening of PbNa-induced sleeping time induced by CRF(0.5nmol/head)-i.c.v. administration in ovariectomized rats . PbNa (30mg/kg) was intraperitoneally injected 60 min after i.c.v. administration of CRF or PBS.

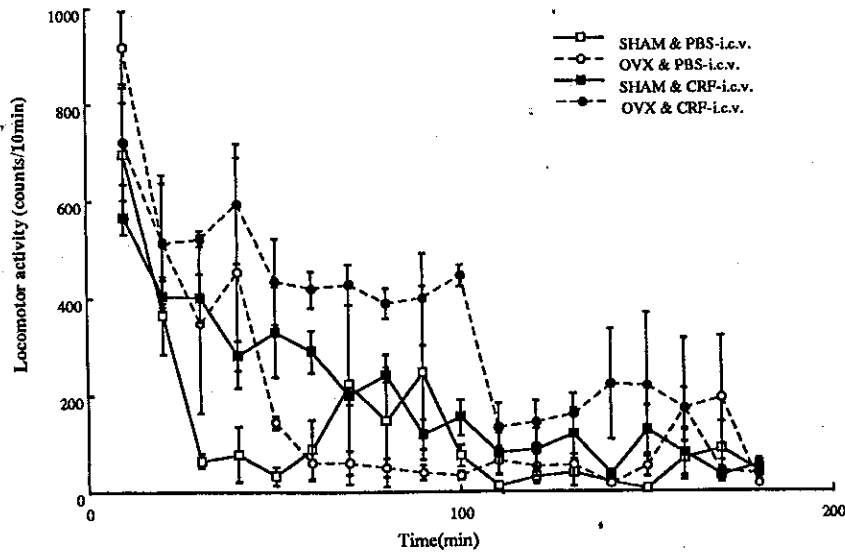


Fig.3 Effect of CRF (0.1 nmol/head)-i.c.v. injection on locomotor activity in sham-operated and ovariectomized rats .Measurement was started 30 min after PBS or CRF-i.c.v. injection. n = 3~5 per group.

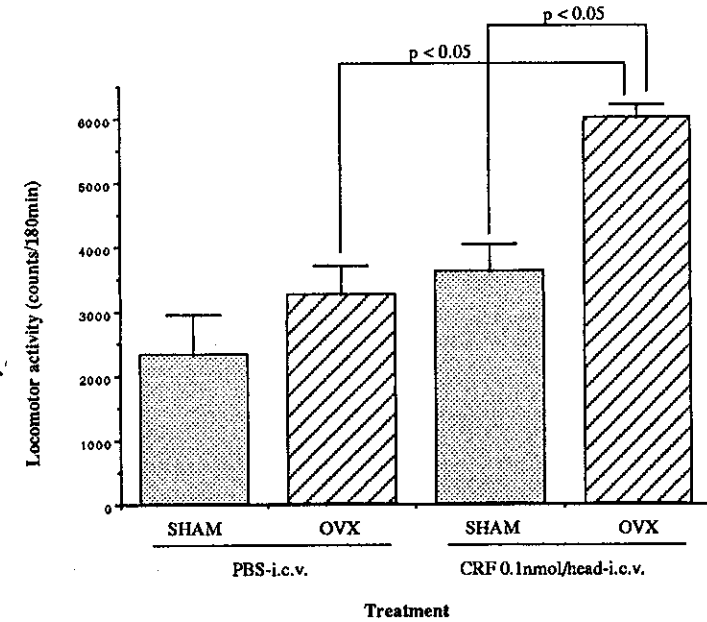


Fig.4 Effect of CRF (0.1 nmol/head)-i.c.v. injection on locomotor activity in sham-operated and ovariectomized rats .Measurement was started 30 min after PBS or CRF-i.c.v. injection. n = 3~5 per group.

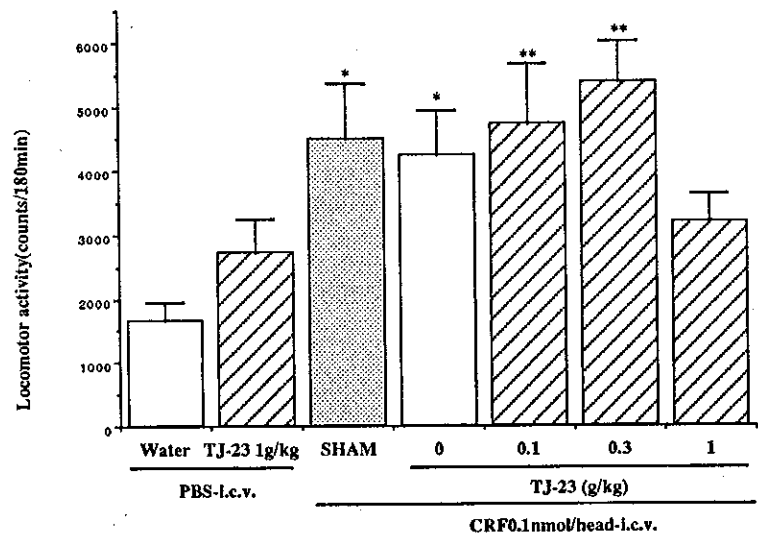


Fig.5 Effect of TJ-23 orally administered for a week on increase of locomotor activity induced by CRF(0.1nmol/head)-i.c.v. administration in ovariectomized rats. Measurement was started 30 min after PBS or CRF-i.c.v. injection.\*\*,  $p < 0.01$ , \*,  $p < 0.05$  versus PBS-i.c.v.(Water).

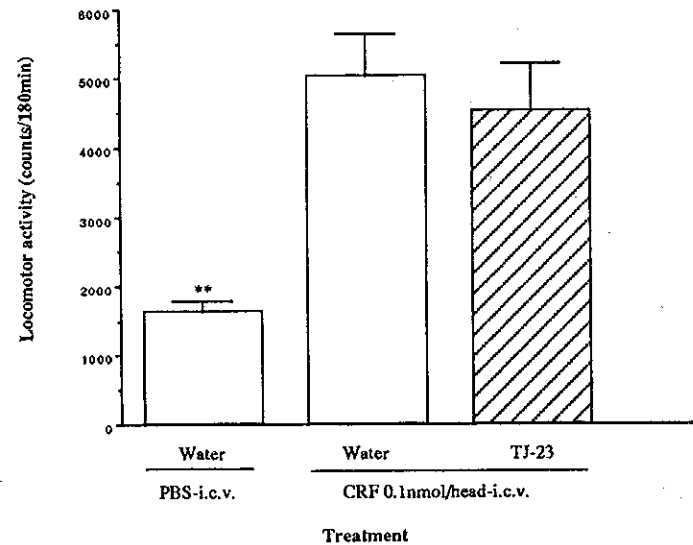
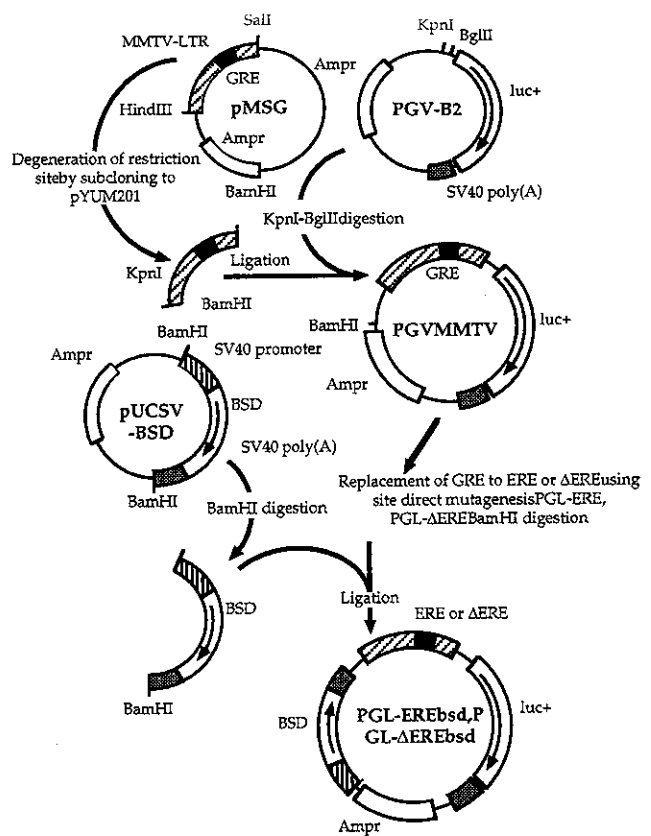


Fig.6 Effect of TJ-23 orally administered for a week on increase of locomotor activity induced by CRF(0.1nmol/head)-i.c.v. administration in sham-operated rats. Measurement was started 30 min after PBS or CRF-i.c.v. injection. \*\*,  $p < 0.01$  versus CRF-i.c.v.(Water).

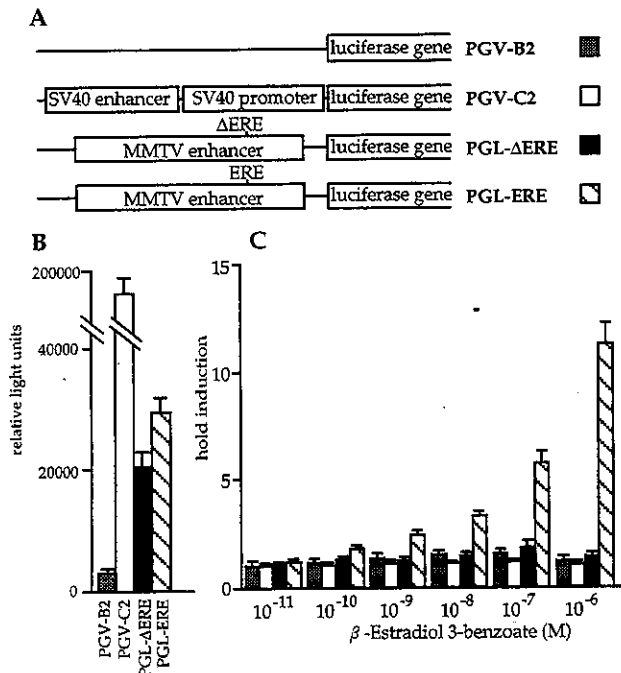
**Table 1** Nucleotide sequence of PGL-ERE and PGL-ΔERE corresponding to hormone response element in MMTV-LTR.

Construct	-183 -- -163	-130 -- -106
PMSG	<u>TGGTACAAACTGTTCTTAAA</u> <u>TTGGTATCAAATGTTCTGATC</u>	
PGL-ERE	<u>TGAGGTCAAAC</u> <u>TGACCTTAAA</u> <u>TTGGTAT-AAA-GTTCTGATC</u>	
PGL-ΔERE	<u>TGAGAAC-AAC-GTTCTTAAA</u> <u>TTGGTAT-AAA-GTTCTGATC</u>	

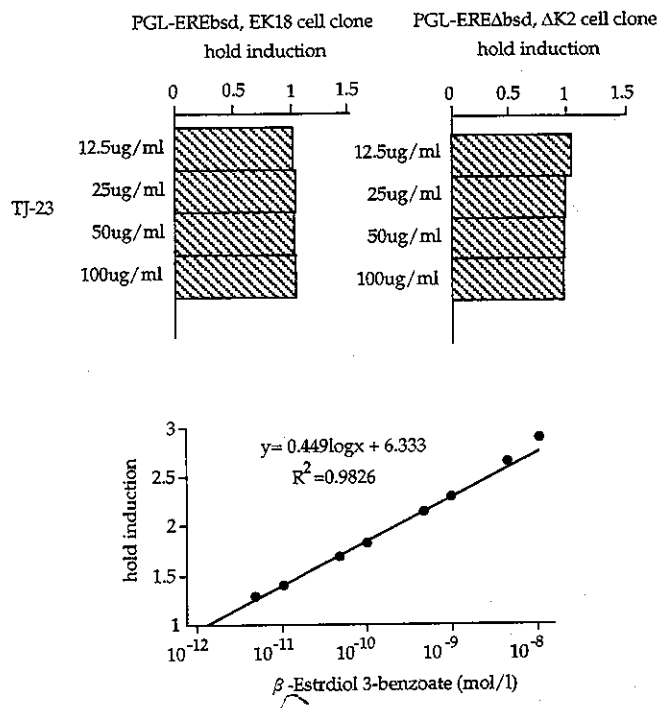
Numbering refers to nucleotide position relative to the start of transcription. Underlined residues represent glucocorticoid responsive element (GRE) in pMSG and degenerated estrogen responsive element (ERE) in PGL-ERE.



**Fig. 7** Construction of plasmid PGL-EREbsd and PGL-ΔEREbsd. pMSG was digested with HindIII and Sall and 1.5kb fragment containing MMTV-LTR was inserted to pYume. Terminals of this fragment were changed by redigesting with BamHI and KpnI, and ligated to PGV-B2 vector linearized with BglII and KpnI (PGV-MMTV). Hormone response element contained in MMTV-LTR were replaced or changed to ERE or ΔERE by site direct mutagenesis technique using Kunkel's method (PGL-ERE, PGL-ΔERE). To obtain stably transformed cells by blasticidin S selection, bsd gene in pUCSV-BSD was digested with BamHI and inserted to BamHI site of PGL-ERE and PGL-ΔERE (PGL-EREbsd, PGL-ΔEREbsd). All plasmids were purified by CsCl-EtBr ultracentrifugation.



**Fig. 8** Induction of luciferase activity in the experiment of transient expression. Structure of plasmids for transfection (A). PGV-B2 not containing either promoter or enhancer sequences was used as a negative control. PGV-C2 containing SV40 promoter and SV40 enhancer sequence used as a positive control. Luciferase activity of the lysate from cells transfected with individual plasmids (B). Induction of luciferase activity by estradiol (C). Results are expressed as the hold induction (with/without estradiol). Each experiment was performed in duplicate.



**Fig. 9** Induction of luciferase activity of stably transformed cell. TJ-23 were added to PGL-EREbsd transformed cells (clone EK18) or PGL-ΔEREbsd transformed cells (clone ΔK2) (A). For quantification of estrogen-like transcriptional activity, various doses of estradiol were added to EK18 and the inductive ratios were standardized (B). Results are expressed as the hold induction (ratio with/without drug). Each experiment was performed in duplicate.

# 漢方生薬「厚朴」エキス成分、ホノキオール の抗不安効果発現に関する研究

丸山 悠司：群馬大学医学部神経精神薬理学講座教授

漢方生薬「厚朴」成分のホノキオール (neolignane誘導體) はわれわれの改良による高架式十字迷路テスト (マウス) によりオープンアーム上の滞在時間を延長し、有意な抗不安効果を発現した。すなわち、ホノキオールは7日間の連続経口投与(0.2 mg/kg)後3または24時間に、また単独投与(20 mg/kg)3時間後にそれぞれ有意の効果を発現した。その有効量は一般的中枢抑制作用のおよそ1/500程度で認められ、同異性体のマグノロールおよびdiazepam (1 mg/kg)の5倍以上の効果を示した。この過程で運動量および懸垂力には有意の変化を認めなかった。さらにホノキオールの抗不安効果はflumazenilとbicuculline、および不安誘発作用を有するCCK-4およびcaffeineとの併用によって抑制された。diazepamの効果は同じくflumazenil, bicucullineで減少したが、caffeineによって助長され、CCK-4の作用を完全に抑制し、ホノキオールとの作用機構の相違を示唆した。

## A. 研究目的

従来の高架式十字迷路装置の改良により各種漢方方剤の抗不安効果を測定し、方剤の一つ、柴朴湯を選定してその発現物質の分離抽出を試みた。その結果、有効成分の主物質がマグノロールおよびホノキオールであることを同定した。次いでホノキオールには用量-効果の相関性から少なくとも柴朴湯の5000倍以上、マグノロールおよびdiazepam (1 mg/kg, p.o.)の5倍以上の効力があることをそれぞれ確認した。今回はこのホノキオールに関する作用機構の推定ならびに不安誘発物質との併用効果をそれぞれdiazepamの効果と比較検討して本薬物の行動薬理学的特徴を明らかにしたので報告する。

## B. 研究方法

**抗不安効果の測定**：6週令のBALB/c系雄マウス(Halan, IN)を用いた。十字迷路装置の構成と抗不安効果の測定法は前報にその詳細を紹介した。すなわち、クローズドアームに直交する2翼のオープンアームには側壁がなく床は透明に改良してあり、マウスが5分間にオープンアームに滞在した時間(秒)を累計した。測定後、効果測定に影響する動物の運動機能[自発運動量(motor activity)および懸垂時間/60 sec. (traction test)による骨格筋弛緩作用]を検討した。**実験項目**：1) ホノキオール(2, 20 mg/kg, p.o.)およびdiazepam (0.5-2 mg/kg, p.o.)の単回投与による効果発現 (ホノキオールは投与後3時間、diazepamは10分後

に迷路テストを実施)。

2)ホノキオールの7日間経口投与後3時間(0.2 mg/kg)および24時間(0.1-2.0 mg/kg)の効果比較。

3) ホノキオール(0.2 mg/kg, p.o., 7日間投与) およびdiazepam(1.0 mg/kg, p.o. 迷路テストの10分前に投与) と他薬物との併用による効果。併用薬物：A. ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬(flumazenil), B. GABAA受容体拮抗薬(bicuculline), C. 不安誘発薬/choleystkinin(CCK-4) および D. caffeine. 併用薬物の投与方法：diazepam (1 mg/kg, p.o.), flumaxenil (0.3 mg/kg, s.c.), bicuculline (0.1 mg/kg, s.c.), および CCK-4(50  $\mu$ l/kg, i.p.) は迷路テスト前10分に、caffeine(30 mg/kg, i.p.) は15分前にそれぞれ投与した。

## C. 研究結果

1) ホノキオールおよびdiazepamの単回投与による効果

題記の結果を表1に示した。ホノキオールは20 mg/kg 投与後3時間にオープンアームでの滞在時間を有意に延長したが、24時間後には失効した。いずれも自発運動、懸垂力に有意の変化を認めなかった。一方、diazepamは0.5-2 mg/kg の間で用量依存性的に滞在時間の延長を示したが、1 mg/kg で有意な自発運動の増加および用量依存的に懸垂力の減少が認められた(表2)。

2) ホノキオールの7日間投与

ホノキオールの各用量による7日間投与後3および24時間の結果を表3に示した。1) におけ

る単独投与(0.2 mg/kg) に対し7日間投与では3時間後に有意な延長時間を示した。24時間後の結果は0.1-0.5 mg/kgの間で用量依存的に滞在時間の延長を示し、運動量、懸垂力ともに有意の変化を認めなかった。

を抑制し、同時にホノキオール、diazepamの効果レベルを減少させた。diazepamで誘発された自発運動量の増加ならびに懸垂力の低下はflumazenilで緩和された。

表1. ホノキオールの単独経口投与による抗不安効果の発現

Time after treatment	Dose	Plus-maze	Activity	Traction
		Time in the open arms (s)	Counts/5 min	Clinging time (s)
1 h				
Tween-80		13.2±2.7	30.6±1.7	60.0±0.0
Honokiol	2 mg kg <sup>-1</sup>	14.0±6.0	28.1±2.1	60.0±0.0
	20 mg kg <sup>-1</sup>	29.2±10.4	30.8±3.7	60.0±0.0
3 h				
Tween-80		13.1±4.7	31.2±1.5	60.0±0.0
Honokiol	2 mg kg <sup>-1</sup>	21.7±5.6	27.7±3.9	60.0±0.0
	20 mg kg <sup>-1</sup>	38.2±7.8*	25.9±2.8	60.0±0.0
24 h				
Tween-80		14.0±2.6	26.2±3.0	60.0±0.0
Honokiol	2 mg kg <sup>-1</sup>	16.0±6.3	20.8±1.2	60.0±0.0
	20 mg kg <sup>-1</sup>	11.6±6.0	21.6±1.9	60.0±0.0

Values are means±s.e., n=10. \*P<0.05, significantly different from the result from the Tween-80-treated group.

表2. ジアゼパムの単独経口投与による抗不安効果の発現

Treatment	Dose	Plus-maze	Activity	Traction
		Time in the open arms (s)	Counts/5 min	Clinging time (s)
Tween-80		12.3±2.6	24.9±1.7	60.0±0.0
Diazepam	0.5 mg kg <sup>-1</sup>	29.7±4.8*	28.2±3.0	55.2±4.8
	1.0 mg kg <sup>-1</sup>	43.5±6.1*	38.9±3.2*	42.6±6.3*
	2.0 mg kg <sup>-1</sup>	137.7±17.8*	30.6±4.2	14.6±2.0*

Values are means±s.e., n=10. Diazepam and Tween-80 were administered 10 min before the behavioural tests. \*P<0.05, significantly different from the result from the Tween-80-treated group.

表3. ホノキオールの7日間投与による抗不安効果の発現

Time after treatment	Dose	Plus-maze	Activity	Traction
		Time in the open arms (s)	Counts/5 min	Clinging time (s)
3 h				
Tween-80		10.2±3.7	30.9±2.3	60.0±0.0
Honokiol	0.2 mg kg <sup>-1</sup>	49.8±10.8*	31.8±3.9	60.0±0.0
24 h				
Tween-80		14.5±5.2	30.3±2.9	60.0±0.0
Honokiol	0.1 mg kg <sup>-1</sup>	26.8±8.0	25.6±3.8	60.0±0.0
	0.2 mg kg <sup>-1</sup>	43.0±7.0*	27.1±2.3	60.0±0.0
	0.5 mg kg <sup>-1</sup>	58.6±13.2*	27.9±3.8	60.0±0.0
	1.0 mg kg <sup>-1</sup>	41.2±7.7*	29.9±2.0	60.0±0.0
	2.0 mg kg <sup>-1</sup>	45.8±6.8*	36.8±2.6	60.0±0.0

Values are means±s.e., n=10. \*P<0.05, significantly different from the result from the Tween-80-treated group.

### 3) ホノキオールと他薬物の併用効果 (表4)

ホノキオールとdiazepamとの併用で滞在時間は有意に延長したが、diazepamで増加した自発運動量はホノキオールで軽減されなかった。

Flumazenil (0.3 mg/kg) は自発運動および懸垂力に影響せずコントロールに対し滞在時間

Bicuculline (0.1 mg/kg) は単独で迷路テスト上の変化を示さなかったが有意に自発運動の低下が認められた。bicucullineはホノキオールおよびdiazepamとの併用で有意に両者のレベルを減少させた。同時にdiazepamで誘発された自発運動の増加と懸垂力低下は緩和されなかった。

CCK-4 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) は単独で有意な滞在時間の低下を示したが自発運動、懸垂力ともに影響はなかった。ホノキオールとCCK-4の併用では相互に拮抗し滞在時間は減少したがdiazepamでは逆転し、diazepamの誘発による自発運動の増強と懸垂力低下はCCK-4で影響されずに残った。

Caffeine (30 mg/kg) は単独で滞在時間に変化は示さなかったが、有意に自発運動を昂進した。ホノキオールとの併用でホノキオール単独のレベルより低値を示したがdiazepamとの併用では有意に増加した。自発運動はいずれもcaffeine単独のレベルと同様であった。diazepamとの併用による懸垂力の結果はdiazepam単独の減少レベルをやや回復した。

を他種(ddY系)マウスを用いて実証し、本研究に応用した。

ホノキオールは63-500 mg/kgの単独投与で筋肉弛緩および鎮静作用などの中枢抑制作用を発現することが報告されているが、本法による抗不安作用は20 mg/kgの単独投与、7日間投与の場合はその1/100の0.2 mg/kgでそれぞれ同等の効果を最終投与後3時間に発現する。既報ではホノキオールの静注半減期は49.22 min(5 mg/kg)と56.24 min(10 mg/kg)であり7日間投与の最大効果が5 mg/kgであることを考えるとホノキオールの効果発現は受容体関連器官への直接作用よりもむしろその代謝物質の効果あるいは神経機構へのallostericな作用の結果と示唆される。

表4. ホノキオール (7日間) およびジアゼパム (単独) と他薬物との併用効果

Treatment	Plus-maze	Activity	Traction
	Time in the open arms (s)	Counts/5 min	Clinging time (s)
Tween-80	12.3 ± 2.6	24.9 ± 1.7	60.0 ± 0.0
Honokiol (0.2 mg kg <sup>-1</sup> )	43.0 ± 7.0*	27.1 ± 2.3	60.0 ± 0.0
Diazepam (1.0 mg kg <sup>-1</sup> )	43.5 ± 6.1*	38.9 ± 3.2*	42.6 ± 6.3*
Honokiol + diazepam	102.3 ± 13.6†	29.8 ± 4.4†	43.8 ± 4.9*
Flumazenil (0.3 mg kg <sup>-1</sup> )	6.7 ± 2.9	25.6 ± 3.0	60.0 ± 0.0
Honokiol + flumazenil	9.7 ± 5.1†	25.5 ± 2.3	60.0 ± 0.0
Diazepam + flumazenil	13.5 ± 3.8†	27.9 ± 1.8†	54.5 ± 2.9*†
Bicuculline (0.1 mg kg <sup>-1</sup> )	7.1 ± 2.8	21.5 ± 2.7*	60.0 ± 0.0
Honokiol + bicuculline	10.7 ± 4.7†	20.9 ± 1.4*†	60.0 ± 0.0
Diazepam + bicuculline	17.4 ± 4.9†	37.0 ± 2.3*	46.6 ± 6.9*
CCK-4 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	2.2 ± 1.1*	29.2 ± 2.2	60.0 ± 0.0
Honokiol + CCK-4	9.3 ± 3.2†	33.8 ± 3.0	60.0 ± 0.0
Diazepam + CCK-4	57.3 ± 13.0*	34.1 ± 5.1	41.3 ± 7.7*
Caffeine (30 mg kg <sup>-1</sup> )	13.9 ± 9.0	60.5 ± 7.4*	60.0 ± 0.0
Honokiol + caffeine	31.0 ± 8.0*	63.7 ± 4.4*†	60.0 ± 0.0
Diazepam + caffeine	93.8 ± 11.3*†	55.1 ± 7.1*†	50.4 ± 5.1

In the honokiol study, 24 h after the last administration of honokiol, bicuculline, CCK-4 or caffeine was administered and the behavioural tests were conducted 10, 10, 10 or 15 min, respectively, after administration. In the diazepam study, diazepam, bicuculline and CCK-4 were administered 10 min before, and caffeine 15 min before the behavioural tests. Values are means ± s.e., n = 10. \*P < 0.05, significantly different from the result from the Tween-80-treated group. †P < 0.05, significantly different from the result from the honokiol- or diazepam-treated groups.

#### D. 考察

高架式十字迷路テストは動物が常時その装置のクローズドアームに滞在することから、その安定化を不安回避の情動と推定し、動物がオープンアーム上での滞在時間を延長する物質(抗不安薬)のスクリーニングに応用されている。すなわち、延長時間の累計をもって不安情動が解除された効果として判定する。

本法のオープンアームの床を透明に改良した装置により、われわれはそのコントロールレベルに対する反応効果を感度よく検出し得ること

このことはホノキオールの異性体であるマグノロールの連日投与でその水素化物濃度が血清中に増加することおよびホノキオールはGABAA受容体へのligand結合実験で親和性を示さないこと(未発表)からも推定された。

ホノキオールの0.2 mg/kgを7日間投与した抗不安効果のレベルがdiazepam, 1 mg/kgのそれと同等であること(用量反応相関から5倍)を確認し、次にこれらの効果発現に関する作用動態を各種薬物との併用で検証した。



その結果、ホノキオールの効果は diazepam との併用で有意に増強されたこと、またホノキオールおよび diazepam の効果はそれぞれ flumazenil および bicuculline との併用で有意に抑制されたことから、ホノキオールの効果発現には GABA<sub>A</sub>-ベンゾジアゼピン複合受容の関与が示唆された。しかし、CCK-4 および caffeine との併用結果からホノキオールと diazepam では相互に異なる作用特性のあることがわかった。

CCK-4 は臨床試験およびモデル動物実験でそのパニックおよび不安誘発効果のあることが知られているが、本実験でもその単独投与により滞在時間の有意な減少が認められた。diazepam と CCK-4 併用で滞在時間は diazepam 単独のレベルより有意に増加し、diazepam が CCK-4 の不安誘発作用を完全に抑制したが、ホノキオールは弱く、いわゆる panic-dysorder の治療には適さないと推定された。

Caffeine もパニック様症状を増加し、実験動物の不安亢進を示すが、本実験では CCK-4 と異なり、迷路上での滞在時間は変化を示さなかった。ホノキオールとの併用ではホノキオール単独のレベルより有意に減少したがホノキオールの caffeine 誘発効果の有意な抑制作用は認められなかった。一方、diazepam との併用では滞在時間を著しく増強し、caffeine の不安誘発効果を有意に抑制した。

#### E. 結論

漢方生薬、「厚朴」成分のホノキオールの中枢抑制作用は 60-500 mg/kg で発現することが知られているが、本実験では改良型高架式十字迷路テストによりホノキオールの抗不安効果が 20 mg/kg の単独投与（マウス）あるいはその 1/100 の 0.2 mg/kg を 7 日間投与すると発現し、そのレベルは diazepam の 1mg/kg 単独投与レベルと同等であることを実証した。これらの効果は同時に自発運動と懸垂力との相互比較から検討した。次いでホノキオールの作用特性を検出するため、diazepam, bicuculline, flumazenil および caffeine との併用効果を検討し、効果発現に GABA<sub>A</sub>-ベンゾジアゼピン複合受容体の関与を示唆した。パニックおよび不安誘発物質の CCK-4, Caffeine との併用からホノキオールの効果発現機作について diazepam と比較検討し両物質の相違を指摘し

た。自発運動および懸垂力の検討から、ホノキオールは単独および連続投与においてなんら影響を与えなかったが、ホノキオールの効果レベルでの diazepam は自発運動の増強と懸垂力の低下を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 栗原 久、丸山悠司：高架式十字迷路テストによる半夏厚朴湯の抗不安効果に関する検討。神経精神薬理、17, 353-358, 1995.
- 2) 栗原 久、丸山悠司：マウスの改高架式十字迷路テストによる漢方方剤の抗不安効果：ベンゾジアゼピン受容体の関与。神経精神薬理、18, 179-190, 1996.
- 3) 栗原 久、森田 誠、石毛 敦、林 絃司、丸山悠司：改良型高架式十字迷路装置による柴朴湯の抗不安効果発現成分の探策。神経精神薬理、18, 643-653, 1996.
- 4) Maruyama, Y., Kuribara, H., Morita, M., Yuzurihara, M., Weintraub, S.T. (1998) Identification of magnolol and honokiol in the anxiolytic extracts of Saiboku-to, an oriental herbal medicine. J. Nat. Prod. 61:135-138.
- 5) Kuribara, H., Staviohaha, W.B., Maruyama, Y., (1998) Behavioural Pharmacological Characteristics of honokiol, an anxiolytic agent present in extracts of Magnolia bark, evaluated by an elevated plus-maze test in mice. J. Pharm Pharmacol. 50:819-826.

##### 2. 学会発表

- 1) 栗原 久、森田 誠、丸山悠司：改良型高架式十字迷路装置による柴朴湯の抗不安効果発現成分の探索。第 26 回日本神経精神薬理学会年会（東京）1996.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

発明の名称：抗不安剤  
出願番号：9-146744

##### 謝辞 (Acknowledgement)

本研究の実施にさいし、栗原 久博士、岸 栄子助手、Dr. W.B.Stavinoaha に感謝の意を表します。