

文献

- 1) Iwasaki K, Satoh-Nakagawa T, Maruyama M, et al.: A randomized, observer-blind, controlled trial of the traditional Chinese medicine Yi-gan san for improvement of behavioral and psychological symptoms and activities of daily living in dementia patients. *J Clin Psychiatry* 66: 248-252, 2005.
- 2) 田原英一, 新谷卓広, 森山健三ら: 高齢者の痴呆による陽性症状に抑肝散が奏効した2例, 漢方の臨床 50:105-114, 2003.
- 3) Mizukami K, Asada T, Kinoshita T, et al.: A randomized cross-over study of a traditional Japanese medicine (kampo), yokukansan, in the treatment of the behavioural and psychological symptoms of dementia. *Int J Neuropsychopharmacol* 12: 191-199, 2009.
- 4) Terasawa K, Shimada Y, Kita T, et al.: Choto-san in the treatment of vascular dementia: A double blind, placebo-controlled study. *Phytomedicine* 4: 15-22, 1997.
- 5) Iwasaki K, Kanbayashi S, Chimura Y, et al.: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of the Chinese herbal medicine "Ba wei di huang wan" in the treatment of dementia. *J Am Geriatr Soc* 52: 1518-21, 2004.
- 6) 萩野信義: 脳に対する当帰芍薬散(TJ-23)の作用様式—特にアルツハイマー病について—, 神経精神薬理 12:229-234, 1990.
- 7) Hagino N: An overview of Kampo medicine: Toki-Shakuyaku-San (TJ-23). *Phytother Res* 7: 391-394, 1993.
- 8) 稲永和豊, 台之尊啓次郎, 二宮嘉正ら: 老年期認知障害の当帰芍薬散による治療効果—多施設共同研究, *Prog Med* 16:293-300, 1996.

厚生労働科学研究費(認知症対策総合研究事業)
分担研究報告書

漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病 BPSD 軽減効果の検証
—プレセボ対照無作為化臨床第2相比較試験
(H22-認知症-一般-002)

研究分担者 独立行政法人国立病院機構 久里浜アルコール症センター
内科診療部長 松井敏史

研究要旨:22年度は本研究の1年目であり、分担研究者も本研究に協力するものとして3回の打ち合わせ会議に出席し、プロトコル作成に参画した。また、協力病院として、久里浜アルコール症センター倫理委員会に研究の詳細を諮り、平成23年1月に本研究は受理された。抑肝散の現在での投与人数・副作用状況を調査したが特段の副作用は認められず、認容性が高いことを確認した。

A. 研究目的

抑肝散が認知症患者の周辺症状、特に陽性症状抑制に効果のあることが報告されているが、プラセボを用いたRCT(ランダム化比較対照試験)はいまだ成されておらず、より科学的な手法による効果確認が急務である。本研究は、東北大学加齢医学研究所の荒井啓行教授を中心とする抑肝散の効果に関する多施設RCT研究の分担者として研究に参画するものである。

B. 研究方法

東北大学加齢医学研究所老年科より提示される共通のプロトコルを用いて、4週間の二重盲検試験を行う。研究の同意・不同意に関して不利益がないよう、また検査の概要は各共同研究者の所属施設でも倫理委員会に諮ることを申し合わせた。当方も、平成22年7月11日、9月25日、11月27日と計3回の会議に出席し、プロトコルの作成といった過程に参画した。また、研

究の前段階として、薬剤科の協力を得て当院における抑肝散の処方と副作用の状況を調査した。

C. 研究結果

久里浜アルコール症センターでは、倫理委員会に提出する研究概要に関する書類を平成22年11月に作成・提出をし、平成23年1月に倫理委員会の審議を経て、承認された(1月18日)。また、平成23年1月時点での当院における抑肝散の処方人数は38名であったがいずれも副作用なく1ヶ月以上の投与がなされていた。

D. 考察

平成22年度は本研究の1年目にあたるが、打ち合わせ会議、倫理委員会での承認と当施設は順調に推移している。また抑肝散の認容性に関しても、低カリウム血症の報告があるが、十分なモニタリングを行うことで安全に研究が進められるものと考えられる。

E. 結論

平成22年度は研究の準備段階であったが、23年度は順調に研究を開始できるものと考えられる。

F. 研究発表

特になし。

G. 論文発表

松井敏史、樋口進 アルコール認知症について日本医事新報 4505; 78-80, 2010.

松下幸生、松井敏史、樋口進 アルコール依存症に併存する認知症 精神神経学雑誌 112; 774-779, 2010.

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)
漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病BPSD軽減効果の検証
—プラセボ対照無作為化臨床第2相比較試験(H22-認知症—一般-002)

分担研究報告書

認知症の周辺症状と介護負担感に対する抑肝散長期投与の効果

研究分担者 神崎恒一 杏林大学医学部高齢医学(教授)

研究要旨:【目的】認知症患者に抑肝散を6カ月以上長期投与し、認知症の周辺症状、家族の介護負担感の変化を検討した。【方法】杏林大学もの忘れセンター通院中の患者のうち抑肝散を投与した56例(男性21名、女性35名、平均年齢 79.6 ± 6.2 歳)を対象として、投与前後で周辺症状(Dementia Behavior Disturbance Scale ; DBD)、家族の介護負担感(Zarit Burden Interview; ZBI)を評価し、変化を調べた。なお、非投与129例(男性53名、女性80名、平均年齢 78.2 ± 7.1 歳)を対照に設定した。【結果】投与前後でDBDに変化を認めなかったが(29.9 ± 16.8 pts \rightarrow 29.2 ± 14.9 pts)、ZBIは有意に低下した(35.1 ± 20.0 pts \rightarrow 28.9 ± 11.0 pts)。【結論】抑肝散の長期投与によって家族の介護負担感が軽減することが示された。

A. 研究目的

認知症の中核症状である記憶障害、見当識障害などに対して、妄想、幻覚、興奮、異常行動などの精神症状や問題行動は、認知症の行動心理学的症候(Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia ;以下BPSDと略す)もしくは周辺症状と呼ばれ、近年その対応・治療について様々な報告がなされている。また、多くの研究により、BPSDは認知症の介護において介護負担感を増加させる最も大きな要因であることが示されており、BPSDに対する対症的治療は重要な意味をもつ。

抑肝散は小児の夜泣きや精神症状に対して用いられており、その後認知症のBPSDに対しても用いられるようになった。その効果について多数の症例報告がされている。また、岩崎らは4週間の抑肝散の服用により基本的日常生活能力

(以下基本的ADLと略す)が向上し、周辺症状が軽減したことを報告している。今回我々は抑肝散を長期投与した症例のADL、周辺症状、家族の介護負担感の変化について検討した。

B. 研究方法

対象:杏林大学もの忘れセンター通院症例の中から、記憶力障害およびBPSDの訴えがみられ、抑肝散を投与された56例(男性21名、女性35名、平均年齢 79.6 ± 6.2 歳)を対象としたアルツハイマー型認知症21名、脳血管性認知症4名、混合型認知症3名、前頭側頭葉変性症17名、レビー小体型認知症6名、軽度認知機能障害5名。また、当センター通院連続症例のうち6カ月の評価期間で基本的ADL、周辺症状、認知機能、家族の介護負担感を評価できた129例(男性53名、女性80名、平均年齢 78.2 ± 7.1 歳)を対照群

とした。アルツハイマー型認知症66名、脳血管性認知症17名、混合型認知症12名、前頭側頭葉変性症10名、レビー小体型認知症6名、軽度認知機能障害18名。対照群は抑肝散投与群と比べて年齢、認知機能(Mini-Mental State examination: MMSE)の得点に有意な違いを認めなかった。

認知症および、軽度認知機能障害の鑑別診断は医師の診察、頭部SPECT, MRI, 各種心理検査の結果に基づいて、複数の医師の協議を経て決定された。

抑肝散投与開始前、投与開始6カ月後に基本的ADLはBarthel Index、周辺症状(Dementia Behavior Disturbance Scale; DBD)、家族の介護負担感をZarit Burden Interview日本語版(以下ZBIと略す)を用いて評価し、後方視的に検討した。結果は平均±標準偏差で示し、各群の比較は対応のあるt検定を用いた。統計学的有意水準はすべて5%未満で検定した。

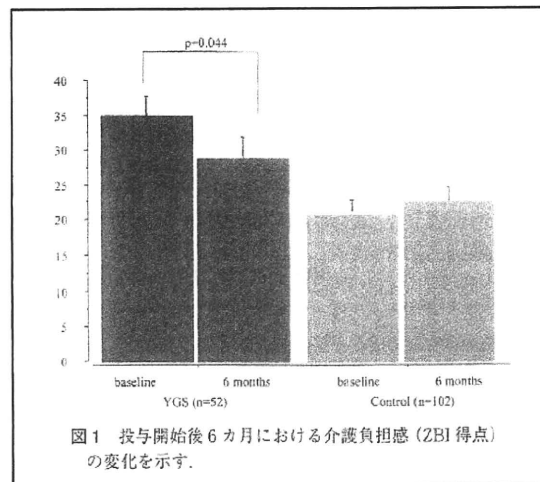
(倫理面への配慮)

本研究は各データを匿名化し、研究利用することを個々の患者ならびにその家族に説明し、文書で同意を得た。なお、本研究は杏林大学倫理委員会の承認を得て実行した。

C. 研究結果

抑肝散投与群のBarthel Indexは 88.9 ± 18.7 pts → 92.5 ± 9.5 ptsと向上したが、有意差は認めなかった。なお、対照群は 94.1 ± 10.5 pts → 90.3 ± 16.2 ptsへと有意に低下した($p=0.035$)。DBDは投与前後において 29.9 ± 16.8 pts → 29.2 ± 14.9 ptsと変化を認めなかった。なお、対照群は 18.8 ± 13.7 pts → 22.5 ± 14.6 ptsと有意な悪化を示した($p=0.0004$)。一方、ZBIは抑肝散投与群において 35.1 ± 20.0 pts → 28.9 ± 11.0 ptsと

有意に低下した($p=0.044$) (図)。



また、Barthel IndexとZBIの得点には抑肝散投与群 $r=-0.36$ ($p=0.0163$)、対照群 $r=-0.47$ ($p<0.0001$)と、両群とも有意な相関を認めた。

D. 考察

抑肝散のBPSDに対する抑制効果は4週間の投与期間で報告されているが、長期投与の効果および抑肝散投与による介護負担感の変化についての報告はない。今回の検討ではADLおよびBPSDにおいて改善もしくは維持の傾向が認められ、長期投与においても岩崎らの報告と同様の傾向が示された。また、家族の介護負担感は無意に低下しており、6カ月以上基本的日常生活機能、周辺症状のレベルを維持することが介護負担感の軽減につながったと考えられる。DBDの下位項目を検討した結果、抑肝散の投与前後において有意に変化した項目は認められなかったものの、陽性症状に軽減する傾向が見られた。しかし、これらの精神症状に対する薬理的機序は未だ明らかにされておらず、その解明が待たれる。また、本研究は後方視的観察研究であり、疾患および初期のBPSDのレベルを合わせた対照群をおいていないため、薬剤効果の解釈には限界がある。今後ラン

ダム比較対照試験による検討が必要である。

E. 結論

抑肝散の長期投与によって家族の介護負担感が軽減することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagai K, Kozaki K, Sonohara K, Akishita M, Toba K: Relationship between interleukin-6 and cerebral deep white matter and periventricular hyperintensity in elderly women. *Geriatr Gerontol Int* 11:2011.
2. Yamada S, Akishita M, Fukai S, Ogawa S, Yamaguchi K, Matsuyama J, Kozaki K, Toba K, Ouchi Y: Effects of dehydroepiandrosterone supplementation on cognitive function and activities of daily living in older women with mild to moderate cognitive impairment. *Geriatr Gerontol Int* 10:280-287, 2010.
3. 町田綾子、山田如子、木村紗矢香、神崎恒一、鳥羽研二: 認知症の周辺症状と介護負担感に対する抑肝散長期投与の効果. *日老医誌* 47:262-263, 2010.
4. 神崎恒一. 高齢者の転倒予防. *日老医誌* 47:137-139, 2010.
5. 神崎恒一. 寝たきり. *日老医誌* 47:393-395, 2010.

2. 学会発表

1. 望月諭、小川純人、秋下雅弘、大田秀隆、石井正紀、飯島勝矢、江頭正人、神崎恒一、鳥羽研二、大内尉義: 臨床治療薬の生存寿命への影響 パラコート障害モデルを用いた ARB による生存寿命延長効果の検討. 第 47 回日本

臨床分子医学会, 東京, 2010 年 4 月.

2. 神崎恒一: 高齢者の転倒 その成因の解明とその予防対策 高齢者の転倒リスクの評価. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
3. 神崎恒一: 認知症診療の実践セミナー 認知症を理解するために必要な老年医学の知識. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
4. 山田如子、木村紗矢香、町田綾子、岩田安希子、守屋佑貴子、小林義雄、中居龍平、神崎恒一、鳥羽研二: デイサービス利用は介護負担を軽減しうるか: 認知症の高齢者総合機能評価を用いた縦断解析. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
5. 町田綾子、山田如子、木村紗矢香、神崎恒一、鳥羽研二: 前頭側頭葉変性症(FTLD)の言語理解および表出についての検討—標準失語症検査(SLTA)を用いて—. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
6. 町田綾子、山田如子、木村紗矢香、神崎恒一、鳥羽研二: 重症認知症患者における残存コミュニケーション能力の検討, 2010 年 6 月.
7. 永井久美子、神崎恒一、小林義雄、鳥羽研二: 軽度認知機能障害における脳委縮・脳血流と動脈硬化との関連. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
8. 小川純人、柴崎孝二、山口潔、山田思鶴、神崎恒一、鳥羽研二、秋下雅弘、大内尉義: 高齢者食生活習慣と世帯構造および介護予防指標との関連性. 第 52 回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010 年 6 月.
9. 長谷川浩、永井久美子、神崎恒一、鳥羽研二: 中高年女性における脊柱矯正・柔軟体操の経年的効果(7 年次報告). 第 52 回日本老年医

学会学術集会, 神戸, 2010年6月.

10. 佐藤道子、長田正史、菊池令子、岩田安希子、木村紗矢香、山田如子、鳥羽研二、神崎恒一: 転倒スコアと歩行機能検査との関連に関する検討. 第52回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010年6月.

11. 内田博子、須藤紀子、岩田安希子、佐藤道子、清水昌彦、木村紗矢香、山田如子、神崎恒一、鳥羽研二: 認知症患者の塩酸ドネペジル服薬時の制酸剤併用に関する検討. 第52回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010年6月.

12. 木村紗矢香、山田如子、町田綾子、岩田安希子、守屋祐貴子、小林義雄、中居龍平、神崎恒一、鳥羽研二: 日本における Frontal Assessment Battery の有用性の検討. 第52回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010年6月.

13. 宅美貴子、木村紗矢香、山田如子、町田綾子、神崎恒一、鳥羽研二: 意味性認知症 (Semantic dementia) に対する言語リハビリテーションの治療効果. 第52回日本老年医学会学術集会, 神戸, 2010年6月.

14. 佐藤道子、須藤紀子、清水昌彦、輪千安希子、八反丸美喜子、宮城島慶、長谷川浩、神崎恒一: NIPPV 管理中に胃壁内気腫を合併した認知症高齢者の一例. 第52回日本老年医学会関東甲信越地方会, 東京, 2010年9月.

15. 八反丸美喜子、藤谷順子、長谷川浩、神崎恒一: 頸部突出法 (neck protrusion) を施行することで良好な摂食が可能となった高齢者嚥下障害の一例. 第52回日本老年医学会関東甲信越地方会, 東京, 2010年9月.

16. 山田如子、町田綾子、木村紗矢香、守屋祐貴子、輪千安希子、小林義雄、中居龍平、神崎恒一、鳥羽研二: 介護負担軽減における在宅

介護サービスの効果の検討 認知症の高齢者総合機能評価を用いた縦断解析. 第29回認知症学会. 名古屋, 2010年11月.

17. 町田綾子、木村紗矢香、山田如子、神崎恒一、鳥羽研二: 認知症症例に対する標準失語症検査 (SLTA) の検討. 第29回認知症学会. 名古屋, 2010年11月.

18. 木村紗矢香、町田綾子、山田如子、守屋祐貴子、輪千安希子、小林義雄、中居龍平、神崎恒一、鳥羽研二: アルツハイマー型認知症 (AD)、前頭側頭型認知症 (FTD)、脳血管性認知症 (VD) の前頭葉機能の比較. 第29回認知症学会. 名古屋, 2010年11月.

19. 小林義雄、岩畔哲也、田中政道、八反丸美喜子、長田正史、守屋祐貴子、輪千安希子、長谷川浩、中居龍平、神崎恒一、鳥羽研二: 突発性正常圧水頭症診断のための定量的画像指標の検討. 第29回認知症学会. 名古屋, 2010年11月.

20. 輪千安希子、長谷川浩、守屋祐貴子、小林義雄、杉山陽一、中居龍平、竹下実希、塚原大輔、宮城島慶、井上慎一郎、佐藤道子、長田正史、清水昌彦、八反丸美喜子、岩畔哲也、須藤紀子、木村紗矢香、山田如子、神崎恒一、鳥羽研二: 釣藤散、抑肝散加陳皮半夏にて心不全を発症した脳血管性認知症の1例. 第29回認知症学会. 名古屋, 2010年11月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病 BPSD 軽減効果の検証

—プラセボ対照無作為化臨床第2相比較試験

高橋 智

岩手医科大学 内科学講座神経内科・老年科分野 准教授

研究要旨: MRIメラニンイメージングによるノルアドレナリンの起始核である青斑核の信号強度の検討では、青斑核の信号は、健常者に比して、MCI の段階ですでに不明瞭となっており、群間比較でも MCI の段階で青斑核の信号強度は有意に低下していた。MCI における青斑核ニューロンの変化は病理学的にも報告されており、今後、このような分子イメージングが MCI における易怒性の予測に寄与できる可能性がある。

A. 研究目的

MRI メラニンイメージングでノルアドレナリンの起始核である青斑核の信号強度を検討することにより、易怒性をはじめとする BPSD の発症の予測に役立てる。

B. 研究方法

MCI 患者 13 名、アルツハイマー病患者 8 名、健常ボランティア 20 名を対象に、3T MRI T1 強調画像で、第4脳室底に直交する斜位水平断メラニン画像を撮像し、上小脳脚交叉付近の白質を標準部位として、青斑核に関心領域を設定し、正常対照群、MCI 群、アルツハイマー病群における青斑核相対コントラストを比較した。

(倫理面への配慮)

検査にあたっては、書面でのインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

青斑核の信号は、健常者に比して、MCI の段階ですでに不明瞭となっており、群間比較でも MCI の段階で青斑核の信号強度は有意に低下していた。

D. 考察

メラニンに捕捉された Fe³⁺がメラニンの T1 短縮作用の主たる要因であると考えられている。青斑核の鉄含量は加齢変化も小さく、青斑核は、MRI を用いたメラニンイメージングに適した部位といえる。黒質緻密層や青斑核のメラニンイメージングは 1.5T MRI では描出が難しく、3T MRI を用いた本法では、脳実質の T1 緩和延長によるコントラストの強調、3T による S/N 比、空間分解能の向上、Fast spin echo 法による磁化移動効果が相乗的に作用して、描出が可能になったものと考えられる。

E. 結論

アルツハイマー病における、病理学的検討で、青斑核病変と認知症の重症度および罹病期間の間に有意な相関を認めたと
いう報告があり、MRI 検査は、アルツハイマー発症早期の青斑核の病変を示唆しており、易怒性の予測に寄与できる可能性
がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高橋智「Patient-centred dementia
medicine:生活障害を診て、家族に関わり、
能力を引き出す医療」第 29 回日本認知
症学会学術集会
(DementiaJapan,2010,No.24,Vol3,265)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)
漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病 BPSD 軽減効果の検証
—プラセボ対照無作為化臨床第2相比較試験—
分担研究報告書

— 基礎薬理学, プラセボ識別試験 —

分担研究者 鳥居塚和生 昭和大学 薬学部 教授

要旨: 実薬とプラセボの識別試験を実施することを分担研究の主たる目的としているが、本年度は味覚識別の一つのファクターとなる嗅覚の寄与に関する検討を実施した。即ち、本年度は嗅覚障害モデルマウスを用いて、感覚器入力に対する行動薬理的検討を実施し、実薬およびプラセボ作成における生物学的評価基準の作成を目的として研究を行った。パイロット試験として既に分担研究者が抗不安作用を見出しデータの蓄積のある加味逍遙散(カシヨウヨウサン)、類似処方(ウケイトウ)について比較検討した。その結果、嗅覚障害モデル動物が記憶学習障害の評価モデルの一つとなり、抑肝散の実薬およびプラセボを投与したときの生物学的力価の評価法になる可能性を明確にした。

A. 目的

実薬とプラセボの識別試験を実施することを分担研究の主たる目的としているが、本年度は味覚識別の一つのファクターとなる嗅覚の寄与に関する検討を実施した。即ち、実薬およびプラセボの識別に関わる因子として考えられる感覚として寄与するものは、味覚だけではなく視覚、嗅覚によるものの寄与も大きい。但し視覚においては剤型の形状や色調を調整することで対応が比較的たやすいが、嗅覚はその識別能力は味覚に比べて数段に高く、プラセボ投与の際に与えている影響は少ない。

既に当研究室では嗅覚障害モデル動物による基礎検討を行い、嗅覚障害により嗅球での dopamine(DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid

(DOPAC)量の低下を抑制することを見出している。そこで本年度は嗅覚障害モデルマウスを用いて、感覚器入力に対する行動薬理的検討を実施し、実薬およびプラセボ作成における生物学的評価基準の作成を目的として研究を行った。併せて嗅覚障害による記憶学習能への影響、およびそれに対する漢方処方の経口投与の効果、脳内モノアミン類への影響について検討した。今回は、漢方処方としてはパイロット試験であることから、既に分担研究者が抗不安作用を見出しデータの蓄積のある加味逍遙散(カシヨウヨウサン)を中心にした。また類似処方(ウケイトウ)と比較検討した。

B. 研究方法

1. 嗅覚障害モデルマウスの作成・被験薬投与プロトコール
 - 1-1. 被験薬の調製

加味逍遙散および温経湯は、生薬より常法に従い調製した。すなわち 1 日分の生薬を煎じ器(ウチダ和漢薬)に入れ、水 600 mL を加えて 40 分煎じた。熱時綿栓ろ過し、室温になってから遠心分離した。上清を吸引ろ過後、凍結乾燥を行いエキスを得た。

1-2. 投与実験

5週齢雄性 ddY 系マウスを三協ラボより購入し実験に用いた。動物実験室にて1週間の馴化後、4匹ごとに対照群(Control)、嗅覚障害(OBL)対照群、加味逍遙散投与群(OBL-KSS)、温経湯投与群(OBL-UKT)の4群に分けた。被験薬は 50mg/kg/day となるように水に溶解し、給水瓶にて自由摂取させた。対照群には蒸留水を自由摂取させた。

1-3. 嗅覚障害

被験薬投与1週間後に以下の操作を行った。マウスをエーテル麻酔下にて上に仰向けに寝かせ、両側の鼻腔内にマイクロシリンジを用いて5%硫酸亜鉛 20 μ L を点鼻し嗅覚障害を惹起した(OBL)。対照群には日本薬局方 注射用水 蒸留水(LOT.K0K83,大塚製薬工業)を点鼻した。5%硫酸亜鉛は、硫酸亜鉛 7 水和物(SIGMA, LOT.113K0037)0.873g を蒸留水 10.0 mL に溶解して調整した。

なお別に、後投与実験として5%硫酸亜鉛点鼻後より温経湯(50mg/kg/day)を投与した実験も行った。

2. 記憶学習試験

OBL 処置 24 時間後に Step-through 型受動的回避学習試験装置を用い獲得試行を行った。電気刺激の強度は予備実験より 0.5mA, 3sec と設定した。獲得試行 24 時間, 48 時間, 96 時間後に記憶保持能の測定を行った。5分間(300sec)を観察時間としてそれ以降はカット

オフした。自発運動量は記憶学習試験終了2日後にオープンフィールドを用いて測定した。

3. 脳の摘出, 分画

オープンフィールド実験終了後、脳を摘出し直ちに液体窒素により凍結し、 -80°C にて冷凍保存した。脳分画は、ドライアイス存在下で脳アトラスに従って切り出しを行い、嗅球、大脳皮質、背側海馬、腹側海馬、中隔野、嗅内野、視床下部の7つに分画した。各組織切片は 1.5 mL の PP チューブに入れ凍結保存した。

4. 脳内モノアミンの抽出・測定

嗅球分画を試料として DA, DOPAC の抽出をエイコム社のモノアミン抽出方法に従い実施した。測定は ECD-HPLC(電気化学検出器-HPLC)を用いて DA, DOPAC の標準品を用いた検量線作成後、嗅球抽出液を測定した。

C. 結果

1. 記憶学習試験結果

OBL-コントロールマウスは経日的に反応潜時の短縮傾向がみられた。一方、嗅覚障害マウスに KSS, UKT を投与した群では反応潜時の短縮が認められなかった。(図1)

24 時間後, 96 時間後を群間で比較すると, 96 時間後には OBL 群で対照群に捕獲して有意な反応潜時の短縮が認められ, これに対して KSS 投与群, UKT 投与群では短縮を抑制していることが示された。

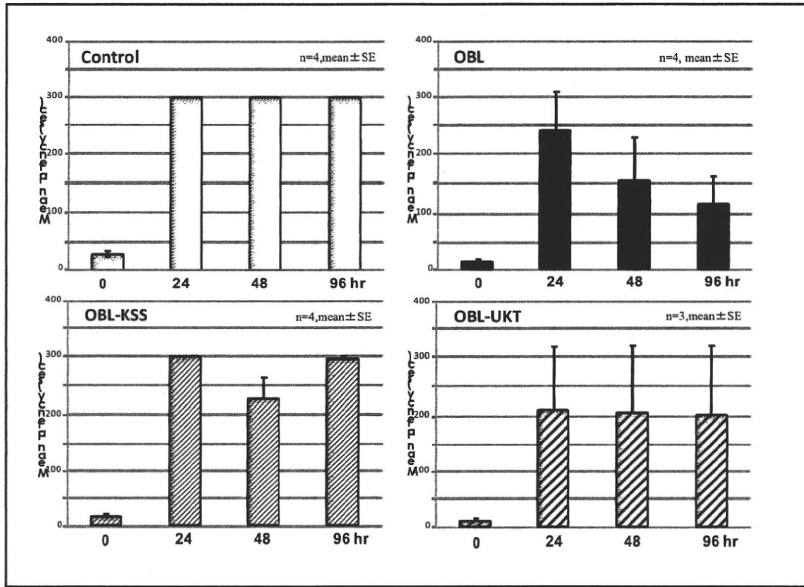


図1. 嗅覚障害モデルマウスの記憶保持能の変化および漢方薬投与の影響(後足)

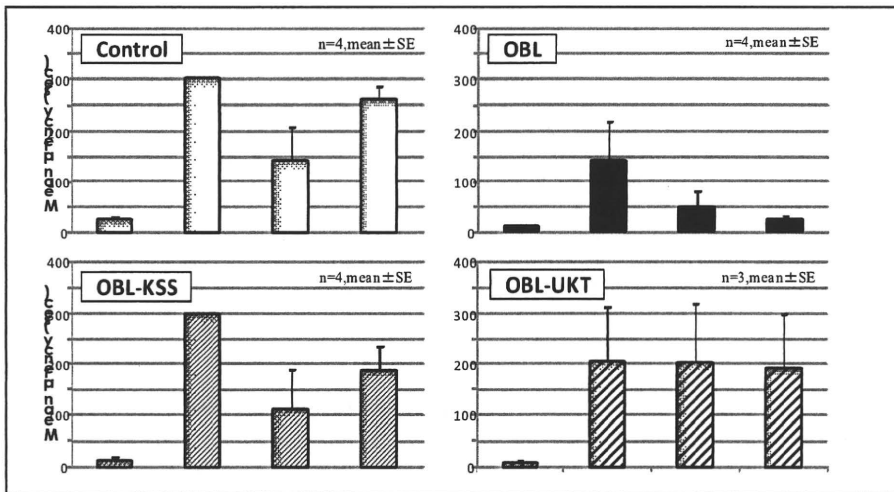


図2. 嗅覚障害モデルマウスの再生試行時の前足挿入までの時間と漢方薬投与の影響

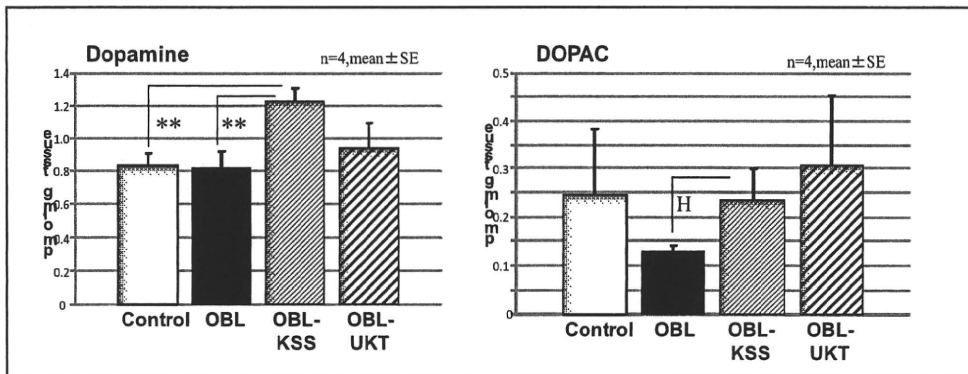


図3. 嗅球内 dopamine, DOPAC 含量への影響 (**:p<0.01)

前足を暗室に入れるまでの時間を示したものが図2であるが、暗室内への探索行動を始めるまでに要する時間が対処群に比較して、OBL 群では早まることが観察された。この前足をに入れるまでに要する時間も KSS 投与群、UKT 投与群では抑制していることが示された。

なおオープンフィールドを用いた自発運動量を測定した結果では、群間での相違はなく、鎮静などによる影響ではないと考えられた。

2. 温経湯の後投与実験

嗅覚障害後に UKT を摂取させたマウスにおいても、嗅覚障害による反応潜時の低下を抑制した。この結果は、予防的な前投与だけでなく、治療的な意義も示唆する成績であった。

3. 嗅球 Dopamine (DA), DOPAC 測定結果 (**:p<0.01, Φ :p<0.1)

嗅球はドーパミン神経系が有意なことが分かっているため、DA, DOPAC 量の変動に着目し、検討した。図3に示すように、DA では漢方薬投与で含量の増加傾向が観察された。DOPAC では OBL で低下し、これに対して漢方薬投与で低下の抑制傾向が示された。

D. 考察と結論

記憶学習試験より嗅覚障害(OBL)により記憶学習試験記憶保持能低下が認められた。これに対し、漢方処方の経口投与は反応潜時が延長され、記憶保持能の低下を抑制した。経目的にも低下を抑制することが確認できた。温経湯では、OBL 処置後投与においても記憶保持能を改善することが示された。嗅球での DA, DOPAC 含量は、OBL により DOPAC の減少が認められたが、DA では認められなかった。しかし、漢方処方投与により含量の増加

あるいは減少抑制が示唆された。今後、未測定試料を測定し、解析する必要があると考えている。また対照群に対する漢方処方を投与時の影響も検討する必要があると考えている。

漢方薬が、感覚器障害やそれに伴う症状の改善に有効な治療法となる可能性がある。これに加え、この嗅覚障害モデル動物は記憶学習障害の評価モデルの一つでもあり、次年度以降は、抑肝散の実薬およびプラセボを投与したときの生物学的力価の評価法になる可能性がある。次年度の検討課題と考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 国際学会

なし

2. 国内学会

1. 鳥居塚和生:漢方医薬の研究および教育、国際社会における日本の役割と展望, 第13回天然薬物研究方法論アカデミー 覚王山シンポジウム, 2010.08.21-22, 名古屋

2. 鳥居塚和生:医学分野における国際標準化の現状と展望, 天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2010. 11. 11 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金(認知症対策総合研究事業)

分担研究報告書

分担研究課題 抑肝散プラセボ分析に関する研究

分担研究者 川原 信夫 独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター長

—抑肝散プラセボの味覚評価並びに化学分析に関する研究—

本研究では、漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第2相試験として実証することを到達目標としている。今回我々は、2009年に新規開発された「抑肝散」プラセボの味覚的な標準化を目的として味認識装置による実薬とプラセボの味覚評価を行い、それらの味の共通点、相違点を数値化して両者の味に関する評価を行うとともに、LC-NMR-MSを用いた化学分析を通じて、両者の成分比較を行った。

LC-NMR-MSを用いた化学分析では、抑肝散エキスとプラセボ両者に含有される構成成分は全く異なることが示された。特にプラセボにはUV(254 nm)吸収が認められる化合物は多く存在せず、全般的に見ても含有化合物が少ないことが判明した。

味認識装置による検討では、抑肝散エキスには酸性苦味、渋味、塩基性苦味後味、旨味、塩味及び甘味が検出された。一方プラセボでは、明確に検出された味要素は旨味及び甘味のみであり、抑肝散エキスとプラセボは明らかに異なる味を呈することが示された。また、抑肝散エキスには明らかに生薬特有のにおいがあり、特に本処方の構成生薬のうちセンキュウ及びトウキに由来すると考えられる特徴的なにおいが感じられた。しかしプラセボ液には特に生薬特有のにおいは感じられなかった。漢方薬を服用した経験のある人は、漢方薬には独特のにおいがあることを知っていると推測される。従って、抑肝散のプラセボをより抑肝散らしくするためには、プラセボに抑肝散特有のにおいを加味することも臨床試験を行う上で有用であると考えられる。

研究協力者

安食菜穂子 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー プロジェクトマネージャー

赤木謙一 独立行政法人医薬基盤研究所共用機器実験室 研究員

A. 研究目的

アルツハイマー病は人生の収穫期とも言うべき晩年において、人間らしく生きるための様々な生活機

能を奪い取り、アルツハイマー病の発症は実社会との決別を意味し、介護にあたる家族は自らの生活の質を犠牲にしながらその精神的・肉体的負担は計り知れない。認知症において従来研究者が注目してきたのは主として中核症状であるが、実際患者を介護する家族にとって最も深刻な問題となるのは精神症状や問題行動、すなわち幻覚、妄想、脱抑制、昼夜逆転、徘徊、易興奮性、介護への抵抗、暴言、抑うつ、意欲障害、不安、焦燥などの周辺症状である。こ

これらの周辺症状に対して今日では Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD) という用語が用いられている。BPSD は介護負担感を増強する大きな要因であり、さらに重い介護負担感、介護者のうつ傾向を一層助長することが知られている。認知症患者を抱える家族の介護負担の軽減を計るにはまずこの BPSD への対策が第一となる。本研究では漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第 2 相試験として実証しようとするものである。認知症における抑肝散の有効性と安全性を報告した研究は多いが、これまではプラセボが開発されなかったため、プラセボを比較対照として検証したエビデンスレベルの高い研究は皆無であった。2009 年、(株)ツムラから抑肝散のプラセボの作成に成功したことが初めて報じられた。本研究では両者の成分比較を目的として、LC-NMR-MS を用いた化学分析を行った。

一方、日局に記載されている生薬は、その各条において性状の項に記載される“味”が適否の判定基準とされている。従って生薬や生薬から調製される漢方処方における味の表現は、化学的合成医薬品と比べてより重要であり、客観的であることが望まれる。しかし現段階では、味は試験者の主観に基づいて評価されさせているため統一された基準がなく、客観性のある評価基準の設定が重要であると考えられる。我々は漢方処方の品質評価研究の一環として味認識装置を用いた漢方処方の味の客観的な評価を試みており、これまでに漢方処方の味の数値化が可能であり、数種類の漢方処方に関して特徴的な味要素を捉え得ること等を明らかにしている¹⁻⁴⁾。本研究ではプラセボの味覚的な標準化を目的として、味認識装置による実薬とプラセボの味覚評価を行い、それらの味の共通点、相違点を数値化して両者の味に関する評価を試みた。

B. 研究方法

1. 実験材料

抑肝散エキス(臨床研究用)及びプラセボ(臨床研究用)は株式会社ツムラより入手した。

2. 装置

1) LC-NMR-MS による検討

LC-NMR-MS の測定に関して、LC 部は Agilent 1200 series (Agilent Technologies, ポンプ: Quat Pump, 紫外可視検出器: VWD, オートサンプラー: ALS) に、カラムオープンとして BPFU-O (Bruker) を用いた。MS 部は, esquire 4000 (Bruker)、イオン化源には ESI を用いた。MS-NMR の送液スプリッターとして 20 分の 1 スプリッターを採用した BNMI (Bruker) を用いた。MS に試料を導入する際には、BNMI のミキシングシリンジを用いて、0.2%ギ酸添加済アセトニトリルを添加した。LC と NMR を接続するために、セル容量 30・L を採用した Cryo-FIT (Bruker) を NMR に装着した。LC-MS-NMR を行うために、Loop storage 法を採用するために BPSU-36 (Bruker) を用いた。NMR は TCI クライオプローブ付き AvanceII 800 (Bruker) を用いた。LC 及び LC-MS の制御には Hyster 3.2 (Bruker)、MS の制御には esquireControl version 5.3 (Bruker)、NMR の制御は Topspin 2.0 (Bruker) を用いた。

2) 味認識装置による検討

味測定には、味認識装置 SA402B (株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー) を用いた。各味要素を検出するための脂質膜センサは、C00, AE1, AAE, CT0, AN0 及び GL1 の 6 種類のセンサを用いた。各センサが検出する味要素を表 1 に示す。

3. 試薬・試液

1) LC-NMR-MS による検討

LC-NMR-MS 測定溶媒は D₂O 99% (Cambridge Isotope Laboratories, INC)、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO., INC) を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。

2) 味認識装置による検討

水は、超純水製造装置(野村マイクロ・サイエンス

株式会社、型式 TW-250) で製した超純水を使用した。味センサの洗浄用並びに安定確認用の溶液に用いた塩化カリウム(特級)、塩酸(容量分析用 1 mol/l)、水酸化カリウム(容量分析用 1 mol/l)は和光純薬工業株式会社より、L(+)-酒石酸(特級)、エタノール(電子工業用 99.5)は関東化学株式会社より入手した。

尚、本研究において動物由来試料を用いた実験は行わず、倫理面で大きな支障となる問題は無いと考えられる。

4. 試料の調製

1) LC-NMR-MS による検討

抑肝散エキス、プラセボ、各100 mg を水 1 mL へ懸濁した後、ボルテックスにて、30 min 間攪拌した。13,000 rpmにて遠心後、沈殿を除去した。上記内容を三回繰り返し行った。

2) 味認識装置による検討

抑肝散エキス及びプラセボ各 1 g をそれぞれ水 180 mL へ懸濁し、マグネチックスターラー(HS-30D: アズワン株式会社)を用いて室温、約 600 rpm で 10 分間攪拌した後、あらかじめ塩化カリウム (1 M) 2 mL 並びに酒石酸 (100 mM) 0.2 mL を添加した 200 mL メスフラスコへ移し、水で 200 mL にメスアップした (5 mg/mL)。室温、1,660 x g にて遠心分離後(卓上遠心機 H-27F: 株式会社コクサン)、分取した上清を味測定に供した。塩化カリウムと酒石酸を各 10 mM と 0.1 mM になるように添加した水溶液をブランクコントロールとして味測定に供した。

5. 測定方法

1) LC-NMR-MS による検討

LC 測定条件: 移動相は、(A) D₂O, (B) CH₃CN を用いた。(A) 90%から 20 min で、(A) 0%までリニアグラジエントを行い、20 min から 25 min (A) 0%にて送液した。流速は 1 mL/min で行った。カラムは YMC-Triart C18 4.6 X 150, 粒子径(5 μm) 細孔径(10 μm)を用いた。UV 観測波長は 254 nm、インジェ

クト量は 10 μL とした。

NMR 測定条件: UV 検出器信号、もしくはトータルイオンクロマトによる信号を目的シグナルとして検出し、BPSU-36 を利用した Loop-Storage 法を行った。NMR 測定パラメータの詳細に関しては表 2 にまとめた。表 2 中の NS (積算回数)、RG (レシーバーゲイン)、SPNAM6 (溶媒除去用シェイプドパルス) については各分画についてパラメータを最適化した。¹H-NMR の化学シフト値はアセトニトリルのメチル基シグナルが 1.93 ppm となるように合わせた。

MS 測定条件: LC から MS への導入の際、BNMI を経由することにより流速を 20 分の 1 に減速させ、同時に 20 μL/min の流速でアセトニトリル(0.2% ギ酸)の添加を行った。データは正イオンモードで取得した。詳細な測定パラメータは表 3 にまとめた。

2) 味認識装置による検討

味認識装置を用いて既報⁴⁾と同様に味の測定を行った。塩化カリウム (10 mM) と酒石酸 (0.1 mM) を溶解した水溶液を出力値コントロールとした。試料液の出力値について、ヒトが感じる味強度の違いを推定し、得られた推定値を各味要素の数値とした。今回、本装置を用いて推定した味の要素は、酸性苦味、酸性苦味後味、渋味、渋味後味、塩基性苦味後味、旨味、塩味及び甘味である。尚、塩味を検出するセンサ (CT0) はクエン酸などの有機酸類にも応答する。

C. 研究結果及び考察

1) LC-NMR-MS による検討

抑肝散エキスとプラセボの LC (青色、254nm) 及び BPC (茶色、Base Peak Chromatogram) のチャートを図 1, 図 2 にそれぞれ示した。この結果から、抑肝散エキスとプラセボ両者に含有される構成成分は全く異なることが示された。特にプラセボには、UV (254 nm) 吸収が認められる化合物は多く含まれていないことが判明した。また BPC チャートからも、プラセボは抑肝散エキスと比較して、含有化合物が少ないことが明らかとなった。続いて UV 吸収並びに BPC が強

く認められたフラクションについて NMR 測定を行い (loop 1, 2)、その NMR チャートを図 3 及び図 4 に示した。これらは 6~7 ppm 付近にシグナルが認められたことから、芳香環を有する化合物であると推測された。プラセボでは、抑肝散エキスにおいて顕著に化合物が溶出していた溶出時間 (7~8 min) において、ほとんど溶出が認められなかった。そこで、BPC において吸収の認められた loop 4, 5 を取得し NMR 測定を行った (図 5, 6)。抑肝散エキスとプラセボの両者で共通の溶出時間 (13.9 min) に MS (227.2 m/z) の物質が溶出していた。その NMR スペクトルを図 7 及び図 8 に示した。しかしながら現時点では化合物の同定には至っておらず、今後の検討が必要と考えられた。

2) 味認識装置による検討

本研究に用いた抑肝散エキスとプラセボの味パターンを図 9 に示す。抑肝散エキスには酸性苦味、渋味、塩基性苦味後味、旨味、塩味及び甘味が検出された。一方プラセボでは、明確に検出された味要素は旨味及び甘味のみであり、抑肝散エキスとプラセボは明らかに異なる味を呈することが示された。

味測定に供した試験液についてヒトによる官能試験 (試験者 1 名) を行ったところ、抑肝散エキス液はわずかに甘く、舌に刺激があり、収斂性が残った。一方プラセボ液は、わずかに甘味を感じる以外はほとんど味を感じなかった。また、大きな特徴として、抑肝散エキスには明らかに生薬特有のにおいがあり、特に本処方の構成生薬のうちセンキュウ及びトウキに由来すると考えられる特徴的なにおいが感じられた。プラセボ液には特に生薬特有のにおいは感じられなかった。液の色については、抑肝散エキスは少し青緑がかった黄土色を呈し、プラセボは少し橙色がかった薄い桃色を呈していた。

以上より、味認識装置による測定から得られた結果は、渋味と甘味に関してはヒトの官能と合っていると考えられる。一方、ヒトによる官能試験では表現されなかった苦味や旨味が味認識装置による測定では検出されたことについては、旨味を検出するセンサ

に応答性を示すアミノ酸やその他処方中に含有すると考えられるデンプン質などによってヒトでは苦味がマスクされたのに対し、味センサではこれらを別々に検出した可能性が考えられる。味認識装置による測定において得られた塩味については、いわゆる「しおあじ」ではなく、本処方の構成生薬中に含まれている有機酸⁵⁾に由来するものと考えられる。

D. 結論

本研究では、漢方方剤「抑肝散」によるアルツハイマー病に伴う精神症状・問題行動の軽減効果を、プラセボを比較対照とした臨床第 2 相試験として実証することを到達目標としている。今回我々は、2009 年に新規開発された「抑肝散」プラセボの味覚的な標準化を目的として味認識装置による実薬とプラセボの味覚評価を行い、それらの味の共通点、相違点を数値化して両者の味に関する評価を行うとともに、LC-NMR-MS を用いた化学分析を通じて、両者の成分比較を行った。

LC-NMR-MS を用いた化学分析では、抑肝散とプラセボ薬両者に含有される構成成分は全く異なることが示された。特にプラセボには UV (254 nm) 吸収が認められる化合物は多く存在せず、全般的に見ても含有化合物が少ないことが判明した。

味認識装置による検討では、抑肝散エキスには酸性苦味、渋味、塩基性苦味後味、旨味、塩味及び甘味が検出された。一方プラセボでは、明確に検出された味要素は旨味及び甘味のみであり、抑肝散エキスとプラセボは明らかに異なる味を呈することが示された。また、抑肝散エキスには明らかに生薬特有のにおいがあり、特に本処方の構成生薬のうちセンキュウ及びトウキに由来すると考えられる特徴的なにおいが感じられた。しかしプラセボ液には特に生薬特有のにおいは感じられなかった。漢方薬を服用した経験のある人は、漢方薬には独特のにおいがあることを知っていると考えられる。従って、抑肝散のプラセボをより抑肝散らしくするためには、プラセボに抑肝散特有のにおいを加味することも臨床試験を行う

上で有用であると考えられる。

E. 引用文献

- 1) Anjiki, N., Kawahara, N., Goda, Y., *Natural Medicines*, 59, 164-170 (2005).
- 2) Anjiki, N., Suzuki A., Kawahara, N., Goda, Y., *Shoyakugakuzasshi*, 60, 21-27 (2006).
- 3) Anjiki, N., Yoshino, C., Kawahara, N., Goda, Y., *Shoyakugakuzasshi*, 61, 6-13 (2007).
- 4) Anjiki, N., Hosoe, J., Fuchino, H., Kiuchi, F., Sekita, S., Ikezaki, H., Mikage, M., Kawahara, N., Goda, Y., *Journal of Natural Medicines*, 65, 293-300 (2011), in printing.
- 5) Akamatsu, K., “Shintei Wakanyaku”, Ishiyaku Publish. Inc., Tokyo, 1970, (ISBN 4-263-73701-6), pp. 13-15, 77-78, 183-184, 186-187, 189-190, 327-329, 706-707, and cited therein.

F. 健康危険情報

本研究において健康に危険を及ぼすような情報はない。

G. 研究発表

1. 誌上发表
なし
2. 学会発表等
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 味測定に用いたセンサと各センサが検出する味要素

センサ名	センサが検出する味要素
C00	酸性苦味
	酸性苦味後味
AE1	渋味
	渋味後味
AN0	塩基性苦味後味
AAE	旨味
CT0	塩味
GL1	甘味

表 2 MS 測定条件

Mode		Tune SPS	
Mass Range Mode	Std/Normal	Target Mass	500 m/z
Ion Polarity	Positive	Compound Stability	90 %
Ion Source Type	ESI	Trap Drive Level	100 %
Alternating Ion Polarity	off	Optimize	Normal
Current Alternating Ion Pol	Positive	Smart Parameter Setting	active
Divert Valve	to Source		
Tune Source		Trap	
Trap Drive	36.9	Rolling	on
Octopole RF Amplitude	150.0 Vpp	Rolling, Averages	2 cts
Lens 2	-60.0 Volt	Scan Begin	100 m/z
Capillary Exit	116.7 Volt	Scan End	1000 m/z
Dry Temp (Set)	320 °C	Averages	8 Spectra
Nebulizer (Set)	30.00 psi	Max. Accu Time	200000 µs
Dry Gas (Set)	7.00 l/min	ICC Target	30000
HV Capillary	4000 V	Charge Control	on
HV End Plate Offset	-500 V		

表 3 NMR 測定条件

PULPROG =	lc1pncwps	Channel f1	
TD =	16384	NUC1 =	1H
NS =	1024	P1 [µs] =	10.00
DS =	8	P18 [µs] =	100000.00
SWH [Hz] =	16025.64	PL1 [dB] =	3.00
AQ [s] =	0.5112308	PL1W [W] =	9.30345917
RG =	203	SFO1 [MHz] =	800.2017941
DW [µs] =	31.200	SP6 [dB] =	53.98
DE [µs] =	20.00	SP6W [W] =	0.00007425
D1 [s] =	3.00000000	SPNAM6 =	p_ak_11022413
D11 [s] =	0.03000000	SPOAL6 =	0.500
d12 [s] =	0.00002000	SPOFFS6 [Hz] =	0.00
d13 [s] =	0.00000400	Channel f2	
D8 [s] =	0.10000000	NUC2 =	13C
16 =	30	PL2 [dB] =	0.00
17 =	1	PL21 [dB] =	26.00
TD0 =	1	PL21W [W] =	0.27699026
		PL2W [W] =	110.27181244
		SFO2 [MHz] =	201.2108424