

平成24年度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)

大阪市立大学老年科神経内科における抑肝散治験の経験

分担研究者 嶋田裕之、

大阪市立大学 大阪市立大学老年内科・神経内科

研究要旨:本年度は最終的に12例の症例のエントリーを行い、昨年度と合わせて合計18例の同意取得例数となった。しかしその内4例は治験開始前に選択基準に合致せず脱落し、本年度の最終的な登録例数は8例であった。さらにそのうち1例は最初の1ヶ月で脱落、もう1例は2ヶ月目で脱落となり、最終的には6例が治験を完全に終了することができた。

**A. 研究目的**

アルツハイマー型認知症患者のBPSDに対して抑肝散の有効性を二重盲検試験にて評価する。

**B. 研究方法**

昨年同様に症例登録を行った。当院では治験事務局と協議の結果、院内CRCの協力を得られることが可能となったので症例の組み入れが行いやすくなった。すなわちCRCがentryにあたっての的確性の再確認、インターネットでの患者の登録、薬剤の確認、データの整理、ネットでの登録などを分業で行った。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪市立大学倫理委員会の承認をうけた。

**C. 研究結果**

患者の詳細を表1に示す。本年度は12例の症例エントリーを行い、昨年度と合わせて合計18例の同意取得例数となった。しかしその内1例は治験開始前のNPI-Q-Jが、1例はMMSE-Jが選択基準に当てはまらなかったため、組み込みできなかった。また1例は同意取得したもののすぐに撤回となったため、脱落、また1例は血液検査にてAST/ALTが基準値以上であったため脱落となった。そのため本年度の最終的な登録例数は8例であった。しかしその内1例は最初の1ヶ月で併用が禁止されている他の漢方薬を内服したため中止、またもう1例も2ヶ月目に被験者本人が帰郷することになったため脱落となり、最終的には6例が治験を終了することができた。

表1.

症例	年齢	性別	MMSE	NPI-Q-J 合計(興奮、 易刺激性)	
7	77	女	22	3 (0)	選択基準に合致せず
8	79	男	23	8 (2)	終了
9	81	男	26	12 (3)	終了
10	80	女	20	8 (2)	併用禁止薬使用のため中止
11	72	男	26	10 (6)	終了
12	72	男	-	-	同意撤回にて脱落
13	79	男	15	10 (4)	被験者が帰郷するため脱落
14	69	女	23	8 (4)	終了
15	80	女	11	10 (2)	終了
16	67	男	27	4 (2)	選択基準に合致せず脱落
17	83	女	20	7 (3)	終了
18	70	男	20	7 (2)	AST/ALT高値のため脱落

#### D. 考察

院内治験事務局と協力して行った結果、予定通りの症例数を組み入れることができた。本研究は多施設共同による二重盲検試験であるが、今年度が最終年度で有り、全体としても症例が予定通り組み入れられた。今後はデータ解析が重要と考えられる。

#### E. 結論

予定通りの症例の組み入れが行われた。

#### F. 研究発表(平成24年度)

##### 1. 論文発表

1. Takeuchi J, Shimada H, Ataka S, Kawabebe J, Mori H, Mizuno K, Wada Y, Shiomi S, Watanabe Y, Miki T.: Clinical Features of Pittsburgh

Compound-B-Negative Dementia. Dement Geriatr Cogn Disord . 2012 ;34 : 112 - 120.

2. Honjo Y, Ito H, Horibe T, Shimada H, Nakanishi A, Mori H, Takahashi R, Kawakami K. Derlin-1-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer's disease. Neuroreport 11;23(10):611-615.
3. Tamura A, Sonoo M, Hoshino S, Iwanami T, Shimada H, Miki T, Shimizu T. Stimulus duration and pain in nerve conduction studies. Muscle and Nerve. 2012 47 (1):12 - 6.
4. Tsutsumi R, Hanajima R, Hamada M, Shirota Y, Matsumoto H, Terao Y, Ohminami S, Yamakawa Y, Shimada H, Tsuji S, Ugawa Y. Reduced Interhemispheric Inhibition in Mild Cognitive Impairment. Experimental Brain Research. 2012 218: 21 - 26.

##### 1. 学会発表

1. 安宅鈴香、嶋田裕之、竹内潤、高橋和弘、和田康弘、武田景敏、山川義宏、田村暁子、山本圭一、伊藤和博、葛田強司、塩見進、中西亜紀、渡邊恭良、三木隆己：臨床的にADと診断されたがPiB-PETでFTLDが疑われた6症例の検討、第53回日本神経学会総会、2012、東京
2. 武田景敏、嶋田裕之、伊藤和博、安宅鈴香、竹内潤、山川義宏、山本圭一、正木秀樹、葛田強司、三木隆己：多発性硬化

- 症 (MS) の皮質病変 - Double inversion recovery (DIR) 法を用いた検討 - 第 53 回日本神経学会総会、2012、東京
3. 田村暁子、園生雅弘、嶋田裕之、三木隆己：感覚神経における電気刺激の刺激持続時間と疼痛強度の関連。第 53 回日本神経学会総会、2012、東京
  4. 安宅鈴香、嶋田裕之、竹内、正木秀樹、中西亜紀、和田康弘、渡邊恭良、三木隆己：前頭側頭葉変性症の PiB-PET によるアミロイドイメージング。第 54 回日本老年医学会学術集、2012、東京
  5. 嶋田裕之、認知症の画像・バイオマーカー 第 3 回日本血管障害性認知障害研究会 シンポジウム 2012、東京
  6. 嶋田裕之：アルツハイマー病の早期診断・治療のためのガイドラインにむけて画像 (MRI、PiB-PET) 第 31 回認知症学会学術集会シンポジウム、2012 つくば
  7. Jun Takeuchi, Hiroyuki Shimada, Suzuka Ataka, Joji Kawabe, Hiroshi Mori, Kei Mizuno, Yasuhiro Wada, Susumu Shiomi, Yuyoshi Watanabe, Takami Miki: Clinical features of Pittsburgh Compound-B-negative dementia, 2012, Vancouver, Canada.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 24年度総括研究報告書  
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Ⅱ相比較試験

研究分担者 伊東大介

研究要旨:認知症における介護において、最も深刻な問題である周辺症状 (Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia (BPSD)) に対しては、確立した治療はない。一方、抑肝散は小児の精神不安などに対して、母児同服処方として使用されている。アルツハイマー型認知症患者の BPSD に対する抑肝散の有効性について、「プラセボを用いたランダム化二重盲験比較試験」を目的に、NPI-Q を主要評価項目としてプラセボ群に対する抑肝散 7.5g/日実薬群の優越性を検討する。合わせて本剤の 12 週投与時の安全性についても検討する。当大学では、本研究に適した症例の選定を厳密に行い、神経心理検査、遺伝子解析、生化学的解析を駆使して症例エントリーの効率化を試みた。その結果、本研究に適した 2 症例をエントリーした。

**A. 研究目的**

認知症における介護において、最も深刻な問題である BPSD に対しては、確立した治療はない。一方、抑肝散は小児の夜泣きや離乳に伴う精神不安などに対して、母児同服処方として使用されている。認知症における有効性と安全性は、単盲験無作為化比較試験によって 2005 年初めて報告された。本研究では、アルツハイマー型認知症患者の BPSD に対する抑肝散の有効性評価のため、「プラセボを用いたランダム化二重盲験比較試験」を行う。

**B. 研究方法**

アルツハイマー型認知症患者の BPSD に対

する抑肝散の有効性について、4 週間後の NPI-Q を主要評価項目、4 週間後以外の NPI-Q 及び MMSE-J を副次評価項目としてプラセボ群に対する抑肝散 7.5g/日実薬群の優越性を検討する。合わせて本剤の 12 週投与時の安全性についても検討する。

当大学では、対象患者の選定に際して NINCDS-ADRDA の診断基準以外に、厳格に診断するシステムの構築を目指した。すなわち、スクリーニング検査として Mini Mental Scale Examination (MMSE)、Clock Drawing Test (CDT)、レーヴン色彩マトリックス検査 (RCPM)、Rey の 15 語記銘 (RAVLT)、Rey の複雑図形 (ROCFT)、WMS-R の論理的記憶 II、Trail

Making Test (TMT)、Stroop Test、語流暢性課題 (Word fluency)を行い効率よく記憶、前頭葉機能を定量的に評価することを試みた。さらに、遺伝子解析 (apoE 遺伝子多型)、生化学的解析 (血清、髄液の  $A\beta$  42/40, リン酸化 tau の測定)を行いより診断技術の向上を目指した。

### C. 研究結果

上記検査法を用いて、本研究に適した2症例のエントリーした。両症例とも典型的アルツハイマー型認知症と診断した。

症例 07-1:治療開始時 MMSE 19 点、NPI 6 点、二重盲検後、MMSE 16 点、NPI 5 点、オープンラベル後、MMSE 21 点、NPI 3 点

症例 07-2:治療開始時 MMSE 22 点、NPI 26 点、二重盲検後、MMSE 27 点、NPI 19 点、オープンラベル後、MMSE 24 点、NPI 4 点  
両症例ともオープンラベル後 NPI の改善をみとめる。

### D. 考察

上述のスクリーニング神経心理検査により検査時間の効率化が可能となった。遺伝子解析、生化学的解析 (血清、髄液の  $A\beta$  42/40, リン酸化 tau の測定)を行うことにより、本研究に適した2症例のエントリーが可能となった。

### E. 結論

確立したスクリーニング神経心理検査、遺伝子解析、生化学的解析はアルツハイマー型認知症患者の選定の効率化に有効であった。

抑肝散のプラセボ対照無作為化臨床第 II 相

比較試験の最終結果が期待される。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1.論文発表

- 1) Ito D\*, Yagi T, Ikawa M, Suzuki N. Characterization of inclusion bodies with cytoprotective properties formed by seipinopathy-linked mutant seipin. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(3): 635-646. (IF=7.636)
- 2) Yagi T, Kosakai A, Ito D\*, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Nabetani A, Ishikawa F, Arai Y, Hirose N, Okano H, Suzuki N. Establishment of induced pluripotent stem cells from centenarians for neurodegenerative disease research. *PLoS One.* 2012; 7(7):e41572. (IF=4.092)
- 3) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, Nihira T, Kobayashi T, Ohyama M, Sato S, Takanashi M, Funayama M, Hirayama A, Soga T, Hishiki T, Suematsu M, Yagi T, Ito D, Kosakai A, Hayashi K, Shouji M, Nakanishi A, Suzuki N, Mizuno Y, Mizushima N, Amagai M, Uchiyama Y, Mochizuki H, Hattori N, Okano H\*. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2

- iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain*. 2012;5(1):35.
- 4) Nihei Y, Ito D\*, Suzuki N. Roles of ataxin-2 in pathological cascades mediated by TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43) and Fused in Sarcoma (FUS). *J Biol Chem*. 2012; in press. (IF=4.773)
  - 5) Yagi T\*, Osaka M, Ito D, Nihei Y, Ohira T, Takahashi S, Suzuki N. Drug-induced intracranial cystic lesion: a complication of antibiotic treatment via an Ommaya reservoir. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2012; in press.
  - 6) Ito D\*, Okano H, Suzuki N. Accelerating progress in iPS cell research for neurological diseases. *Ann Neurol*. 2012; 72(2): 167-174. (IF=11.089)
  - 7) 二瓶義廣, 伊東大介, 鈴木則宏. 家族性 ALS と sALS 発症関連遺伝子オーバービュー — *Clinical Neuroscience* 2011; 29(9):1074-1075.
  - 8) 吉崎崇仁, 伊東大介, 鈴木則宏. 臨床経過と日常診療における診断・治療のポイント
  12. 血管性認知症とその類縁疾患 *認知症学 (下)* 2012; 315-319.
  - 9) 伊東大介 神経変性疾患における iPS 細胞研究の現状と展望 —アルツハイマー病 iPS 細胞の樹立と解析— 遺伝子医学 MOOK 2012; 22: 80-86.
  - 10) 伊東大介, 鈴木則宏. アルツハイマー病の根本治療への展望 *細胞工学 監修 鈴木則宏/伊東大介* 2012; 31(10): 1086-1089.
  - 11) 八木拓也, 伊東大介. iPS 細胞技術を用いたアルツハイマー病の疾患モデリング. *細胞工学* 2012; 31(10): 1143-1148.
  - 12) 伊東大介, 鈴木則宏. アルツハイマー病克服への挑戦 *Medical science digest* 2012; 9: 422-423.
  - 13) 逢坂麻由子, 伊東大介. 疾患 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病研究 *Medical science digest* 2012; 9: 424-427.
  - 14) 伊東大介. 慶應義塾大学病院メモリークリニック・神経内科—精神・神経科合同診療科の試み— *Cognition and Dementia* 2012; in press.
  - 15) 吉崎崇仁, 伊東大介. あなたも名医！ここを押さえる！パーキンソン病診療 34 のギモンに答える *日本医事新報社* 2012; 113-117.
- ## 2.学会発表
- 1) 二瓶義廣, 吉崎崇仁, 伊東大介, 岡瑞紀, 高野晴成, 加藤隆, 田淵肇, 三村將, 鈴木則宏. 当院メモリークリニック通院患者における Ataxin2 遺伝子の CAG リピート数の検討. 第 109 回日本内科学会総会・講演会, 京都, 2012.4.
  - 2) 松本紘太郎, 中原仁, 伊東大介, 清水利彦, 高橋慎一, 鈴木則宏. エタネルセプト投与中に中枢神経系に多発する脱髄病変を来した 27 歳女性例. 第 109 回日本内科学会総会・講演会, 京都, 2012.4.
  - 3) Ito D. Conjoint pathological cascades mediated by RNA-binding proteins, TDP-43, FUS and Ataxin-2. (シンポジウム) 第 53 回日本神経学会総会, 東京, 2012. 5
  - 4) Yagi T, Ito D, Nihei Y, Ishihara T, Suzuki N.

Progressive motor deficit linked to ER stress in mutant seipin transgenic mice. 第53回日本神経学会総会, 東京, 2012. 5

- 5) Nihei Y, Yagi T, Yoshizaki T, Ito D, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Okano H, Suzuki N. Induced pluripotent stem cell models from spinal and bulbar muscular atrophy. 第53回日本神経学会総会, 東京, 2012. 5.
- 6) 伊東大介. 神経疾患 iPS 細胞の現状と展望 Overview. (シンポジウム) 第53回日本神経学会総会, 東京, 2012. 5.
- 7) 伊東大介. 神経変性疾患における iPS 細胞研究の急進展 -アルツハイマー病 iPS 細胞の樹立と解析- イブニングセミナー 第53回日本神経学会総会, 東京, 2012. 5.
- 8) 伊東大介. レビー小体型認知症を正しく理解する (シンポジウム) 第53回日本神経学会学術大会市民公開講座, 東京, 2012. 5.
- 9) 八木拓也, 小堺有史, 伊東大介, 岡田洋平, 赤松和土, 二瓶義廣, 鍋谷彰, 石川冬木, 広瀬信義, 岡野栄之, 鈴木則. Generation of iPS cells from centenarians for neurodegenerative disease research. 第31回日本認知症学会学術集会, 茨城, 2012. 10.

平成 24 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、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、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学的検討を実施し、実薬およびプラセボ作成における生物学的評価基準作成を目的として研究を行った。先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。またこのモデルは嗅球におけるドーパミンレベルの著しい低下とともに受動的回避課題の大幅な減衰を引き起こすが、これには嗅球における神経伝達物質の機能を持つとされる L-カルノシンが関与することを示し、中枢におけるドーパミン神経系制御に L-カルノシンが寄与することを明らかにした。今回、更にドーパミン再取り込み阻害薬ノミフェンシンを用い、ドーパミンの関与について検討を行い、生物学的力価測定法としての可能性を評価した。

## 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、平成 24 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継続実施した。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。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。昨年度までに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学的検討を実施し、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. 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)および類似処方の温経湯(ウンケイトウ)を対象とした検討を行った.

本年度はドーパミン再取り込み阻害薬ノミフェンシンを用い, ドーパミンの関与について検討を行い, 生物学的力価測定, 評価法としての可能性を検討した.

## 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

漢方処方の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

4-5週齢の雄性 ddY 系マウスあるいは C57BL /6 マウス を三協ラボあるいは日本 SLC 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  $\mu$ 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, 3.2sec 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

嗅球面分を試料として 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。

#### 5. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスへの影響

##### 5-1. 被験薬の調製

Nomifensine maleate (ノミフェンシン; Research Biochemicals International, MA, USA) を用いた。これらの試薬は生理食塩液に溶解し、実験に供した。

##### 5-2. 投与実験

4-5 週齢の雄性 ddY 系マウスあるいは C57BL/6 を日本 SLC 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, ノミフェンシン投与 + 嗅覚障害群 (NOM+OBL) に分けた。

##### 5-3. 記憶学習試験

OBL 処置 72 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, 3.2sec と設定した。獲得試行 24 時間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。

### C. 結果

#### 1. 記憶学習試験結果

昨年度に報告した結果と同様に、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, あるいは 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。本年度は ddY マウス, C57BL/6 マウスで検討したが同じような結果になり種差は認められなかった。嗅覚障害により種差なく受動的回避学習試験では記憶学習能の低下が認められることを確認した。

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。(図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。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。

#### 3. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスの記憶学習能への影響

図2に示したような実験プロトコールで、嗅覚障害の 30 分前にノミフェンシンを腹腔内投与した。ノミフェンシン濃度と投与タイミングはドーパミン再取り込み部位での

6-hydroxydopamine の阻害実験より求め 5.0 mg/kg とした。(図2)

嗅覚障害で記憶学習能の低下が見られたが、ドーパミン再取込み阻害剤のノミフェンシンを嗅覚障害前に投与した場合には、反応潜時の延長が観察された。(図3)

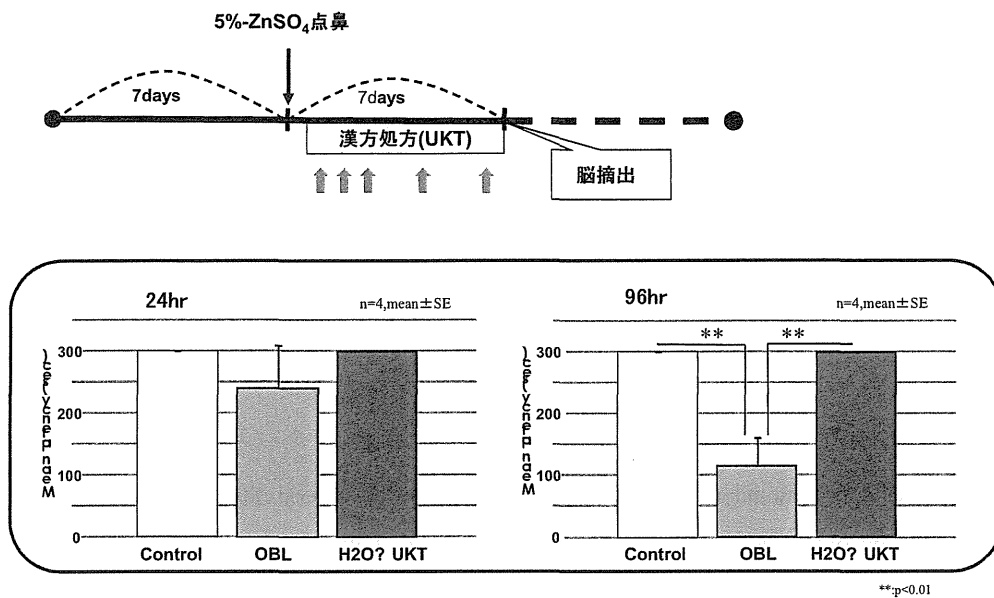


図1. 嗅覚障害モデルマウスへの漢方薬の後投与による記憶保持能の変化

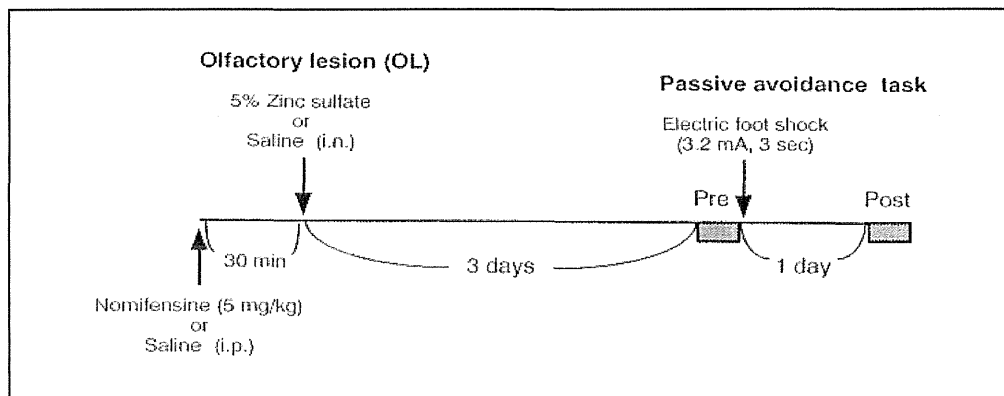


図2. Experimental design for testing the effects of nomifensine pretreatment on peripheral olfactory lesion-induced changes in the passive avoidance task in mice.

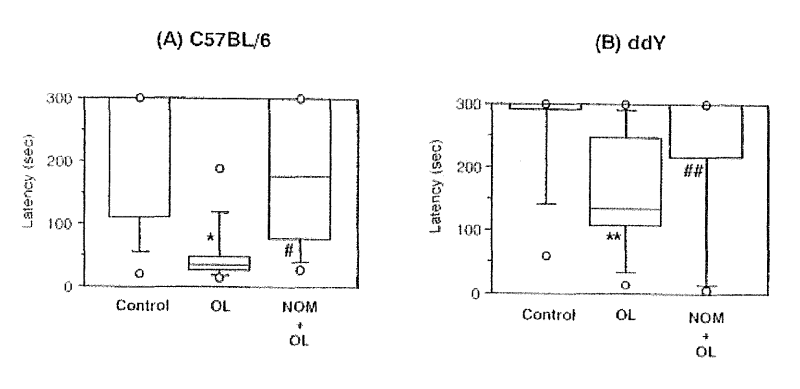


Figure 3. Effects of nomifensine (NOM) pretreatment on peripheral olfactory lesion (OL) - induced impairment of passive avoidance task in C57BL/6 (A: n=9-11) and ddY mice (B: n=9-11). Nomifensine maleate (5 mg/kg) or saline was injected i.p. 30 min before intranasal irrigation with 5% zinc sulfate solution or saline. Three days later, passive avoidance acquisition trials were performed. \*\* p<0.01, \*p<0.05 vs control, ## p<0.01, # p<0.05 vs OL

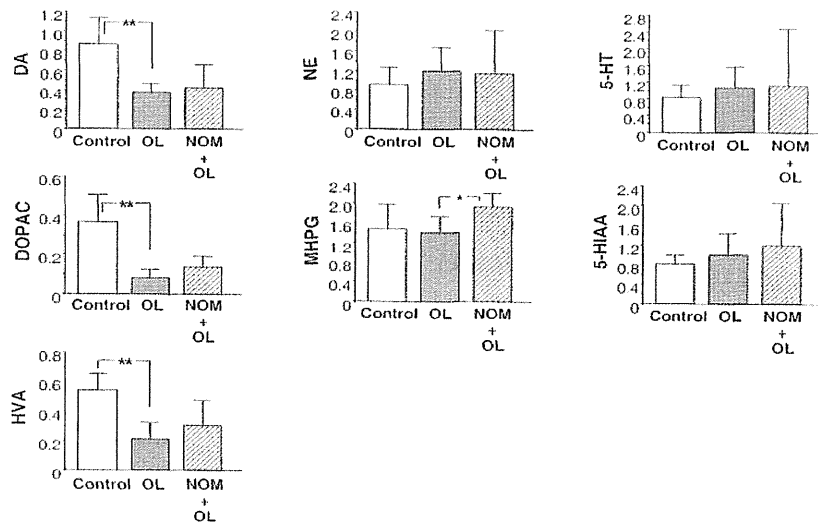


Figure 4. Effects of nomifensine (NOM) pretreatment on peripheral olfactory lesion (OL) - induced monoamines changes in C57BL/6 mice olfactory bulb (p mol/mg tissue). Control; saline pretreatment (-30 min, i.p.) + saline irrigation, OL; saline pretreatment (-30 min, i.p.) + zinc sulfate irrigation, NOM+OL; nomifensine maleate pretreatment (-30 min, i.p.) + zinc sulfate irrigation. \*\* p<0.01, \*p<0.05 vs control

#### 5. ノミフェンシン投与による嗅覚障害モデルマウスの脳内モノアミン類の変化

嗅球中の DA, DOPAC 量は OBL で低下した。しかしノルアドレナリンやセロトニン系の神経伝達物質の変化は認められなかった。これに対するノミフェンシン前投与では、これら DA, DOPAC, HVA (homovanillic acid) などの低下には影響しなかった。MHPG (3-methoxy-4-hydroxy-phenylglycol) で増加が観察された。(図4)

#### 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、漢方処方剤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。経口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、漢方処方剤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剤を投与時の影響も検討する必要があると考えられる。

昨年度は、カルノシンは神経細胞保護の作用を示し、ドーパミン神経系の制御に重要な役割を担っていることを示した。これらは嗅覚が感情や記憶形成機能に深く関わっていることを示唆している。本年度は、このような嗅覚障害が種差にかかわらずに惹起されること、嗅

覚への入力刺激が感情や記憶形成に重要であることを示した。特にノミフェンシン投与では自発運動量に顕著な影響を及ぼさなかったことから、嗅覚障害が記憶学習能へ影響していると考えられる。

一方、ドーパミン系神経系への影響を、神経伝達物質を指標に検討したが、ノミフェンシン投与ではドーパミン含量などの低下を抑制せず、顕著な影響を与えなかった。このことは、記憶学習能には嗅覚のドーパミン系神経系が唯一関与しているわけではないことを示唆する。ノミフェンシンにより、大脳辺縁系、アミグダラ、海馬、視床下部などにおける変容を抑制したと考えられる。

臨床比較試験において、現代薬は実薬とプラセボの作成は、カプセルや錠剤といった剤形を選択でき、患者に判別出来ない製剤を比較的容易に作成できる。漢方薬はエキス製剤であることが多く、実薬とプラセボの作成は容易ではない。特に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くない。ヒトにおいても実薬とプラセボの識別を無意識下にも行い、結果に影響する可能性も考慮される。

これら一連の研究より、感覚器障害により高次中枢機能の変化が惹起されること、その背景にはドーパミン神経系やカルノシンなどの化学物質が関与することなどを明らかにしたが、嗅覚系は感情や記憶形成に重要な役割を果たしていることがわかった。また、このような嗅覚障害モデル動物は実薬およびプラセボの差

について、生物学的力価の評価法になる可能性が考えられた。

加えて、嗅覚障害という疾患やそれに伴う症状の改善に、漢方薬投与は有効な治療法となる可能性があることを明らかにした。

## 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:嗅覚障害モデルマウスに対する漢方処方の影響, 日本生薬学会第58回年会, 2011.09.24-25, 東京

2. Mizowaki M, and Toriizuka K.: Pretreatment with nomifensine protects from the impairment of passive avoidance task induced intranasal irrigation with zinc sulfate in mice. Pharmacology Biochemistry and behavior, (under preparation)

3. Mizowaki M, and Toriizuka K.: L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine)-induced stereotypy in mice, Neuroscience Letter, , (under preparation)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

－抑肝散プラセボの化学分析評価に関する研究－

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、抑肝散エキスのLC-NMR-MSを用いた化学分析を継続するとともに、2009年に新規開発された「抑肝散」プラセボについて、日本薬局方収載確認試験法に関する評価の一環としてTLCを用いた化学分析を行い、両者の成分比較を行った。

この結果、グリチルリチン酸標準品と抑肝散のLC-NMR-MSの比較から、抑肝散エキスにはグリチルリチン酸が確実に存在していることが確認された。

また、TLCによる検討では、抑肝散エキスとそのプラセボ薬について成分比較を行なった。その結果プラセボ薬には目立った成分は含まれず、実薬には広範囲の極性に多くの成分が認められた。

**研究協力者**

淵野裕之 独立行政法人医薬基盤研究所筑波研究部栽培研究室長

赤木謙一 独立行政法人医薬基盤研究所共用機器実験室副室長

**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。本研究では昨年度に引き続き両者の成分比較を目的として、特に抑肝散に含まれる生薬の内、多くの漢方処方用いられている甘草の主成分であるグリチルリチン酸が抑肝散中での程度検出されるかを物理化学的手法である LC-MS/NMR (loop-storage) 法及び LC-MS-SPE/NMR(SPE) 法を用いて確認した。

また我々は、昨年度 GCMS を用いて実薬とプラセボ薬との比較を行なった。その結果、プラセボにはステアリン酸、パルミチン酸と推定される脂肪酸が多く含まれていることが確認された。抑肝散には同様にステアリン酸、パルミチン酸と思われるピークも確認されたが、生薬由来と思われるいくつかのピークを確認した。特に hinesol、eudesmol と推定される成分が検出され、これらは本来ソウジュツの成分と

考えられた。

一方、日局に記載されている生薬は、確認試験において TLC を用いた生薬特異的成分の定性試験を行っている。そこで今回は生薬特異的成分の評価の一環として TLC を用いた化学分析を検討した。

## 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-SPE/NMR 法を行うために、SPE (Solid Phase Extraction) 装置として PROSPEKT2 (Spark 社)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) TLC による検討

TLC 画像は、カマグ社製 TLC ビジュアライザーを用いて撮影した。

## 3. 試薬・試液

### 1) LC-NMR-MS による検討

LC-MS 測定溶媒は、MilliQ 水、アセトニトリル LC/MS 用 99.8% (Kanto Chemical CO., INC) を用いた。NMR 測定には、重水化アセトニトリル(99.9%, ATOM % D, ISOTEC inc.)を用いた。その他の試薬は、全て試薬特級品を用いた。

### 2) TLC による検討

用いた標準物質は以下のとおりである。

- ①リキリチン(和光純薬)
- ②サイコサポニン A(和光純薬)
- ③サイコサポニン B2(和光純薬)
- ④サイコサポニン D(和光純薬)
- ⑤リンコフィリン(和光純薬)
- ⑥グリチルリチン酸(日本公定書協会)

## 4. 試料の調製

### 1) LC-NMR-MS による検討

抑肝散エキス試料10mgをはかり取り、milliQ 水1 mLに懸濁し、ボルテックスにて30 min攪拌した。その後13000 rpmにて遠心後、沈殿を除去した。上記ボルテックス、遠心操作を計三回を行い、沈殿を除去した。その後、0.2・ $\mu$ mのフィルターに通した。グリチルリチン酸試料は水への可溶性が低いので、500・gを250・Lの

MilliQ水と50・LのCD<sub>3</sub>CNの混合溶液に可溶化させた。ボルテックスにて30 min間攪拌した。その後13000 rpmにて遠心後、沈殿を除去した。その後、0.2・ $\mu$ mのフィルターに通した。

### 2) TLC による検討

実薬及びプラセボを各1g正確に量り、乳鉢にてすりつぶした。これを遠沈管に入れ、メタノール1mLを加え、振とう器にて10分間振とうした。その後、遠心機にて2000 rpmにて20分遠心した。上澄み液をとり、TLCに供した。

標準物質については、濃度が1mg/mLになるように70%メタノールで溶かしたものをTLC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) D<sub>2</sub>O, (B) CH<sub>3</sub>CNを用いた。(A) 95%から15 minで、(A) 30%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・ $\mu$ m) 細孔径(10・ $\mu$ m)を用いた。UV 観測波長は210 及び254nm、カラム温度は40°Cに設定した。試料注入量は抑肝散、グリチルリチン酸それぞれで25・L、10・L (20・g 相当)で行った。

NMR 測定条件: UV 検出器信号、及びMSのトータルイオンクロマト(BPC)信号を用いてグリチルリチン酸由来の信号を検出し、Hystar3.2 ソフトウェアを用いて目的分画を取得した。Loop-storage 法では、BPSU-36に目的分画を取得した後に、取得したD<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN 濃度比においてNMR 測定セル

へ送液した。SPE法においては、PROSPEKT2を利用してトラップカラムへ目的分画を取得した後、重アセトニトリルを用いてカラムから溶出させてNMR測定セルへ送液した。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(レシーバゲイン)、SPNAM6(溶媒消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。<sup>1</sup>H-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・L/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1にまとめた。

## 2) TLCに関する検討

実薬、プラセボ、標準物質について、各5μLずつスポットした。

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。

## C. 研究結果

### 1) LC-NMR-MSによる検討

グリチルリチン酸についての構造と化学量について図1に示した。グリチルリチン酸の標準品を軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図2に示した。図2-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図2-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間11.0 minにおいて溶出した化

合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、435.4, 453.4, 471.4, 647.4, 823.4, 845.4 m/zの値を得た。矢印は各値との差のm/z値を示した。抑肝散を軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図3に示した。図3-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図3-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間7.9 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、453.4, 471.4, (487.2), (512.2), (579.3), 647.4, (677.3), (711.3), (752.3), 823.4, 845.4 m/zの値を得た。括弧はグリチルリチン酸標準品には確認されなかったMS値を示す。グリチルリチン酸の標準品を重水(D<sub>2</sub>O)-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した結果を図4に示した。図4-AはUV(210nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図4-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間12.6 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、454.4, 474.4, 652.5, 674.4, 832.5, 853.5, 869.5 m/zの値を得た。抑肝散を軽重水(D<sub>2</sub>O)-アセトニトリル移動相によって分析した結果を図5に示した。図5-AはUV(254nm)、BPCのクロマトグラフィーの結果を示した。図5-BはBPCにおいて主ピークが溶出した保持時間7.9 minにおいて溶出した化合物のMS(m/z)値を示した。低分子量より、454.4, 474.4, 652.5, 674.4, 831.5, 853.5, 869.5 m/zの値を得た。軽水-アセトニトリル移動相の分析系によって分析した分画はSPE法によりNMR測定を行った(図6-Aはグリチルリチン酸標準品、図6-Bは抑肝散のNMRスペクト

ルをそれぞれ示す)。軽水-アセニト移動相の分析系によって分析した分画は SPE 法により NMR 測定を行った(図 6-C はグリチルリチン酸標準品、図 6-D は抑肝散の NMR スペクトルをそれぞれ示す)。

## 2) TLC による検討

抑肝散エキス、プラセボ及び各種標準物質の各種波長及び試薬噴霧後の TLC チャートを図 7 に示す。抑肝散の組成は、一般的にはビャクジュツ、ブクリョウ、センキュウ、チョウトウコウ、トウキ、サイコ、カンゾウである。しかし、ビャクジュツをソウジュツにかえた処方もあり、前年度の GCMS 検討の結果、本実薬にはソウジュツが使われていると推定された。今回の TLC 検討では、標準品としてカンゾウの成分としてリキリチン、グリチルリチン酸、サイコの成分としてサイコサポニン A、B、B2、チョウトウコウの成分としてリンコフィリンを同時に展開した。

プラセボについては UV 照射下、希硫酸噴霧後加熱下の観察では顕著なスポットを確認するには至らなかった。しかし白色光下において、クロロホルム/メタノール/水混液(6:4:0.8)による展開において  $R_f$  値約 0.3 付近に青色のスポットを認めた。また実薬においては多くのスポットが観察された。リキリチンは希硫酸噴霧後加熱すると UV366 nm 照射下において黄色の蛍光を発するが、実薬において同  $R_f$  値付近に同様の黄色の蛍光スポットを認めた。

## D. 考察

グリチルリチン酸の標準品を軽水-アセニト

移動相の分析系によって分析した結果からグリチルリチン酸と考えられる 823.4 (m/z) の値を得た。グリチルリチン酸の分子量は 822.99 であるので、823.4 (m/z) はグリチルリチン酸の  $H^+$  付加体であると考えられる。理論的には 823.99 (m/z) になるが、装置の検出感度、分解能等を考慮すると妥当だと考えられる。 $Na^+$  イオン付加体の場合は、分子量+23(ナトリウム付加)の値で検出されることから、845.4 (m/z) 値は  $Na^+$  イオン付加体だと考えられる(823.4-1+23=845.4)。グリチルリチン酸から構成糖であるグルクロン酸1つが解離した MS 値が 647.4 (m/z) を示し、2つ解離している MS 値が 453.4 (m/z) を示していると考えられる。647.4 (m/z) と 453.4 (m/z) の差は 194 となり、グルクロン酸の分子量と一致する。823.4 (m/z) と 647.4 (m/z) の差は 176 となり、647.4 (m/z) と 471.4 (m/z) の差も同様に 176 となる。図 6-A と図 6-B の NMR スペクトルから、交換性プロトン領域である 3-4ppm の領域にはシグナルが消えている。これは移動相中の deuterium がグリチルリチン酸の交換性プロトンと交換した結果である。図 6-E に図 6-A と図 6-B の重ね合わせのスペクトルを示した。図 6-F に図 6-C と図 6-D の重ね合わせのスペクトルを示した。これから非交換性プロトンのシグナルが確認された。

グリチルリチン酸の標準品を重水( $D_2O$ )-アセニト移動相の分析系によって分析した結果からグリチルリチン酸と考えられる 832.5 (m/z) の値を得た。軽水での分析結果と比較すると、832.5-823.4= 9.1 の差が確認された。グリチルリチン酸には、3 つのカルボン酸と 5