

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18892

研究課題名(和文) 体温と血流量を指標とした睡眠改善物質探索のための新規アッセイ法

研究課題名(英文) An in vivo assay method for natural sleep-promoting substances using measurement of skin temperature

研究代表者

小川 優子(Ogawa, Yuko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：00454497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：筆者らはマウスの脳波測定を用い、人が本来持つ睡眠調節機能を促進する物質を天然から探索することを目的に研究を行ってきた。しかし、脳波測定は測定前の準備や測定後の解析に時間と手間がかかることから、スクリーニング法としては適さない。そこで、睡眠導入時に起こる体温変動に注目した、睡眠改善物質探索のための新規アッセイ法を開発した。本研究では新規アッセイ法を用い、天然から睡眠調節機能を促進する物質の探索を目指した。一方、本アッセイ法の応用例として、睡眠改善効果を示す漢方処方である抑肝散に適用し、抑肝散としての薬効に7種類の構成生薬がそれぞれどのように関与しているのかを検討した。

研究成果の概要(英文)：We have contributed to the search for substances that promote natural sleep from natural products, in research using electroencephalographic analyses of mice. But electroencephalographic analysis is not suitable as a screening assay method because it requires time-consuming, labor-intensive procedures prior to measurement and in analyzing the results. Therefore, we developed a new and easy in vivo assay method to screen sleeping substances using thermography. This assay method was focused on the changes in body temperature during sleep induction. In this study, we use this novel assay method and search for sleep-promoting substances from natural products.

On the other hand, we also thought it might be possible to apply the method to Kampo formulae in order to determine the involvement of each crude drug component. In this study, the role of each crude drug in the activity of Yokukansan was evaluated.

研究分野：生薬・天然物化学

キーワード：睡眠 体温 チコリ 抑肝散

1. 研究開始当初の背景

睡眠は1日の約3分の1を占める生活の一部で、生命維持に欠かせない重要なものである。しかし、24時間型の社会スタイルやストレス社会の拡大により不眠に悩む人々は増加傾向にあり、現代人の10人に1人は睡眠薬を服用しているといわれている。現在使われている睡眠薬は、頭痛や不快感、日中への眠気の持ち越しなどの副作用や、身体依存に対する不安が多い。そこで、近年では睡眠改善効果を謳った天然由来成分のサプリメントが多数販売されているが、その多くは安全性や有効性が科学的に証明されていない。このような社会的背景から、筆者らはマウスの脳波測定を用い、人が本来持つ睡眠調節機能を促進する物質を天然から探索することを目的に研究を行ってきた。しかし、脳波測定は電極の処理手術を始めとする測定前の準備や測定後の解析に時間と手間がかかることから、スクリーニング法としては適していない。そこで、睡眠導入時の体温変動に注目した、睡眠改善物質探索のためのアッセイ法を新規に開発した (Ogawa et al., *Research J. Phytochemistry*, 2013)。

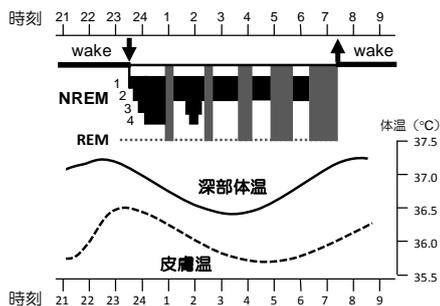


Fig. 1 睡眠と体温との関係

睡眠は深部体温の低下と共に開始し、上昇して終了するといわれており (Fig. 1)、体温を効率良く低下させることがより良い睡眠の導入につながる。睡眠導入時の体温低下は、末梢部位からの熱放散に由来しており、①末梢血管が拡張し、血流量増加に伴う熱移動、②熱放散量の増加による皮膚温の上昇、③深部体温の低下というプロセスを取る。筆者らが開発したアッセイ法は、試験物質投与後のマウスの体温変動をサーモグラフィで測定することにより、眠りを誘導する物質のスクリーニングを行うものである。本アッセイ法は無麻酔下、自由に行動するマウスの体温を撮影するだけの非常に簡易な方法で、脳波測定の結果との相関性も得られていることから、スクリーニング法として適していると考えられる。なお、睡眠改善物質探索のためのスクリーニング法に関する報告は、これが初めてである。

2. 研究の目的

本研究では、筆者らが開発した睡眠導入時における体温変動を指標にした睡眠改善物質探索のための新規アッセイ法を用い、天然から自然な眠りを引き起こす物質を単離することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 体温測定方法

ddY系マウス (4-6週令、雄性) を個別のケージに移し、無麻酔下で自由に行動させる。投与30分前から2分毎にサーモグラフィ実験システム (FLIRE60 Compact Thermal Imaging, 320×240 pixels IR Resolution) を用いて自由に行動するマウスの体温を測定し、投与前30分間の平均体温を標準体温とする。その後水または試験物質の投与を行い、投与後の体温への影響を評価する (n=5)。なお、期間中のマウスは明期と暗期を12時間サイクル (明期開始時間: 午前8時、照明約100 lux) で設定した24±2°Cの環境で管理し、水および餌は自由に摂取させる。試験物質の投与は脳波測定時の実験手順に従い (Ogawa et al., *Sleep Biol Rhythms*, 2013)、暗期に行う。

2) 睡眠改善効果を示す天然物のスクリーニング

本アッセイ法を用い、天然物から睡眠改善効果を示す物質のスクリーニングを行う。活性が得られた天然物についてはエキスを大量に作製し、活性成分の解明を行う。

まずは、チコリ (*Cichorium intybus* L.) の熱水抽出エキス (300 mg/kg, p.o.) について睡眠改善効果が予測されたことから、活性を指標に成分の単離と同定を行う。

3) 開発したスクリーニング法の応用

筆者らが開発したアッセイ法を漢方処方に適用し、構成生薬の相加・相乗効果の検討を行う。今回は不眠の際に臨床で使用されている抑肝散を用いる。

抑肝散はチョウトウコウ、トウキ、センキュウ、ソウジュツ、ブクリョウ、カンゾウ、サイコの7種類の構成生薬から成る漢方製剤で、睡眠改善効果が科学的に報告されているが、各構成生薬が「抑肝散」としての睡眠改善効果にどのような働きを示すのかについては明らかにされていない。そこで、構成生薬の相加・相乗効果の検討を行うため、抑肝散の構成生薬を1種類ずつ個別に、または2種類、3種類、4種類ずつといった複数組み合わせた処方エキスを多数作製し、投与後の体温変動を検討する。

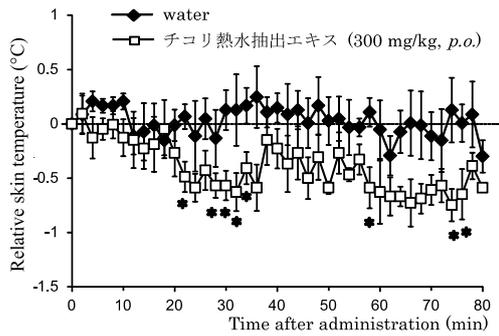


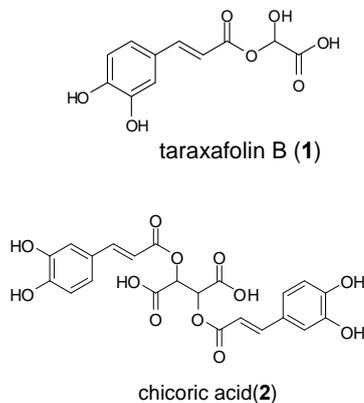
Fig. 2 チコリ熱水抽出エキスが投与後の体温変動に及ぼす影響

Each circle represents the mean \pm S.E. of the difference of the normal skin temperature of each mouse. * $p < 0.05$ as compared with the water administrated

4. 研究成果

1) チコリの睡眠改善効果

チコリ (*Cichorium intybus*) はキク科の植物でヨーロッパ、西アジア、エジプト、北アメリカで広く生育しており、糖尿病、肝臓障害、胆管の炎症や腎臓の病気に民間薬として用いられている。また、インドに伝わるアーユルヴェーダやパキスタンなどイスラム圏に伝わる伝統医学であるユナニ医学でチコリは炎症に対する薬として使用されている。チコリ (*Cichorium intybus*) の地上部の熱水抽出エキスについてスクリーニングを行ったところ、有意な活性がみられた (Fig. 2)。そこで、活性成分の単離を目的として Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーおよびリサイクリング HPLC を繰り返し行い、2種類の化合物を単離した。両化合物の構造については、各種スペクトルデータから、それぞれ taraxafolin B (1)、chicoric acid (2) と同定した。



単離した2種類の化合物についてアッセイを行ったところ、taraxafolin B は活性を示さず、一方の chicoric acid には有意差が認められた (Fig. 3)。Chicoric acid は taraxafolin B の二量体である。両者の活性

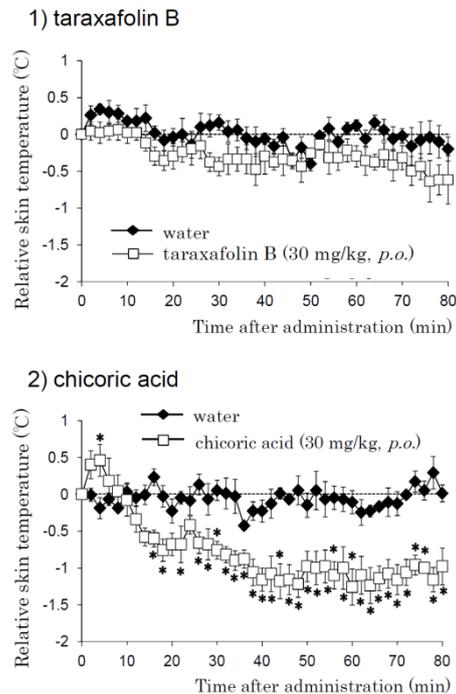
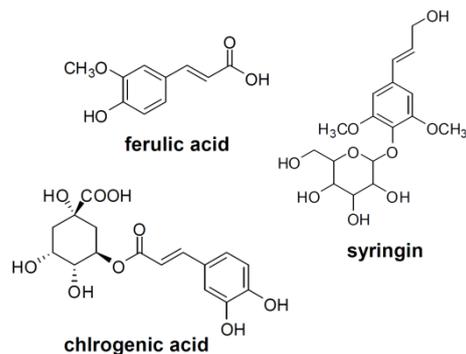


Fig. 3 チコリ含有成分が投与後の体温変動に及ぼす影響

Each circle represents the mean \pm S.E. of the difference of the normal skin temperature of each mouse. * $p < 0.05$ as compared with the water administrated group (n=5).

に違いが見られた理由については、現在検討中である。

一方、chicoric acid と構造が類似した化合物において睡眠改善作用の報告が認められたことから、類縁化合物における睡眠改善作用について、本アッセイ法を用いて調べた。今回はフェノール性化合物の中で ferulic acid、chlorogenic acid、syringin について行ったところ、ferulic acid、syringin は体



温の低下を示し、睡眠改善作用が考えられた (Fig. 4)。一方、chlorogenic acid については活性が見られなかった。今回の結果において、chlorogenic acid は活性を示さなかったが、反復・連続投与が中途覚醒時間の短縮、睡眠効率の改善及び起床時の熟眠感の改善作用を有することが報告されていたことから、現在反復投与の結果を検討中である。

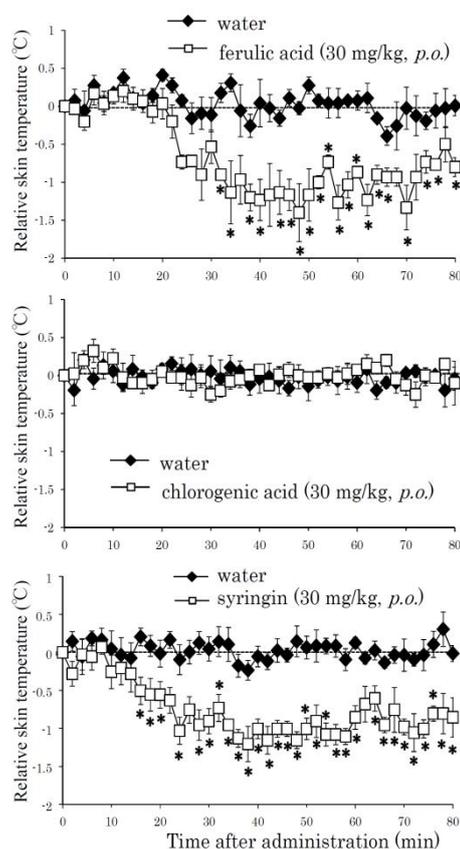


Fig. 4 類縁化合物が投与後の体温変動に及ぼす影響

Each circle represents the mean \pm S.E. of the difference of the normal skin temperature of each mouse. * $p < 0.05$ as compared with the water administrated group (n=5).

3) 開発したスクリーニング法の応用

西洋医学はワンピークが論理的に活性を示すのに対し、漢方は様々なピークが身体全体に足し算、掛け算、引き算で働きかけて活性を示す。したがって、漢方処方における構成生薬の働きを解明するにあたり、局所的に生じる現象の一部を切り取った検討では解明出来ず、これまでにほとんど研究が行われていない。本アッセイ法は、全身反応として生じる体温変動に注目したアッセイ法である。そこで、本アッセイ法を漢方処方に応用することで、構成生薬が漢方処方としての薬

効にどの様に関与しているかを知ることが出来るのではと考えた。今回は、不眠の際に臨床で使用されている抑肝散に注目した。

① 構成生薬 1 種類抽出エキスが及ぼす影響

7 種類の構成生薬 (釣藤鈎、柴胡、川芎、当帰、茯苓、蒼朮、甘草) を 1 種類ずつ投与した。その結果、投与後の体温変動を示した生薬 (釣藤鈎、柴胡、川芎、当帰) と、示さなかった生薬 (茯苓、蒼朮、甘草) に分類出来た。抑肝散の薬効に対する構成生薬の働きについて科学的に記した研究は、今回が初めてである。

- ・ 生薬単体で活性を示す生薬：
釣藤鈎、柴胡、川芎、当帰
- ・ 生薬単体では活性を示さない生薬：
茯苓、蒼朮、甘草

② 構成生薬 1 種類抜き抽出エキスが体温に及ぼす影響

先の結果において、活性を示さなかった生薬 (茯苓、蒼朮、甘草) は抑肝散には必要ないのではと考え、抑肝散から構成生薬 1 種類ずつを抜いた処方を作製した。その結果、生薬単体で体温低下作用を示した釣藤鈎、柴胡および川芎は、抑肝散から除いた場合も活性に影響を与えなかった。これは、釣藤鈎、柴胡または川芎を抜いたとしても、エキス中には他に活性を示す他の生薬が含まれているからと考えられる。

一方、生薬単体では活性を示さなかった茯苓、蒼朮、甘草を抜くことで抑肝散としての活性は消失した。茯苓、蒼朮または甘草抜きエキスには、単体で活性を示す生薬が含まれているにも関わらず活性が消失したことから、茯苓、蒼朮、甘草も抑肝散には必要で、直接的には働かないものの、他の生薬をサポートすることにより、『抑肝散』としての活性に関与していると考えられた。

一方、当帰は異なった傾向を示し、単体でも活性を示す一方で、抜くことにより活性が消失した。したがって、単体で活性を示す一方で他の構成生薬の活性をサポートする働きがあると考えられた。

【抑肝散構成生薬の分類】

- i) 単体で睡眠改善効果を示す生薬：
釣藤鈎、柴胡、川芎
- ii) 生薬単体では睡眠改善効果を示さないが、他の生薬に影響することで睡眠改善効果に関与している生薬：茯苓、蒼朮、甘草
- iii) 生薬単体でも活性を示し、その一方で他の構成生薬に影響を与える生薬：当帰

③ 抑肝散における茯苓、蒼朮、甘草の働き

茯苓、蒼朮、甘草がどの生薬の働きをサポートしているのかについて検討するため、茯苓、蒼朮、甘草の3生薬間での相互作用を検討した。その結果、茯苓、蒼朮、甘草は単体では投与後の体温変動には影響を示さなかったが、3種類を混合することで有意な体温低下を示した。しかし、2種類を組み合わせたエキスでは、投与後の体温に影響を示さなかった。

茯苓、蒼朮、甘草は、単体では活性を示さないが、3種類を組み合わせることで活性を示す。そこで、3生薬を個別に抽出し、その後混合させたエキスを作成したが、活性は得られなかった。

・茯苓、蒼朮、甘草：3種類混合で抽出した時のみに睡眠改善効果を示す。

④ 含有成分の比較

茯苓、蒼朮、甘草は、抽出方法の違いにより活性が異なる。そこで、3種類を混合したエキスと、3生薬を個別に抽出し、その後混合させたエキスについて、HPLCを用いて含有成分の比較を行った(Fig. 5)。その結果、両者ではpHが異なり、また含有成分についても違いがあることを明らかにした。すなわち、抽出の段階で生じる化学反応が活性に繋がっている可能性が示唆された。

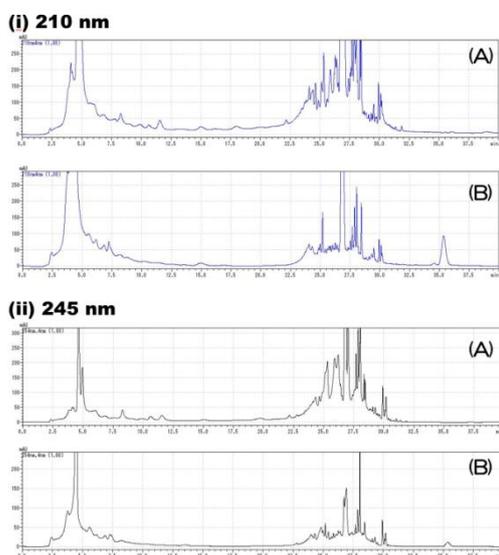


Fig. 5 抽出方法の違いによる成分比較：

3種類(茯苓、蒼朮、甘草)混合エキス

A: 3種類の生薬を混合して抽出、

B: 各生薬を個別に抽出後3種類を混合

⑤ 抑肝散構成生薬を含む他の漢方処方のスクリーニング

これまでの結果から、釣藤鈎、柴胡、川芎、当帰は、生薬単体で睡眠改善効果を示すこと

が明らかとなった。そこで、これらの生薬を含む漢方処方、いずれも睡眠改善効果を示すのかと考え、釣藤鈎、柴胡、川芎または当帰を含む漢方処方を投与した後の体温変動を検討した。今回は、七物降下湯(釣藤鈎、川芎、当帰、芍薬、黄耆、黄柏、地黄)および八味逍遥散(柴胡、当帰、茯苓、蒼朮、甘草、芍薬、生姜、薄荷)について検討した。

七物降下湯は、高血圧に伴う随伴症状(肩こり、眩暈、耳鳴り等)に効果があるとして用いられる漢方処方、生薬単体で活性を示す釣藤鈎、川芎、当帰が含まれている。しかし、七物降下湯は投与後の体温低下を示さなかった。したがって、睡眠改善効果を持つ生薬が入っているというだけでは、睡眠改善効果に結び付かないことが分かった。

八味逍遥散は、不眠症に用いられる漢方処方である。また、更年期障害や月経不順など、多くの婦人系疾患に用いられている加味逍遥散の前身となる漢方処方、抑肝散構成生薬のうち、柴胡、当帰、茯苓、蒼朮、甘草が含まれている。八味逍遥散投与後は、有意な体温低下を示し、睡眠改善効果が示唆された。七物降下湯には活性が見られず、八味逍遥散には活性が見られた理由については、現段階では不明である。七物降下湯に含まれる他の構成生薬が、釣藤鈎や川芎、当帰の働きを抑制した可能性もあれば、他の生薬の働きを助ける3生薬(茯苓、蒼朮、甘草)が入っていないことが理由の可能性もある。現在、七物降下湯に3生薬(茯苓、蒼朮、甘草)を加えた漢方処方を作製し、活性についての検討を行っている。

・七物降下湯(釣藤鈎、川芎、当帰、芍薬、黄耆、黄柏、地黄)：活性なし

・八味逍遥散(柴胡、当帰、茯苓、蒼朮、甘草、芍薬、生姜、薄荷)：活性あり

日本は超高齢化社会を迎え、漢方医学の重要性が認識され始めている。また、漢方の臨床的な有効性に対する評価、再評価が進んでおり、漢方処方の活性メカニズムに対する報告も多数認められる。しかし、それぞれ異なった働きを持つ構成生薬が、漢方処方の薬効に対してどの様に関与しているのかについては、これまでにほとんど研究されていない。今回、抑肝散の睡眠改善効果に対する構成生薬の役割を検討し、抑肝散の構成生薬が3種類に分類可能となることを科学的根拠に基づいて明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計1件）

1. Yuko Ogawa, Yuuko Fujii, Reina Sugiyama, Tenji Konishi, The role of the seven crude drug components in the sleep-promoting effect of Yokukansan, Journal of Ethnopharmacology, 177, 19-27 (2016). (査読あり)

〔学会発表〕（計4件）

1. 小川優子、藤井悠子、杉山令奈、小西天二、『抑肝散の睡眠改善効果（第2報）』、日本薬学会第136年会、2016年3月。
2. Yuko Ogawa, Ayana Minamizawa, Sachie Tada, Tenji Konishi, The variation of skin blood flow after administration of sleep-promoting, 第39回日本神経科学大会、2016年7月。
3. 小川優子、南澤彩奈、冨田幸恵、藤井悠子、杉山玲奈、小西天二、『体温および血流量変動を指標とした睡眠改善物質探索のための新規アッセイ法の開発と応用』、第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2016年10月。
4. Yuko Ogawa, Ayana Minamizawa, Sachie Tada, Tenji Konishi, An in vivo assay method for natural sleep-promoting substances, Society for Neuroscience, 2017年11月。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 優子 (OGAWA, Yuko)

国立循環器病研究センター・再生医療部・
非常勤研究員

研究者番号：00454497