

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01662

研究課題名(和文) 社会的ストレスが情動障害に与える影響と漢方薬の効果

研究課題名(英文) Effects of social stress on emotional disorders and effects of the Traditional
Kampo medicine

研究代表者

小林 弘幸 (KOBAYASHI, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50245768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在社会において、ストレスは様々な疾患の病態に関係している。とくに慢性社会的ストレスが原因となって生じる適応障害、うつ病、慢性疲労症候群などの精神疾病は、社会問題化している。社会的心理ストレスモデルを用いて、臨床において心身医学領域で用いられている半夏厚朴湯の攻撃行動および社会的行動に対する作用について検討した。半夏厚朴湯はストレスによって誘発される攻撃行動および社会的行動を用量依存的に改善した。この作用は中枢作用のみならず、ストレスによる全身症状に対しても効果を出す可能性が示唆された。また実験結果からセロトニン系を介して作用発現する作用機序が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Stress is involved in clinical conditions of several diseases in the modern society. Especially, mental diseases such as adjustment disorder, depression, and chronic fatigue syndrome caused by chronic social stress are recognized as serious social problems. In the present study, we demonstrated the effect of Hangekobokuto (HKT) for amelioration of aggressiveness and social behavior using mice as stress models. HKT dose-dependently controlled the aggressive behavior induced by isolation stress. It was confirmed that the effect disappeared by the administration of 5HT1A receptor antagonist. And the blood corticosterone decreased by the administration of HKT. Serotonin and dopamine in the prefrontal region increased by the administration of HKT. IL-6 in the brain stem decreased dose-dependent manner. It was confirmed that HKT has effects not only on the central action but also on the systemic symptoms caused by stress. It was suggested the mechanism acted on the serotonin system.

研究分野：漢方薬、病院管理学

キーワード：半夏厚朴湯 攻撃性 隔離ストレス セロトニン ドーパミン IL-6

1. 研究開始当初の背景

近年の社会構造の高度化、多様化によって、我々を取り巻く社会環境の変化により、我々の好むと好まざるとにかかわらず多くの物理的、心理的・精神的刺激によるストレスを受けており、現代は「ストレス社会」と言われている。ストレスによって起こる病態はさまざま、種々の身体疾患だけでなく、睡眠障害、うつ病、不安、攻撃性、さらに思考の非柔軟化、などの情動障害、さらに肥満、痛み、不定愁訴など多岐にわたっている。近年、自殺の増加が社会問題になっており、自殺の原因の一つがうつ状態であると言われている。また、精神疾患患者はこの10年間で1.5倍以上に増加し、今や300万人を大きく上回っており、精神・神経疾患に対する社会の関心は非常に高い。このように、からだのバランスを崩す原因として、ストレスが問題になっている。本来、ストレス反応はストレス刺激に対する生体の防御機能として必要なものであるが、過剰なストレス刺激により、生体の恒常性維持機能(ホメオスタシス)が破綻し適応力を失い、病的状態の原因となる。しかしながら、ストレスによるこのような神経精神性の障害が生じるメカニズムは明らかでない。心の病と体の病には密接なクロストークがあり、生体がさまざまなストレスに対応しながらそれ自身を最適化させていくうえでの本質的な個体レベルでのシグナリングと考えられる。過敏性腸症候群、頭痛、めまい、肥満、アトピー性皮膚炎などはストレスによって影響を受ける身体疾患であることが知られている。心の病であっても、体への影響が出ることが多いことから、全身へのケアが必要となる。

我々はストレスモデルを用いた研究において、漢方薬抑肝散がストレスによりアトピー性皮膚炎が悪化し^{1, 2)}、その悪化を漢方薬抑肝散が改善すること、ストレスにより増加した攻撃性を改善すること³⁾、また、香蘇散がストレスによる睡眠障害を改善することを報告している⁴⁾。また、過敏性腸症候群に対して漢方薬の効果が知られている。

2. 研究の目的

臨床および前臨床研究から、ストレス応答性に対して視床下部 - 下垂体 - 副腎系(Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis: HPA axis)、セロトニン(5-HT)やノルアドレナリン、ドーパミン、神経ステロイドなどの生理活性物質が重要な役割を果たしていることが知られている。現在、5-HT神経系に作用する薬物(5-HT受容体作動薬、選択的セロトニン再取り込み阻害剤(SSRI))、ベンゾジアゼピン受容体作用薬などが、うつ病、うつ様症状および不安症状の治療に用いられている。またドーパミンD1受容体作動薬も、拘束ストレスによって生じるうつ状態を改善する作用がある⁵⁾。しかし抗うつ薬の服用による副作用、抗不安薬による依存問題な

ど、アドヒアランスがよいとはいえない場合がある。また、心の健康をサポートすることが重要になっている。このような現状のなかで、漢方薬の抗ストレス作用、抗うつ作用が注目されており、多数の研究が報告されている。漢方医学においては、からだ全体のバランスを整えることを治療目的にしており、からだのバランスを崩す原因であるストレスに対して効果が得られることは理にかなっていると考えられる。そこで、我々は、ストレスによる障害のなかでも睡眠障害、情動障害、思考および自律神経障害に対する漢方薬の作用に注目し研究を実施した。

今回の研究を通して我々は、「漢方薬は身体の変調と精神の変調を同時に把握し、心と体は一体のものとして治療する」という概念から漢方薬の心と体のクロストークに対する作用を分子レベルから研究しバイオマーカーの検索にも取り組んでいきたい。とりわけ漢方薬のEvidence-based medicine (EBM) 確立に寄与し、新たな治療法を開発していきたいと考えている。統合医療の中でも多くのEBMが報告されている「漢方薬」の作用メカニズムを解明することで、適正な治療法を確立し国民や患者の健康に寄与できると考えている。保険上、漢方薬で治療できるメリットは、患者の安全性・経済的負担を考えた上でも非常に大きい。中でも漢方薬のEBM確立が最優先される一つの理由として、西洋医学と漢方医学の融合が日本における統合医療の質の向上を真っ先に成し遂げ、諸外国に発信できると考えているからである。

3. 研究の方法

漢方薬のストレス誘発睡眠障害、情動障害、認知機能および自律神経機能に対する作用、ストレス関連因子の探索を中心にストレスと心と体のクロストークの関連について実施した。

(1) 漢方薬のストレス誘発情動障害に対する作用

漢方薬の情動行動に与える効果について、ストレスモデルを用い、行動薬理的、神経生理学的観点から検証する。ストレスモデルは、マウスを4~8週間の社会的心理ストレス負荷、すなわち隔離飼育することにより作製した。行動薬理試験は、睡眠作用試験、ガラス玉覆い隠し試験、Splash試験およびソーシャルインターラクション試験により測定した。臨床において心身医学領域で用いられている不安神経症、不眠症、神経性胃炎などに効果がある半夏厚朴湯について検討した。

動物実験は、順天堂大学医学部動物実験に関する指針(JACUC)に従っておこなわれた(登録番号1022)。

・動物: ddY マウス(4週齢雄性)

マウスは日本 SLC 株式会社(Shizuoka, Japan)より購入した。一週間の馴化後、動

物は実験期間中透明ケージ (9 x 13 x 20 cm) で 6 週間、隔離飼育した。群飼育対照群は 1 ケージ (23 x 31 x 15.5 cm) 5 匹で飼育した。すべての動物は馴化期間から試験期間を通じ 23±2、相対湿度 55±10%、7:00 から 19:00 の 12 時間明暗周期、自由飲水、普通飼料摂餌 (MF, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) 条件で飼育した。

・薬物

半夏厚朴湯はツムラ社製エキス剤の乾燥粉末を用いた。構成生薬は半夏、厚朴、茯苓、生姜、蘇葉の 5 つの生薬からなり、これを精製水に溶解し投与した。

5-HT1A 受容体アンタゴニスト WAY-100635 マレイン酸塩 (Sigma, St. Louis, MO, USA) は生理食塩水に溶解した。

・睡眠試験

Pentobarbital sodium salt (50mg/kg) を腹腔内投与し、睡眠導入時間、睡眠時間を測定した。睡眠時間は正向反射の消失から覚醒までとした。

・ガラス玉覆い試験

透明アクリル製ボックス (250 x 250 x 300 mm) の底に厚さ 5 cm になるように床敷 (ウッドチップ) を敷き詰め、その上に 25 個のガラス玉 (直径 2 cm) を縦横 5 個ずつ 3 cm 間隔で均等に並べた。ボックスにマウスを入れ、15 分後に床敷により 2 / 3 以上覆い隠されたガラス玉の数を目視により複数人で測定した。

・Splash 試験

10% Sucrose 溶液をマウスの背中に吹き付ける。透明アクリル製シリンダー (12 x 18 cm) に入れ、Grooming Behavior (身繕い行動) の時間、回数を 5 分間複数人で測定した。

・ソーシャルインタラクション試験

ソーシャルインタラクション試験は、これまでに報告されている方法に従った (Ikarashi et al., 2009; Uchida et al., 2009)。被験マウスと対峙用マウス (無処置の同週齢群飼育マウス) をオープンフィールド装置 (50 x 50 x 50cm, Neuroscience, Inc., Tokyo, Japan) に入れ、両者間の行動を 10 分間記複数人で観察した。対峙動物に対する被験動物の攻撃行動 (aggressive grooming: 攻撃的グルーミング、tail rattling: 尾の威嚇的振戦、chasing: 追撃行動、attacking: 噛み付き行動) および社会行動 (sniffing: 臭い嗅ぎ行動、following: 追尾行動、contacting: 接近探索行動) の合計をそれぞれカウントした。

・実験デザイン

4 週間の隔離飼育を行ったマウスに半夏厚朴湯を 0.25% と 0.5% の用量 (0.5g/kg と

1.0g/kg 計算) で飲水投与により 14 日間投与した。コントロール群は精製水を与えた。14 日投与後、ソーシャルインタラクション試験により攻撃行動と社会行動を観察した。半夏厚朴湯の作用機序の検討については、実験当日は生理食塩水または WAY-100635 (0.1mg/kg) をソーシャルインタラクション試験の 30 分前に腹腔内注射し、攻撃行動と社会行動を観察した。WAY-100635 単剤投与の効果を確認するため、隔離飼育した非投与群に WAY-100635 または生食を腹腔内注射した場合の評価も行った。

ソーシャルインタラクション試験終了後、イソフルラン麻酔下、眼底動脈採血により血液採取および大脳前頭前野、脳幹部を摘出した。血液は遠心分離 (15000rpm x 20 分、4℃) の後血清を得た。血清は測定まで -20℃ に凍結保存した。血清中コルチコステロン、IL-6 は ELISA Kit を用いて測定した。コルチコステロンはマウスコルチコステロンキット (Assay Designs, Michigan, USA)、IL-6 はマウス IL-6 キット (mouse IL-6 Immunoassay, R&D Systems, USA) を用いて測定した。大脳前頭前野、脳幹部は測定まで -80℃ に凍結保存した。緩衝液中 (0.01N 塩酸 (wako)、1 mM EDTA (sigma)、4mM 二亜硫酸ナトリウム (sigma)) にてホモジナイズし、遠心分離 (15000rpm x 30 分、4℃) の後、上清液を得た。ドーパミン (Dopamine Research RIA, Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany)、セロトニン (Serotonin Research RIA, Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany) および IL-6 (mouse IL-6 Immunoassay, R&D Systems, USA) は各 ELISA Kit により測定した。総蛋白質量 (BCA Protein Assay kit Pierce, Rockford, IL, USA) を測定した。

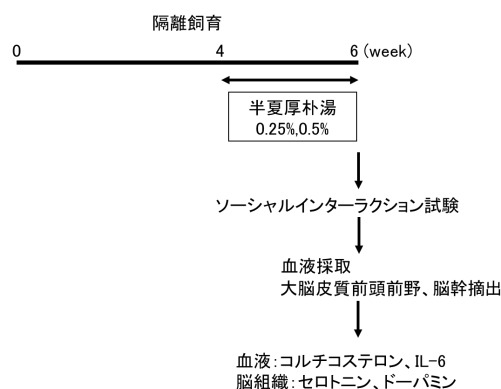


図 1. 実験デザイン

・統計解析

全てのデータは、平均 ± 標準誤差で示した。データは対照群と間の差を評価するために、Fisher's test により解析した。全ての検定において p 値が 0.05 以下を有意差ありと判断した。

(2) 唾液成分を用いたストレスの検証
ヒトのストレスの検証として唾液成分を指標に解析した。

対象者は本研究に同意を得られた口臭を気にしている人 38 名とした。口腔ガス、唾液を採取、気分アンケート The Profile of Mood State 2 (POMS2) を用いてストレスを解析した。口腔ガスはオーラルクロマ (エフアイエス株式会社) を用いて硫化水素 (H₂S)、メチルメルカプタン (CH₃SH)、ジメチルサルファイド ((CH₃)₂S) を測定した。唾液成分はコルチゾール (Salivare Cortisol Enzyme Immunoassay ELISA Kit, Salimetrics LLC)、クロモグラニン A (YK070 Human Chromogranin A Kit, 株式会社 矢内原研究所) を測定した。

4. 研究成果

・ストレスによる情動障害の影響

ストレスによって誘発される情動障害を行動薬理学的観点から検討した。社会的隔離飼育によりストレスを負荷し、睡眠作用試験、ガラス玉覆い隠し試験、Splash 試験およびソーシャルインタラクション試験を行った。ストレスによる睡眠障害は隔離飼育 3 週目から観察された。不安症状はガラス玉覆い隠し試験、ソーシャルインタラクション試験を用いた。隔離飼育 4 週目より不安症状、攻撃行動の増加、社会的行動の減少が観察された。うつ症状・Apathy については Splash 試験を用いた。隔離飼育 5 週目よりうつ症状・Apathy が観察された。隔離飼育による社会的心理ストレスによって睡眠障害、不安、うつ症状等の情動障害が発現することが確認された。

・漢方薬のストレス誘発情動障害に対する作用

半夏厚朴湯は不安神経症、神経性胃炎、つわり、せき、しわがれ声、神経性食道狭窄症、不眠症に用いられる漢方薬である。半夏厚朴湯の不安により誘発される攻撃性および社会行動性に対する作用について実験を行った。

半夏厚朴湯は隔離ストレスで誘発された攻撃行動を用量依存的に抑制した。とくに半夏厚朴湯 0.5% 投与群では攻撃性の増加と社会行動性の減少に有意な改善がみられた (図 2)。

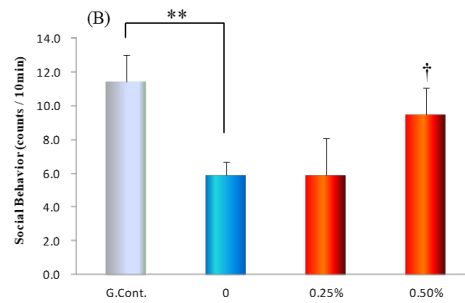
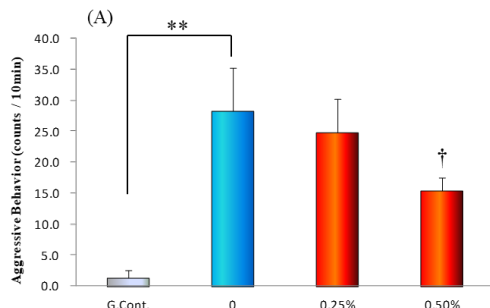


図 2. 攻撃行動、社会的行動に対する半夏厚朴湯の作用 (A: 攻撃行動、B: 社会的行動、Mean ± S.E. n=10, **: p<0.01, †: p<0.05 vs. 0)

この改善効果は 5HT_{1A} receptor antagonist である WAY-100635 の単回投与で消失した。また WAY-100635 単独では行動に影響を与えなかった (図 3)。これより半夏厚朴湯の作用は 5HT_{1A} receptor に作用することが確認された。

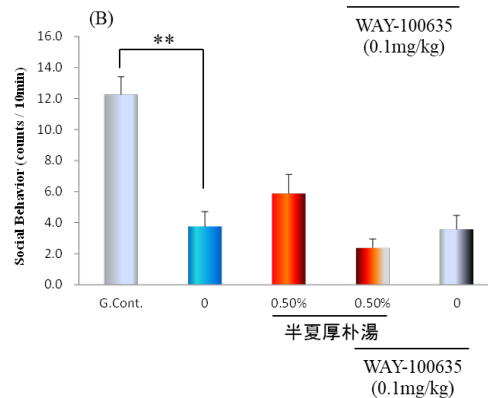
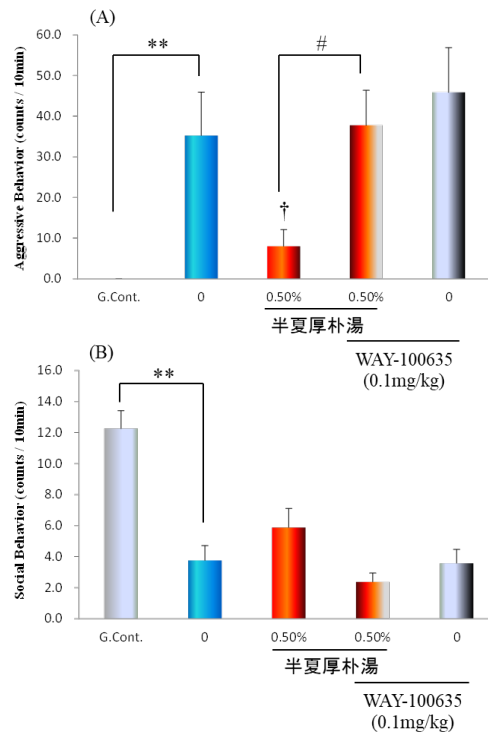


図 3. 5HT_{1A} receptor antagonist による攻撃行動、社会的行動に対する半夏厚朴湯の作用 (A: 攻撃行動、B: 社会的行動、Mean ± S.E. n=10, **: p<0.01, †: p<0.05 vs. 0)

生化学的評価において、隔離ストレスにより血清 corticosterone は増加した。増加した corticosterone は 2 週間の半夏厚朴湯投与により用量依存的に有意に減少した。隔離ストレスにより増加した血清 IL-6 は、2 週間の半夏厚朴湯投与により減少したが有意な差ではなかった。

隔離ストレスにより減少した大脳皮質前頭前野の serotonin は半夏厚朴湯の投与により増加した。一方 dopamine については半夏

厚朴湯の投与により用量依存的に有意に増加した。

隔離ストレスにより脳幹部位の IL-6 は増加した。半夏厚朴湯は増加した IL-6 を容量依存的に有意に減少した。

IL-6 は、脳内では astrocytes や microglia によって産生され、統合失調症、うつ病、不安障害など慢性ストレスによる引き起こされる気分障害の体内炎症マーカーサイトカインとして知られる。最近の知見によれば、IL-6 はニューロン可塑性に重要なメッセンジャーである ERK(extracellular signal-regulated kinases) 活性に影響を与え、また実際に海馬 LTP の減少や皮質シナプス伝達の下向を招く。したがってこの炎症因子レベルの上昇は、それが大脳皮質前頭前野において起きた場合は、この皮質領域の活動を低下させ、結果として扁桃体などが司る情動行動の亢進へとつながる可能性がある。近年、ストレスとサイトカインとの関係が重要視されている。今回、半夏厚朴湯は炎症性サイトカイン IL-6 を減少させた。作用機序に関しては、さらなる検証が必要であると思われるが、半夏厚朴湯の中樞作用のみならず、ストレスによる全身症状に対しても効果を出す可能性が示唆された。

半夏厚朴湯にはストレスによる攻撃性の改善効果があることが確認された。また実験結果からセロトニン系を介して効果発現する作用機序が示唆された。

(2) 唾液成分を用いたストレスの検証

近年、口臭に対する関心が高まっており、口臭で悩む人は年々増加している。今回、口臭とストレスの相関について検討した。唾液を試料とした測定は、採取が簡単なこと、採取時に侵襲を伴わないこと、汚染の危険性が低いことなどの特徴から、ストレス研究などの分野で注目されている。口腔ガスが低値な人、すなわち口臭がない被験者の方がクロモグラニン A が高く、気分アンケートにおいても抑うつ感が高く、友好性が低いことが観察された。また、コルチゾールについては差がみられなかった。ストレスを受けるとストレス反応系として視床下部-交感神経-副腎髄質系 (SAM 系) と視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系 (HPA 系) が活性化される。口臭で悩んでいる人は、実際口臭がなくてもストレスを感じていることが確認された。SAM 系を介したストレス反応であることが確認された。歯科領域におけるストレスに対する対策が必要なが示唆された。

<引用文献>

- 1) Ju Jiang, et al, Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga Mice. Journal of Dermatological Scienc 56,37-42. 2009
- 2) Funakushi N., et al. (2011) Ameliorating

effect of Yokukansan on the development of atopic dermatitis-like lesions and scratching behavior in socially isolated NC/Nga mice. Arch Dermatol Res. 303,659-67.2011

3) Nishi A., et al. Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in Uncaria hook, is a potent serotonin1A receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by yokukansan. Neuroscience 207,124-136.2012

4) Koga N., et al, Kososan, a traditional Japanese herbal medicine, reverses sleep disturbance in socially isolated mice via GABAA-benzodiazepine receptor complex activation. Phytomedicine. 21,697-703.2014

5) Mizoguchi K., et al, Dopamine-receptor stimulation in the prefrontal cortex ameliorates stress-induced rotarod impairment. Pharmacol Biochem Behav. 72,723-8.2002

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)

Yoshinao Harada, Takuji Yamaguchi, Ailing Hu, Satoru Otani, Cheolsun Han, Yumiko Kurihara, Hiroyuki Kobayashi, Hajime Arai.

Effect of hangekobokuto for amelioration of aggressiveness and social behavior in socially isolated mice.

Traditional & Kampo Medicine. 2018

DOI:10.1002/tkm2.1095 査読あり

[学会発表](計 2 件)

原田佳尚「隔離ストレス誘発攻撃行動に対する半夏厚朴湯の効果」

第 6 7 回日本東洋医学会学術総会、2016 年

韓哲舜、「隔離ストレス誘発情動障害に対する香蘇散の効果」

第 6 7 回日本東洋医学会学術総会、2016 年

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 弘幸 (KOBAYASHI, Hiroyuki)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号: 50245768

(2) 研究分担者

大谷 悟 (OTANI, Satoru)

了徳寺大学・健康科学部・教授

研究者番号：70211795

(3)研究協力者

山口 琢児 (YAMAGUCHI, Takuji)

胡 愛玲 (HU, Ailing)

原田 佳尚 (HARADA, Yoshinao)

加藤 正幸 (KATOU, Masayuki)