

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07119

研究課題名（和文）発育期における神経精神機能の発達異常に対する漢方治療の基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on kampo therapy for developmental abnormalities of neuropsychiatric functions

研究代表者

荒木 良太（Araki, Ryota）

摂南大学・薬学部・講師

研究者番号：90710682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：臨床現場では発達障害に対して様々な漢方薬が使用されている。本研究では、漢方薬がどのように発達障害の症状を軽減するのかを明らかにするために、基礎的な研究を行った。隔離飼育マウスを用いた検討から、加味温胆湯は多動などの症状を抑制することが示されたが、その作用は対症療法な側面が強い可能性が示された。また、腸内細菌叢のかく乱により社会性が低下したマウスを用いた検討から、回腸の抗菌ペプチドのReg3ファミリーの発現減少が間接的に脳の発達に關与する可能性が示された。さらに、回腸の抗菌ペプチドのReg3ファミリーの発現を誘導する漢方薬として補中益気湯を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床において、様々な漢方薬が重い副作用を伴わずに発達障害に対して有効性を示す症例が報告されており、漢方薬が発達障害治療の選択肢の1つになり得るものと考えられる。しかしながら、根拠に基づく医療が重視される現代医療では、科学的根拠に乏しい漢方薬が十分に活用されているとは言い難い。本研究結果をさらに発展させることにより、精神症状に対して対症療法的に使用できる漢方薬や、腸内細菌叢の乱れている発達障害に対して腸の異常から精神機能の異常を改善できる漢方薬を科学的に示せるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In clinical, various kampo medicines have been used for developmental disorders. In this study, basic research was carried out to clarify how kampo medicines alleviate the symptoms of developmental disorders.

In isolation-reared mice, kamiuntanto was shown to suppress symptoms such as hyperactivity, but its effects may be more symptomatic.

In mice with impaired sociability due to disruption of the gut microbiota, it was shown that decreased expression of Reg3 family, antimicrobial peptides, in the ileum may be indirectly involved in abnormal brain development. Furthermore, hochuekkito was found to be a kampo medicine that induces the expression of the Reg3 family in the ileum.

研究分野：神経精神薬理学

キーワード：発達障害 漢方薬 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉症や注意欠如・多動症などの発達障害の児童生徒数は近年増加しており、早急な対策が求められる。発達障害の原因は未だ十分に解明されていないものの、家系研究や双生児研究などから、少なからず後天的な要因が関与するものとされている。一般的に、発育期における適切な療育が発達障害の症状を改善させることに鑑みると、発育期における神経精神機能の発達が発達障害の症状を改善させるうえで重要であるものと考えられる。

発達障害の主な治療法は療育などの発育期の環境調整であるが、衝動性や興奮などにより生活に支障をきたす場合は薬物療法が検討されている。発達障害の薬物療法では中枢刺激薬、抗精神病薬、抗うつ薬、抗てんかん薬などが用いられるが、これら薬物による治療は対症療法に過ぎず、神経精神機能の発達を促す効果は期待できない。そのため、長期的な服用が必要とされるケースが多いが、これら薬物は副作用が強く、発育期の小児に対する使用は慎重にならざるを得ない。

一方で臨床現場では、発達障害に対して、漢方薬が重い副作用を伴わずに有効性を示す症例が報告されており、漢方薬が発達障害治療の選択肢の1つになり得るものと考えられる。しかしながら、根拠に基づく医療が重視される現代医療では、科学的根拠に乏しい漢方薬が十分に活用されているとは言い難い。とりわけ、発達障害に対する漢方薬の有効性に関しては症例報告があるものの、作用機序などの科学的根拠は見られない。

2. 研究の目的

本研究では発達障害への有効性が示唆される漢方薬の効果を明らかにすることを目的に、発育期の環境により行動異常が見られる動物モデルを作製し、作製した動物モデルを用いて、漢方薬が対症療法的に作用するのか、発達を促すことで持続的に作用するのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル

本研究では、発育期の環境により神経精神機能に異常が見られる動物モデルとして、発育期に社会的に隔離飼育したマウス(隔離飼育マウス)と、離乳前に抗菌薬のクラリスロマイシン(CAM)を投与し腸内細菌叢をかく乱したマウス(CAMマウス)を用いた。

隔離飼育マウスは雄性 ddY 系マウスを3週齢から6週間単独飼育することで作製した。対照マウス(集団飼育マウス)は1ケージ5匹で飼育した。9週齢時に解析を行った。

CAMマウスは、CAM(75 µg/kg/回)を0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁し、雄性 C57BL/6J マウスに15日齢から5日間1日2回経口投与することで作製した。7週齢時に解析を行った。対照マウスにはCMCを投与した。

(2) 漢方薬の投与

隔離飼育マウスを用いた検討では、加味温胆湯(1000 mg/kg)を1日1回経口投与した。持続的な効果を評価するために、加味温胆湯は発育期の3週齢から6週齢までの3週間投与した。

回腸の Reg3β/γ の mRNA 量への影響を解析する検討では、3または5週齢の雄性 C57BL/6J マウスに大建中湯、大柴胡湯、補中益気湯、抑肝散をそれぞれ1000 mg/kg の用量で経口投与し、24時間後に回腸における mRNA 量を解析した。

(3) 新奇環境下における自発運動量の解析

30×30×30 cm の新奇ケージに解析マウスを入れ、ANY-maze Video Tracking Software(Stoelting, Wood Dale, IL, USA) を用いて30分間の移動距離を測定した。

(4) 新奇マウスと遭遇した際における自発運動量の解析

図1のように30×30×30 cm のケージを金網で2つのコンパートメントに分け、大きいコンパートメントに解析マウスを、小さいコンパートメントに新奇マウスを入れ、ANY-maze Video Tracking Software を用いて20分間の移動距離を測定した。



図1. 新奇マウスと遭遇した際における自発運動量の解析装置

(5) 3チャンバー試験

図2のような3部屋に区切られた解析用ケージの両端の部屋に空のカゴを設置し、解析マウスを真ん中の部屋に入れ、10分間自由に探索させた。その後、片方のカゴに7週齢の雄性 C57BL/6J マウスを入れ、さらに解析マウスを10分間自由に探索させた。Stranger zone (マウスが入ったカゴがある部屋)、Empty zone (マウスが入っていないカゴがある部屋) での滞在時間

を ANY-maze Video Tracking Software を用いて解析した。また、測定した Stranger zone 滞在時間と Empty zone 滞在時間から以下の計算式を用いて Preference index を算出した。

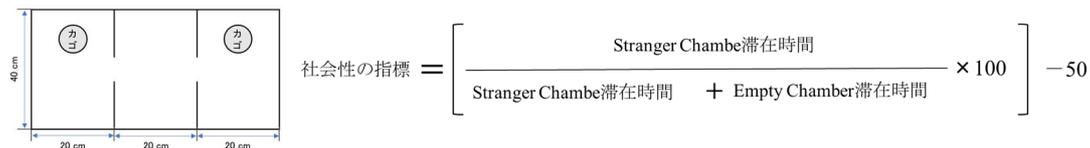


図 2 . 3 チャンバー試験装置と社会性の指標

(6) 嗅覚馴化/脱馴化試験

精製水、100 倍希釈したアーモンド抽出物 (Mikoya kosho, Tokyo, Japan)、バナナ抽出物 (Mikoya kosho)、社会的臭気 1 と社会的臭気 2 を準備した。社会的臭気 1 と社会的臭気 2 は、試験マウスと同性同週齢総系統のマウスを飼育しているそれぞれ別のケージの床敷きを綿棒で拭うことで作製した。精製水、アーモンド抽出物、バナナ抽出物 50 μ L および社会的臭気をしみ込ませた綿棒を、ケージの蓋に取り付け、精製水、アーモンド抽出物、バナナ抽出物、社会的臭気 1、社会的臭気 2 の順序で同じ臭気を 2 分ずつ 3 回連続で提示し、マウスがにおいをかくのに費やした時間を測定した。

(7) 定量的リアルタイム PCR

回腸末端部 5 mm を採取し、RNA 抽出、cDNA 合成を行った。合成した cDNA を鋳型に Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (Takarabio, Shiga, Japan) を用いて、各遺伝子の mRNA 量を解析した。

4. 研究成果

(1) 隔離飼育マウスを用いた検討

過去の検討から、隔離飼育マウスでは新奇環境下および新奇マウスと遭遇した際において多動が見られること、加味温胆湯 (1000 mg/kg) を 1 時間前に経口投与することで新奇マウスと遭遇した際において多動が抑制されること、加味温胆湯が大脳皮質前頭前野の細胞外セロトニン量を増加させることを見出している (引用文献)。そこで本研究では、発育期の 3 週齢から 6 週齢までの 3 週間、加味温胆湯 (1000 mg/kg) を経口投与することで、9 週齢時の多動を抑制できるかを評価した。その結果、加味温胆湯はどちらの多動も抑制傾向にはあるものの、有意な抑制作用は見られなかった (図 3)。過去の結果を踏まえると、隔離飼育マウスに対する加味温胆湯の多動抑制作用は比較的短期的な対症療法にあたるものであり、神経精神機能の発達を促す効果は期待できない可能性が考えられた。

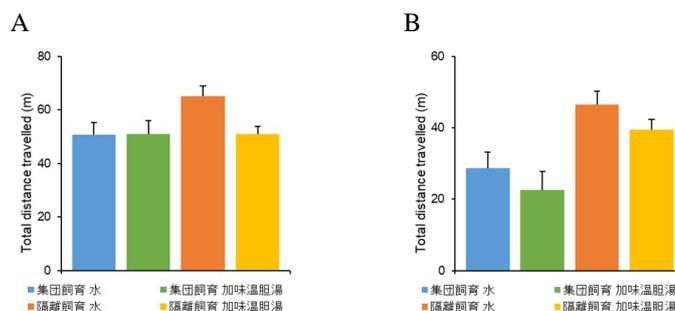


図 3 . (A) 新奇環境下における自発運動量。二元配置分散分析：主効果 (飼育) [$F_{1,36} = 2.97, P = 0.09$]、主効果 (投与) [$F_{1,36} = 2.82, P = 0.10$]、交互作用 (飼育×投与) [$F_{1,36} = 2.97, P = 0.09$]。 (B) 新奇マウスと遭遇した際における自発運動量。二元配置分散分析：主効果 (飼育) [$F_{1,33} = 11.10, P = 0.02$]、主効果 (投与) [$F_{1,33} = 1.60, P = 0.22$]、交互作用 (飼育×投与) [$F_{1,33} = 0.01, P = 0.93$]。

(2) CAM マウスを用いた検討

隔離飼育マウスを用いた検討では主に漢方薬が脳に直接作用することを想定していたが、漢方薬は全身に幅広く作用することから、脳に対して間接的に作用する可能性も考えられる。そこで本検討では脳機能や発達障害との関連が報告されている腸や腸内細菌に注目した。

本検討ではまず、発育期に腸内細菌叢がかく乱されることで神経精神機能の発達が障害されるような動物モデルの作製を試みた。離乳前の 2 週間に様々な抗菌薬を臨床用量相当で経口投与し、成熟後の 7 週齢時に 3 チャンバー試験により社会性を評価したところ、マクロライド系抗菌薬の CAM を投与したマウスにおいて、社会性の低下が観察された (図 4)。

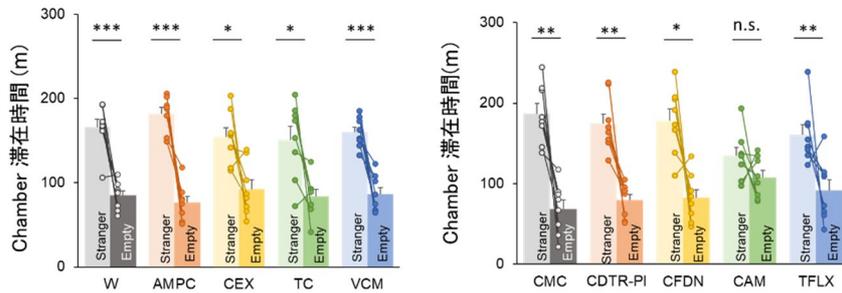


図4 . 離乳前抗菌薬投与が成熟後の社会性に及ぼす影響。W : 精製水、AMPC : アモキシシリン、CEX : セファレキシン、TC : テトラサイクリン、VMC : バンコマイシン、CMC : 0.5 % カルボキシメチルセルロース、CDTR-PI : セフジトレンピボキシル、CFDN : セフジニル、CAM : クラリスロマイシン、TFLX : トスフロキサシン。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

CAM に絞りさらなる条件検討を行ったところ、CAM (75 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{回}$) を 15 日齢から 5 日間 1 日 2 回経口投与することで同様の社会性の低下が見られることを明らかにした (図 5 A)。この条件で CAM マウスの行動を解析したところ、対照マウスと比べて CAM マウスでは他のマウスのにおい (社会臭) に対する反応が乏しいことが示された (図 5 B)。

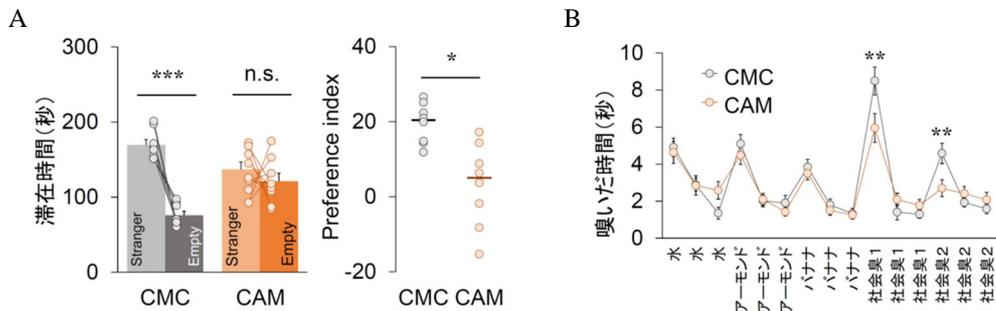


図5 . 離乳前 CAM 投与が成熟後の社会性に及ぼす影響 (A) 3 チャンバー試験。(B) 嗅覚馴化/脱馴化試験。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

CAM マウスにおいて行動の異常が見られたことから、次に糞便サンプルから腸内細菌叢を解析した。その結果、対照マウスと比べて CAM マウスでは腸内細菌による腸管上皮細胞への攻撃が亢進しているような菌叢を有していること、こうした菌叢を有しているマウスでは脳の発達が障害されていることが予想された (data not shown)。こうした結果から、CAM マウスでは腸管バリア機能が低下することで腸内細菌からの攻撃が増加していると予想し、腸管バリア機能を解析した。その結果、対照マウスと CAM マウスで、腸管透過性、結腸の粘液層には違いは見られなかったが、対照マウスと比べて CAM マウスでは回腸において抗菌ペプチドである *Reg3 β/γ* (*Reg3b/g*) の mRNA 量が減少していることを見出した (図 6)。Reg3 ファミリー以外の抗菌ペプチドの mRNA 量に違いは見られなかった。

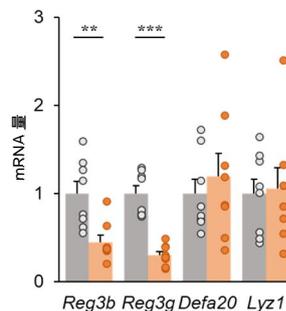


図6 . CAM マウスの回腸における抗菌ペプチド mRNA 量。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

回腸の抗菌ペプチドの Reg3 ファミリーの発現減少により腸管バリア機能が低下することで腸内細菌からの攻撃が増加していると考えられることから、回腸の Reg3 ファミリーの発現を誘導するような漢方薬が CAM マウスの異常を改善できるものと考えた。そこで、回腸の *Reg3 γ* の mRNA 量を増加させるような漢方薬のスクリーニングを行った。腸管免疫への作用が報告されている大建中湯、大柴胡湯、補中益気湯、および腸管免疫への作用は報告されていないが発達障害に対して用いられる抑肝散について検討を行ったところ、補中益気湯を経口投与したマウス

の回腸において、Reg3 γ の mRNA 量の増加が見られた（図7）。現在、補中益気湯に絞り、さらなる解析を進めている。

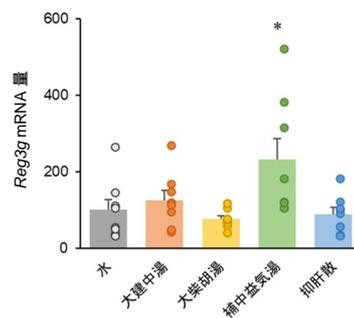


図7 . 漢方薬がマウスの回腸 Reg3g mRNA 量に及ぼす影響。* $P < 0.05$ vs 水投与群。

< 引用文献 >

Hiraki Y, Araki R, Fujiwara H, Ago Y, Tanaka T, Toume K, Matsumoto K, Yabe T. Kamiuntanto increases prefrontal extracellular serotonin levels and ameliorates depression-like behaviors in mice. *J Pharmacol Sci.*, 139, 72-76, 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木良太
2. 発表標題 精神神経症状に対する和漢薬の作用に関する基礎研究 - モノアミン神経系の解析 -
3. 学会等名 第38回和漢医薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木良太、大石結、富永悠季、竹本羽那、村田彩綺、井上亮、喜多絢海、矢部武士
2. 発表標題 幼少期における抗菌薬の使用と自閉症スペクトラム障害の関連性についての基礎的研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石結、富永悠季、竹本羽那、村田彩綺、平川泰佑、井上亮、喜多絢海、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 幼若期クラリスロマイシン投与が腸内細菌叢と大脳皮質遺伝子発現に及ぼす影響の網羅的解析
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永悠季、大石結、竹本羽那、村田彩綺、平川泰佑、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 幼若期クラリスロマイシン投与と自閉症スペクトラム障害様行動に関する基礎的研究
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木良太、竹本羽那、村田彩綺、平川泰佑、井上亮、喜多絢海、矢部武士
2. 発表標題 幼少期のクラリスロマイシン投与は成熟後の自閉症様行動を誘発する
3. 学会等名 第142回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木良太、井上 亮、尾崎 清和、稲永 美乃里、喜多 絢海、矢部 武士
2. 発表標題 抗菌薬による発達期の腸内細菌叢の異常と自閉症スペクトラム障害との関連性についての基礎的研究
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木良太、村田彩綺、竹本羽那、平川泰佑、井上亮、喜多絢海、矢部武士
2. 発表標題 幼若期クラリスロマイシン投与マウスの腸内細菌叢と脳内遺伝子発現の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹本羽那、村田彩綺、岡田真依、平川泰佑、石原百華、喜多絢海、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 幼若期のクラリスロマイシン投与は自閉症スペクトラム障害様行動と樹状突起スパインの形成異常を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村田彩綺、竹本羽那、岡田真依、平川泰佑、石原百華、稲永美乃里、尾崎清和、川崎通夫、喜多絢海、荒木良太、矢部武士
2. 発表標題 幼若期クラリスロマイシン投与により自閉症スペクトラム障害様行動を示すマウスの腸管バリア機能の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	矢部 武士 (Yabe Takeshi) (40239835)	摂南大学・薬学部・教授 (34428)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------