

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590776

研究課題名（和文）嗅覚障害（感覚器障害）の予防・治療に有効な和漢薬の作用機序と  
活性物質の探索研究研究課題名（英文）Studies of active substances and action mechanisms of traditional  
Japanese medicines on anosmia, olfactory disturbance, using  
olfactory bulb lesioned mice.

研究代表者：鳥居塚 和生（TORIIZUKA KAZUO）

昭和大学 薬学部 教授

研究者番号：60135035

## 研究成果の概要（和文）：

硫酸亜鉛（5%）20 $\mu$ L 点鼻による嗅覚障害モデルマウスを作成し、嗅球中モノアミン含量への影響について電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法により検討した。その結果、対照群に対して、硫酸亜鉛を点鼻投与した群のドーパミン（DA）組織重量は低下することがわかった。この嗅覚障害モデルマウスに対して、漢方処方の加味逍遙散（KSS：柴胡、芍薬、朮、茯苓、当帰、甘草、牡丹皮、山梔子、薄荷、生姜）を経口投与した群では、DA 組織重量の低下が抑制された。構成生薬 10 種より一味の生薬を除いた処方を作成し生薬の寄与を検討したところ、加味逍遙散の脳内モノアミン含量に対する障害改善効果は、構成生薬が総て揃った処方としたときが最も高く、一味を抜くことで弱まることを確認した。また甘草、芍薬、生姜、朮が効果に大きく寄与することが示された。

また感覚器入力に対する行動薬理的検討を実施した。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ことを明らかにした。またこのモデルにおける嗅球におけるドーパミンレベルの著しい低下と、受動的回避課題の大幅な減衰を引き起こすことに関与する物質を明らかにする目的で、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( $\beta$ -alanyl-L-histidine)の関与について検討した。L-カルノシンの腹腔内投与により用量依存的にマウスの常同行動を惹起した。またこれらはドーパミン受容体拮抗剤のクロロプロマジン、ハロペリドールおよびドーパミン合成酵素阻害剤で抑制された。中枢におけるドーパミン神経系における制御に L-カルノシンが寄与することを示した。またドーパミンの再取り込み阻害剤ノミフェンシンの投与で、記憶学習障害が顕著な改善を示すことを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Reduction of olfactory sense is one of the symptoms of senile dementia of the Alzheimer type (SDAT). Some researchers hypothesize that changes in the olfactory system are not only a symptom but also a cause for SDAT, but little is known about the correlation between olfactory sense and memory. In animal experiments, a reduction of memory maintenance has been reported in rats after olfactory bulbectomy. The role of the olfactory bulb in rodents is related to exchange of information, sex instinct and emotion caused by odor. The olfactory bulb is not only an organ of smell but is also related to emotional behavior.

Spraying zinc sulfate into the nasal cavity promotes the secretion of glutamate, so that the sense of smell is definitely induced by obstruction of the regeneration of olfactory bulb epithelial cells. In the experiments until now, reductions of learning

memory and of the neurotransmitters in the brain were observed to be induced by zinc sulfate.

We investigated the effects of Kampo formulation, Kamishoyosan, on changes of neurotransmitters and reduction of learning memory in mice with olfactory bulb lesioned mice. Kamishoyosan extract was administered orally and an improvement in learning memory and reversal of the decrease of neurotransmitters in the brain were observed. It is therefore suggested that Kamishoyosan may improve learning memory repairing the injury to the neurons and restoring the amount of neurotransmitters. And we observed the behavioral change under systemic administration of L-carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) in mice, and L-carnosine causes stereotyped behavior which is dependent on dopaminergic transmission. Furthermore, administration of nomifensine, dopamine reuptake inhibitor, before zinc sulfate irrigation significantly protected the occurrence of acquisition impairment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	900,000	270,000	1,170,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学

## 1. 研究開始当初の背景

感覚器からの脳への刺激は、高次機能の維持に必須であると言われる。高齢化社会に到来に伴い、生活の質（QOL）の向上が問われている現在、感覚器異常に対する治療薬を探索することの必要性は高い。

感覚神経の中で嗅覚神経系は鼻粘膜—嗅球—脳求心部位と入力構造が比較的単純ではあり、ヒトではその障害は意識されないことが多い。しかしながら Alzheimer 病の発病初期および痴呆を伴う Parkinson 病では共通して嗅覚障害が見られ嗅覚神経系で神経変性が著しいことが知られている。また嗅球摘出ラットは情動の変化を伴う学習障害モデルとして用いられている。このように嗅覚系は高次機能との関わりが深い感覚器であるものの、鼻粘膜上の嗅細胞からの求心性入力による高次機能の調節機構についての研究やましては嗅覚障害に対する治療薬の開発研究は極めて少ないのが現状である。

先に申請者らはマウスを用いた嗅覚障害実験で著明な受動的回避学習の獲得・保持障害が見られること、この障害は、漢方処方や生薬の長期投与により改善あるいは軽減する事をみいだした（Song Q-H, Toriizuka K,

et al.: Jpn J Pharmacol, 86, 183-188, 2001)

（Song Q-H, Toriizuka K, et al.: J Traditional Med, 18, 64-70, 2001）。この結果は、このような漢方処方や生薬が嗅覚系の障害に対する治療薬あるいは改善薬となる可能性を示している。

本研究は感覚器障害、特に記憶学習能や QOL の維持に重要であるが患者自身は病気としての自覚意識が少ない嗅覚障害に焦点をあて、それを改善する治療薬を漢方処方・生薬に見出そうとするものである。また本研究は、嗅覚障害モデルの中樞コリン作動性神経の関与についても検討することから、その過程を通じて抗痴呆薬探索の可能性も期待できる。

## 2. 研究の目的

従来、嗅覚系の実験は動物の嗅球を摘出することで検討されている。このような嗅球摘出は鼻粘膜からの求心性の系のほかに脳から嗅球へ向かう系も剥奪してしまうため、嗅覚入力の役割のみを検討するには不適當であったが用いられてきた。また嗅球自体を摘出してしまいうため、嗅覚機能の回復という薬効解析に応用できず、事実そのような検討もほ

とどなされてない。

申請者らは、硫酸亜鉛の点鼻により鼻粘膜に障害を与えるという方法を用いて記憶学習能が低下することを見出したが、これは感覚器からの入力が高次機能に重要な影響があるということを示す新たな知見である。また嗅覚の入力障害の治療薬や改善薬を探索することも可能な実験系である。この実験系を用いて、効果が認められた漢方処方や生薬を手掛かりとして次の2点を明らかにすることを3年間の目的とする；①どのような作用機序で改善するのかを、(i)嗅球の神経細胞と神経伝達物質、(ii)嗅球から視床下部や嗅内野へ神経細胞の投射などに焦点を絞って検討する、②どのような物質が有効であるのか、生理活性成分を明らかにする（複合作用であることも念頭に置く）。

### 3. 研究の方法

#### 1) 被験薬の調製

漢方処方・加味逍遙散（KSS）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。

#### 2) 嗅覚障害モデルマウスの作成・被験薬投与プロトコール

4-5週齢雄性 ddY 系マウスあるいは C57BL/6 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、4～6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。

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（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）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。

#### 3) 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。

#### 4) 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℃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。

#### 5) 脳内モノアミンの抽出・測定

嗅球画分を試料として 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。

#### 6) カルノシン投与による嗅覚障害モデルマウスへの影響

##### 6-1. 試薬類の調製

L-Carnosine（カルノシン； $\beta$ -alanyl-L-histidine）、 $\alpha$ -methyl-DL-p-tyrosine（ $\alpha$ -MRT）、chlorpromazine、haloperidol 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。

##### 6-2. 投与実験

4-5週齢雄性 ddY 系マウスを日本 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）、カルノシン投与群、カルノシン+chloro-promazine 投与群、カルノシン+ $\alpha$ -MRT 投与群、カルノシン+haloperidol 投与の4群に分けた。カルノシンの濃度依存性は3-300 mg/kg で検討した。

##### 6-3. 常同行動

常同行動は apomorphine 誘導常同行動スケールを利用し、45秒の観察を5分間インターバルで30分実施しスコア化した。

#### 4. 研究成果

<平成 21 年度>

硫酸亜鉛 (5%) 20  $\mu$ L 点鼻による嗅覚障害モデルマウスを作成し、嗅球中モノアミン含量への影響について電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー法により検討した。その結果、対照群に対して、硫酸亜鉛を点鼻投与した群のドーパミン (DA) 組織重量は 3 日経過では 70%, 7 日経過では 55% 程度にまで低下していた。モノアミン類の代謝物の 3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) は DA より代謝され生成されるが、この DOPAC も組織重量においても 3 日経過では 30%, 7 日経過では 25% 程度に低下していた。一方、ノルエピネフリン (NE) およびセロトニン (5-HT) に目立った変化はみられなかった。

硫酸亜鉛嗅覚障害モデルマウスに対して、漢方処方 of 加味逍遙散 (KSS) を経口投与して脳内アミン類への影響を検討した。KSS 群では、DA 組織重量は 200% に上昇していた。DOPAC 組織重量についても 300% と高値を示した (図-1, 図-2)。NE 及び 5-HT では、それぞれの群の間で目立った変化が見られなかった。構成生薬 10 種より一味の生薬を除いた処方を作成し生薬の寄与を検討したところ、生姜抜き加味逍遙散投与群では DA 組織重量は 140% を示し、DOPAC 組織重量は 200% を示した。NE 及び 5-HT では、目立った変化はみられなかった。一味抜き処方での検討から、加味逍遙散の障害改善効果は処方としたときが最も高く、一味を抜くことで弱まることを確認した。また甘草、芍薬、生姜、朮が効果に大きく寄与すると考えられた。

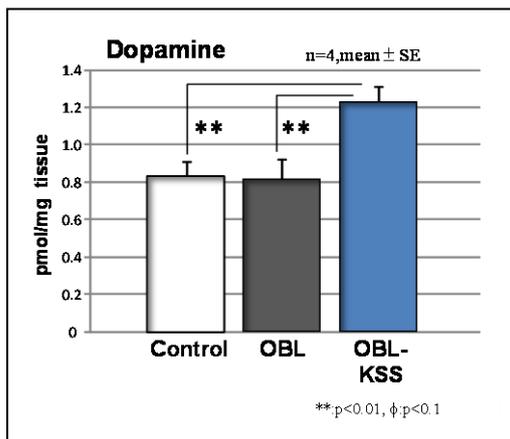


図-1

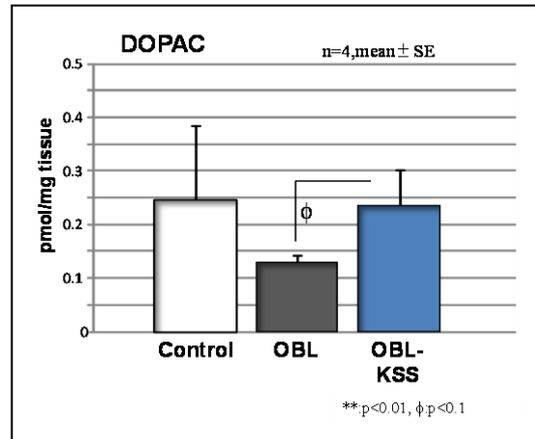


図-2

<平成 22 年度>

漢方処方の加味逍遙散 (KSS) を経口投与した群では、嗅覚障害を予防する可能性が示されたため、ステップスルー型受動的回避学習装置を用い記憶学習能への影響を検討した。記憶保持能は嗅球障害によって低下した。この低下はコリンエステラーゼ阻害剤のフィズチグミンにより抑制されたことから、嗅覚障害によりコリン作動性神経系の低下が起こることが示された。これらを踏まえ KSS の効果を経日的に評価したところ、嗅覚障害群では記憶能の低下が認められたが、一方、KSS 投与群では低下が抑制され記憶能の改善が認められた (図-3, 図-4, 図-5)。

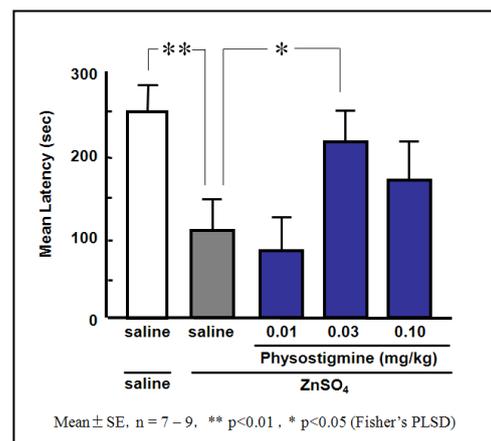


図-3

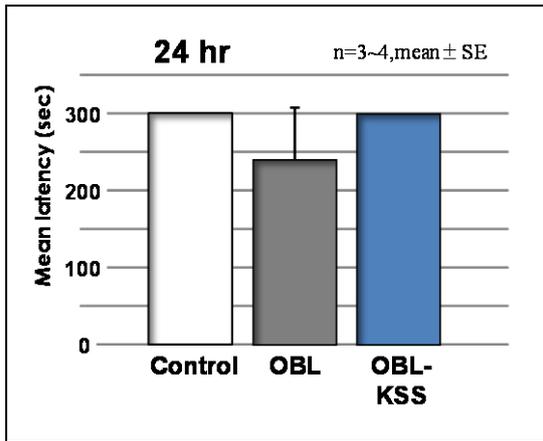


図-4

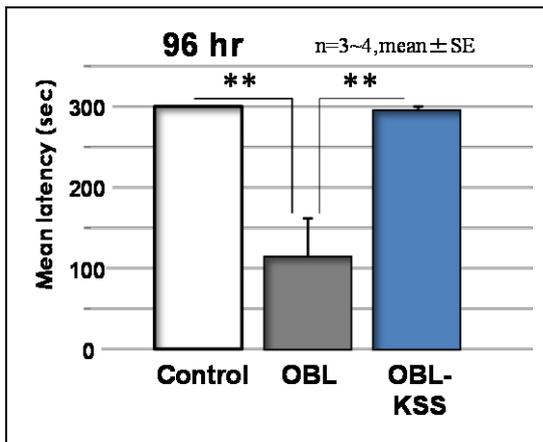


図-5

また、オープンフィールドを用いた自発運動量の測定から、これらの DA 神経系が関与する行動には、嗅球において神経伝達物質として作用している L-carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) が関与していることを示す成績が得られた。

<平成 23 年度>

嗅覚障害モデルにおける嗅球におけるドーパミンレベルの著しい低下と、受動的回避課題の大幅な減衰を引き起こすことに関与する物質を明らかにする目的で、嗅球における神経伝達物質の機能を持つとされる L-carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) の関与について検討した。L-carnosine の腹腔内投与により用量依存的にマウスの常同行動を惹起した (図-6)。

またこれらはドーパミン受容体拮抗剤のクロプロマジン、ハロペリドールおよびドーパミン合成酵素阻害剤で抑制された。中枢におけるドーパミン神経系における制御に L-carnosine が寄与することを示した (図-

7, 図-8)。さらにドーパミンの再取り込み阻害剤ノミフェンシンの投与で、記憶学習障害が顕著な改善を示すことを明らかにした (図-9)。

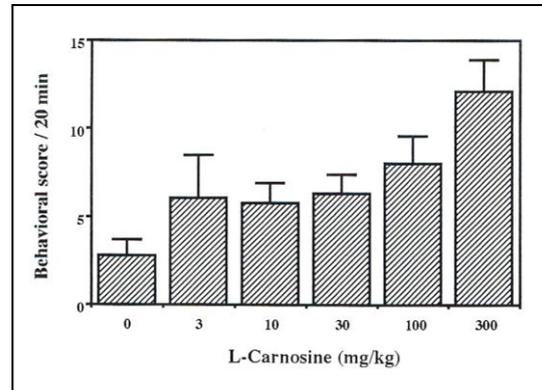


図-6

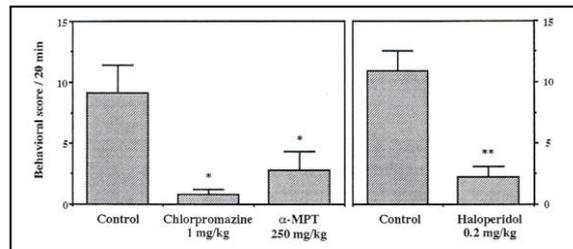


図-7

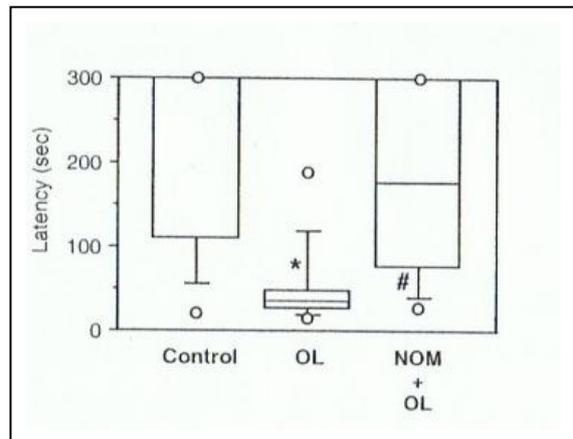


図-8

##### 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 5 件)

- 1) Koike Y, Fukumura M, Hirai Y, Hori Y, Usui S, Atsumi T, Toriizuka K: Novel phenylacetonitrile glycosides,

adenophoraside A, B, C, D and E, from Adenophora roots, J. Nat. Med., 64, 245-251, 2010

2) 堀由美子, 宮下しずか, 福村基徳, 磯田進, 平井康昭, 鳥居塚和生, 伊田喜光: ショウガ科 Curcuma 族植物の化学的識別法の検討, 日本市場品のウコン類生薬と之を材料とする健康食品について, 昭和薬学雑誌, 1(1), 73-83, 2010

3) Fujii M, Hirai Y, Miura T, Saito M, Fukumura M, Hori Y, Akita H, Toriizuka K, Ida Y: Isolation of (S)-N-feruloyl normetanephrine from Achyranthes fauriei and determination of its absolute configuration, Shoyakugaku Zasshi (The Japanese Journal of Pharmacognosy), 64(1), 26-27, 2010

4) Okamoto T, Park C-H, Noh J-S, Toriizuka K, Sei Y, Park J-C, Yokozawa T: Hepto-/reno-protective activity of Chinese prescription Kangen-karyu through inhibition of AGE formation and fibrosis-related protein expression in type 2 diabetes. J. Pharmacy and Pharmacology, 63, 952-959, 2011

5) Park CH, Yamabe N, Okamoto T, Toriizuka K, Yokozawa T: Chinese prescription kangen-karyu ameliorates the development of diabetic hepatic damages via regulating oxidative stress and inflammation in the liver of db/db mice. Biol Pharm Bull. 34(3):383-388, 2011

[学会発表] (計2件)

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

3) 鳥居塚和生, 山村実佳, 堀由美子, 福村基徳, 渥美聡孝, 磯田進, 平井康昭: 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

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳥居塚 和生 (TORIIZUKA KAZUO)  
昭和大学 薬学部 教授  
研究者番号: 60135035

### (2) 研究分担者

平井 康昭 (HIRAI YASUAKI)  
昭和大学 薬学部 准教授  
研究者番号: 50175551

堀 由美子 (HORI YUMIKO)  
昭和大学 薬学部 講師  
研究者番号: 60317584

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: