

加味温胆湯の抗痴呆作用と  
その作用機作に関する研究

矢部 武士

# 序論

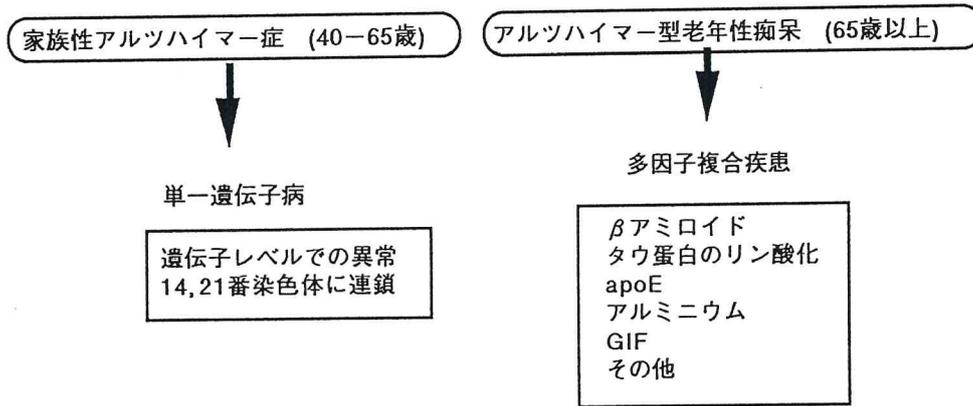


図1 アルツハイマー病の分類

アルツハイマー病の病理学的所見

1.  $\beta$ アミロイドの蓄積からなる老人斑の出現
2. 異常にリン酸化されたタウ蛋白質の沈着からなる神経原繊維変化
3. マイネルト基底核でのコリン作動性神経細胞の脱落

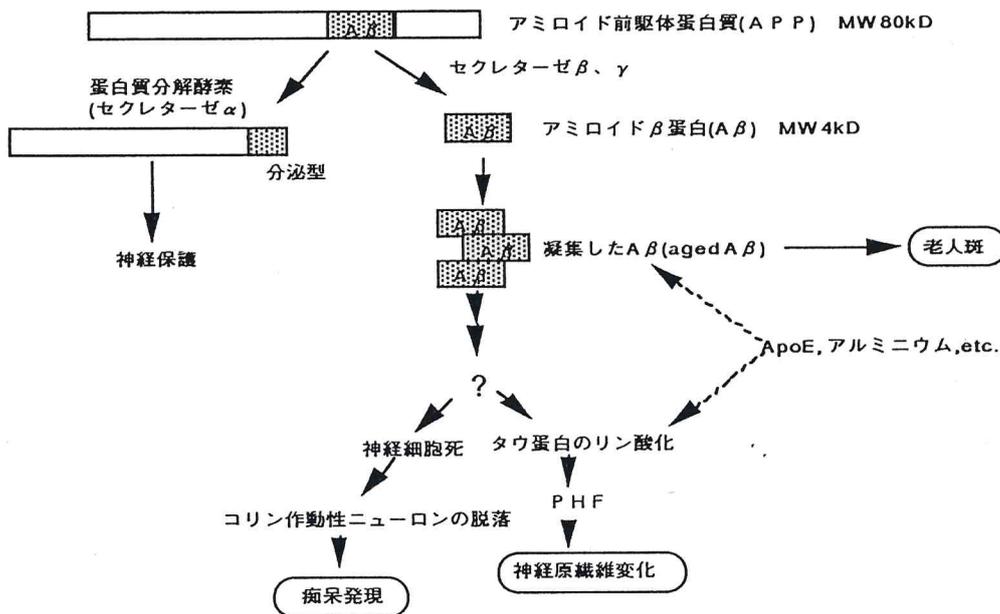


図2 アミロイド仮説によるアルツハイマー症発症機構

アルツハイマー病の発症メカニズムは今なお不明であり、治療薬の開発においても確立された戦略は存在しない。

# 痴呆症とコリン作動性神経

アルツハイマー病患者

大脳皮質、海馬のアセチルコリン量低下 → 痴呆の程度と相関  
ChAT活性低下

痴呆モデル動物

スコポラミン投与ラット → 記憶学習能低下 ← AChE阻害薬で改善  
前脳基底核破壊ラット  
老齢ラット



神経脱落を防いだり脳内アセチルコリン量をもめることにより  
痴呆症状を改善できる可能性

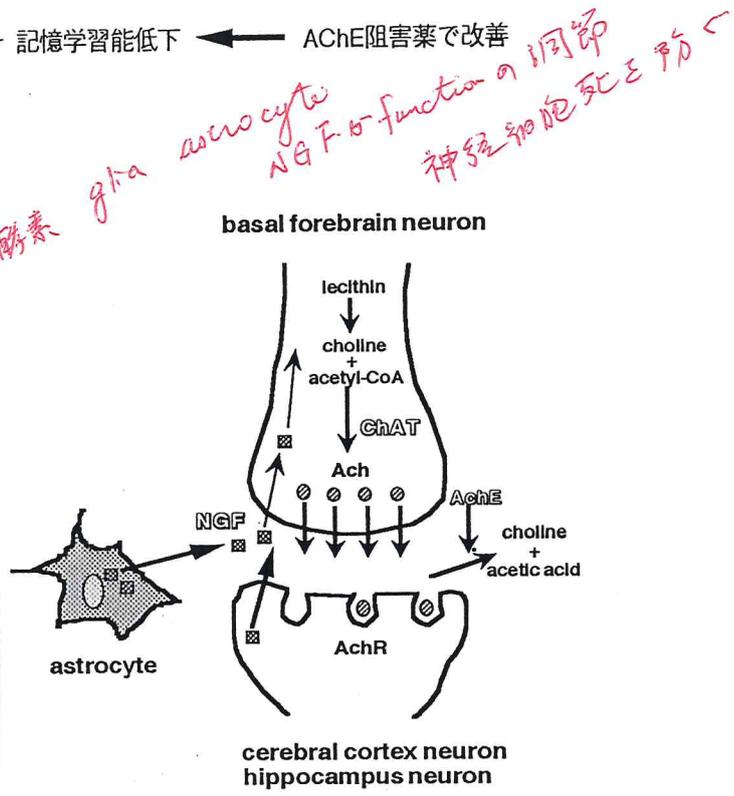
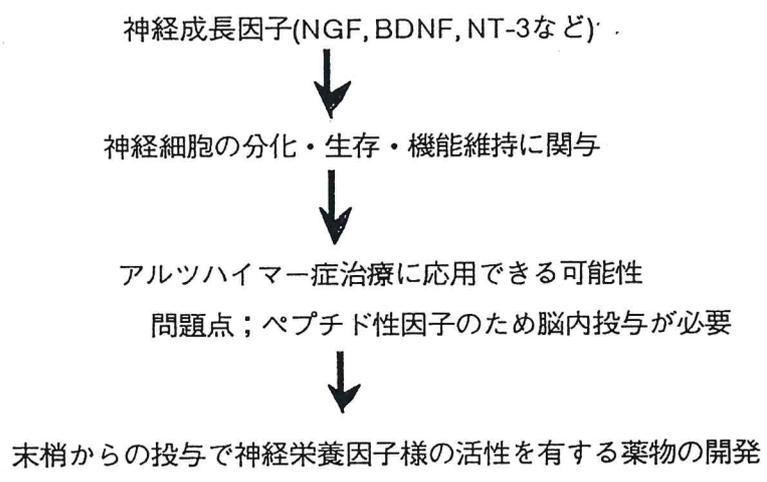


図3 アセチルコリンの合成

## 神経栄養因子



## 漢方薬

1. 現代医学で治療が困難な疾患に対して有効な場合がある。
2. 副作用が比較的少なく老人医療に適している。

臨床で数種の漢方処方に  
痴呆改善効果



より有効な漢方処方の検索  
作用メカニズムの解析  
活性本態の解明

### 本論文の構成

1. 中隔野初代培養細胞を用いた神経栄養因子様作用 (ChAT活性増加作用) を有する漢方処方の検索 (第1章)



加味温胆湯に強い活性

2. 痴呆モデル動物に対する加味温胆湯の効果 (第2章)
3. 培養細胞を用いた加味温胆湯の作用メカニズムの検討

第3章 前脳基底野初代培養細胞ChAT活性誘導作用の作用メカニズム

第4章 アストログリア細胞NGF産生促進作用の作用メカニズム

4. 加味温胆湯構成生薬のChAT及びNGF誘導作用 (第5章)

# 1. 中隔野初代培養細胞ChAT活性を指標とした神経栄養因子様活性を有する漢方処方スクリーニング (第1章)

## (目的)

記憶学習などの高次認識機構には前脳基底野に存在するコリン作動性神経が重要な働きをしていると考えられており、この領域の神経の障害による脳内アセチルコリン量の低下がアルツハイマー症における痴呆症状の主要因と考えられている。従ってこれらの領域のニューロンの脱落を防いでやったり、残存しているニューロンの機能を賦活させることができれば痴呆症状を改善できる可能性が考えられる。そこで中枢のコリン作動性神経に対して神経栄養因子様の活性を示す薬物を見出すことを目的として、初代培養中隔野細胞のアセチルコリン合成酵素 (ChAT) 活性を指標としたスクリーニング系を用いて、52種類の漢方処方について検討を行なった。

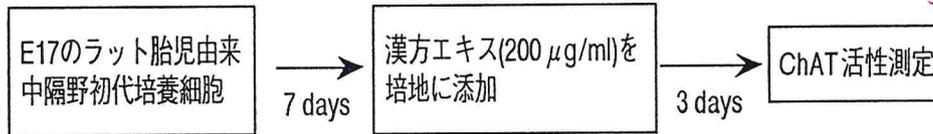
図4

ラット脳におけるコリン作動性ニューロンの分布



B: マイネルト基底核 DB: 対角対野  
 Cau: 線条体 CC: 大脳皮質  
 H: 海馬 OB: 嗅球 MS: 中隔野

## (方法)



ChAT活性 (% of cont.)	処方数
80%以下	13
80-120%	35
120-150%	2
150%以上	2

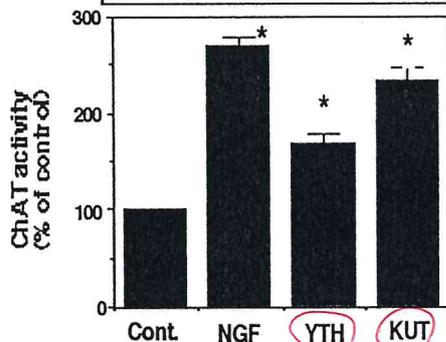


図5 中隔野初代培養細胞に対する加味温胆湯 (KUT) の影響

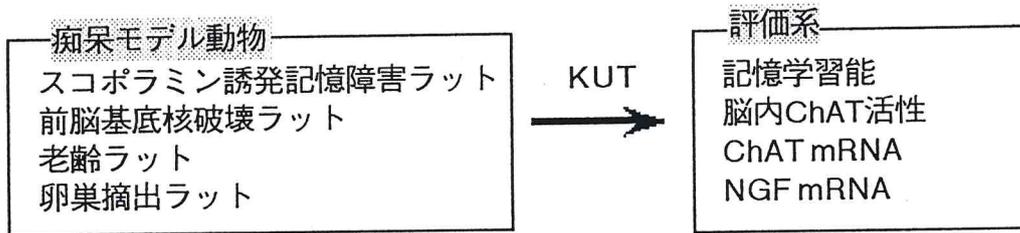
YTH; 抑肝散加陳皮半夏 KUT; 加味温胆湯  
 \* P<0.01 NGF (50ng/ml), KUT, YTH (200 μg/ml)

Table 1 加味温胆湯の組成

加味温胆湯 (g)
半夏; Pinelliae tuber (5.0g)
竹茹; Phyllostachys Caulis (3.0g)
枳実; Aurantii Fructus Immaturus (3.0g)
茯苓; Hoelen (3.0g)
陳皮; Aurantii Nobilis Pericarpium (3.0g)
甘草; Glycyrrhizae Radix (2.0g)
遠志; Polygalae Radix (2.0g)
玄参; Scrophulariae Radix (2.0g)
人参; Ginseng Radix (2.0g)
地黄; Rehmanniae Radix (2.0g)
酸棗仁; Zizyphi Spinosi Semen (2.0g)
大棗; Zizyphi Fructus (2.0g)
生姜; Zingiberis Rhizoma (0.5g)
(Total 31.5g)

## 2. 痴呆モデル動物に対する加味温胆湯(KUT)の抗痴呆作用の検討(第2章)

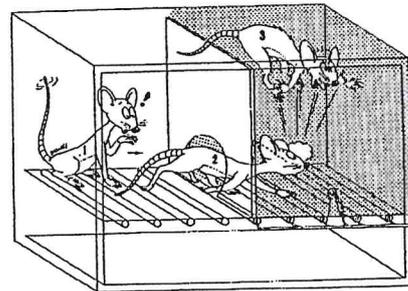
初代培養コリン作動性神経細胞を用いたスクリーニングにより強いChAT活性増加作用が認められた加味温胆湯(KUT)について種々の痴呆モデル動物を用い大脳皮質ChAT活性や受動的回避学習試験などを指標にin vivoでの作用の検討を行なった。



### 典型的な記憶学習試験

1. 受動的回避反応 { ステップスルー式  
ステップダウン式
2. 能動的回避反応 (弁別条件回避反応) { レバー押し型  
シャトル型  
その他
3. 迷路試験 (直線迷路、TorY迷路、空間迷路、放射状迷路等)
4. その他

図6 ステップスルー式受動的回避学習試験



(抗痴呆薬の探求; 田所作太郎編)

### [前脳基底核破壊ラットに対する作用]

図7 イボテン酸注入による前脳基底核の破壊

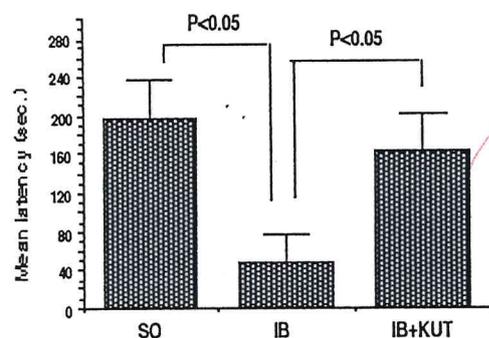
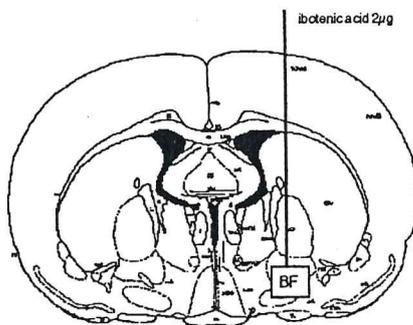


図8 前脳基底核破壊動物の受動的回避行動に及ぼす加味温胆湯の作用

前脳基底核破壊群 (IB) では偽手術群に比べて潜時の短縮が認められたが、加味温胆湯はこの低下を有意に改善した。

[老齡ラットに対する作用]

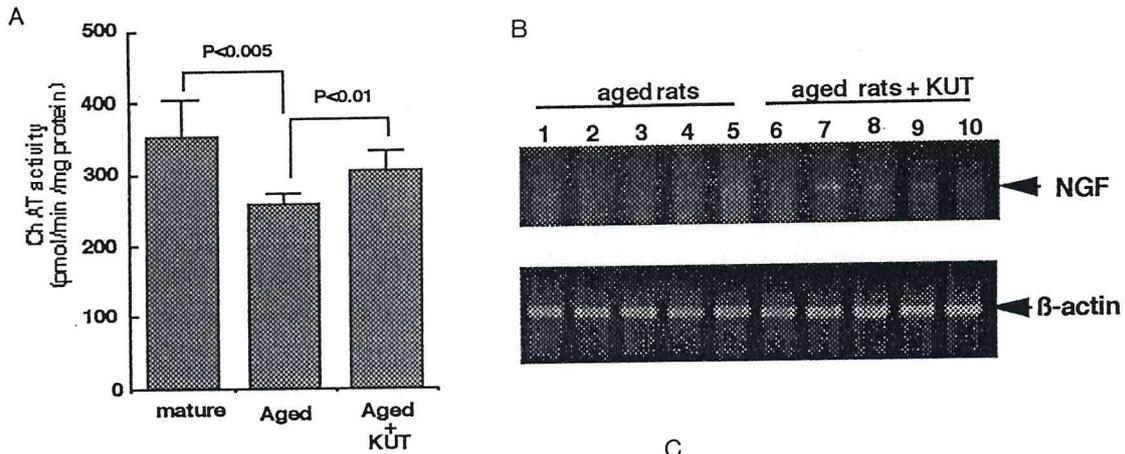
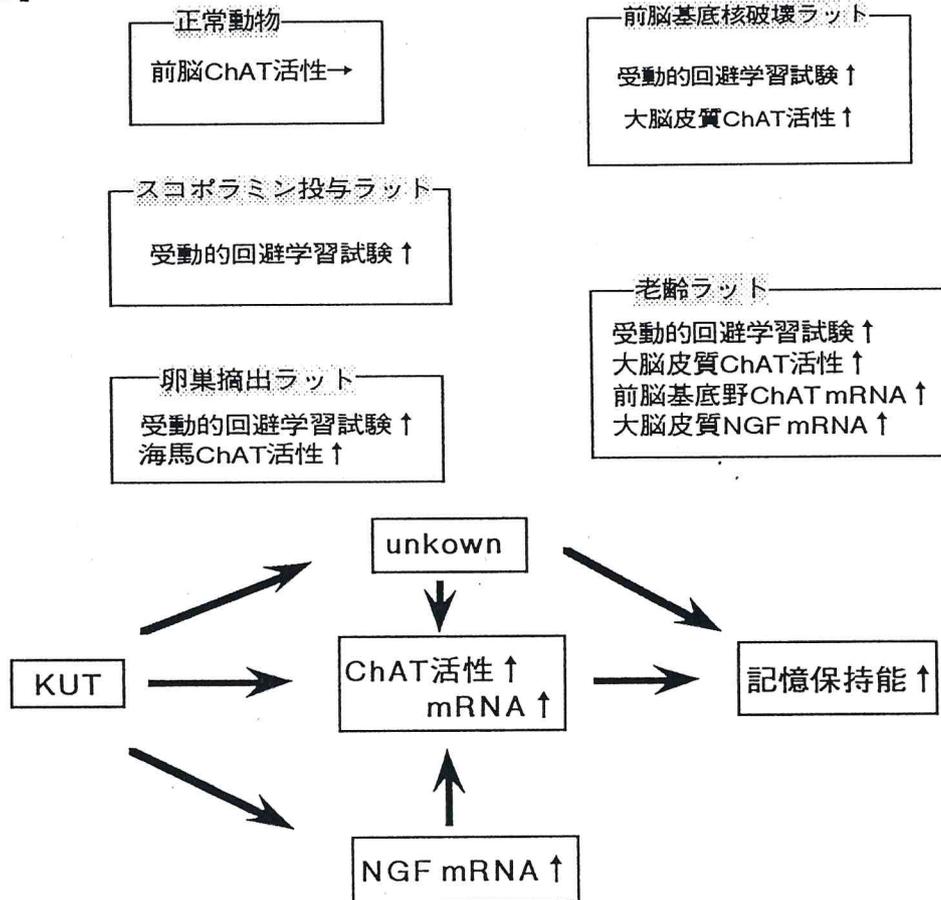


図9 老齡ラット脳内のChAT活性及びNGF mRNA発現に及ぼす加味温胆湯の影響  
 3ヶ月間加味温胆湯を摂取させた老齡ラットの大脳皮質におけるNGF mRNA含量をRT-PCR法により、ChAT活性はFonnumの方法により検討した。A; 大脳皮質ChAT活性 B; PCR産物のアガロースゲル電気泳動像 C; 染色強度をNIH imageにより画像解析し数値化した結果を示した。

[まとめ]



### 3. 培養細胞を用いた加味温胆湯作用メカニズムの解析 (第3章、第4章)

痴呆モデル動物を用いた検討から加味温胆湯は脳内のChATやNGFの発現を増加させることにより痴呆モデル動物の低下した記憶保持能を改善する可能性が考えられた。そこでKUTによるChATやNGFのup regulationを前脳基底野初代培養細胞や大脳皮質由来アストログリア細胞を用いて検討を行なった。

#### [KUTによるChATのup regulation]

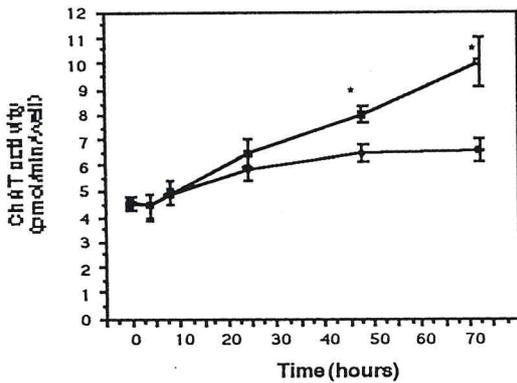
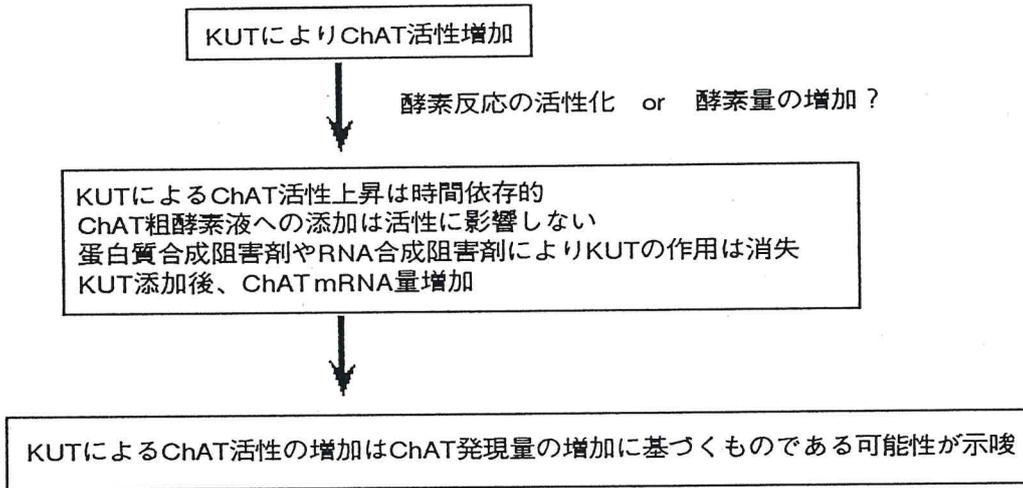


図10 KUT添加後の細胞内ChAT活性の変動  
前脳基底野初代培養細胞にKUT (200  $\mu$ g/ml)の濃度で添加し、0、4、8、24、48、72時間後のChAT活性をFonnumの方法により測定した。(■) control, (□) KUT  
\*  $P < 0.05$

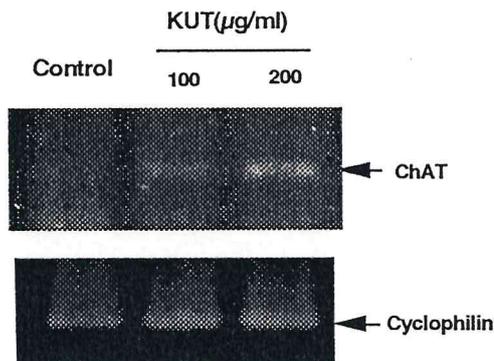


図11 KUTによるChAT mRNA発現量の増加  
前脳基底野初代培養細胞にKUT (100及び200  $\mu$ g/ml)を添加し6時間後のChAT mRNA発現量をRT-PCR法により検討を行なった。

## [KUTによるNGF産生促進作用]

(方法)

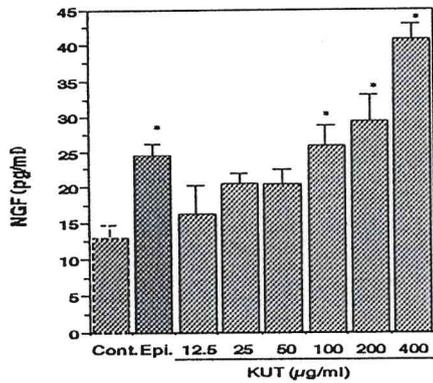
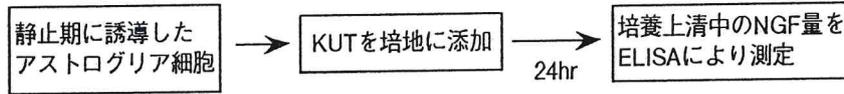


図12 アストログリア細胞のNGF分泌能に及ぼすKUTの影響

培養がコンフルエントに達した後、無血清培地に切り替えることにより静止期に誘導した細胞を実験に用いた。KUT添加24時間後の培養上清中のNGF量は100 μg/ml以上の濃度で有意に増加した。KUTによるNGF分泌促進作用はpositive controlとして用いたエピネフリン(50 μM)と同等あるいはそれ以上の強さを示した。\* P<0.05

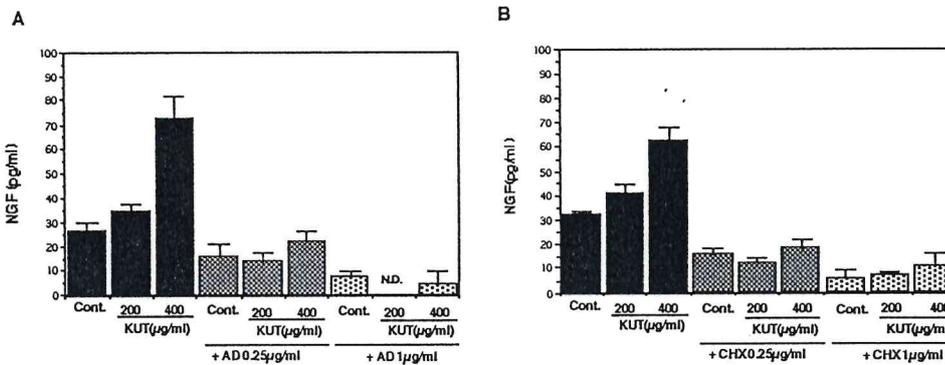
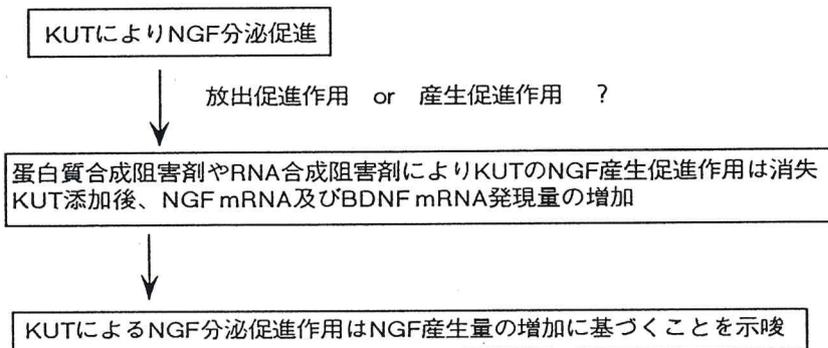


図13 KUTのNGF誘導作用に対するアクチノマイシンD (A) 及びシクロヘキシミド (B)の影響

KUTによるNGF誘導はアクチノマイシンDやシクロヘキシミドの共存により完全に消失した。

[KUTによるChATやNGF誘導作用における細胞内情報伝達系の関与]

ChATやNGFの発現は、Ca<sup>2+</sup>やcAMPなどのセカンドメッセンジャーによる細胞内情報伝達系の活性化により誘導されることが知られている。そこで細胞内情報伝達系因子の阻害剤を用いてChATやNGF誘導に関与する因子の検索を行った。

inhibitor	ChAT activity	NGF secretion
K252a(nonspecific protein kinase inhibitor)	↓	↓
H-7(PKCspecific inhibitor)	→	→
H-89(PKA specific inhibitor)	↓	↓
KN-62 (Ca <sup>2+</sup> /CaM kinase inhibitor)	→	→
W-7 (CaM inhibitor)	N.D.	→
TMB-8 (Ca <sup>2+</sup> release inhibitor)	N.D.	→
herbimycin A (tyrosine kinase inhibitor)	N.D.	↓

N.D.; not determined

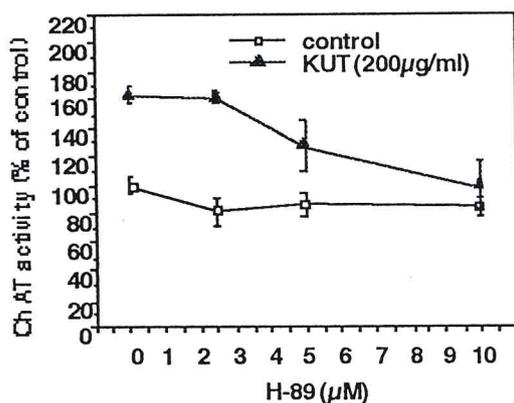


図14 KUTによるChAT誘導に対するH-89の影響

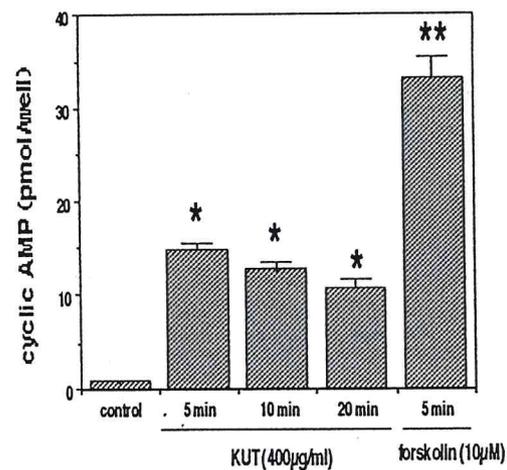


図15 KUT添加後のアストログリア細胞内cyclic AMP含量の変動

KUTによるChATやNGFの誘導にcAMP-PKA経路の活性化が関与している可能性が示唆された

[KUTのChATやNGF誘導作用におけるc-fosの関与]

・ChATやNGF遺伝子の発現は、その転写調節領域に存在するTRE (AP-1 binding site) に、がん原遺伝子産物であるc-fosとc-junの複合体であるAP-1が結合することにより促進されることが知られている。  
 ・c-fosの転写調節領域にはCRE (cAMP response element) が存在し、cAMP-PKA経路の活性化によりその転写が促進される。

KUTによるChATやNGF誘導にc-fosの誘導に基づくAP-1活性の増加が関与している可能性

・前脳基底野細胞やアストログリア細胞へのKUTの添加によりc-fos mRNA量が増加  
 ・c-fos アンチセンスオリゴヌクレオチドによりKUTのNGF誘導能は有意に低下

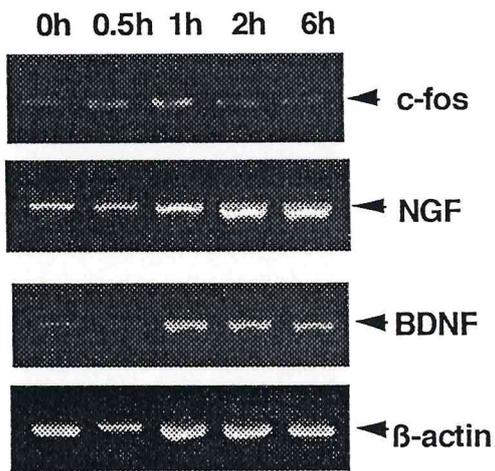


図16 アストログリア細胞 c-fos mRNA 発現に及ぼす KUT の影響

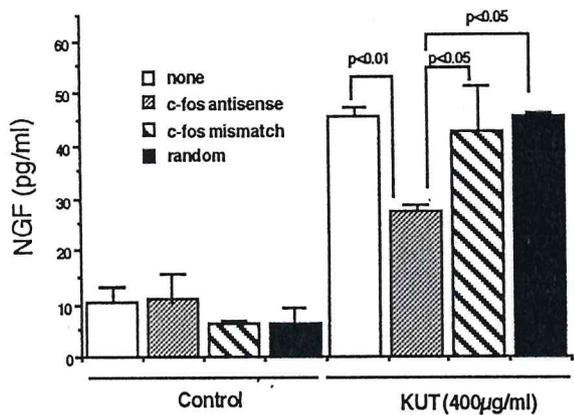


図17 KUTのNGF誘導作用に対するc-fosアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響  
 KUT添加の6時間前よりアンチセンスオリゴで処置したアストログリア細胞のNGF産生能をELISA法により検討した。

KUTの作用発現にc-fosの発現増加が関与している

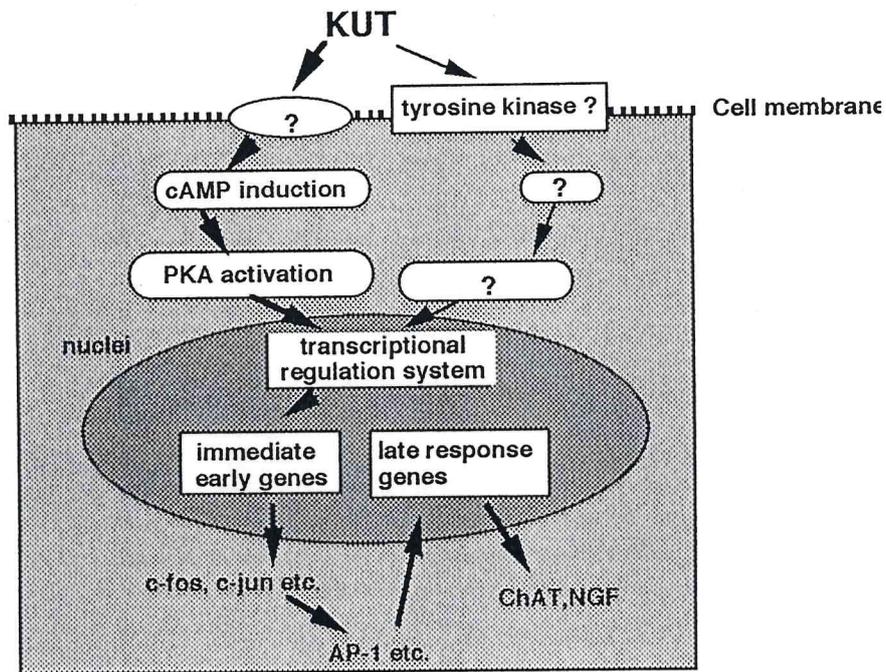


図 18 加味温胆湯の作用機作の仮説

KUTはコリン作動性神経細胞やアストロサイトの細胞表面の未知のレセプターあるいは細胞内の因子に直接に作用し、細胞内のcAMP濃度を増加させることによりPKAを活性化させることが予想される。常在転写因子であるCREB (cyclic-AMP-response element binding protein) はPKAやCa<sup>2+</sup>/CaM kinaseによりリン酸化を受けることにより活性化し、初期応答遺伝子の転写(c-fosなど)を促進することから、KUTによるc-fos mRNA発現増加にCREBの活性化が関与しているものと推定している。このようにして増加したc-fosは、c-junなどのJun family蛋白質とAP-1と呼ばれるヘテロダイマーを形成し、ChATやNGFの転写調節領域に存在するAP-1 siteに結合することによって、これらの遺伝子の転写を促進すると思われる。

#### 4. 加味温胆湯構成生薬の作用（第5章）

ChATやNGFの誘導に関与するKUTの構成生薬を同定するためKUT一味抜きエキスや構成生薬単味エキスを調製しその作用を検討した。

##### ChAT活性への影響

遠志抜きKUTエキスはChAT誘導能なし  
遠志単独エキスでChAT活性増加  
遠志単独エキスでChATmRNA発現増加

##### NGF産生への影響

遠志抜きKUTエキスはNGF誘導作用が低下  
遠志単独エキスでNGF産生能増加  
遠志単独エキスでNGFmRNA発現増加  
遠志単独エキスの作用はH-89の共存により消失

KUTの中枢作用に遠志が重要な働きをしている

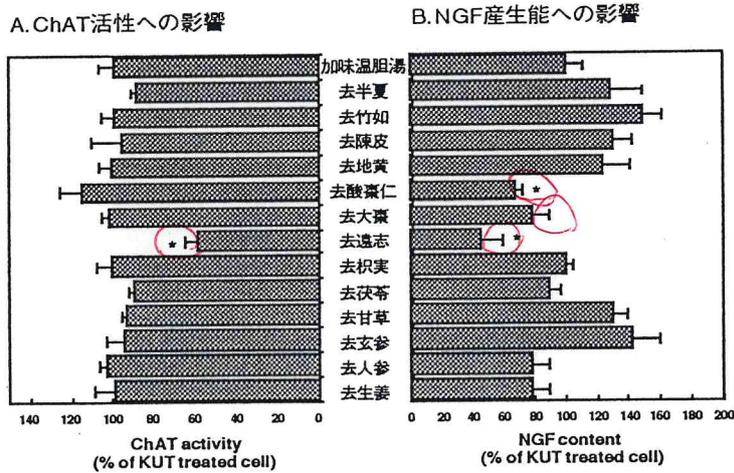


図19 KUT一味抜き処方のChAT及びNGFへの作用  
KUT構成生薬のうち1種類の生薬を除いて調製したKUT一味抜き処方を調製し前脳基底野細胞ChAT活性(A)やアストログリア細胞NGF産生(B)に及ぼす影響について検討した。遠志抜きエキスでは両作用の低下が認められた。

#### 遠志 (Polygalae Radix)

- 古典
- ・ 『志を遠大にもつことが可能になる』の意味
  - ・ 『不足を補い、邪気を除き、九キョウを利し、知恵を益し、耳目を聡明にし、物を忘れず、志を強くし、力を倍す。久しく服すれば身体を軽くし、老衰せぬ。』として神農本草経において上品に分類されている。

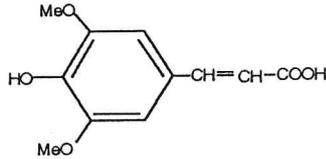
- 成分
- サポニン類、フェノール配糖体、オリゴ糖類、スクロース誘導体などその化学構造内に桂皮酸誘導体をもつものが多い

[遠志由来成分の作用]

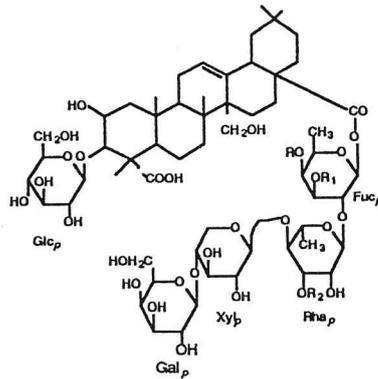
現在までに報告されている遠志の薬理作用

ベントバルビタール睡眠延長作用 (Wang ら、1995) (Nikaido ら、1981)	→	遠志エキス 粗オリゴ糖画分 onjisaponin F 遠志由来桂皮酸誘導体
抗ストレス性潰瘍作用 (山崎ら 1981)	→	遠志エキス 粗サポニン画分
cAMP ホスホジエステラーゼ阻害作用 (Nikaido ら、1981)	→	onjisaponin B, E, F, G,

桂皮酸誘導体を化学構造内に有する成分が活性に関与している可能性が考えられる。



3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid  
(sinapic acid)

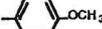


Onjisaponin A  
R=MC, R<sub>1</sub>=Rha, R<sub>2</sub>=Apl

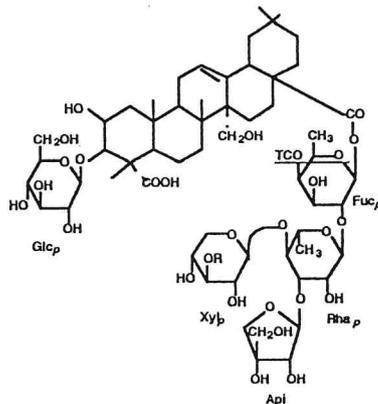
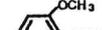
Onjisaponin B  
R=MC, R<sub>1</sub>=Rha, R<sub>2</sub>=H

Onjisaponin E  
R=TC, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H

MC=-CO-CH=CH-



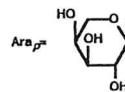
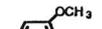
TC=-CO-CH=CH-

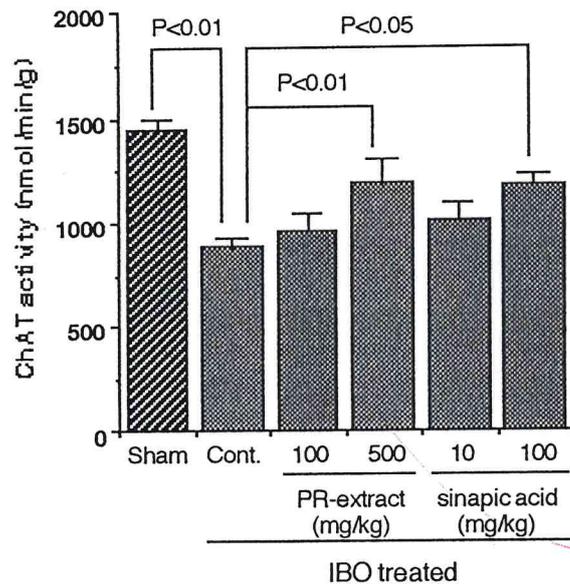


Onjisaponin F  
R=Ara<sub>p</sub>

Onjisaponin G  
R=H

TC=-CO-CH=CH-





1W 100mg/kg  
500mg/kg

図20 前脳基底核破壊ラットに対する遠志エキス及びシナピン酸の影響

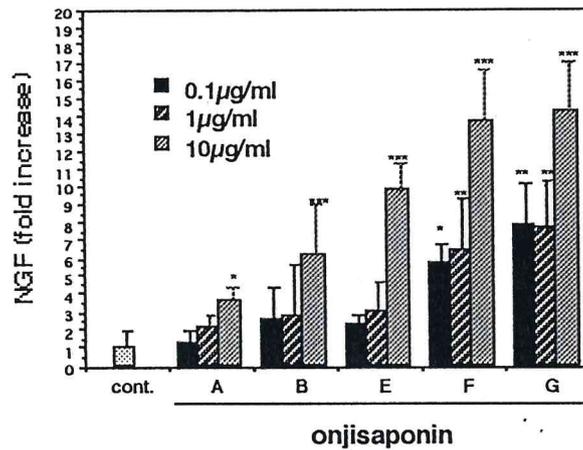
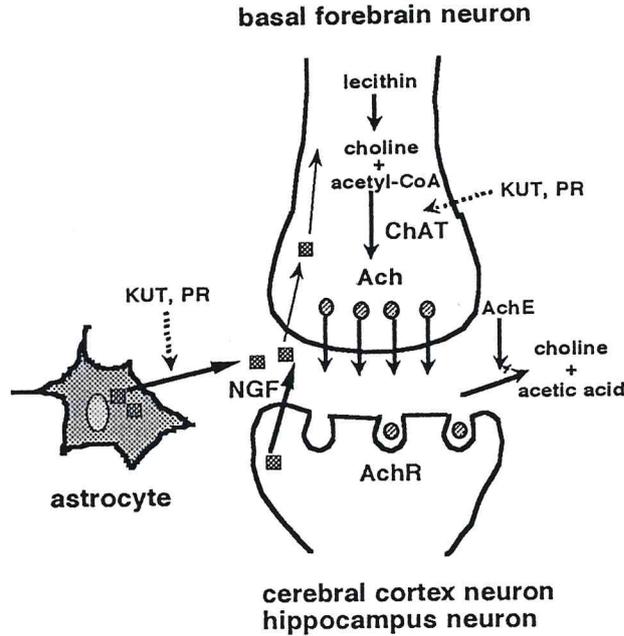


図21 アストログリア細胞 NGF 産生に対する onjisaponin A-G の作用

桂皮酸誘導体をその化学構造内に有する化合物が ChAT や NGF の誘導に関与している可能性が示唆された。

総括



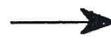
本研究結果からKUTはコリン作動性神経細胞に対する直接的な神経栄養因子様作用 (ChATのup regulation)、及びNGFやBDNFなどの神経栄養因子発現の増加を介した作用により、痴呆モデル動物の記憶保持能を改善することが明らかとなった。

中隔野初代培養細胞ChAT活性を指標としたスクリーニング (第1章)



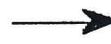
神経栄養因子様作用を有するKUTを見だし

KUTにより痴呆モデル動物の記憶保持能を改善 (第2章)



中隔野初代培養細胞を用いたスクリーニング系が抗痴呆薬の開発に応用できる可能性が示唆

KUTによるChATやNGFの誘導にPKAが関与 (第3章、第4章)



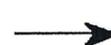
記憶や学習といった高次認識機構にcAMP系が重要な働きをしている可能

KUTはアストログリア細胞のNGF産生を転写レベルで増加(第4章)



内因性の神経栄養因子をコントロールする薬物が抗痴呆作用を有する可能性が示唆

KUTの中樞作用発現に遠志が重要な働きをしている (第5章)



神農本草経に見られる「益知・不忘」を科学的に証明した

補足

加味温胆湯の臨床研究については、厚生省長寿科学総合研究の課題の一つとして、著者らのグループと愛知県早蕨会福祉村病院との共同研究により70名の老人性痴呆患者を対象に行なわれ、空間見当識及び会話などで有意な改善が認められ、全般改善率で脳機能改善薬として用いられている塩酸ピフェメラン (セレボート; シオノギ) 以上の改善率を示すことが明らかとなっている (厚生省長寿科学総合研究・平成7年度研究報告書)。