



クラシエ株式会社 漢方研究所
野島 悠佑、村木 那緒、道原 成和、千葉 殖幹

はじめに

ストレスとは外部からの刺激を受けて生じる緊張状態のことであり、その結果、その強さに応じた生理学的反応および行動の変化が引き起こされる。生体がストレスを受けると、視床下部で副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが分泌される。それをうけて下垂体から副腎皮質刺激ホルモンが放出され、それが副腎皮質での糖質コルチコイドの分泌を促すことで、血糖値の上昇や抗炎症作用を惹起し、ストレスに対応する。このように視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸は、ストレス下の体の恒常性維持に欠かせない役割を果たしている(図1: HPA軸)。通常、高まった糖質コルチコイドは負のフィードバック(高まりすぎるのを抑える)機構が働くことで濃度は適切に調節されているが、反復するストレスが続くとそのフィードバック機構が破綻するため、糖質コルチコイドが高濃度に維持され健康上の問題を引き起こす。糖質コルチコイドのうち、ヒトではコルチゾールが、げっ歯類ではコルチコステロンがそれぞれストレス反応の仲介の役割を担っている^{1, 2)}。反復的なストレス負荷によるHPA軸の制御の破綻は、コルチコステロン分泌の持続的な増加を促し、うつ病を引き起こすと報告されている³⁾。WHOによると世界人口の推定3.8%にあたる約2億8000万人が、慢性ストレスによるうつ病を経験しており、世界的な社会問題となっている⁴⁾。うつ病の治療には、SSRIやSNRIなどの抗うつ薬を服用することが基本であるが、性機能障害や嘔吐・下痢、不眠のような副作用が頻発するため、漢方薬を用いるケースも多い。日本うつ病学会治療ガイドラインには、まだエビデンスレベルは高くはないとされるものの、加味逍遙散および加味帰脾湯などの漢方薬も薬物療法や精神療法との併用療法として掲載されている。

うつ病患者の脳においては、慢性ストレス応答を抑制する役割のある脳海馬体積減少、および海馬機能の低下が報告され⁵⁾、うつ病と海馬の関係が近年盛んに研究されている。マウスやラットを用いた基礎研究では、身体的

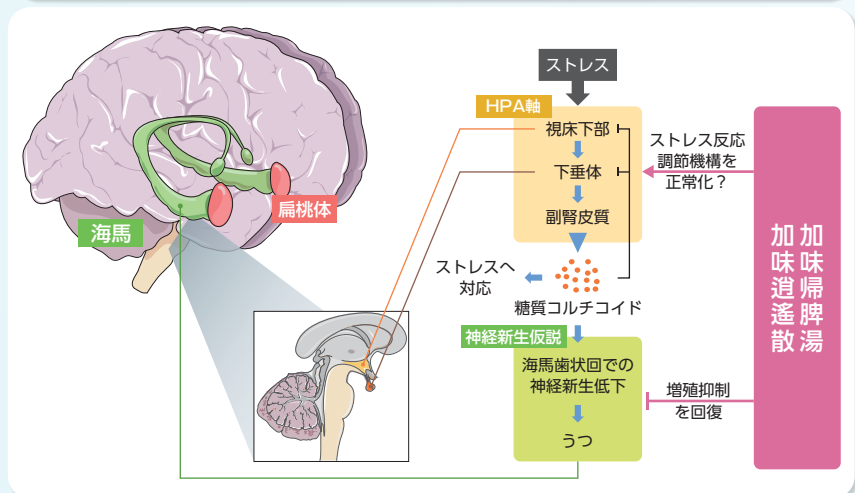
なストレス^{6, 7)}あるいは、精神的なストレス⁸⁾を与えることで、うつ様の症状を示すことが分かっており、ストレスの種類にかかわらず、海馬での神経細胞新生を抑制することが報告されている⁹⁻¹¹⁾。さらに、抗うつ薬が海馬の神経新生を増加させること¹²⁾から、海馬での神経新生とうつとの関連が明らかにされつつある(図1: 神経新生仮説)。成体ラット海馬歯状回由来細胞を用いた検討において、ストレスを模倣した糖質コルチコイド受容体作動薬であるデキサメタゾン(DEX)により、神経新生阻害が認められ、その神経新生阻害を、うつ病の治療に用いられるリチウムが回復させることが報告されている¹³⁾。

そこで、本検討では、成体ラット海馬の歯状回由来初代培養細胞を用いて、DEXによる神経新生抑制に対して、加味逍遙散および加味帰脾湯の有効性を評価した。

試験方法

6週齢(雄)のSDラットを導入(日本SLC)し、本試験に供した。脳を摘出し、ラット用ブレインスライサ(室町機械)でスライスした。顕微鏡下で両側の海馬歯状回を摘出し氷冷したHBSS(Gibco)に入れた。得られた歯状回細胞は10U/mLのパパイン(Worthington)および0.1mg/mLのDNase(Sigma)を含んだHBSS中で37°C、15分反応させた。その後1.4mg/mLのovomucoid(Worthington)を入れ反応を停止させた。細胞はピペッティングにより塊を分

図1 ストレス応答と神経新生仮説



断し、細胞懸濁液は70 μ mのフィルター(BD falcon)を通した。細胞はPoly-L-Lysine(Innoprot)ラミニンコート(Fuji film)した96wellプレート(Greiner)に1.0 \times 10⁴cells/wellで播種した。培養は10% B-27 Plus supplement(Gibco)、20ng/mL bFGF(Miltenyi Biotec)、1% penicillin/Streptomycin(Sigma)を含んだNeurobasal(Gibco)を用い、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下の条件で行った。

〈細胞増殖測定試験〉

初代培養から一晚経過後、培地にデキサメタゾン(DEX, Fuji film)5 μ Mあるいは溶媒(DMSO)とともに加味帰脾湯あるいは加味逍遙散を終濃度50 μ g/mL、100 μ g/mL、500 μ g/mLになるように添加した。その後72時間培養し、Resazurin(Biotium)を10 μ L/well添加して、Resazurin添加3時間後の570nmの波長の吸光度を測定した。

〈統計学的解析〉

得られたデータ値は平均値 \pm 標準偏差で示した。連続変数をとる2群の結果はWelchのT検定を行い、3群以上の結果は一元配置分散分析後、Tukeyの多重比較検定法を行った。全ての検定はEZRを用いて行い、危険率 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

〈試験結果〉

ラット海馬歯状回由来初代培養細胞はDEX添加により、対照群(DMSO添加群)と比較して50%ほど有意に増殖が抑えられていた(図2)。加味逍遙散添加群ではDEX添加による初代培養細胞に対する増殖抑制作用を、加味逍遙散が濃度依存的に回復させた(図2a)。加味帰脾湯添加群では50 μ g/mLの濃度で添加した時に最も増殖能が高く、DEXを添加しない対照群よりも増殖能が2倍ほど高くなった。

また50 μ g/mLより高濃度では増殖能の活性化の程度が低くなっていく結果が得られた(図2b)。

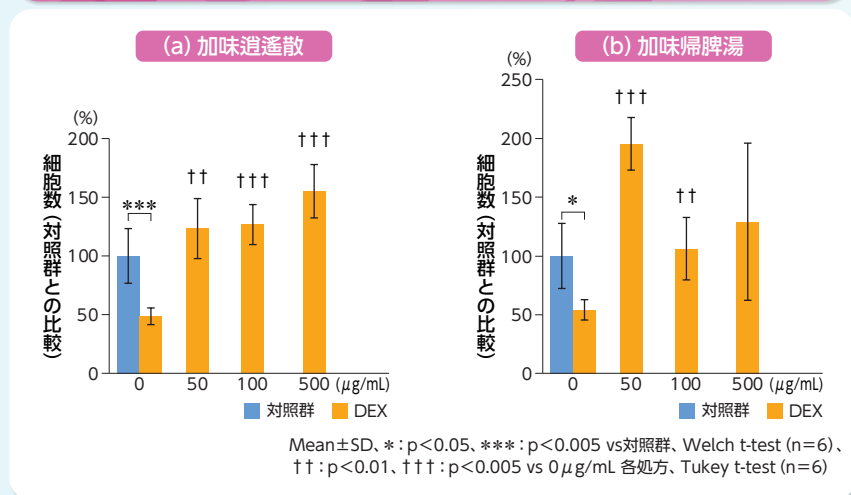
考察とまとめ

今回の試験では、ラット海馬歯状回由来初代培養細胞に対してDEXによる増殖抑制に対する加味逍遙散および加味帰脾湯の効果について検討した(図2a, b)。加味逍遙散添加群では初代培養細胞の増殖能が、加味逍遙散の濃度依存的に回復し、500 μ g/mLの濃度においては、対照群の150%まで細胞増殖が促進された(図2a)。今回と同実験条件下の検討においてDEXは神経前駆細胞の分化あるいはアポトーシスには影響せず、細胞増殖のみ抑制するという報告がある¹³⁾。またDEXは糖質コルチコイド受容体を介して細胞周期を回すサイクリンD1の発現を抑制することで細胞増殖を抑制することも知られている^{14, 15)}。今回の結果から、加味逍遙散および加味帰脾湯は、DEXの糖質コルチコイド受容体を介した細胞増殖抑制を解除するように働いている可能性や、直接的に神経系細胞の増殖を活性化作用を持つ可能性が考えられた。

海馬での神経新生は、HPA軸の負のフィードバック機構に重要な役割を持つことが報告されている¹⁶⁾。加味逍遙散は更年期障害や月経前症候群の精神不安などの症状によく処方されるが、海馬はHPA軸だけでなく、扁桃体の活性化も制御していることが知られており¹⁷⁾、扁桃体の活性化は不安や恐怖、怒りなどの情動に必須であることから¹⁸⁾、精神神経症状に対する加味逍遙散の効果は、海馬での神経新生促進作用を介している可能性が考えられた。また機序としては、加味逍遙散はエストロゲン様作用を持つことが示されている¹⁹⁾。これは成体ラットの海馬由来初代培養神経前駆細胞に対しエストロゲンが直接作用して細胞増殖を促進する²⁰⁾という報告があることや、エストロゲンは、グルココルチコイド受容体の脱リン酸化を介してDEXの作用を阻害することから²¹⁾、今回の検討で見られた細胞増殖作用は加味逍遙散では、エストロゲン様作用によるものである可能性が考えられる。

一方、加味帰脾湯添加群は対照群に対し200%近くも増殖能が高くなっており、加味帰脾湯はDEXに対する拮抗作用のほかに、神経前駆細胞の増殖活性を顕著に促進する作用を持つ可能性が考えられた。また、加味

図2 成体海馬歯状回由来初代培養細胞を用いた細胞増殖測定試験



帰脾湯は社会行動に関与するオキシトシンニューロンを活性化させることが報告されており²²⁾、さらにその構成生薬のうち、大棗・当帰・生姜の組み合わせが、オキシトシン受容体を活性化することが報告されている²³⁾。オキシトシンは、ERKのリン酸化を介して、神経系細胞の増殖を促進させることが報告されており²⁴⁾、加味帰脾湯はそのオキシトシン様作用によって細胞増殖を促進している可能性も考えられる。一方で、加味帰脾湯は、比較的多くの生薬で構成されており、生薬レベルで調査すると相反する報告も見受けられる。例えば、ヒトのニューロンの分化と生存を促進する神経栄養因子(BDNF)を産生する末梢株化細胞を用いた研究において、BDNFの産生を柴胡と遠志が促進させる一方、人参や甘草には、これを抑制するとの報告がある²⁵⁾。このことから、細胞増殖についても加味帰脾湯の構成生薬のなかには抑制的に働くものもある可能性があり、高濃度の条件ではそれが顕著に表れる可能性も考えられた。神経系のダメージからの回復では、神経細胞の増殖を促すばかりではなく、相反する増殖停止につづく神経への分化および神経突起の伸長など神経としての成熟促進も重要になってくる。加味帰脾湯では、神経分化を促進するとの報告もある²⁶⁾。そのため、加味帰脾湯添加群は50 μ g/mLのときに最も増殖能が高くなっているものの、高濃度では増殖抑制や分化成熟効果のために増殖が低下

する可能性があり、結果的にベルシェイプ型の薬効を示したと考えられた(図2b)。そこで今後は、加味帰脾湯の投与量のバランスと神経回復の関係に関する研究を進めていく予定である。

加味逍遙散と加味帰脾湯では、当帰、生姜、茯苓、甘草、山梔子、柴胡、白朮の7つの生薬が共通している。うち、柴胡には中枢神経抑制作用が知られ、白朮には抗うつ作用が報告されている^{27, 28)}。今回の結果から、加味帰脾湯と加味逍遙散の両方に細胞増殖の活性化作用があったため、共通生薬の中に責任生薬が含まれることが推定され、今後、それらを確認しつつ、シグナル経路の解析を進め、2処方の効果に関する詳細なメカニズムを明らかにしていく予定である。

われわれは以前、慢性拘束ストレス負荷により尿中のコルチコステロン量の増加とうつ様行動が認められるモデルに加味帰脾湯を投与すると、増加した尿中コルチコステロン量が減少する傾向を認め、うつ様行動も改善されることを報告した²⁹⁾。また、加味逍遙散についても、閉経後慢性浸水ストレスモデルで上昇した血中コルチコステロンを減少させ、うつ様行動を改善することが報告されている³⁰⁾。そのため、加味帰脾湯や加味逍遙散には、海馬を介した糖質コルチコイドへの拮抗作用だけでなく、直接的なHPA軸の制御効果も期待される(図1)。

【参考文献】

- 1) Gjerstad J. K. et al.: Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. *Stress* 21: 403-416, 2018. doi: 10.1080/10253890.2018.1470238
- 2) McEwen B. S.: Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87: 873-904, 2007. doi: 10.1152/physrev.00041.2006
- 3) Feijó de Mello A. A. et al.: Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Braz. J. Psychiatry* 25: 231-238, 2003. doi: 10.1590/s1516-44462003000400010
- 4) WHO Newsroom Depressive disorder (depression), 31 March 2023 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (2024年11月19日閲覧)
- 5) MacQueen G. M. et al.: Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *PNAS*. 100: 1387-92, 2003. doi: 10.1073/pnas.0337481100
- 6) Katz R. J. et al.: Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 5: 247-51, 1981. doi: 10.1016/0149-7634(81)90005-1
- 7) Mao Y. et al.: Validity of chronic restraint stress for modeling anhedonic-like behavior in rodents: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res.* 23: 50, 2022. doi: 10.1177/03000605221075816
- 8) Yoshioka T. et al.: Chronic Vicarious Social Defeat Stress Attenuates New-born Neuronal Cell Survival in Mouse Hippocampus. *Behavioural Brain Research* 416: 113536, 2022. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113536
- 9) Torner L. et al.: Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *Journal of Neuroscience*, 29: 1826-1833, 2009 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009
- 10) Tanapat P. et al.: Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol.* 437: 496-504, 2001. doi: 10.1002/cne.1297
- 11) Gould E. et al.: Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *PNAS*, 95: 3168-3171, 1998. doi: 10.1073/pnas.95.6.3168
- 12) Malberg J. E. et al.: Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 20: 9104-9110, 2000. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-09104.2000
- 13) Boku S. et al.: Glucocorticoids and Lithium Reciprocally Regulate the Proliferation of Adult Dentate Gyrus-Derived Neural Precursor Cells Through GSK-3 β and β -Catenin/TCF Pathway. *Neuropsychopharmacology* 34: 805-815, 2009. doi: 10.1038/npp.2008.198
- 14) Allen J. C. et al.: Cyclin D1 in ASM Cells from Asthmatics Is Insensitive to Corticosteroid Inhibition. *J Allergy (Cairo)* 2012: 307838, 2012. doi: 10.1155/2012/307838
- 15) Liu H. et al.: Dexamethasone inhibits proliferation and stimulates SSECKS expression in C6 rat glioma cell line. *Brain Research* 1265: 1-12, 2009. doi: 10.1016/j.brainres.2009.01.050
- 16) Snyder J. S. et al.: Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behavior. *Nature* 476: 458-461, 2011. doi: 10.1038/nature10287
- 17) 井ノ口 馨: 恐怖記憶研究鳥瞰-最近の知見と展望-. *不安障害研究*5: 13-21, 2013. doi: 10.14389/adr.5.13
- 18) 北條 敬: 扁桃体と情動-症例 S.M.について-. *臨床神経心理* 30: 1-13, 2019. doi: 10.57305/clineneuropsytohoku.30_0_1
- 19) 青木 やよい ほか: 加味逍遙散の冷えに対する有用性検討. *phl漢方* 71: 26-27, 2018
- 20) 千葉 秀一 ほか: 成体脳の神経新生に対するエストロゲン作用-グラニューリンの関与と加齢に伴う変化-. *日本生殖内分泌学会雑誌* 11: 17-20, 2006
- 21) Zhang Y. et al.: Estrogen Inhibits Glucocorticoid Action via Protein Phosphatase 5 (PP5)-mediated Glucocorticoid Receptor Dephosphorylation. *Mechanisms of Signal Transduction*. 284: 24542-24552, 2009. doi: 10.1074/jbc.M109.021469
- 22) Miyano K. et al.: The Inhibition of TREK-1 K Channels via Multiple Compounds Contained in the Six Kamikihito Components, Potentially Stimulating Oxytocin Neuron Pathways +. *Int. J. Mol. Sci.* 25: 4907, 2024. doi: 10.3390/ijms25094907
- 23) Maejima Y. et al.: Identification of oxytocin receptor activating chemical components from traditional Japanese medicines. *J Food Drug Anal.* 29: 653-675, 2021. doi: 10.38212/2224-6614.3381
- 24) Alanazi M. M. et al.: Cell proliferation and anti-oxidant effects of oxytocin and oxytocin receptors: role of extracellular signal-regulating kinase in astrocyte-like cells. *Endocr Regul* 54: 172-182, 2020. doi: 10.2478/enr-2020-0020
- 25) Nakajima K. et al.: Identification of traditional Japanese Kampo medicines and crude drugs that upregulate brain-derived neurotrophic factor in human peripheral cells. *Acta Neurobiol Exp* 81: 393-404, 2021. doi: 10.55782/ane-2021-042
- 26) Tomita K. et al.: Kamishoyosan and Kamikihito protect against decreased KCC2 expression induced by the P. gingivalis lipopolysaccharide treatment in PC-12 cells and improve behavioral abnormalities in male mice. *Heliyon* 9(12): e22784, 2023. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22784
- 27) 山崎 幹夫: 配合処方の持つ多彩な薬理作用. *柴胡*. *phl漢方* 38: 10-11, 2012
- 28) 小林 義典 ほか: 白朮精油の抗うつ作用. *Aroma Res.* 6: 356-361, 2005
- 29) 野島 悠佑 ほか: うつ症状に対する加味帰脾湯の効果. *phl漢方* 100: 36-38, 2024
- 30) Shimizu S. et al.: Antidepressive Effects of Kamishoyosan through 5-HT1A Receptor and PKA-CREB-BDNF Signaling in the Hippocampus in Postmenopausal Depression-Model Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019:9475384, 2019. doi: 10.1155/2019/9475384