

不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス及びその含有成分の

抗不安作用に関する研究

—行動及び自律神経活動に基づく薬理的検討—

2021

宮崎 翔平

Studies on the anxiolytic effects of *Acanthopanax Senticosus*  
HARMS extract and its components in anxiety - high sensitive  
rats

—Pharmacological investigations based on behavior and  
autonomic nervous activity—

2021

Shouhei Miyazaki

## 目 次

緒言	1
第 1 章 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響	
第 1 節 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの抗不安作用	
緒言	5
実験方法	6
結果	13
考察	16
第 2 節 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響	
緒言	17
実験方法	18
結果	19
考察	21
第 3 節 小括	22
第 2 章 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス含有成分の抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響	
緒言	23
第 1 節 不安高感受性ラットにおけるエレウテロサイド E 及びクロロゲン酸の抗不安作用	
緒言	24
実験方法	25
結果	29
考察	32

第2節 不安高感受性ラットにおけるエレウテロサイド E 及びクロロゲン酸  
の海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

緒言 . . . . . 34  
実験方法 . . . . . 35  
結果 . . . . . 36  
考察 . . . . . 38

第3節 不安高感受性ラットにおけるイソフラキシジン及びシリニン  
の抗不安作用

緒言 . . . . . 40  
実験方法 . . . . . 41  
結果 . . . . . 43  
考察 . . . . . 45

第4節 小括 . . . . . 47

結語 . . . . . 48  
引用文献 . . . . . 49  
謝辞 . . . . . 59  
英文要旨 . . . . . 60

## 略語一覽

ASH; *Acanthopanax senticosus* HARMS

SYG; Syringaresinol di-O- $\beta$ -D-glucoside

CHA; Chlorogenic acid

ISO; Isofraxidin

SYR; Syringin

CNS; Central nervous system

BDNF; Brain-derived neurotrophic factor

NSF test; Novelty suppressed feeding test

OFT; Open field test

IEBW test; Improved elevated beam walking test

ND; Normal diet

FD; Food deprivation

Cont; Control

HF; High frequency

LF; Low frequency

VLF; Very low frequency

nu; Normalized unit

HRV; Heart rate variability

HC; Home cage

NC; Novel cage

EPM; Elevated plus maze

BSA; Bovine serum albumin

TrkB; Tropomyosin receptor kinase B

PVDF; Poly vinylidene difluoride

TBST; Tris-HCl-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween-20

## 緒言

### ストレスによる身体への影響

外部環境の変化によって引き起こされるストレスは、自律神経と視床下部-下垂体-副腎（HPA）軸に影響を与えることが知られている。自律神経は大きく分けて交感神経と副交感神経の2つに分類される。交感神経の活性化は、心拍数や血圧の上昇、皮膚や内臓から骨格筋への血流の移行、気管や気管支平滑筋の弛緩などを誘導し、これに対して、副交感神経の活性化は交感神経の活性化に拮抗する作用を誘導する(1)。心理的ストレスの1つである不安は、交感神経の活性化を誘導し、副交感神経を抑制することが知られている。この現象は不安障害の患者や心理的ストレス下のげっ歯類においても観察されている(2-4)。交感神経の活性化は、支配臓器へのノルアドレナリンの分泌及び副腎髄質からのアドレナリンの体循環への分泌を促進し、HPA 軸では、副腎皮質からグルココルチコイドを体循環へ分泌し、環境変化に抵抗するための様々な作用を誘導する。またストレス応答には興奮性アミノ酸やグルココルチコイドが重要な役割を果たし、エンドカンナビノイドや脳由来神経栄養因子などが介在している(5)。慢性的なストレス（長期的な不安など）は、HPA 軸と自律神経の活性化を介してストレス性胃潰瘍やうつ病を誘発する(6,7)。したがって、ストレス関連疾患を予防するためには、これらのストレスを緩和する方法が重要であると考えられる。2017年度における国民医療費は43兆710億円である。その中でも傷病分類“精神及び行動の障害”1兆9092億円を占めている。しかし、うつ病や不安障害では軽度で治療を受けていない患者が多くいるために、医療費に表れていない社会的影響が大きいことも知られている(8)。WHOの報告によると、疾患による生命や生活の質の損失を表す包括的な指標である障害調整生命年（Disability-adjusted life year: DALYs）において、日本では上記に関連した3疾患がワースト20（3位：うつ病、5位：自殺・自傷、19位：双極性障害）に位置しており、大きな社会的損失になっている(9)。厚生労働省の患者調査によると、うつ病などの気分障害やストレス関連障害の総患者数は年々増加しており(10)、今後精神科疾患による社会的損失は大きくなっていくと考えられる。また、高血圧や糖尿病などの生活習慣病と同様に早期発見・早期介入によって重症化を予防できることが示唆されており、厚生労働省の“今後の精神保健医療福祉のあり方等に関する検討会”においても早期に支援することの重要性が報告されている(11)。したがって、疾患にまでは発展していない状態で、日々の生活の中で感じているストレスを和らげることによって疾患へと進展することを未然に防ぐことが重要であると考えられる。不適切な生活習慣の是正は、社会構造的な問題により容易に解決することができない一面もある。一方、サプリメントは、生活習慣の改善よりも簡便な方法であり、多忙な現代社会で生活する人たちでは、サプリメントを利用している人も少なくない。ビタミンやミネラル以外では特にチョウセンニンジンやエゾウコギなどの機能性植物そのものや含有成分が世界的にも注目されている(12,13)。

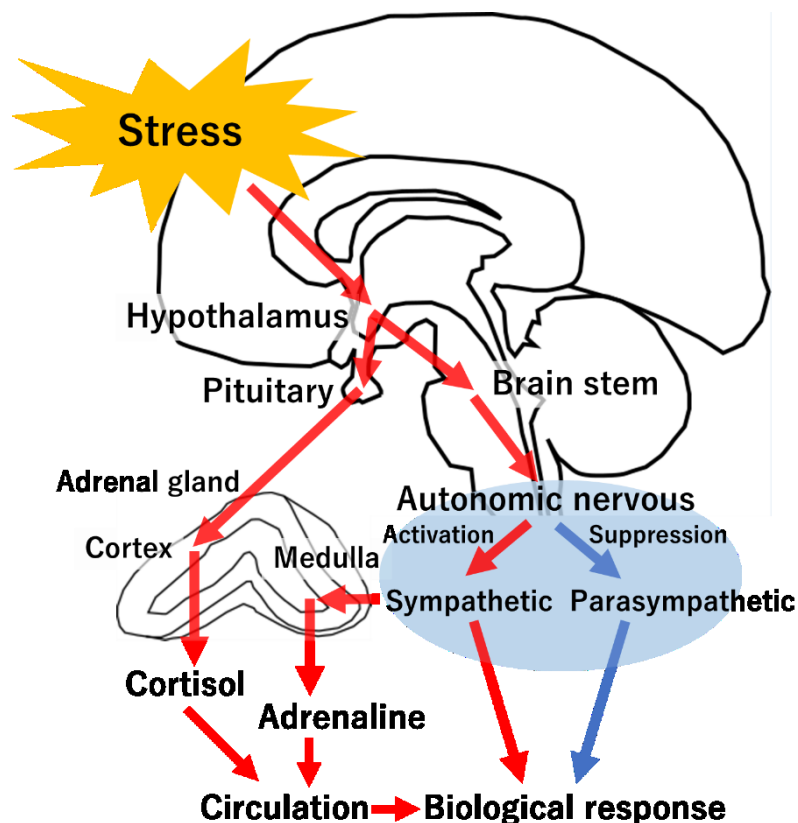


Figure 1. Stress activates sympathetic nervous and hypothalamus-pituitary-adrenal gland axis.

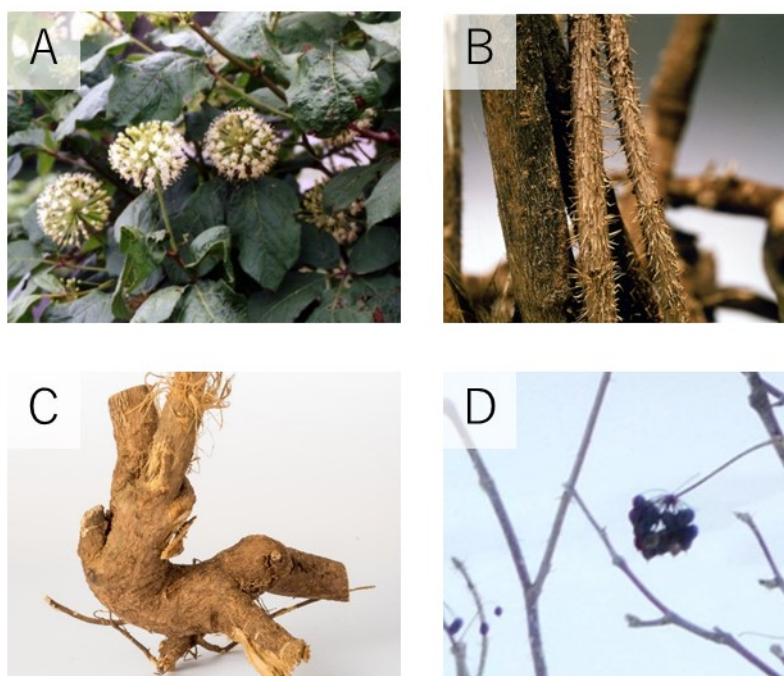
### エゾウコギについて

エゾウコギ (学名 *Acanthopanax senticosus* HARMS: ASH) は、チョウセンニンジンと同じウコギ科に属する落葉低木でロシア、中国の北東部、日本の北海道など様々な地域に広く自生している。古来より中国では、ASH の根皮は五加皮、根及び根茎は刺五加と呼ばれ、高血圧やリウマチ性関節炎、滋養強壮に伝統的に使用されていた(14,15)。また、西洋諸国においても代替医療として広く使用されている。本草学の古典である神農本草経や本草綱目にも記載が見られ、本草綱目の序文には「一握みの五加 (エゾウコギ) は馬車いっばいの金銀財宝にも勝る」とあり、重宝されていたことが伺える。日本では、北海道に自生することから蝦夷のウコギ (エゾウコギ) と呼ばれており、枝や幹にある硬いとげから蛇ノボラズや鳥トマラズとも呼ばれていた。ASH の学術的な研究は、1960 年代に旧ソ連科学アカデミーでの薬効に関する研究が始まりであるとされる。現在では、研究の対象は生薬の薬用部位としての根や根茎、根皮だけではなく葉や果実にも広がっている。ASH は食薬区分において「医薬品的効能効果を標ぼうしない限り医薬品と判断しない成分本質 (原材料)」に指定されており、医薬品的効能効果を標ぼうしない範囲では食品として扱われている。ASH 摂取による副作用は極めて限定的であるが、シトクローム P450 に影響を与えることが報

告されているため医薬品を服用している人では注意が必要になる(16,17)。1960年代から抗疲労効果などを目的に NASA やソ連の宇宙飛行士に愛用されてきた。また、ASH は摂取してもドーピングに該当する成分を含んでいないことからアスリートにも愛用されている。

ASH の薬理作用としては以下のものが報告されている。根や根茎では、抗がん作用や免疫調節作用（抗炎症作用・免疫賦活化作用）、抗酸化作用、抗疲労作用、抗うつ作用、放射線障害防止作用など幅広い作用をうかがい知ることができる(18–20)。また、近年では、ASH の果実や葉の研究も進んでおり、その果実はインスリン抵抗性や肝臓での脂質の蓄積を改善する作用(21)が、葉を用いた研究では、抗高コレステロール血症作用や抗炎症作用が報告されている(22,23)。

しかし、ASH の心理的ストレスへの有効性については、さらなるエビデンスの蓄積が必要である。



**Figure 2. (A) The leaf and flower, (B) thorns, (C) root, (D) fruit of *Acanthopanax senticosus* HARMS.**

### 脳由来神経栄養因子 (BDNF: brain-derived neurotrophic factor) について

BDNF は、119 個のアミノ酸からなるポリペプチドで、神経新生や神経可塑性において重要な役割を果たしており、情動や認知機能に関与することが報告されている(24–27)。海馬、扁桃体、小脳、大脳皮質で高発現しており、特に海馬のニューロンで最も高いレベルで発現している。脳以外の組織では肝臓や心臓、肺などの末梢組織にも発現している(28)。BDNF の調節異常が、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患及び双極性障害やうつ病、統合失調症などの精神疾患に関与していることが報告されている(29,30)。



BDNFは、高親和性受容体である tropomyosin receptor kinase B (TrkB) に結合し、受容体が二量体化し自己リン酸化が起こることが引き金となり、Ras/mitogen-activated protein kinases (MAPK) 1/2 (extracellular signal-regulated kinases [Erk] 1/2) 経路、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt 経路、phospholipase C- $\gamma$  (PLC  $\gamma$ ) 経路の3つの細胞内シグナルが活性化される(31)。Erk1/2の活性化は、cAMP response element-binding protein (CREB) をリン酸化(活性化)し、遺伝子の転写を活性化することが知られており、その標的遺伝子はBDNFなどの神経栄養因子をはじめとして細胞死調節分子、転写因子、細胞内シグナル伝達分子など様々である(32,33)。

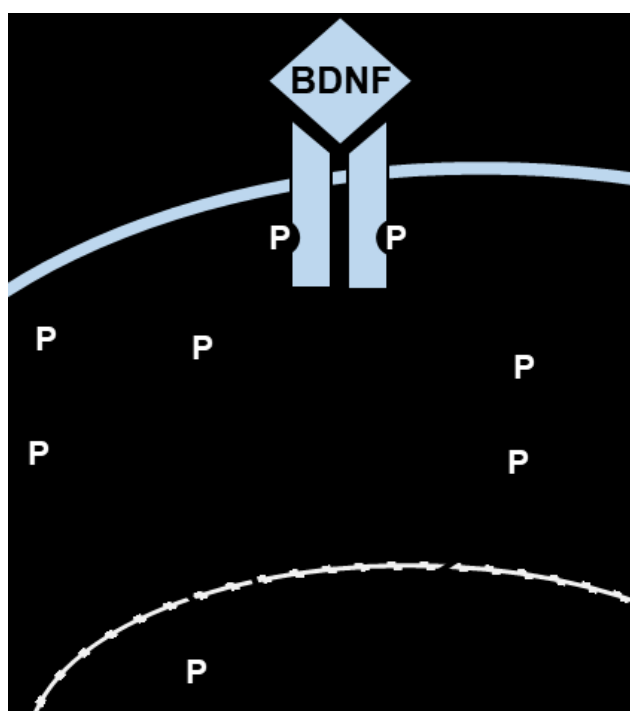


Figure 3. The BDNF/TrkB signaling cascade.

### 本論文の目的

本論文では、ラットへのASHエキス及びその含有成分の経口投与による抗不安作用を行動薬理的・自律神経学的に検討し、海馬BDNF/TrkBシグナルへ与える影響について明らかにすることを目的とした。第1章ではASHエキス投与による抗不安作用を行動薬理試験によって行動及び自律神経活動を評価し、さらに海馬BDNF/TrkBシグナルへの影響についてウエスタンブロッティング法及び免疫染色法により解析した。第2章では、ASHエキス含有成分の抗不安作用について、行動薬理試験及びその時の自律神経活動を評価し、海馬BDNF/TrkBシグナルへの影響を第1章と同様に解析した。

## 第1章

### 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの 抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

#### 第1節 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの

#### 抗不安作用

##### 緒言

ASH エキスは、ストレスに対する耐性を高めるアダプトゲンとしても知られている(34,35)。これまでの研究において、ASH エキスはラットを用いた尾部懸垂試験および強制水泳試験において、無動時間が短縮され、抑うつ症状出現が抑制されることが報告されている(20,36,37)。また、当研究室では以前に ASH エキス投与が水浸拘束ストレスによる胃潰瘍の発生を抑制したことを報告している(38)。このことから、ASH エキスには胃潰瘍やうつ病を予防する抗ストレス作用があると推測される。過度のストレスが胃潰瘍やうつ病を引き起こすあるいは悪化させることは一般的に広く知られている。Hans Selye が提唱した汎適応性症候群において、ストレスは視床下部に影響を与え、交感神経系・副腎髄質系と下垂体系・副腎皮質系の両方が胃潰瘍やうつ病を誘発するとされている(7)。胃潰瘍やうつ病などのストレスに起因した疾患は、中枢神経へのストレス刺激を基本軸として発症する。ASH エキスはストレスに起因した疾患（胃潰瘍やうつ病）を予防する可能性があると考えられていることから、ASH エキスが中枢神経にも影響を及ぼす可能性が推察される。実際にコルチコステロンや 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン、ロテノンなどによる神経毒性から保護する作用(39-41)や脳内モノアミン系に影響することも報告されている(42)。しかし、ASH のストレスに起因した疾患の予防効果において、自律神経活動への影響は不明である。また、先行研究において行われたストレス負荷試験では拘束ストレスや強制遊泳などラットの身体へ直接的に影響を与えるものが多く、不安や葛藤などといった心理的なストレスに対する影響の研究はあまり行われていない。

そこで本節では、新奇環境摂食抑制 (NSF: novelty suppressed feeding) 試験と高架式十字迷路 (EPM: elevated plus maze) の改良版である改良型高架 (IEBW: improved elevated beam walking) 試験を用いてその行動を評価し、また行動薬理試験時の心拍変動 (HRV: heart rate variability) 解析による自律神経活動を評価し ASH エキスの抗不安作用を検討した。

## 実験方法

### 1 ASH エキスの主要成分含量の測定

中国黒龍江省産の ASH の根先 2~5 cm を乾燥させたものを切断し、熱水で抽出した。抽出液を減圧下で濃縮し、スプレードライヤーを用いて乾燥させたエキス粉末（ロット番号 8142）は、サンクロレラ株式会社（京都市）から提供された。この生薬標本は、北海道医療大学薬学部生薬学研究室の西部三省名誉教授により鑑定された。

エキス中の各主要成分を高速液体クロマトグラフィー（HPLC: high performance liquid chromatography）を用いて分離・定量したところ、ASH エキスは、クロロゲン酸（CHA: 829.5 mg/100 g）、エレウテロサイド E（別名シリンガレジノール ジ-*O*-β-D-グルコシド SYG: 625.2 mg/100 g）、イソフラキシジン（ISO: 101.4 mg/100 g）、エレウテロサイド B（別名シリンギン SYR: 325.2 mg/100 g）、エレウテロサイド B1（95.2 mg/100 g）、を含有していた（Figure 4）。

HPLC の測定条件は以下に示す通りである。

CHA、エレウテロサイド B1、ISO の定量

カラム；オクタデシルシリルカラム、移動相；アセトニトリル：水：ギ酸=13：87：1、流量；1.0 mL/min.、波長；345 nm（検出器感度；0.048 Au/Fs）、温度；35°C

SYG、SYR の定量

移動相；A 液 アセトニトリル：水=1：9、B 液 アセトニトリル：水=5：5、B 液 0→0.75 mL/min.、40 分間のグラジエント、総流量；1.0 mL/min.、波長；220 nm（検出器感度；0.160 Au/Fs）、カラムと温度は 1 と同じ。

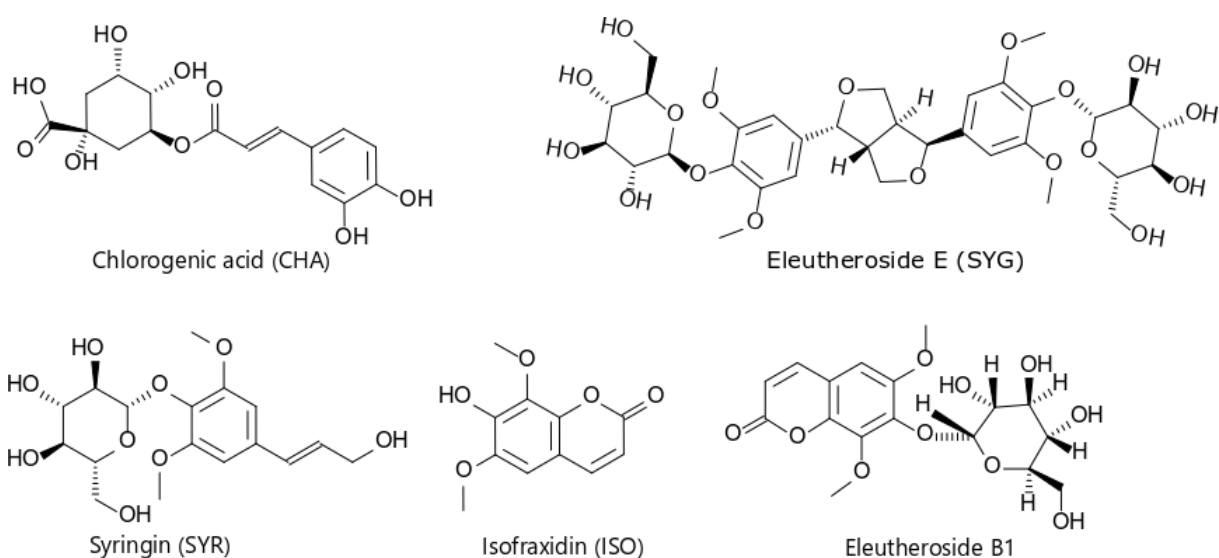


Figure 4. The structures of *Acanthopanax senticosus* HARMIS's major components.

## 2 実験動物

6 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを日本エスエルシー株式会社(SLC, Inc.)から購入し、標準的なポリカーボネートケージに個別に飼育収容し、7 日間連続したハンドリングによる実験者への馴化を行った。ラットは通常餌 (ND : MF、オリエンタル酵母製造株式会社) と水を自由摂取させ、室温  $23 \pm 2$  °C、湿度 50-65 %に維持された部屋で 12 時間の明暗サイクル (7:00 点灯-19:00 消灯) で飼育した。

## 3 生体電位送信機埋め込み手術

1 週間の予備飼育の後、ラットを局所麻酔薬 (ロピバカイン塩酸塩水和物、表面麻酔、切開部位への滴下) と全身麻酔薬 (ペントバルビタールナトリウム、40 mg/kg、*i.p.*) で処置し、無線テレメータ (TR50BB; KAHHA sciences Ltd.) を腹腔に埋め込んだ。術後感染予防のために抗生物質 (イミペネム水和物およびシラスタチンナトリウム、8.3 mg/kg) を筋肉内注射した。手術後 7 日間の回復期間を設け、その間はラットに触れないように飼育した。

## 4 動物の選別

データのばらつきを抑え、サンプル数の少ない実験の再現性を高めるために、以下のよう独自の選択方法を用いた。飼育ケージ内での行動について、実験者が害を及ぼすことをラットが認識していると、実験者に警戒して飼育ケージ内の奥側に移動しすることをこれまでの実験で確認している。この状態で投与やハンドリングを繰り返すことで、強い回避行動 (例えば、ハンドリング中に暴れて暴力的になってケージから逃げようとするなど) や抑うつ的な行動を示すことが多くあった。逆に、飼育ケージの手前側にいるラットでは、そのような行動はみられなかった。そこで、飼育施設に入った直後とハンドリング後の飼育ケージ内のラットの位置を記録し、飼育ケージの手前側のラットのみを実験に供した。このようなラットは、ハンドリング時の自律神経活動の乱れが少なく、行動薬理試験においても高い再現性を示した。

IEBW 装置を用いて、その高架上での行動及び自律神経活動に基づいて大きく 2 種類に分類し (後述、6.2 改良型高架試験の項を参照)、不安感受性が高いと考えられるラットを用いて以後の IEBW 試験を行った。

## 5 薬物投与

それらを 3 群 (コントロール[Cont], ASH1%, ASH5%) に分けた。試験食は ND と ASH エキスを混合して 1%もしくは 5%(w/w)の濃度に調製し、7 日間自由摂取させた。また Cont 群では精製水 1 mL を、ASH 処置群では 1%もしくは 5%の ASH 水溶液 1 mL を 1 日 1 回 7 日間連続してゾンデを用いて強制経口投与を行った。さらに各行動薬理試験の 30 分前に最後の強制経口投与を行った。

## 6 心拍変動 (HRV) 解析による心臓自律神経活動の評価

心拍は、安静状態においても心拍間隔の周期的な変動が見られる。この周期的な変動は、交感神経と副交感神経の入力からなり、周期的変動の周波数の違いからそれぞれの寄与度を算出することができることから自律神経活動の評価によく用いられている。

送信機の埋め込み手術後、心電図データは、飼育ケージ下の遠隔測定受信装置兼充電装置及びデータ収集システム (PowerLab16/35, PL3516, AD Instruments)、コンピュータを接続した無線テレメトリーシステムによって経時的に記録した。心臓自律神経活動は、HRV 解析によって評価した。HRV データは LabChart Pro (ver. 8.0, AD Instruments) を使用して保存および解析した。HRV 解析では、取得した心電図の心拍 (R 波と R 波の間隔) の時系列変化を解析した。時系列 R-R 間隔変動の周波数領域解析およびパワースペクトル密度の算出は、高速フーリエ変換アルゴリズムを用いて行った。得られたパワースペクトラムは各周波数に応じて高周波数 (high frequency [HF]: 0.6-3.0 Hz)、低周波数 (low frequency [LF]: 0.2-0.6 Hz)、および超低周波数 (very low frequency [VLF]: <0.2 Hz) に分類した。HF 成分および LF 成分は正規化された単位 (HFnu および LFnu) で表した。HF 成分のパワーは心臓副交感神経活動を示し、LF 成分は副交感神経変調を伴う交感神経活動を示す。LF/HF は、心臓の交感神経-副交感神経の活動バランスを示す。自律神経解析は、新奇環境摂食抑制試験 (NSF) 試験では Cont 群及び ASH5%群で、IEBW 試験では Cont 群、ASH1%群と ASH5%群で実施した。

## 7 行動薬理試験

### 7.1 新奇環境摂食抑制試験 (NSF test)

NSF 試験は、うつ病/不安様行動の尺度としてよく使用されており、Bodnoff らが報告している方法(43) に修正を加えて実施した。NSF 試験のスケジュールは、Figure 5A に記載した。新奇環境として、底面と側面が黒色のビニール袋で覆われた床敷なしのケージ (NC: Novel Cage、Figure 5B) を用いた。まず、24 時間絶食したラットの飼育ケージ (HC: Home cage、Figure 5B) での 30 分間の摂食行動を調べた。HC での実験後、餌を自由摂取とし 1 日の間隔を置き、再度 24 時間絶食後に 30 分間の NC での試験を行った。HC 及び NC でのエサを食べ始めるまでの時間、30 分間の総摂餌量、最初に 1 分以上連続して食べるまでの餌のペレットへの接触回数を記録・評価した。

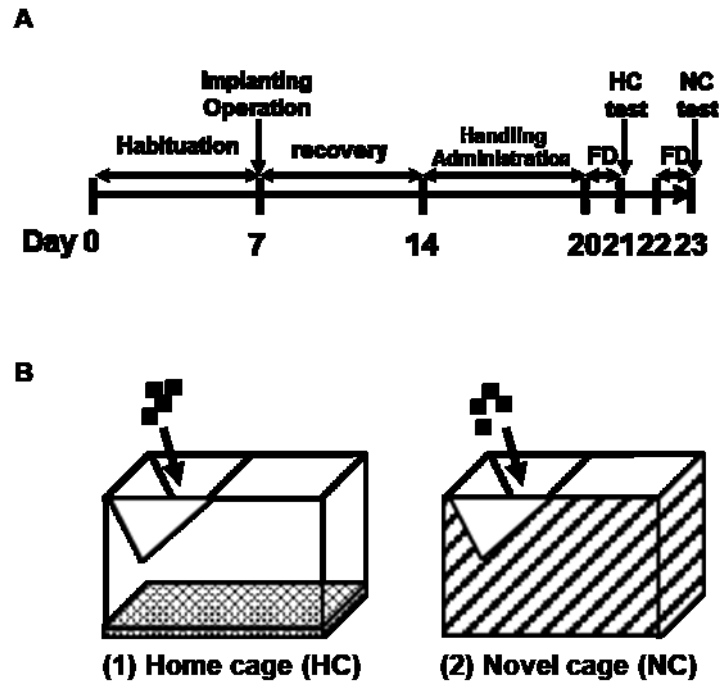
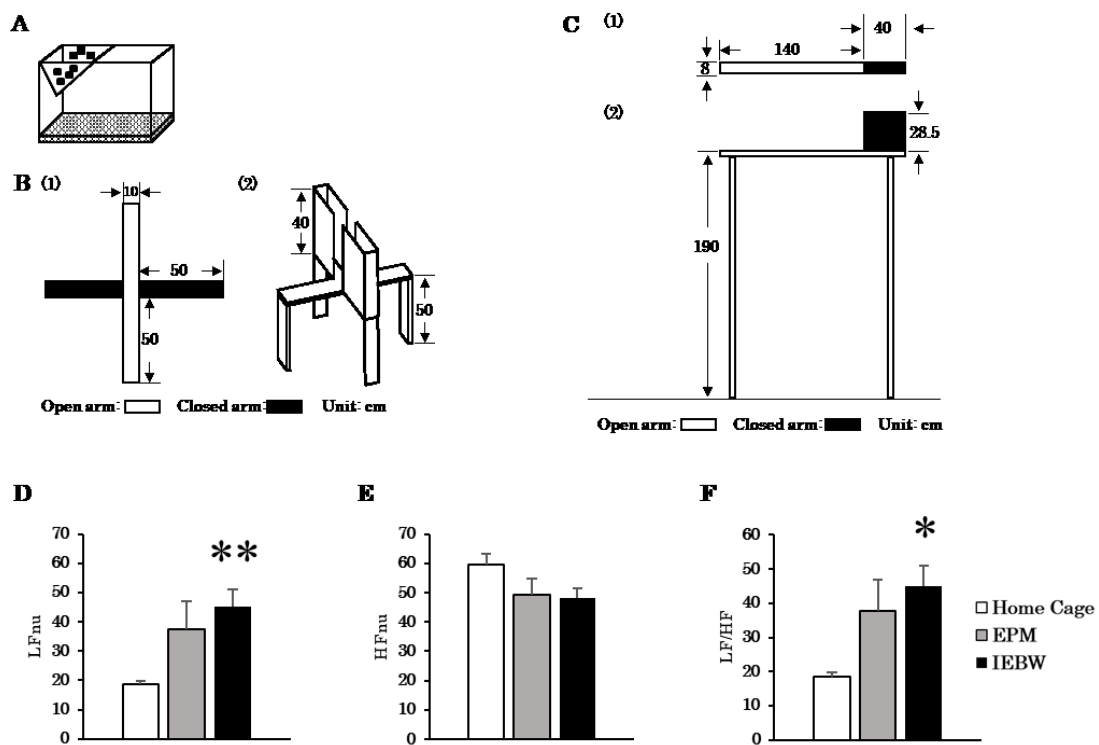


Figure 5. Schedule and test apparatus in NSF test. (A) Schedule of the NSF test. FD: food deprivation. (B) Modified model of the NSF apparatus. (1) Home cage. (2) Novel cage.

## 7.2 改良型高架試験 (IEBW test)

ASH エキスの抗不安作用をさらに調べるために、高所ストレスを利用した行動薬理試験を行った。本実験ではまず、飼育ケージ内 (Figure 6A) での自律神経活動の測定と一般的に用いられている高架型十字迷路 (EPM、 Figure 6B) 装置上での自律神経活動を評価することを目的に予備実験を行ったところ、個体差に基づく大きなばらつきが観察された。そこで  $2 \times 4$  の板材 (180 cm  $\times$  3.8 cm  $\times$  8.9 cm) を床面から 190 cm の高さに設置し、壁のないオープンアーム (140 cm  $\times$  8.9 cm) とアクリル板の壁で囲まれたクローズドアーム (40 cm  $\times$  8.9 cm  $\times$  28.5 cm) からなる IEBW 装置 (Figure 6C) を作成した。飼育ケージ及び EPM 装置、IEBW 装置において自律神経活動を測定した。HC では低い交感神経活動と高い副交感神経活動が観察された (Figure 6 D-F)。EPM 装置 (Figure 6B) 上では、ラットの LF/HF および LFnu の値が増加する傾向があったが、この自律神経活動の変化は、ばらつきが大きく統計学的に有意な差は観察されなかった (Figure 6D-F)。一方で、IEBW 装置を使用したところ LF/HF と LFnu は HC 条件と比較して有意に増加した (Figure 6D-F)。そこで、本実験では HC 条件と比較して有意な自律神経活動の変化が観察された IEBW 試験を用いて ASH エキスによる抗不安作用を解析することとした。



**Figure 6. Improved elevated beam walking (IEBW) as an improved version of the elevated plus maze (EPM) and analysis of the heart rate variability (HRV) in each conditions.** The three apparatuses: (A) home cage (HC); (B) EPM, (1) view from above and (2) bird's eye view; and (C) IEBW, (1) view from above and (2) view from the side. (D) LFnu (normalized unit of the LF value) indicates the sympathetic nervous system activity. (E) HFnu (normalized unit of the HF value) indicates the parasympathetic nervous system activity. (F) LF/HF indicates the balance of the sympathetic and parasympathetic nervous systems. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. HC (repeated measures ANOVA).

また、IEBW 装置上におけるラットの行動及び自律神経活動から大きく 2 種類に分類できた (個性判別: Type selection)。クローズドアームから 140 cm 離れたオープンアームの先端部にラットを置いて 60 秒以内にクローズドアームへと入るラットを Short stay type (S type)、一方、60 秒を超えてからクローズドアームに入ったラットを Long stay type (L type) と分類した。IEBW 装置上での自律神経活動について、S type は L type と比較して交感神経活動を示す LFnu が有意に高い一方で、副交感神経活動を示す HFnu が有意に低下していた (Figure 7A-C)。この結果から IEBW 試験においてクローズドアームへと入るまでの時間が短い S type ラットは L type ラットに比べて不安を感じやすいことが明らかになった。このことから以降の実験ではすべて S type のラットを用いて実験を行った。

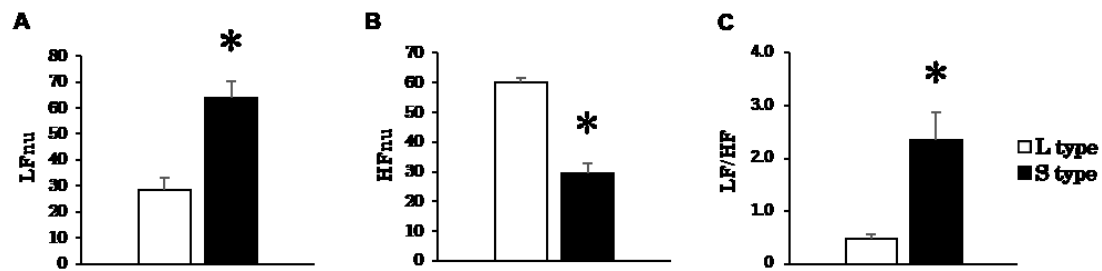


Figure 7. S type rat shows higher sensitivity to anxiety in the IEBW test than L type rat. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 4$ ; \* $p < 0.05$  vs. L type (unpaired student t-test) .

IEBW 試験のスケジュールを Figure 8 に記載した。7 日間の連続投与の後、行動薬理試験を実施する日には、経口投与 30 分後にクローズドアームから 140 cm 離れたオープンアームの先端部にラットを置き、3 分間の行動（オープンアーム上での滞在時間）と自律神経活動を評価した。

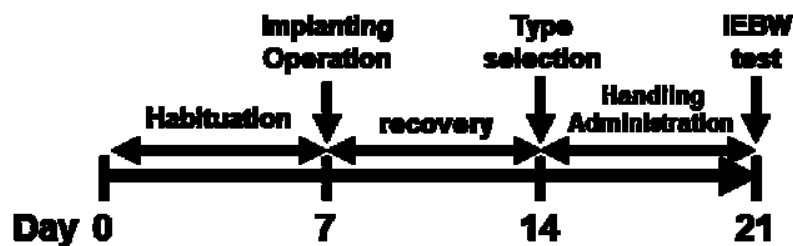


Figure 8. Schedule of the IEBW test.

## 8 組織採取

行動薬理試験終了 30 分後、ラットを安楽死させ、脳を速やかに取り出し、海馬組織を分離し-70°Cで冷凍保存した。

## 9 動物倫理に関わる事項

本研究は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施された。すべての実験プロトコールは、鈴鹿医療科学大学動物利用倫理委員会の承認を得ている（2016年4月1日第1号）。



## 10 統計解析

データは、平均値±標準誤差として示した。統計分析は、SPSS 統計 26 (IBM) を用いて行った。等分散性を Levene の検定で確認し、群間比較には一元配置分散分析 (oneway-ANOVA) を用いた。ANOVA で有意差が認められた場合、Dunnett の t 検定または T3 ポストホック検定を用いて、Cont 群との有意差を検定した。条件間の差については対応のある Student の t 検定もしくは反復測定 ANOVA を用いて有意差を検定した。2 群間の差については、独立した Student の t 検定によって有意差を検定した。p 値 < 0.05 を有意と設定した。

## 結果

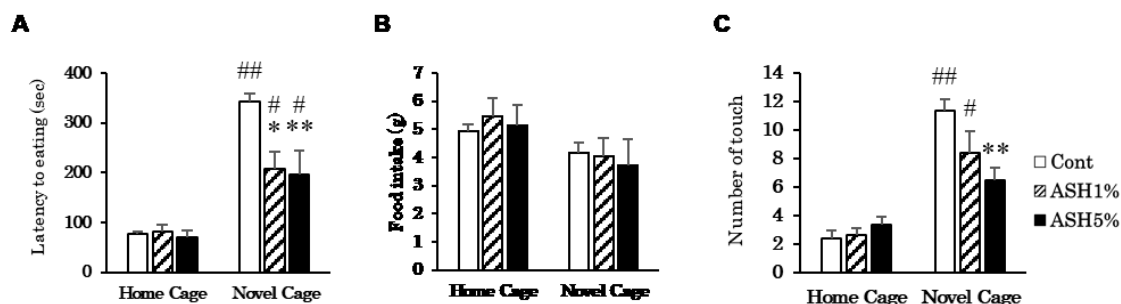
### 1 NSF 試験

#### 1.1 摂餌行動への影響

HC 条件では、食べ始めるまでの時間、30 分間の総摂餌量、最初に 1 分以上連続して食べるまでのペレットへの接触回数について各群間で差は見られなかった (Figure 9A-C)。

NC 条件では、ASH1%及び ASH5%群において、Cont 群と比較して餌を食べ始めるまでの時間が有意に短縮した (Figure 9A)。30 分間の餌摂取量は、各群間で差は見られなかった (Figure 9B)。ASH5%群は Cont 群と比較して最初に 1 分以上連続して食べるまでのペレットへの接触回数が有意に減少した (Figure 9C)。

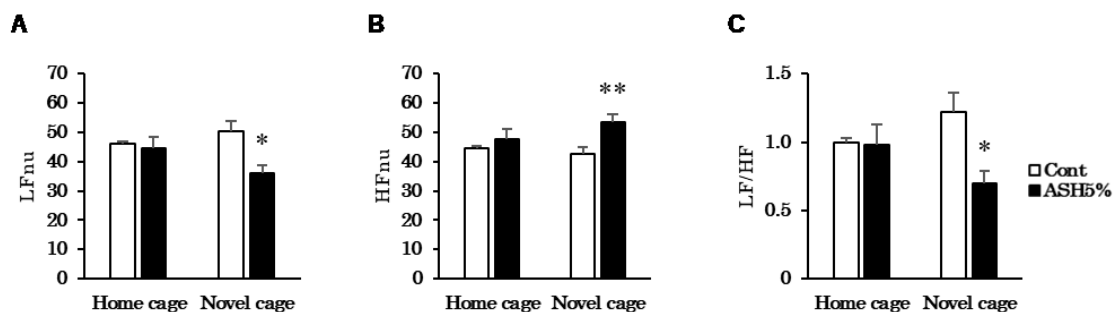
NC 条件では HC 条件と比較すると、いずれの投与群においても餌を食べ始めるまでの時間が有意に延長していた (Figure 9A)。30 分間の総摂餌量では差はみられなかった (Figure 9B)。NC 条件において、Cont 群と ASH1%群は最初に 1 分以上連続して食べるまでのペレットへの接触回数が HC 条件と比較して有意に増加した (Figure 9C)。



**Figure 9.** Effects of ASH extract on anxiety-related behaviors induced by mild stress in the novelty suppressed feeding (NSF) test. (A) Latency time to start eating. (B) Total food intake. (C) The number of pellet touches before the first continuous eating period of > 1 min. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 5-6$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's t-test). # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs. HC (paired t-test).

## 1.2 HRV 解析による自律神経活動の評価

HC 条件では、各群間で LF/HF 及び LFnu、HFnu の値に差は見られなかった (Figure10)。対照的に、NC 条件では、ASH5%群は、Cont 群と比較して HFnu が有意に増加し、LF/HF および LFnu 値が有意に減少した (Figure 10)。

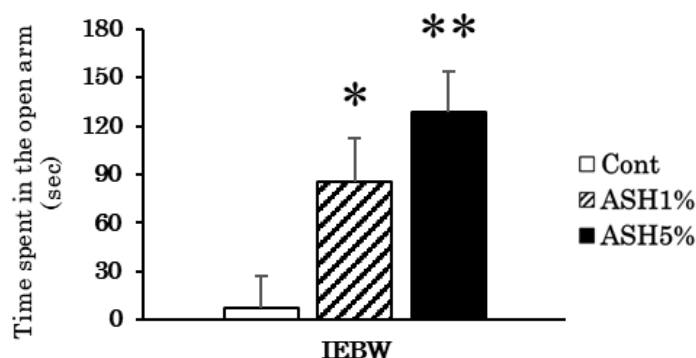


**Figure 10. Effects of ASH extract on the autonomic nervous control of heart rate in the novelty suppressed feeding (NSF) test.** Power spectrum analysis of heart rate variability in the NSF test. (A) LFnu (normalized unit of the LF value) indicates the sympathetic nervous system activity. (B) HFnu (normalized unit of the HF value) indicates the parasympathetic nervous system activity. (C) LF/HF indicates the balance of the sympathetic and parasympathetic nervous systems. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Cont group (unpaired t-test).

## 2 IEBW 試験

### 2.1 オープンアーム滞在時間

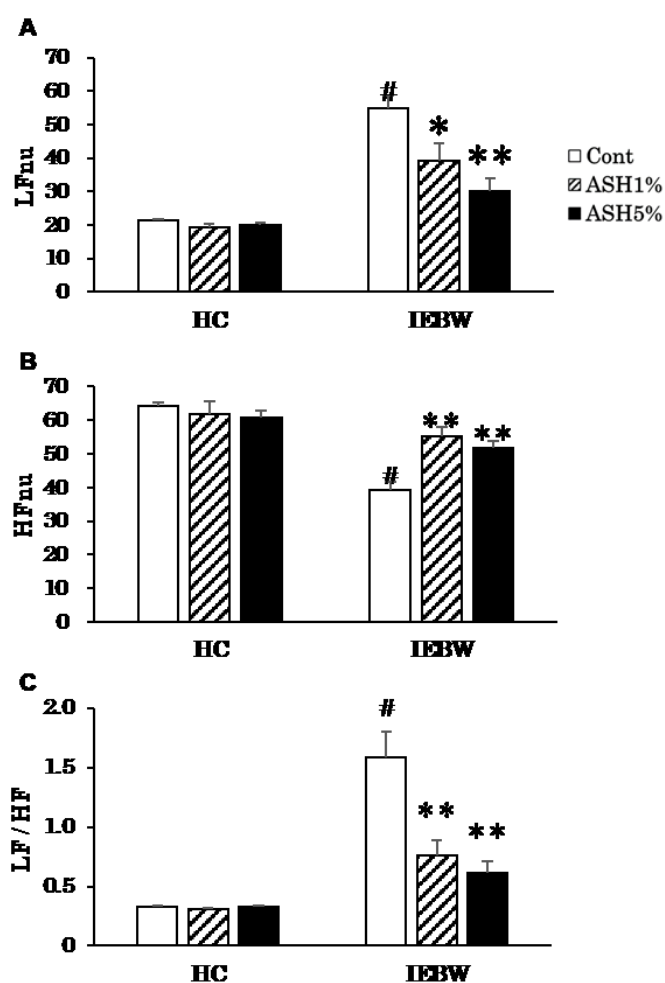
ASH1%群と ASH5%群では、Cont 群に比べてオープンアームでの滞在時間が有意に延長した (Figure 11)。



**Figure 11. Effects of ASH extract on anxiety-like behaviors induced by strong stress in the IEBW test.** Time spent in the open arm (sec) are shown. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6-8$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's T3 test).

## 2.2 HRV 解析による自律神経活動の評価

HC 条件では、投与群間で有意な変化はみられなかった。HC 条件と IEBW 条件を比較すると、Cont 群において LFnu 及び LF/HF の有意な上昇 (Figure 10A, C) に加えて HFnu の有意な低下 (Figure 10B) が観察された。ASH エキス投与により Cont 群で観察された IEBW 条件による各指標の変化は減弱された。また IEBW 条件において、Cont 群と比較して、LFnu 及び LF/HF の有意な低下 (Figure 10A, C) に加えて HFnu の有意な増加 (Figure 10B) が観察された。



**Figure 12.** Effects of ASH extract on the autonomic nervous system control of heart rate in the IEBW test. The power spectrum analysis of heart rate variability (HRV) on IEBW. (A) LFnu (normalized unit of the LF value) indicates the sympathetic nervous system activity. (B) HFnu (normalized unit of the HF value) indicates the parasympathetic nervous system activity. (C) LF/HF indicates the balance of the sympathetic and parasympathetic nervous systems. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6-8$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's t-test), # $p < 0.05$  vs. home cage (paired t-test).

## 考察

ラットは、なじみのない環境で不安を感じるため、餌を食べ始めるまでの時間が長くなることが知られている。代表的なベンゾジアゼピン系抗不安薬であるジアゼパムを投与することで餌を食べ始めるまでの時間が短縮されることから、NSF 試験は薬物の抗不安作用を調べる行動薬理試験としてよく用いられる(43)。

本実験では、NSF 試験の結果を標準化するために、NSF 試験を実施する前にラットの HC 条件における行動を確認した。HC 条件において、行動及び自律神経活動のいずれにおいても、ASH エキスの投与は影響を与えなかったこと (Figure 9, 10) から、ストレスがない飼育ケージ条件では行動変化を起こさないことが示唆された。NC 条件での ASH エキスの効果を検討したところ、ASH エキス配合餌の投与は食べ始めるまでの時間を有意に短縮し、特に 5%ASH エキス投与では、1 分以上連続して食べるまでのペレットへの接触回数を有意に減少させた (Figure 9)。よって、ASH エキス投与により新奇環境への不安が緩和される可能性が示唆された。加えて、NC 条件では、5%ASH エキス投与が交感神経活動を低下させ、副交感神経活動を増加させたことから (Figure 10)、ASH エキスの抗不安作用が自律神経活動の面からも確認できた。

次に不安高感受性ラットを選別し、高所ストレスに対する ASH エキスの影響を調べた。高所ストレスの動物モデルとして一般的に用いられる EPM 試験を改良した IEBW 試験を行い ASH エキスの抗不安作用について検討した。Cont 群において、HC 条件と比較して、IEBW 装置上では LFnu の上昇及び HFnu の低下に加え LF/HF の上昇がみられたことから (Figure 12)、IEBW 装置上のラットは交感神経の活動が活性化し、副交感神経の活動が低下しており強いストレスを感じていることが考えられた。ASH1%群及び ASH5%群において、オープンアームでの滞在時間の有意な延長が認められた (Figure 11)。また ASH エキス投与は、IEBW 装置による交感神経の活性化や副交感神経の抑制を阻害し (Figure 12)、高所ストレスによる自律神経活動の影響を緩和していることが示唆された。

以上のことから、ASH エキスは、不安高感受性ラットにおいて NSF 試験で負荷されるような軽度のストレスのみではなく、高所ストレスのような強いストレスにも効果を示すことが示唆された。

## 第2節 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキスの

### 海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

#### 緒言

2006年にChenらはBDNFの一塩基変異によるアミノ酸置換（Val66Met）が、神経細胞からのBDNF分泌不全を起こし、この変異を導入したマウスではストレス環境において、不安様行動が増加し、この不安様行動の増加は抗うつ薬であるフルオキセチンでは改善できないことを報告した(44)。近年の研究では、うつ病の改善にはBDNF/TrkBシグナルの活性化が重要であり、抗うつ薬の投与が海馬でのBDNF発現を増加させることで改善することが報告されている(25,26,45)。また、海馬におけるBDNFの過剰発現が抗不安作用を有することが報告されている(46)。さらに、海馬BDNFのmRNAレベルは、急性ストレスと慢性ストレスの結果として低下することが報告されている(47)。これらの報告から、ストレスによる不安行動は、海馬BDNF発現量の変化と密接に関係していることが示唆されている。また、ASH水抽出物を投与したマウスの脳では、CREBの発現量が増加することが報告されている(20)。さらに、ASHエキスはラット副腎髄質褐色細胞腫の株化細胞であるPC12細胞においてBDNFの転写を促進して、コルチコステロンによる神経毒性に対して保護作用を示すことが示唆されている(41)。したがって、第1節において観察されたストレス条件下でのASHエキスの抗不安作用は、BDNF発現の変化によるものである可能性がある。そこで、IEBW試験後の不安高感受性ラットの脳を用いて、海馬におけるBDNF/TrkBシグナル関連タンパク質のウェスタンブロット解析と特異的抗BDNF抗体を用いた免疫染色解析を行った。

## 実験方法

### 1 ウェスタンブロッティング

IEBW 試験後のラットから採取した海馬にタンパク質分解酵素阻害剤や脱リン酸化酵素阻害剤を含む組織懸濁液を加え組織懸濁液を作成後、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、ゲル中のタンパク質を Immun-Blot PVDF 膜 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に転写した。PVDF 膜を、3%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む TBST (トリス緩衝食塩水、0.1% Tween 20) でブロッキングし (1 時間、室温)、次いで BDNF (ab108319、Abcam)、および TrkB (#4603S、Cell Signaling Technology, Inc. [CST])、p-TrkB (#4619S、CST)、p-CREB (#9198S、CST)、CREB (#9197S、CST)、 $\beta$ -アクチン (#4970S、CST) に対する一次抗体希釈液 (1 : 1000) で、インキュベートした (4°C、一晚)。これをワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 (#7074S、1:1000、CST) でインキュベートした (1 時間、室温)。免疫応答性バンドは、化学発光検出キットを用いて検出し、可視化にはライトキャプチャー AE-6971/2 装置 (ATTO) を用いた。化学発光強度を、CS アナライザー 4 (ATTO) を用いて数値化した。BDNF 及び pTrkB、pCREB は  $\beta$ -アクチン、総 TrkB、又は CREB で標準化した。

### 2 免疫染色法

ラット脳を 4%パラホルムアルデヒドで固定 (4°C、一晚) した後、凍結保護のために 10%、20%、30%スクロース・リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に順次浸漬 (4°C) し、ドライアイスで凍結した。凍結した脳は、Tissue-Tek<sup>®</sup> O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン株式会社) を用いて包埋し、-80°C で保存した。その後、クライオスタットを用いて -15°C で厚さ 10  $\mu$ m の組織切片を作製した。作製した組織切片を PBS で満たしたシャーレに収集し、10%BSA を含む PBS でインキュベートし (1 時間、室温)、次いで抗 BDNF 抗体希釈液 (Sc-20981、1:100、Santa Cruz Biotechnology) 中でインキュベートした (3 日間、4°C)。二次抗体希釈液 (#4413S、1:1000、CST) 中でインキュベートした (2 時間、室温)。切片を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) にのせ、封入剤 Fluoromount<sup>™</sup> (Diagnostic BioSystems) を用いて封入した。画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) で撮影した。

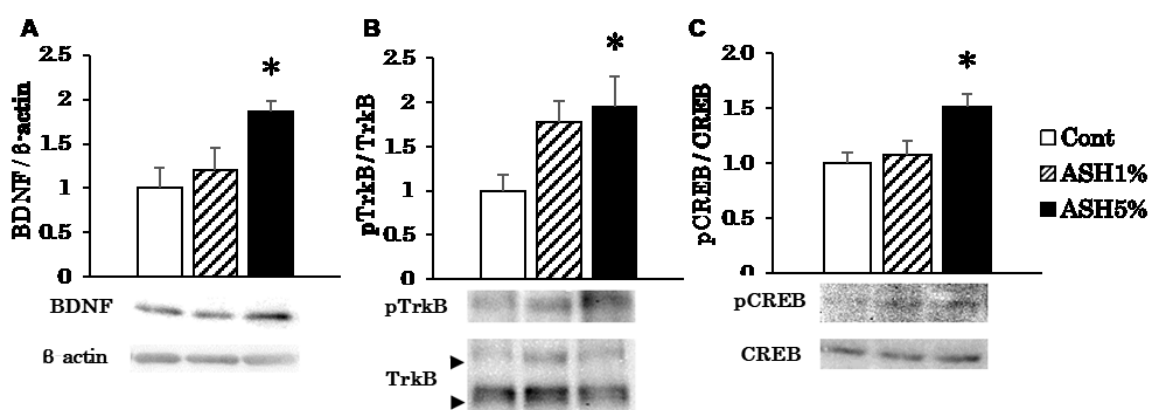
### 3 統計解析

データは、平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。統計分析は、SPSS 統計 26 (IBM) を用いて行った。等分散性を Levene の検定で確認し、群間比較には一元配置分散分析 (oneway-ANOVA) を用いた。ANOVA で有意差が認められた場合、Dunnett の t 検定または T3 ポストホック検定を用いて、Cont 群との有意差を検定した。p 値 < 0.05 を有意と設定した。

## 結果

### 1 ウェスタンブロッティング

Cont 群及びASH1%群、ASH5%群において、各ラットの脳から海馬を摘出し、ウェスタンブロッティング法により BDNF/TrkB シグナル関連タンパク質の発現を解析した。ASH1%群の海馬 BDNF 発現量は Cont 群と同程度であったが、ASH5%群では有意に増加していた (Figure 13A)。さらに、ASH5%群では、BDNF の受容体である TrkB のリン酸化が有意に上昇し、次いで、BDNF/TrkB シグナルカスケード下流の cAMP 応答エレメント結合タンパク質 (CREB) のリン酸化が有意に上昇した (Figure 13B, C)。

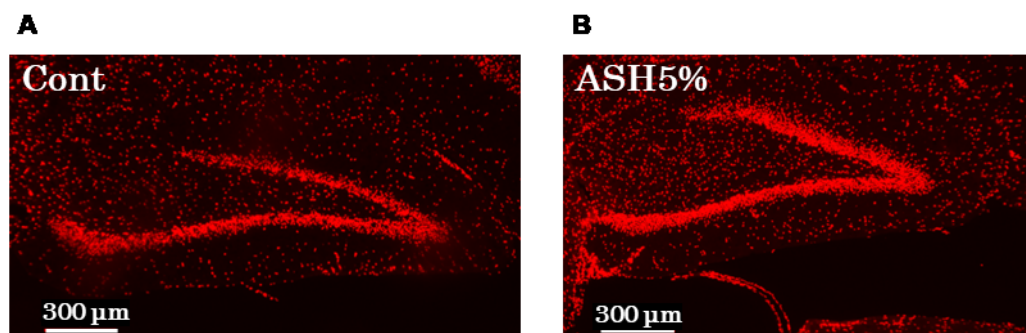


**Figure 13. Effects of ASH extract on hippocampal BDNF/TrkB signaling.** Analysis of hippocampal (A) BDNF, (B) phospho-TrkB (pTrkB), and (C) phospho-CREB (pCREB) protein levels by western blotting. BDNF was normalized by  $\beta$ -actin, whereas pTrkB and pCREB were normalized by total TrkB and CREB, respectively. Each value is presented as a ratio vs. Cont group. Data are presented as the mean  $\pm$  SE; n = 4–5; \*p < 0.05 compared with the Cont group (Dunnett's t-test).



## 2 免疫染色

次に、Cont 群及び ASH5%群の海馬における BDNF タンパク質の免疫組織学的解析を行った。5%ASH エキスを経口投与したラット海馬では、BDNF 陽性タンパク質の顕著な増加が観察された (Figure 14)。



**Figure 14.** Immunohistochemical staining for hippocampal BDNF. Representative images of staining with the anti-BDNF antibody in (A) Cont and (B) ASH5% are shown.

## 考察

5%ASH エキスを投与した不安高感受性ラットの海馬における BDNF タンパク質の発現量が有意に増加し、TrkB、CREB のリン酸化も有意に増加することが明らかとなった。さらに、免疫組織学的解析においても、5%ASH エキスを投与した場合、ラット海馬における BDNF の発現が著しく上昇することが確認された。不安様行動の減少が観察された ASH1% 群において BDNF/TrkB シグナルの活性化が見られなかったことから、ASH エキスによる BDNF/TrkB シグナルの活性化には至適投与量が存在することが示唆された。また ASH エキス投与による IEBW 装置上での行動の変化には一部濃度依存性が見られたため、5%ASH エキス投与による不安様行動の減少は BDNF/TrkB シグナルが介在することにより ASH1% 群よりも強い作用が見られた可能性がある。

海馬アストロサイトに BDNF を過剰発現させることで神経新生を促し不安様行動の減少を示すこと(48)や海馬腹側部の CA1 領域には不安に関連する細胞群が存在すること(49)が報告されている。また、海馬背側部における BDNF/TrkB シグナルカスケード下流の Erk の活性化により抗不安様行動が増加した報告(50)もあり、海馬での BDNF 発現量の増加は抗不安作用を誘導する強いファクターであると考えられる。

以上のことから、不安高感受性ラットにおいて 5%ASH エキスによる海馬での BDNF/TrkB シグナルの活性化が抗不安作用を強めている可能性が示唆された。

### 第3節 小括

第1章では、2種類の行動薬理試験を通して通常ラット及び不安高感受性ラットにおいてASHエキス投与がストレス環境下での不安様行動の減少や自律神経活動の安定化をもたらし、抗不安作用を示すことを確認した。また、行動薬理試験のストレスによる交感神経の活性化及び副交感神経の抑制をASHエキスが減弱することが明らかとなった。5%ASHエキス投与は、抗不安作用に関連する海馬BDNF/TrkBシグナルを活性化することが示唆された。以上の結果から、抗不安作用を有するASHエキスは、メンタルヘルスにおいて有益なサプリメントや予防薬になり得ると考えられる。

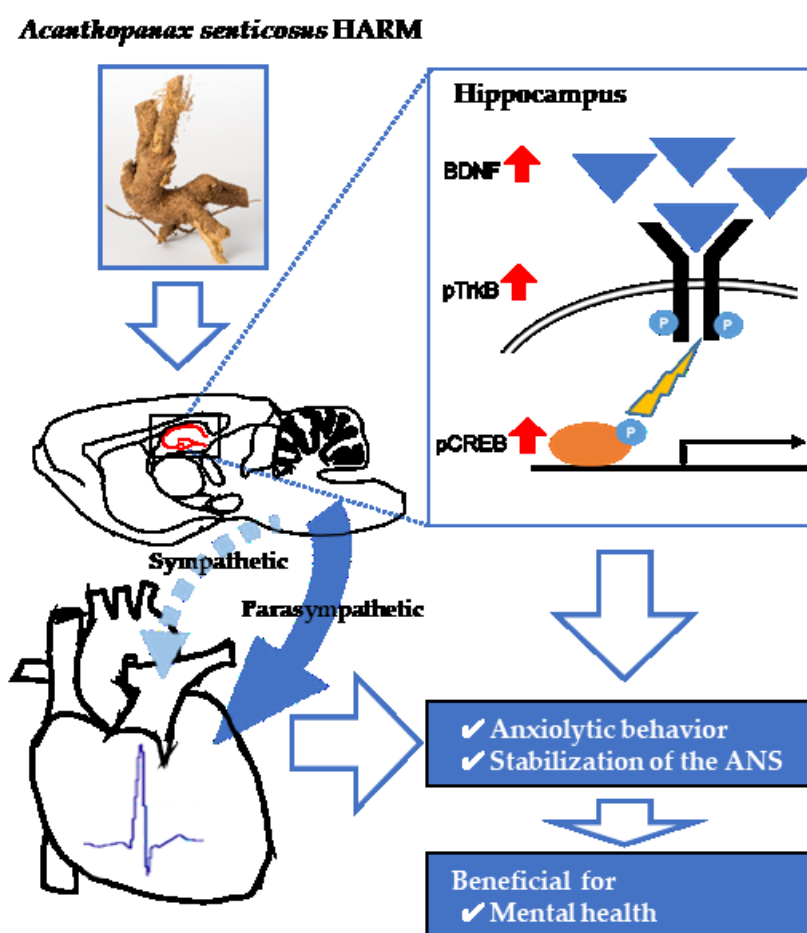


Figure 15. *Acanthopanax senticosus* HARM extract induced the anxiolytic behavior, the stabilization of autonomic nervous system (ANS) activity and BDNF/TrkB signaling activation.

## 第 2 章

### 不安高感受性ラットにおけるエゾウコギエキス含有成分の

#### 抗不安作用及び海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

##### 緒言

第 1 章において、不安高感受性ラットへの ASH エキス投与が、強いストレス条件下での行動及び自律神経活動の観点から抗不安作用を示し、海馬 BDNF/TrkB シグナルを活性化することが明らかとなった。第 1 章で用いた ASH エキスは、クロロゲン酸 (CHA: 829.5 mg/100 g)、エレウテロサイド E (SYG: 625.2 mg/100 g)、シリンギン (SYR: 325.2 mg/100 g)、イソフラキシジン (ISO: 101.4 mg/100 g)、エレウテロサイド B1 (95.2 mg/100 g) を含有していた。これらの生理活性物質の活性については様々な報告がされている(18,19,51)。CHA は、植物における重要な二次代謝物であり、人の食事に豊富に含まれるポリフェノール化合物である。CHA の主な作用として、抗酸化作用、抗炎症作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、血糖降下作用、脂質低下作用、心血管疾患予防作用、抗変異原性作用、抗がん作用、免疫調節作用などが *in vitro* および *in vivo* での研究で明らかにされている(52)。SYG は ASH の根や茎に豊富に含まれているリグナン配糖体である。SYG は、免疫賦活化作用やがんの転移に関わるマトリックスメタロプロテアーゼなどの遺伝子の転写抑制作用、NF- $\kappa$ B/AP-1 活性阻害作用による炎症反応調節作用を示すことが報告されている(18)。SYR は、ASH エキスに含まれるリグノール配糖体であり、エレウテロサイド B とも呼ばれている。抗酸化作用、放射線防護作用、免疫調節作用、抗炎症作用、血糖降下作用、抗疲労作用が報告されている(51)。ISO は、ASH の根に含まれるクマリン化合物の 1 つで、抗疲労作用、抗ストレス作用、免疫補助作用を有する。また、ISO はアルドース還元酵素阻害作用、抗白血病作用、抗マラリア作用、がん予防作用、胆汁分泌促進作用が報告されている(51)。これら 4 成分については、炎症・免疫の調節作用や抗がん作用、代謝性疾患に対する作用など幅広く検討されている。

しかし ASH エキスの抗不安作用に関連する含有成分については依然として不明である。そこで本章では、オープンフィールド試験 (OFT) と EPM 試験を改良した IEBW 試験を用いてラットの不安様行動を評価し、また IEBW 試験時の HRV 解析により自律神経活動を評価し不安高感受性ラットにおける ASH エキスの抗不安作用に関与する有効成分の同定を試みた。

## 第1節 不安高感受性ラットにおけるエレウテロサイド E 及び

### クロロゲン酸の抗不安作用

#### 緒言

ASH エキスは強制水泳時間を延長させ、この作用は SYG においても同様の効果が報告されている(53)。また、ASH エキスが水浸拘束ストレスにより誘発される胃潰瘍の発症を抑制し、その作用は ASH エキス中でも含有量が特に多い CHA や SYG においても観察され、中でも SYG が最も強く、CHA はその次に強い胃潰瘍発症抑制作用を持つことが報告されている(38)。このことからこの 2 成分は特に ASH エキスの抗ストレス作用に寄与している可能性が高いと考えられた。SYG は TNF- $\alpha$  及び IL-6、AP-1、NF- $\kappa$ B の産生抑制や酸化ストレスの減弱を介して抗炎症作用を示す(54-56)ことや肥満糖尿病モデル db/db マウスにおいてインスリン抵抗性を改善し、肝臓での解糖系の亢進やグルコース利用を低下させることで糖代謝を調節する作用(57)が報告されている。SYG はマウスにおいて断眠ストレスによる体重減少や記憶能力の低下を改善し、海馬内のセロトニンやドパミンの濃度に影響を与えること(58)や、SYG のアグリコンである (+) - シリンガレジノールは、興奮性シナプス伝達を抑制する(59)ことが報告されている。CHA は抗酸化作用を示すポリフェノール化合物であり、GABA<sub>A</sub> 受容体を介して誘導される抗不安作用が報告されている(60)。これらの知見から、ASH エキスによる心理的ストレスの軽減は、これらの成分が中枢神経系へ作用することを介して生じることが考えられる。しかし各成分の ASH エキスの抗不安作用に対する寄与は不明である。

そこで本節では、OFT と IEBW 試験 を用いて、SYG 及び CHA の 2 成分の行動への影響を評価した。また行動薬理試験時の HRV 解析により自律神経活動を評価し SYG 及び CHA の抗不安作用を解析した。

## 実験方法

### 1 被験物質

#### 1.1 ASH エキス

第1章第1節で用いた ASH エキスを用いた。

#### 1.2 SYG の単離

ASHエキス粉末 (1250 g) を、MeOH (3750 mL、3 h×2) を用いて還流条件下で抽出した。抽出物を濾過し、次いで減圧下で濃縮した。得られた濃縮液をH<sub>2</sub>Oに懸濁し、Et<sub>2</sub>O、CHCl<sub>3</sub>、及びn-BuOHで連続的に抽出した。n-BuOH抽出物 (219 g) を5つに分離し、各画分 (約41 g) をSiO<sub>2</sub>カラムクロマトグラフィー (φ8.0×25.0 cm) にかけて、CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (450:50:5) で溶出した。Rf値が0.55 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 70:30:5) の化合物を含む画分を回収し、濃縮した。得られた残渣をSiO<sub>2</sub>カラムクロマトグラフィー (Ø 3.0×19.0 cm) でさらに精製し、EtOAc/CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:2:1) で溶出した。Rf値が0.15 (EtOAc/MeOH = 7:3) の化合物を含む画分を回収し、濃縮した。MeOHからの再結晶により、650 mgの白色沈殿物が得られた。純度は、Cosmosil® 5C<sub>18</sub>-AR-IIカラム (4.6×250 nm) を用いた220 nmでの紫外吸収から測定した。HPLCの溶媒は以下の通りであった。

移動相: A液, 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液; B液, 0.05% トリフルオロ酢酸-アセトニトリル溶液.

検出カラムを流速1 mL/min、5分間、90%A液で溶出し、その後、40分間にわたって90%A液から50%A液への直線的なグラジエントで溶出した。保持時間 (tR) を分単位で記録した (tR = 22.2分、純度91.0%)。単離された物質をESI-MSにより分析したところ分子式C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>18</sub> (742.2684 g/mol) およびm/z [M+Na]<sup>+</sup> 765.2618 (calcd, 765.2582) を有し、標準品のSYGと比較を行うことで同定した。

### 2 実験動物

雄性 SD ラット (IEBW 試験では6週齢、OFTでは7週齢) を日本エスエルシー株式会社から購入し、標準的なポリカーボネートケージに個別に飼育し、7日間連続したハンドリングによる実験者への馴化を行った。ラットは通常餌と水を自由摂取させ、室温 23±2 °C、湿度 50-65 %に維持された部屋で12時間の明暗サイクル (7:00 点灯-19:00 消灯) で飼育した。

### 3 手術

1 週間の予備飼育の後、ラットを局所麻酔薬（ロピバカイン塩酸塩水和物、表面麻酔、切開部位への滴下）と全身麻酔薬（ペントバルビタールナトリウム、40 mg/kg、*i.p.*）で処置し、無線テレメータ（TR50BB; KAHA sciences Ltd.）を腹腔に埋め込んだ。術後感染予防のために抗生物質（イミペネム水和物およびシラスタチンナトリウム、8.3 mg/kg）を筋肉内注射した。手術後 7 日間の回復期間を設け、その間はラットに触れないように飼育した。

### 4 実験動物の選別

第 1 章第 1 節と同様に IEBW 装置を用いて不安高感受性ラットの選別を行った。

### 5 薬物投与

第 1 章第 1 節における ASH5%群における ASH エキスの摂餌量に基づき、各薬物の体重当たりの投与量（CHA [Sigma-Aldrich, C3878], 40 mg/kg ; SYG, 32 mg/kg ; Mix, CHA [40 mg/kg] と SYG [32 mg/kg] の混合物）を決定した。本実験では、ポジティブコントロールとしてクロキサゾラム（CLO, Sepazon™, 0.2 mg/kg）を使用した。各薬物は精製水 1 mL に溶解して 1 日 1 回 7 日間連続してゾンデを用いて強制経口投与を行った。さらに各行動薬理試験の 30 分前に（Cont、CHA、SYG、Mix）または 2 時間前（CLO）に最後の経口投与を行った。OFT では、ASH 群も設定し、第 1 章第 1 節と同様に ASH エキスの投与も行った。

### 6 自律神経活動の評価

第 1 章第 1 節と同様に心電図データを無線テレメトリーシステムによって経時的に記録した。心臓自律神経活動は、R-R 間隔変動のスペクトル分析によって評価した。R-R 間隔変動の周波数領域分析およびパワースペクトルを、高速フーリエ変換アルゴリズムを用いて算出し、得られたパワースペクトラムを各周波数に応じて高周波数（HF: 0.6-3.0 Hz）、低周波数（LF: 0.2-0.6 Hz）、および超低周波数（VLF: -0.2 Hz）に分類した。LF 成分および HF 成分は標準化された単位（LFnu および HFnu）で表示した。HFnu は心臓副交感神経活動を示し、LFnu は副交感神経変調を伴う交感神経活動を示す。LF/HF は、心臓の交感神経-副交感神経の活動バランスを示す。自律神経解析は、IEBW 試験において実施した。

## 7 行動薬理試験

### 7.1 オープンフィールド試験 (OFT)

OFTは新奇環境下におけるげっ歯類の自発運動や壁のない中心部での滞在時間などの探索行動を指標として不安状態を評価するためによく用いられる。

本実験ではBroadhurstにより考案されたもの(61) に修正を加えて実施した。OFTのスケジュールをFigure 16Aに示す。Figure 16Bに示す円形オープンフィールド装置 (OF-25R、直径75 cm、壁高40 cm、室町機械) を使用した。装置は、Figure 16Cに記載されているように3つの区画に分割した。ラットをオープンフィールド装置に入れ、10分間自由に探索させた。オープンフィールド装置内の活動をビデオカメラで記録し、ANY-maze™ (Stoelting Co.) を用いてラットの行動を分析し、装置内での自発運動に加えて、各区画での滞在時間を解析した。

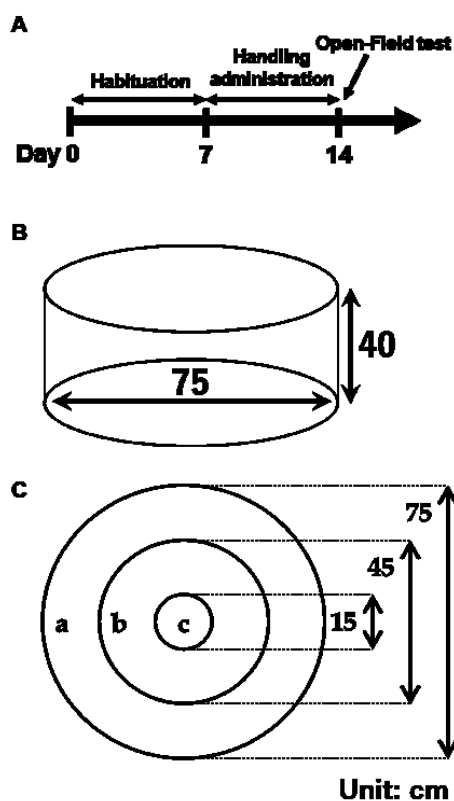


Figure 16 (A) Schedule and (B) apparatus, (C) sectioning in the open-field test.

### 7.2 IEBW 試験

第1章第1節と同様にIEBW装置を用いて行った。経口投与30分後にラットをオープンアームの先端部におき、3分間自由に探索させた。その時の行動及び自律神経活動を記録した。Figure 8に示した実験スケジュールに即して実施した。



## 8 組織採取

行動薬理試験の後、ラットを安楽死させ、脳を速やかに摘出し、海馬組織を分離し-70°Cで冷凍保存した。

## 9 動物倫理に関わる事項

本研究は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施された。すべての実験プロトコールは、鈴鹿医療科学大学動物利用倫理委員会の承認を得ている（2016年4月1日第1号）。

## 10 統計解析

データは、平均値±標準誤差として示した。統計解析は、SPSS26 (IBM) を用いて行った。等分散性をLeveneの検定で確認し、グループ間比較には一元配置分散分析 (oneway-ANOVA) を用いた。ANOVAで有意差が認められた場合、Dunnnettのt検定またはT3ポストホック検定を用いて、Cont群との有意差を検定した。2群間の差は、独立したStudentのt検定を用いて有意差を検定した。p値 < 0.05を有意と設定した。

## 結果

### 1 OFT

総移動距離および総移動時間は、ASH5%、Mix、およびCLO群で、コントロール(Cont)群よりも有意に増加していた (Figure 17 A, B)。CHA群及びSYG群もまた、これらのパラメータを増加させたが、その差は有意ではなかった。Figure 16Cに示すように装置を3つの区画に分割し、各区画への侵入回数を測定した。別の区画への総進入数は、投与群において増加する傾向があった (Figure 17C)。各区画への進入数の総進入数に対する比率は、各群間で差は見られなかった (Figure 17D-F)。

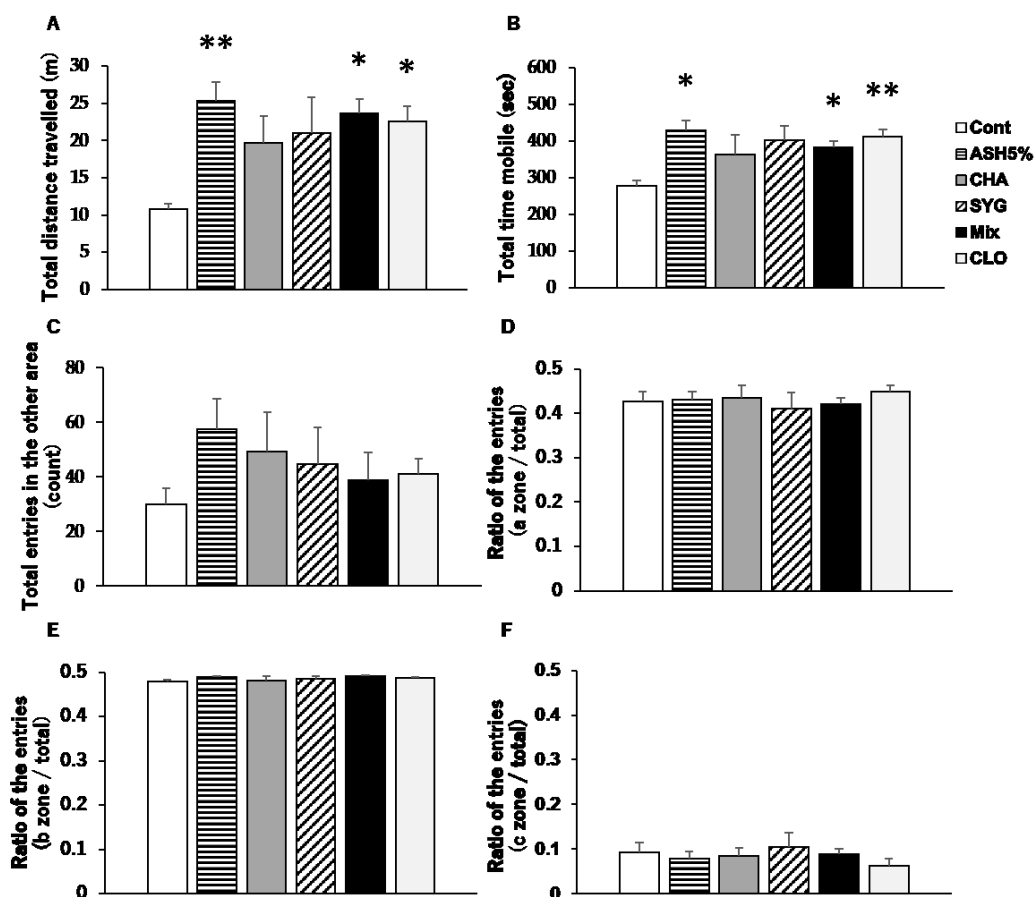


Figure 17. Effects of *Acanthopanax senticosus* HARMs (ASH), its major components (chlorogenic acid [CHA], eleutheroside E [SYG], and a mixture of both [Mix]), and cloxazolam (CLO) on anxiety-related behaviors induced by mild stress in the open field test. (A) Total distance traveled. (B) Total time mobile. (C) Total entries into another area (count). (D) Ratio of entries into another zone to the total entries. (E) Ratio of entries into zone b to the total entries. (F) Ratio of entries into zone c to the total entries. Data are presented as the mean  $\pm$  SE; n = 5–6; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Cont group (Dunnett's t-test).

## 2 IEBW 試験

### 2.1 オープンアーム滞在時間

CHA群とMix群では、Cont群に比べてIEBW試験におけるオープンアームの滞在時間が有意に増加した (Figure 18)。また、SYGを投与したラットでもオープンアームの滞在時間が長くなったが、その差は有意ではなかった。また、ポジティブコントロールであるCLOを投与したラットでは、滞在時間の延長傾向を示したが有意ではなかった (Figure 18)。

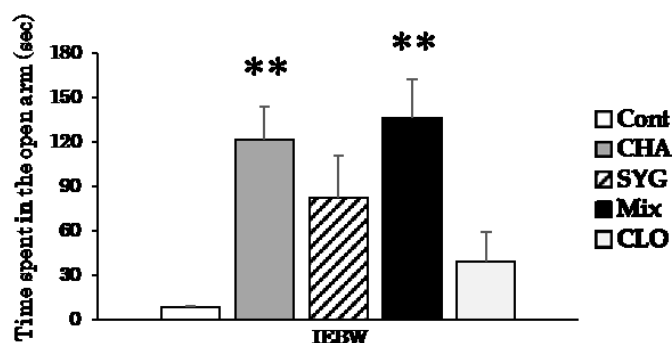


Figure 18. Effects of the major components of *Acanthopanax senticosus* HARMS (chlorogenic acid [CHA], eleutheroside E [SYG], and a mixture of both [Mix]) and cloxazolam (CLO) on anxiety-like behaviors induced by strong stress in the improved elevated beam walking test. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 5-7$ ;  $**p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's T3 test).

### 2.2 HRV 解析による自律神経活動の評価

テレメータを移植したラットのホームケージでの安静時の自律神経活動を測定した。その結果、各群間で自律神経活動に差は見られなかった (Figure 19)。その後、IEBW 条件で自律神経活動を測定した。IEBW 条件ではホームケージ条件と比較すると、Cont 群で LFnu 値が有意に増加し、HFnu 値が有意に減少した。また、LF/HF 値の有意な増加も観察された。CHA 群においても LFnu 値、LF/HF 値が有意に高く、HFnu 値が有意に低い値を示した。SYG 群では、HFnu 値のみが有意に低下していた。一方で Mix 群と CLO 群では Cont 群で見られた変化は観察されなかった。IEBW 条件において Cont 群と比較して SYG 群、Mix 群、CLO 群では、HFnu 値が有意に増加し、LFnu 値、LF/HF 値が減少した (Figure 19A-C)。しかし、CHA 群では有意な変化は見られなかった。

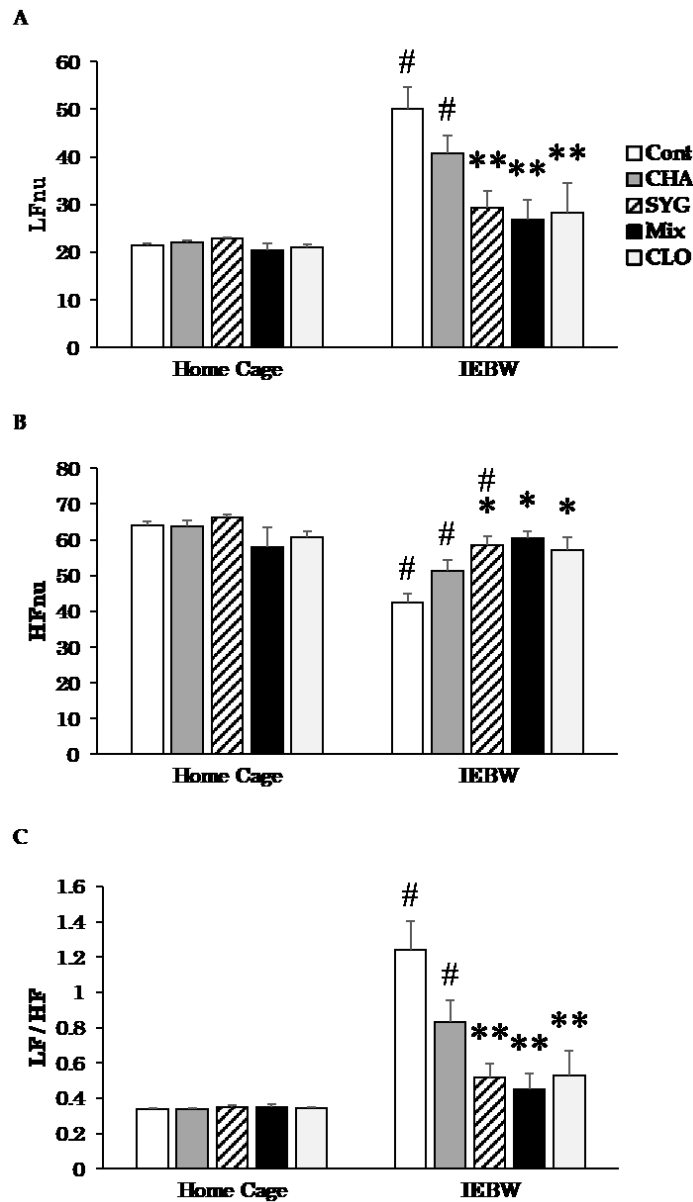


Figure 19. Effects of the major components of *Acanthopanax senticosus* HARMs (chlorogenic acid [CHA], eleutheroside E [SYG], and a mixture of both [Mix]) and cloxazolam (CLO) on the autonomic nervous system control of heart rate in the improved elevated beam walking (IEBW) test. The power spectrum analysis of heart rate variability in the home cage and in the IEBW test. (A) Normalized low-frequency (LF) power (LFnu) reflects sympathetic nervous system activity. (B) Normalized high-frequency (HF) power (HFnu) reflects parasympathetic nervous system activity. (C) LF/HF indicates the balance between sympathetic and parasympathetic nervous system activities. Data are presented as the mean  $\pm$  SE; n = 5–8; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. Cont group (Dunnett's *t*-test), #p < 0.05 vs. each group in home cage (paired *t*-test).

## 考察

Jin らは、OFT において ASH エキスがマウスの各区分の横断回数や立ち上がり回数に影響を与えないことを報告している(20)。そこで、本実験では OFT におけるラットの各区分への進入回数、総移動距離、総移動時間を調べた。総移動距離及び総移動時間は、ASH 群、Mix 群、CLO 群の方が Cont 群と比較して有意に増加していた (Figure 17A, B)。しかし、OFT において主要な不安様行動と考えられる中央区画への進入回数は、各群間で有意な変化は見られなかった (Figure 17F)。ASH エキスおよび Mix は、Jin らが以前に報告したように、不安様行動の指標とされる壁に沿って移動する性質 (接触走性: thigmotaxis) には効果を及ぼさなかった (Figure 17C)。一方で、新奇環境下での不安や恐怖により誘発される自発運動の抑制を改善した。ベンゾジアゼピン系薬剤によるオープンフィールド装置での自発運動量の増加は、不安により誘発される自発運動抑制の解除 (脱抑制) によるものと考えられており(62)、ASH 群および Mix 群で見られた自発運動量の増加は、部分的な抗不安作用によるものである可能性が考えられる。したがって、ASH エキス及び Mix は、OFT において示されたように CLO と同様に部分的な抗不安作用を有していると考えられる。第 1 章第 1 節において示された ASH エキスの結果では、オープンアームでの滞在時間が延長され、IEBW 装置上での交感神経活動の上昇と副交感神経活動の抑制が改善されていた。そこで本節では有効成分を特定するために、ASH エキスとその成分の結果を比較しこれまでの知見を考慮して検討した。CHA はオープンアームでの滞在時間を延長し、IEBW 試験での副交感神経活動の抑制を緩和させる傾向があったのに対し、SYG は交感神経活動の上昇と副交感神経活動の抑制を改善した (Figure 18, 19)。CHA は、ベンゾジアゼピン受容体を介して GABA による作用を高めることで EPM 試験におけるオープンアームでの滞在時間の延長や侵入回数の増加などの抗不安作用を発揮すること(60)や OFT で中央区画での滞在時間に影響を与えないこと(63) が報告されていることから、CHA 投与における行動薬理試験の結果はこれまでの報告と一致していた。さらに、CHA がヒトの副交感神経活動を増強するという報告(64)は、CHA が IEBW 試験において行動では有意な変化が見られなかったが副交感神経の抑制を減弱させる傾向があった結果と一致していた。SYG は、海馬のセロトニンとドパミンの濃度を変化させることで、断眠ストレスによる行動障害を回復させること (57) や、そのアグリコンである(+)-シリンガレジノールが、興奮性シナプス伝達を抑制する作用も有する(59)ことが報告されている。ASH エキスにおいても同様に脳内モノアミンの濃度に影響を与えることが知られている(42)。今回の研究では、SYG が心臓の自律神経活動を調節し (Figure 19)、有意ではなかったがラットの行動を変化させることが観察された (Figure 18)。これらの効果は、先行研究においても報告されていた神経活動調節作用に起因するものだと考えられる。さらに行動学的に有意な変化をもたらした CHA と自律神経安定化作用を示した SYG との混合投与 (Mix) は、IEBW 試験において行動と自律神経活動の両方において抗不安作用を示した (Figure 18, 19)。

以上のことから、Mix 群の結果は ASH エキスの結果と一致しており、ASH エキスの抗不安作用は、不安高感受性ラットにおいて CHA の行動学的作用と SYG の神経学的作用の複合的な作用によって誘導される可能性が高いと考えられる。

本研究では、ポジティブコントロールとしてベンゾジアゼピン系薬剤の1つであるCLOを用いた。一般に、主要な抗不安薬であるベンゾジアゼピン系薬剤は、OFTにおいて自発運動や中央区画での滞在時間を延長させ、EPM試験においてオープンアームへの進入回数とオープンアームでの滞在時間を延長させることが知られている。本実験では、CLOはOFTにおける自発運動を増加させ、IEBW試験ではオープンアームでの滞在時間には影響を与えなかった (Figure 17, 18)。また、CLOは、IEBW試験において高所ストレスの自律神経活動への影響を緩和した (Figure 19)。これまでCLOの自律神経活動を調べた試験は行われていないが、その他のベンゾジアゼピン系薬剤がヒトの心臓自律神経活動に及ぼす影響は多くの研究で報告されている。しかし、その結果は一貫していなかった(65–72)。これらの実験結果の不一致は条件 (e.g. 使用薬剤の違い、ストレスの有無、麻酔の使用、基礎疾患など) が異なるためであると考えられている。Cloosらの報告によると、ベンゾジアゼピン系薬剤の効果 (鎮静作用、筋弛緩作用、抗痙攣作用、抗不安作用) は、各薬剤の間でそれぞれの強さが異なると報告されている(73)。Cloosらの報告では、CLOは鎮静作用・筋弛緩作用・抗痙攣作用が弱く、抗不安作用が強いとされている。しかし、我々の実験では、CLOは不安の程度が弱いと考えれるOFTにおいて有意な不安様行動の減少を示したが、不安の程度がより強いと考えれるIEBW試験では不安様行動の減少が認められなかった (Figure 17, 18)。一方で、ASHエキスの主要成分 (CHAとSYG) の混合物は、いずれの不安状態においても有効であった。CLO群はクローズドアームへすぐに入り、クローズドエリア内での無動時間が延長したことから鎮静や筋弛緩が起こっていた可能性が考えられる。

したがって、CLOは自律神経活動を調節するが、鎮静や筋弛緩も引き起こしていると考えられる。そのため、CLOの使用には細心の注意が必要であることが示唆される。CLOの薬理作用についての研究は多くないが、本研究では、行動 (OFTとIEBW) と自律神経活動 (IEBW) に対するCLOの結果から、抗不安薬として使用する際の注意点について新たな知見が得られた。

## 第2節 不安高感受性ラットにおけるエレウテロサイド E 及び

### クロロゲン酸の海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響

#### 緒言

BDNF は、神経新生やシナプス可塑性、認知や情動に重要な役割を果たしている(24,25,27,74,75)。最近の研究では、海馬における BDNF の発現増加が不安様行動の減少と関連していることが報告されている(46,48,76–79)。一方で、ストレス誘発性グルココルチコイドは BDNF の発現を低下させ、海馬のシナプス可塑性と記憶力を低下させることが示唆されている(80–82)。ASH エキスは、神経毒性に対する保護効果を有し(39,40,42,83)、BDNF mRNA レベルを増加させること(41)が報告されている。第1章第2節において ASH エキスが海馬での BDNF 発現を増加させることを報告した(84)。ASH エキスの抗不安作用は、BDNF/TrkB シグナルの調節を介して発揮される可能性がある。しかし、海馬の BDNF/TrkB シグナル伝達に対する作用に寄与する ASH エキスの有効成分は不明である。

SYG の分子薬理的な作用は、炎症関連分子においてよく研究されている。コラーゲン誘発性関節炎モデルにおいて血清中の TNF- $\alpha$  や IL-6、IL-23 濃度を低下させること(85)や、I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化や NF- $\kappa$ B のサブユニット p65 の核内移行を抑制すること(54)が報告されている。また、神経科学領域では、イソフルラン誘発性認知機能障害モデルにおいてアセチルコリン及びコリンアセチルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ 7 型ニコチン性アセチルコリン受容体、NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニット 2B の減少を抑制することが報告されている(86)。

CHA は、アルツハイマーモデル APP/PS1 マウスおよびアミロイド  $\beta$  (25-35) 曝露ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、mTOR/TFEB シグナル伝達経路により誘導されるカテプシン D タンパク質発現を上昇させること(87)や、PC12 細胞において、コルチコステロンによるオートファジーやアポトーシスの誘導、Akt/mTOR シグナル伝達経路の抑制を改善すること(88)、分子ドッキング法において神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) や NMDA 受容体に対して阻害薬様の結合様式を示すこと(89)が報告されている。

しかし、SYG 及び CHA が不安高感受性ラット海馬 BDNF/TrkB シグナルに与える影響については不明である。そこで本節では SYG 及び CHA による海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響についてウエスタンブロッティング法及び免疫染色法で解析した。

## 実験方法

### 1 ウェスタンブロッティング

IEBW 試験後のラットから採取した海馬にタンパク質分解酵素阻害剤や脱リン酸化酵素阻害剤を含む組織懸濁液を加え組織懸濁液を作成後、SDS-PAGE で分離し、ゲル中のタンパク質を Amersham™ Hybond P™ PVDF 0.45 膜 (Cytiva) に転写した。PVDF 膜を、5%BSA を含む TBST 中でブロッキングし (1 時間、室温)、次いで BDNF (ab108319、abcam)、TrkB (#4603S、CST)、p-TrkB (#4619S、CST)、p-CREB (#9198S、CST)、CREB (#9197S、CST)、および  $\beta$ -アクチン (#4970S、CST) に対する一次抗体希釈液 (1:1000) で、インキュベートした (一晩、4°C)。これを HRP 標識二次抗体希釈液 (#7074S、1:1000、CST) でインキュベートした (1 時間、室温)。免疫応答性バンドは、化学発光検出キットを用いて検出し、可視化にはライトキャプチャーAE-6971/2 装置を用いた。化学発光強度を、CS アナライザー4 を用いて数値化した。BDNF 及び pTrkB、pCREB は  $\beta$ -アクチン、総 TrkB、又は CREB でそれぞれ標準化した。

### 2 免疫染色法

ラット脳を 4%パラホルムアルデヒド中で固定した (一晩、4°C) 後、凍結保護のために 10%、20%、30%スクロース・PBS に順次浸漬し (4°C)、ドライアイスで凍結した。凍結した脳は、Tissue-Tek® O.C.T. compound を用いて包埋し、-80°C で保存した。その後、クライオスタットを用いて -15°C で厚さ 10  $\mu$ m の組織切片を作製した。作製した組織切片を PBS 中に採取し、10%BSA を含む PBS 中でインキュベートし (1 時間、室温)、次いで抗 BDNF 抗体 (Sc-20981、1:100、Santa Cruz Biotechnology) でインキュベートした (3 日間、4°C)。そして二次抗体希釈液 (#4413S、1:1000、CST) でインキュベートした (2 時間、室温)。切片を MAS コートスライドガラスにのせ、封入剤 Fluoromount™ を用いて封入した。画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) で撮影した。

### 3 統計解析

データは、平均値 $\pm$ 標準誤差として示した。統計分析は、SPSS統計26 (IBM) を用いて行った。等分散性を Levene の検定で確認し、群間比較には一元配置分散分析 (oneway-ANOVA) を用いた。ANOVA で有意差が認められた場合、Dunnett の t 検定ポストホック検定を用いて、Cont 群との有意差を検定した。p 値 < 0.05 を有意と設定した。



## 結果

### 1 ウェスタンブロッティング

Cont 群、CHA 群、SYG 群、および Mix 群について、各ラットの脳から海馬を切除し、ウェスタンブロッティングによって BDNF/TrkB シグナル関連タンパク質の発現およびリン酸化を検出した。海馬の BDNF タンパク質発現の有意な増加は、SYG 群と Mix 群で観察されたが、CHA 群では観察されなかった (Figure 20)。さらに、Mix 群では、BDNF 受容体である TrkB のリン酸化が有意に上昇し、BDNF mRNA の転写促進に関連する CREB のリン酸化が有意に上昇した (Figure 20B、C)。一方、CREB のリン酸化は SYG 群で有意に増加したが、TrkB のリン酸化の増加は有意ではなかった ( $p = 0.055$ )。

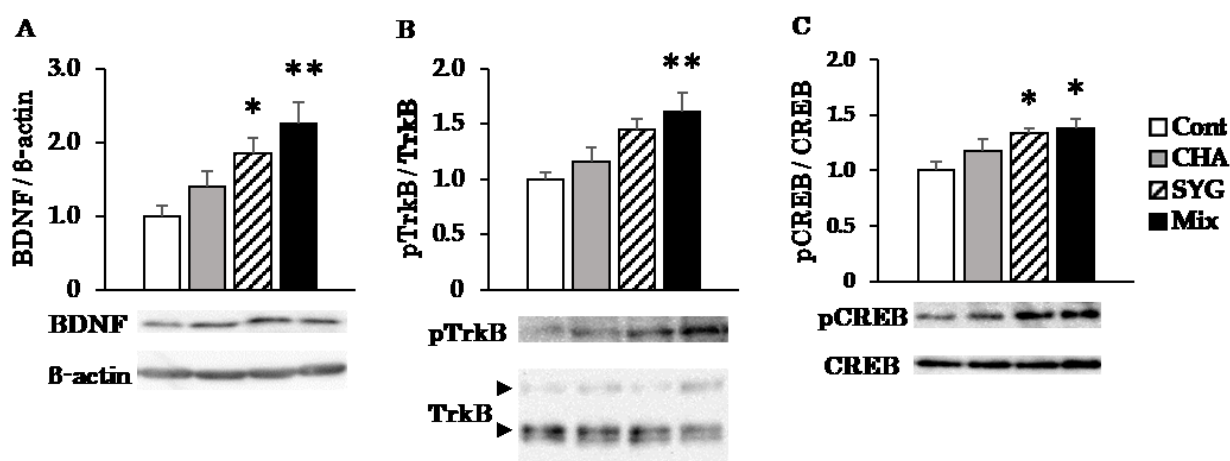
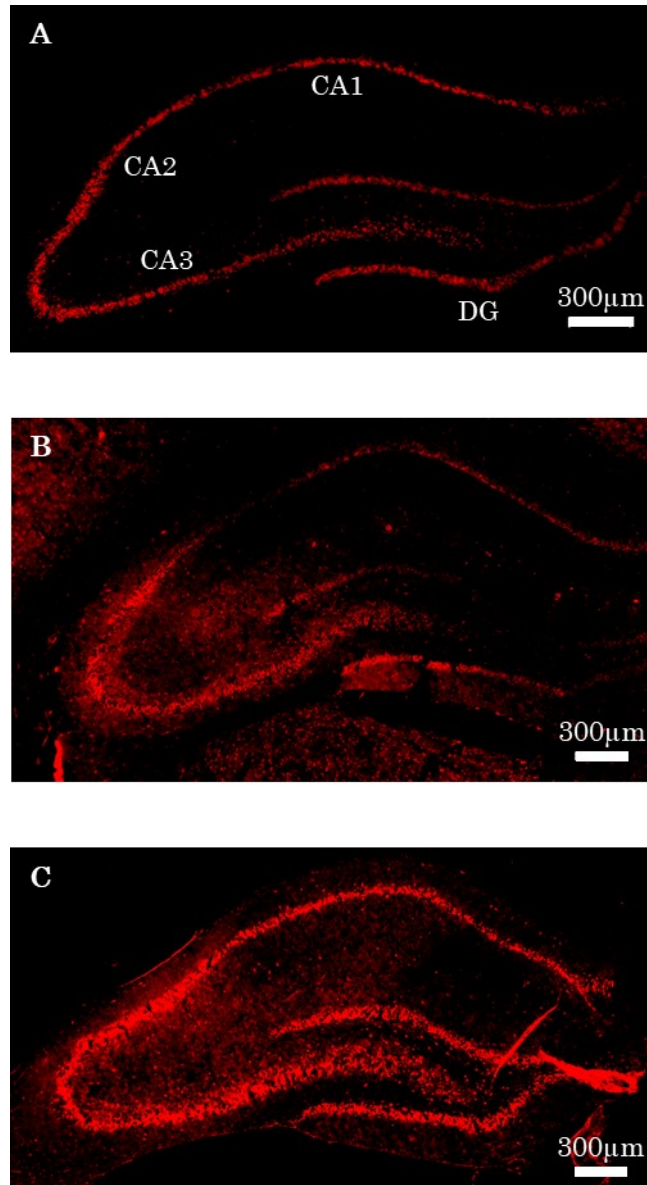


Figure 20. Effects of the major components of *Acanthopanax senticosus* HARMS (chlorogenic acid [CHA], eleutheroside E [SYG], and a mixture of both [Mix]) on hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) / tropomyosin receptor kinase B (TrkB) signaling. Analysis of hippocampal (A) BDNF, (B) phospho-tropomyosin receptor kinase B (pTrkB), and (C) phospho-cAMP response element binding protein (pCREB) protein levels by western blotting. BDNF expression was normalized to  $\beta$ -actin expression, whereas pTrkB and pCREB levels were normalized to those of TrkB and CREB, respectively. Each value is presented as a ratio vs. Cont group. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 5$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's t-test).

## 2 免疫染色

Cont 群と SYG 群、 Mix 群の海馬 BDNF タンパク質発現の免疫組織学的解析を行った。その結果、SYG 群と Mix 群ともにラット海馬において BDNF タンパク質の発現が顕著に増加していることが確認された (Figure 21)。また、SYG 群では BDNF 発現の増加が一部の領域 (アンモン角 [cornu ammonis: CA] 2-3 と歯状回 [dentate gyrus: DG]) に見られたのに対し、Mix 群では CA 全体と DG で BDNF の発現が増加していた (Figure 21)。



**Figure 21. Immunohistochemical staining for hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF).** Representative images of staining using anti-BDNF antibody in the (A) Cont, (B) eleutheroside E (SYG) and (C) mixture of SYG and chlorogenic acid (Mix) groups. CA1–3, cornu ammonis 1–3; DG, dentate gyrus.

## 考察

近年の研究では、BDNF/TrkBシグナルが脳内シグナル伝達やシナプス可塑性に重要であり、様々な精神疾患（うつ病、双極性障害、統合失調症、パニック障害、心的外傷後ストレス障害[PTSD]など）と関連していることが報告されている(90,91)。さらに、以前の研究では、海馬におけるBDNFの発現量が不安様行動と関連していることが報告されている(46,48,76-79)。さらに、海馬BDNFのmRNA発現は、急性ストレスと慢性ストレスの両方によって減少する(47)。また、海馬BDNFおよびTrkBの発現量低下は、ストレス誘発性うつ病に対する脆弱性にも関連している(92)。これらの知見から、ストレスによる不安関連行動は海馬BDNF発現の変化と密接に関連していることが示唆されている。さらに、CREBのリン酸化はニューロンにおけるBDNFを介した応答に重要な役割を果たしていることが報告されている(33)。ストレス条件下でのASHエキスの抗不安作用は海馬BDNF TrkBシグナルの活性化に関連している可能性がある。そこで、ASHエキスの含有成分を投与したラットを用いてIEBW試験を行い、海馬のBDNF/TrkBシグナル関連タンパク質の発現をウェスタンブロット法と免疫染色法で解析した。SYG投与ラットの海馬では、BDNFの発現とCREBのリン酸化が増加していることが明らかになった。また、Mix投与ラットの海馬ではBDNFの発現が増加し、TrkBとCREBのリン酸化が増加した。ノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンは海馬BDNFの発現に関連していること(32,93,94)が報告されており、ASHエキスとその含有成分であるSYGのアグリコンは、海馬のモノアミンとその代謝物の量に影響を与えることが報告されていること(42,59)から、SYGは脳内モノアミンの調節作用によりBDNF/TrkBシグナルに影響を与えていると考えられる。

さらに、免疫組織化学的解析の結果、ラットの海馬におけるBDNFの発現は、SYG群とMix群において顕著に増加することが明らかになった。CA1領域とDG領域では、SYG群と比べMix群でBDNFが多く発現していた。海馬のCA1、CA3、DG領域はグルコルチコイドに対して脆弱である(95)。また、コルチコステロンやストレスは海馬のBDNF発現を低下させることが報告されている(47,96-98)。さらに、コルチコステロン濃度は、海馬の他の領域よりもCA1の錐体ニューロンとDGの顆粒ニューロンの方で高いことが報告されている(99)。グルコルチコイド受容体はCA1とDGでは豊富に発現しているが、CA3では発現が低いことからストレスに対するコルチコステロンの影響は海馬の部位によって異なると考えられる。特にPTSD患者ではCA1の容積が小さく(100)、動物モデルにおいてこの領域でのBDNF mRNA発現の慢性的な低下がPTSD様の行動ストレス反応を引き起こすこと(101)が報告されている。また、アルツハイマー病や統合失調症でもCA1の体積が小さくなることが報告されている(102,103)。よく知られた漢方薬の処方である逍遥散には抗うつ効果があり、慢性的な拘束ストレスによって誘発されるCA1のBDNF発現の低下を打ち消す効果がある(104)。さらに、Jimenezらは、不安様行動に関与する細胞（不安細胞）が腹側CA1領域に存在することを報告しており(49)、CA1領域のBDNFは不安細胞を修飾する可能性がある。し

たがって、CA1領域におけるBDNFタンパク質の発現を増加させたSYGとCHAの混合投与は、PTSDや統合失調症などのストレスに起因する精神疾患の予防に応用できる可能性が示唆された。

### 第3節 不安高感受性ラットにおけるイソフラキシジン及び

#### シリンジンの抗不安作用

##### 緒言

イソフラキシジン (ISO) の様々な薬理作用は、Mohammad らによってまとめられている(105)。特に、抗炎症作用と抗酸化作用についての研究が行われている。シリンジン (SYR; エレウテロサイド B と呼ばれる) は免疫調節作用を持ち(106)、アセチルコリンの遊離を介してインスリン抵抗性を改善すると考えられている(107)。神経系への影響については、両成分ともに培養細胞系でのアミロイド $\beta$  (25-35) による軸索及び樹状突起の萎縮に対して明らかな保護効果を示した(108,109)。また、ISO は、ドパミンの代謝に関与するモノアミン酸化酵素 B (MAOB) を阻害することが示唆されている(110)。しかし、これらの成分について抗不安作用を行動薬理的に検討した研究は報告されていない。そこで本節では、ISO 及び SYR の抗不安作用を検討するために IEBW 試験を行い、行動及び自律神経活動を評価した。

## 実験方法

### 1 実験動物

6 週齢雄性 SD ラットを日本エスエルシー株式会社から購入し、個別に標準的なポリカーボネートケージで飼育し、7 日間連続したハンドリングによる実験者への馴化を行った。ラットは通常餌と水を自由摂取させ、室温  $23\pm 2$  °C、湿度 50-65 % に維持された部屋で 12 時間の明暗サイクル（7:00 点灯-19:00 消灯）で飼育した。

### 2 生体電位送信機埋め込み手術

1 週間の予備飼育の後、ラットを局所麻酔薬（ロピバカイン塩酸塩水和物、表面麻酔、切開部位への滴下）と全身麻酔薬（ペントバルビタールナトリウム、40 mg/kg、*i.p.*）で処置し、無線テレメータ（TR50BB: KAHA sciences Ltd.）を腹腔に埋め込んだ。術後感染予防のために抗生物質（イミペネム水和物およびシラスタチンナトリウム、8.3 mg/kg）を筋肉内注射した。手術後 7 日間の回復期間を設け、その間はラットに触れないように飼育した。

### 3 実験動物の選別

第 1 章第 1 節と同様に IEBW 装置を用いて不安高感受性ラットの選別を行った。

### 4 薬物投与

第 1 章第 1 節における ASH5% 群における ASH エキスの摂餌量に基づき、各薬物の体重当たりの投与量（ISO: 5 mg/kg, 099-03651, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, SYR: 16 mg/kg, S920050, Toronto Research Chemicals）を決定した。各試薬は精製水 1 mL に溶解して 1 日 1 回 7 日間連続してゾンデを用いて強制経口投与を行った。行動薬理試験日には、行動薬理試験の 30 分前に強制経口投与した。

### 5 自律神経活動の評価

第 1 章第 1 節と同様に心電図データを無線テレメトリーシステムによって経時的に記録した。心臓自律神経活動は、R-R 間隔変動のスペクトル分析によって評価した。R-R 間隔変動の周波数領域分析およびパワースペクトルを、高速フーリエ変換アルゴリズムを用いて算出し、得られたパワースペクトラムを各周波数に応じて高周波数（HF: 0.6-3.0 Hz）、低周波数（LF: 0.2-0.6 Hz）、および超低周波数（VLF: <0.2 Hz）に分類した。LF 成分および HF 成分は標準化された単位（LFnu および HFnu）で表示した。HFnu は心臓副交感神経活動を示し、LFnu は副交感神経変調を伴う交感神経活動を示す。LF/HF は、心臓の交感神経-副交感神経の活動バランスを示す。

## 6 IEBW 試験

ISO と SYR について、第 1 章第 1 節と同様に IEBW 装置を用いて行った。経口投与 30 分後にラットをオープンアームの先端部におき、3 分間自由に探索させた。その時の行動及び自律神経活動を記録した。Figure 8 に示した実験スケジュールに即して実施した。

## 7 組織採取

行動薬理試験の後、ラットを安楽死させ、脳を速やかに摘出し、海馬組織を分離し-70°C で冷凍保存した。

## 8 動物倫理に関わる事項

本研究は、「Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication)」及び「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」、「鈴鹿医療科学大学動物実験指針」に従って実施された。すべての実験プロトコールは、鈴鹿医療科学大学動物利用倫理委員会の承認を得ている（2016 年 4 月 1 日第 1 号）。

## 9 統計解析

データは、平均値±標準誤差として示した。統計解析は、SPSS26 (IBM) を用いて行った。等分散性を Levene の検定で確認し、群間比較には一元配置分散分析 (oneway-ANOVA) を用いた。ANOVA で有意差が認められた場合、Dunnnett の t 検定を用いて、Cont 群との有意差を検定した。条件間の差は、対応のある Student の t 検定を用いて有意差を検定した。p 値 < 0.05 を有意と設定した。

## 結果

### 1 オープンアーム上での滞在時間

SYR 群は Cont 群と比較して、オープンアームでの滞在時間が有意に延長した。一方、ISO 投与ラットでは、オープンアームでの滞在時間が延長したが、その差は有意ではなかった (Figure 22)。

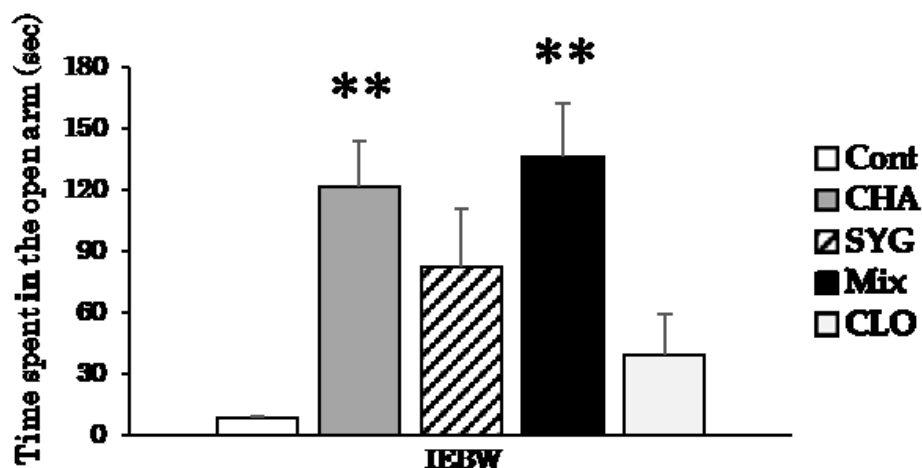
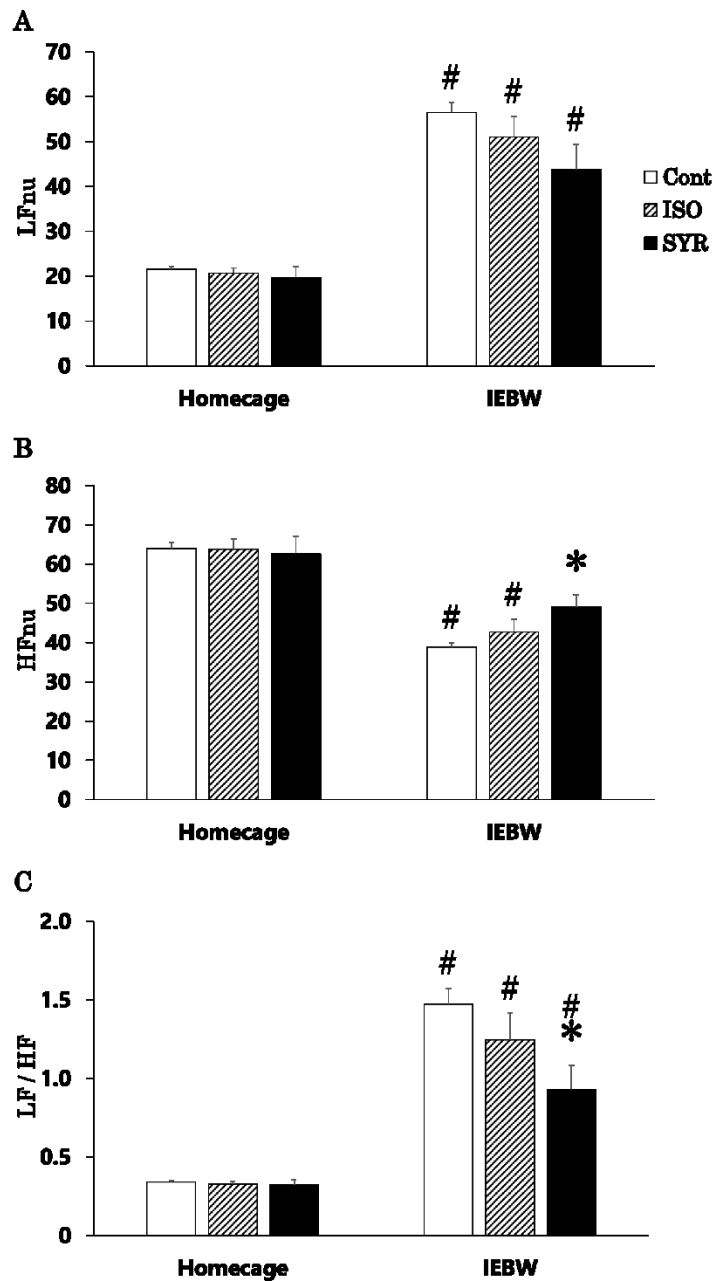


Figure 22. Effects of isofraxidin (ISO) and syringin (SYR) on anxiety-like behaviors in the improved elevated beam walking test. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 5$ ;  $***p < 0.01$  vs. Cont group (Dunnett's t-test).

### 2 HRV 解析による自律神経活動の評価

テレメータを移植したラットをホームケージ条件下、安静時の自律神経活動を測定したところ、いずれの群も Cont 群と比較して変化はみられなかった。ホームケージ条件と IEBW 条件を比較すると、Cont 群と ISO 群で LFnu 及び LF/HF が有意に増加し、HFnu が有意に減少した (Figure 23)。一方、SYR は LFnu 及び LF/HF が有意に増加していた。IEBW 条件において、Cont 群と比較して、SYR は HFnu を有意に増加させ、LF/HF を有意に低下させた (Figure 23B, C)。





**Figure 23.** Effects of isofraxidin (ISO) and syringin (SYR) on the cardiac autonomic nervous system in the improved elevated beam walking (IEBW) test. The power spectrum analysis of heart rate variability in the home cage and in the IEBW test. (A) Normalized unit of low-frequency (LF) power (LFnu) reflects sympathetic nervous system activity. (B) Normalized unit of high-frequency (HF) power (HFnu) reflects parasympathetic nervous system activity. (C) LF/HF indicates the balance between sympathetic and parasympathetic nervous system activities. Data are presented as the mean  $\pm$  SE;  $n = 5$ ;  $*p < 0.05$  vs. Cont group (Dunnett's  $t$ -test),  $\#p < 0.05$  vs. each group in home cage (paired  $t$ -test).

## 考察

これまでの研究において、ASH エキスは不安高感受性ラットにおいて交感神経活動の亢進及び副交感神経活動の抑制を緩和させることが明らかとなっている。また、ASH エキスの投与は IEBW 装置のオープンアームでの滞在時間を延長した(84)。以前の研究では、ISO がアミロイドβによる毒性に対して神経保護効果を発揮し、MAOB 活性を抑制することが報告されており(110)、不安様行動に対する効果が示唆されている。今回の研究では予想に反して、ISO は不安様行動及び自律神経活動において Cont 群と比較して有意な変化を示さなかった。ISO の投与量は、第1章で抗不安作用を示した ASH5%群における ASH エキスの摂取量と含有量に基づいて決定したが、不安様行動へ影響を与えるのに十分な MAOB 活性阻害作用を示す投与量ではなかったと考えられる。また、ISO は ASH エキスに含有されるエレウテロサイド B1 から体内で変換されることで、ASH エキス投与時には二相性の血中濃度のピークを示し、薬物動態学的パラメータ（半減期、濃度-時間曲線下面積）などが単独投与時と異なること(111) から、ISO の単独投与より ASH エキス投与時の ISO の体内動態を再現することは難しいと考えられる。したがって、ASH エキス投与における ISO の抗不安作用を評価するためには、ISO とエレウテロサイド B1 の混合投与などさらなる行動学的研究を行う必要がある。一方で、SYR 投与は副交感神経の抑制を減弱させ、IEBW 装置のオープンアームでの滞在時間を延長させた。SYR は神経末端からのアセチルコリンの放出を促進することが報告(107)されており、SYR のアセチルコリン放出促進作用は、IEBW 試験における副交感神経系活動の増加と関連している可能性が示唆される。近年の報告では、SYR の経口投与は、マウスの脳における一酸化窒素 (NO) 濃度及び一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性を低下させた(112)。一方で、マウスマクロファージ RAW 264.7 細胞を用いた研究では、SYR 処置後の NO 産生に有意な変化は認められなかった(106)。NO はストレス応答において重要な役割を果たしており、治療標的として考えられている(113)。低用量の N $\omega$ -ニトロ-L-アルギニンメチルエステルや 7-ニトロインダゾールのような NOS 阻害剤は、EPM 試験において抗不安作用を示した(114)。しかし、NO そのものが交感神経活動を抑制し、副交感神経活動を活性化することや(115)、ムスカリン受容体の活性化が NO 産生を誘導すること(116)が知られている。中枢性 NO は、自律神経において興奮性及び抑制性ニューロンと複雑に相互作用しており、NO や NOS 阻害剤の作用を複雑にしている。SYR による NO 濃度及び NOS 活性の低下は、麻酔下で見られたことであるため覚醒下かつストレス下において同様に観察されるかは不確かであるが、NOS 阻害剤による抗不安作用が報告されていることから SYR の不安様行動の減少作用には NOS 阻害作用が関与していることが示唆される。しかし、自律神経への影響については、末梢性のアセチルコリンの遊離促進作用と NOS/NO 経路が相互作用している可能性が示唆される。今回明らかになった SYR の不安様行動減少作用と自律神経調節作用には、NOS/NO 経路とアセチルコリン遊離促進の両方が関与している可能性がある。この作用機序を明らかにするためには、NOS

阻害剤やムスカリン受容体遮断薬などを用いたさらなる研究が必要である。

以上のことから、**SYR** は不安高感受性ラットにおける **ASH** エキスの抗不安作用に部分的に寄与していると考えられるが、**ISO** の寄与は少ないと考えられる。

## 第4節 小括

本章では、第1章において、抗不安作用が見られたASHエキスの含有成分について行動薬理学的手法並びに分子生物学的手法を用いて検討した。ASHエキス含有成分の中でもSYGとCHAの組み合わせは、ASHエキスの結果と非常に似た結果を示した。またSYRは行動及び自律神経活動の面において部分的にASHエキスの抗不安作用に寄与している可能性が示唆された。ISOは、第1章でのASHエキス摂取量に基づいた投与量では抗不安作用を示すことはできなかった。今回の実験では、CHAとSYGの組み合わせしか検討できなかったがISOなども他の成分と組み合わせることで抗不安作用を示す可能性が考えられるため、成分の組み合わせに関する研究も行っていく予定である。

vs. Cont	Time spent in the open arm	Sympathetic nervous	Parasympathetic nervous	BDNF/TrkB signal
ASH5%	↑	↓	↑	↑
CHA	↑	↓	↑	↑
SYG	↑	↓	↑	↑
CHA+SYG	↑	↓	↑	↑
ISO	↑	—	—	—
SYR	↑	↓	↑	—



 significant   
  tendency (not significant)   
 — no change

Figure 24. Effects of *Acanthopanax senticosus* HARMS extracts and its major components on anxiety-like behavior, autonomic nervous system and BDNF/TrkB signal.

## 結語

ストレスが発端となる、もしくは増悪因子として知られているうつ病などの気分障害やストレス関連障害の総患者数が年々増加している。疾患を予防する新規植物由来成分や機能性食品の発見や開発、既知の成分や食品による健康増進におけるエビデンスの蓄積は世界的にも望まれている。古代中国の時代からストレスに対して効果があるとされてきたウコギ科の植物である ASH は有用な植物であると考えられる。そこで本研究では、ストレス関連疾患の予防や治療への ASH の応用可能性を探索することを目的として、不安高感受性ラットにおける ASH エキス及びその含有成分について、抗不安作用及び不安に関連があるとされる海馬 BDNF/TrkB シグナルへの影響を行動薬理的及び分子生物学的に検討した。

第 1 章では、ASH エキスがストレス条件下において自律神経活動の安定化や抗不安様行動を示すことを明らかとした。また、不安に関連する BDNF/TrkB シグナルは 5%ASH エキスの投与により活性化することが示された。

第 2 章では、不安高感受性ラットにおいて 4 種類の ASH エキス含有成分 (CHA, SYG, SYR, ISO) について検討したところ、1) SYG が主に自律神経活動の安定化や海馬 BDNF/TrkB シグナルを活性化すること、2) CHA が抗不安様行動を誘導すること、3) SYG と CHA の組み合わせにより ASH エキスと同様の自律神経活動の安定化や抗不安様行動、海馬 BDNF/TrkB シグナルの活性化を誘導すること、4) SYR が抗不安様行動やストレスによる副交感神経活動の低下抑制を示すこと、5) ISO は ASH エキスに含まれていた量の単独投与では効果を示さなかったことが明らかとなった。以上の結果から ASH エキスの摂取が心理的ストレスの緩和に有用であることや、ASH エキスの抗不安作用は、CHA の行動学的作用と SYG の自律神経学的作用の複合的な作用によって誘導される可能性が高いことが考えられた。また、SYR は行動学的には ASH エキスと同様の作用が見られたが、自律神経活動においては副交感神経のみに影響を与えた点、ISO 単独では効果が見られなかった点について CHA と SYG の組み合わせで作用が変化した点を踏まえると、これら 2 成分についても SYG や CHA などの他の成分との組み合わせなどによって与える影響が変化する可能性が考えられた。

以上のことから、ASH は心理的ストレスに有効であり、その有効成分としては SYG と CHA、SYR である可能性が示唆された。また、限られた副作用しか持たない ASH は、心理的ストレスに対するサプリメントや予防薬として優れている可能性が示唆された。

## 引用文献

1. Kreibig SD. Autonomic nervous system activity in emotion: A review. *Biol Psychol.* 2010;84(3):394–421.
2. Beauchaine TP. Vagal tone, development, and Gray's motivational theory: toward an integrated model of autonomic nervous system functioning in psychopathology. *Dev Psychopathol.* 2001;13(2):183–214.
3. Friedman BH, Thayer JF. Anxiety and autonomic flexibility: a cardiovascular approach. *Biol Psychol.* 1998 Mar;47(3):243–263.
4. Nijssen MJMA, Croiset G, Diamant M, Stam R, Delsing D, de Wied D, et al. Conditioned fear-induced tachycardia in the rat: vagal involvement. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jun 5;350(2–3):211–222.
5. McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, et al. Mechanism of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2016;18(10):1353–1363.
6. Zhang S, Xu Z, Gao Y, Wu Y, Li Z, Liu H, et al. Bidirectional crosstalk between stress-induced gastric ulcer and depression under chronic stress. *PLoS One.* 2012;7(12):e51148.
7. SELYE H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* 1950 Jun 17;1(4667):1383–1392.
8. 学校法人慶応義塾. 精神疾患の社会的コストの推計 平成22年度障害者総合福祉推進事業 30-2. 2011.
9. 櫻井武, 澤明. 実験医学 心と体のクロストークから解く精神・神経疾患: 発症基盤・病態生理を担う分子カスケードから臨床応用まで. 羊土社; 2012.
10. 厚生労働省. 知ることからはじめようみんなのメンタルヘルス総合サイト. <https://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/data.html>
11. 今後の精神保健医療福祉のあり方等に関する検討会厚生労働省. 資料3 早期支援について. 2009.
12. Dwyer JT, Coates PM, Smith MJ. Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources. *Nutrients.* 2018 Jan 4;10(1):41.
13. Rader JI, Delmonte P, Trucksess MW. Recent studies on selected botanical dietary supplement ingredients. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Sep;389(1):27–35.
14. Shougaku-kan. *Chuyaku Encyclopedia*. 2nd ed. Tokyo: Shanghai Science Technology Publishing Company; 1985.
15. Ren CC. *Zusetsu Kanpo-Iyaku Daijiten (1)*. Tokyo: Kodansha; 1982.
16. World Health Organization. *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants volume 2*. 2002. p.83–96.

17. Committee on Herbal Medicinal Products, European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim., radix. Vol. 44, European Medicines Agency. 2014.
18. Li T, Ferns K, Yan Z-Q, Yin S-Y, Kou J-J, Li D, et al. *Acanthopanax senticosus*: Photochemistry and Anticancer Potential. *Am J Chin Med*. 2016;44(08):1543–1558.
19. Deyama T, Nishibe S, Nakazawa Y. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta Pharmacol Sin*. 2001;22(12):1057–1070.
20. Jin L, Wu F, Li X, Li H, Du C, Jiang Q, et al. Anti-depressant effects of aqueous extract from *Acanthopanax senticosus* in mice. *Phyther Res*. 2013;27(12):1829–1833.
21. Saito T, Nishida M, Saito M, Tanabe A, Eitsuka T, Yuan SH, et al. The fruit of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation by modulation of liver adenosine monophosphate–activated protein kinase activity and lipogenic gene expression in high-fat diet–fed obe. *Nutr Res*. 2016;36(10):1090–1097.
22. Nishida M, Kondo M, Shimizu T, Saito T, Sato S, Hirayama M, et al. Antihyperlipidemic effect of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim) Harms leaves in high-fat-diet fed mice. *J Sci Food Agric*. 2016 Aug;96(11):3717–3722.
23. Leem K-H, Lee S, Kim HK. Extrusion process enhances the anti-inflammatory effect of *Acanthopanax senticosus* leaves. *Food Sci Biotechnol*. 2014 Jun 30;23(3):911–916.
24. Hashimoto K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: An historical overview and future directions. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2010;64(4):341–357.
25. Duman CH, Schlesinger L, Russell DS, Duman RS. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res*. 2008 Mar 14;1199:148–158.
26. Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Repérant C, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology*. 2008 Nov;55(6):1006–1014.
27. Pardon M-C. Role of neurotrophic factors in behavioral processes: implications for the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Vitam Horm*. 2010;82:185–200.
28. Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019 Aug;13:363.
29. Notaras M, van den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to

- stress, and stress-related disorders. *Molecular Psychiatry*. 2020 Oct;25(10):2251–2274.
30. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a promising therapeutic agent in parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020 Feb;21(3):1170.
  31. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol*. 2010;25(2):237–258.
  32. Patel NJ, Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Norepinephrine and nitric oxide promote cell survival signaling in hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol*. 2010 May;633(1–3):1–9.
  33. Finkbeiner S, Tavazoie SF, Maloratsky A, Jacobs KM, Harris KM, Greenberg ME. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*. 1997 Nov;19(5):1031–1047.
  34. Brekhman II, Dardymov I V. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol*. 1969;9:419–430.
  35. Gaffney BT, Hügel HM, Rich PA. The effects of *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng* on steroidal hormone indices of stress and lymphocyte subset numbers in endurance athletes. *Life Sci*. 2001;70(4):431–442.
  36. Nishibe S, Kinoshita H, Takeda H, Okano G. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1990 Jun;38(6):1763–1765.
  37. Gaire B, Lim D. Antidepressant effects of *Radix et Caulis Acanthopanax Santicosi* extracts on rat models with depression in terms of immobile behavior. *J Tradit Chinese Med (Chung i tsa chih ying wen pan)*. 2014 Jun;34(3):317–323.
  38. Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, Nishibe S. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull*. 1996 Sep;19(9):1227–1230.
  39. Fujikawa T, Miguchi S, Kanada N, Nakai N, Ogata M, Suzuki I, et al. *Acanthopanax senticosus* Harms as a prophylactic for MPTP-induced Parkinson's disease in rats. *J Ethnopharmacol*. 2005 Feb;97(2):375–381.
  40. Fujikawa T, Kanada N, Shimada A, Ogata M, Suzuki I, Hayashi I, et al. Effect of sesamin in *Acanthopanax senticosus* HARMS on behavioral dysfunction in rotenone-induced parkinsonian rats. *Biol Pharm Bull*. 2005 Jan;28(1):169–172.
  41. Wu F, Li H, Zhao L, Li X, You J, Jiang Q, et al. Protective effects of aqueous extract from *Acanthopanax senticosus* against corticosterone-induced neurotoxicity in PC12



- cells. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jul;148(3):861–868.
42. Fujikawa T, Soya H, Hibasami H, Kawashima H, Takeda H, Nishibe S, et al. Effect of *Acanthopanax senticosus* Harms on biogenic monoamine levels in the rat brain. *Phytother Res*. 2002 Aug;16(5):474–478.
  43. Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical anti-depressant drugs in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989;97(2):277–279.
  44. McEwen BS, Herrera DG, Chen Z-Y, Hempstead BL, Bath KG, Yang C, et al. Genetic Variant BDNF (Val66Met) Polymorphism Alters Anxiety-Related Behavior. *Science*. 2006;314(5796):140–143.
  45. Björkholm C, Monteggia LM. BDNF - A key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2016 Mar;102:72–79.
  46. Bahi A. Hippocampal BDNF overexpression or microR124a silencing reduces anxiety- and autism-like behaviors in rats. *Behav Brain Res*. 2017;326:281–290.
  47. Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res*. 2005 Oct;53(2):129–139.
  48. Quesseveur G, David DJ, Gaillard MC, Pla P, Wu M V., Nguyen HT, et al. BDNF overexpression in mouse hippocampal astrocytes promotes local neurogenesis and elicits anxiolytic-like activities. *Transl Psychiatry*. 2013 Apr;3(4):e253.
  49. Jimenez JC, Su K, Goldberg AR, Luna VM, Biane JS, Ordek G, et al. Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*. 2018 Feb;97(3):670–683.e6.
  50. Sierra-Fonseca JA, Parise LF, Flores-Ramirez FJ, Robles EH, Garcia-Carachure I, Iñiguez SD. Dorsal Hippocampus ERK2 Signaling Mediates Anxiolytic-Related Behavior in Male Rats. *Chronic Stress*. 2019;3:2470547019897030.
  51. Huang LZ, Zhao HF, Huang BK, Zheng CJ, Peng W, Qin LP. *Acanthopanax senticosus*: Review of botany, chemistry and pharmacology. *Pharmazie*. 2011;66(2):83–97.
  52. Miao M, Xiang L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Adv Pharmacol*. 2020;87:71–88.
  53. Arai K, Miyajima H, Mushiroda T, Yamamoto Y. Metabolites of *Penicillium italicum* Wehmer: Isolation and structures of new metabolites including naturally occurring 4-ylidene-acyltetronic acids, italicinic acid and italicic acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989 May;37(12):3229–3235.
  54. Wang S, Yang X. Eleutheroside E decreases oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation and reprograms the metabolic response against hypoxia-reoxygenation injury in

- H9c2 cells. *Int Immunopharmacol*. 2020 Jul;84:106513.
55. He C, Chen X, Zhao C, Qie Y, Yan Z, Zhu X. Eleutheroside E ameliorates arthritis severity in collagen-induced arthritis mice model by suppressing inflammatory cytokine release. *Inflammation*. 2014 Oct;37(5):1533–1543.
  56. Yamazaki T, Shimosaka S, Sasaki H, Matsumura T, Tukiya T, Tokiwa T. (+)-Syringaresinol-di-O-beta-D-glucoside, a phenolic compound from *Acanthopanax senticosus* Harms, suppresses proinflammatory mediators in SW982 human synovial sarcoma cells by inhibiting activating protein-1 and/or nuclear factor-kappaB activities. *Toxicol In Vitro*. 2007 Dec;21(8):1530–1537.
  57. Ahn J, Um MY, Lee H, Jung CH, Heo SH, Ha TY. Eleutheroside E, An Active Component of *Eleutherococcus senticosus*, Ameliorates Insulin Resistance in Type 2 Diabetic db / db Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:934183.
  58. Huang L-ZZ, Wei L, Zhao H-FF, Huang B-KK, Rahman K, Qin L-PP. The effect of Eleutheroside E on behavioral alterations in murine sleep deprivation stress model. *Eur J Pharmacol*. 2011 May;658(2–3):150–155.
  59. Cho YS, Song WS, Yoon SH, Park K-Y, Kim M-H. Syringaresinol suppresses excitatory synaptic transmission and picrotoxin-induced epileptic activity in the hippocampus through presynaptic mechanisms. *Neuropharmacology*. 2018;131:68–82.
  60. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci*. 2007 Nov;262(1–2):77–84.
  61. Broadhurst PL. PSYCHOGENETICS OF EMOTIONALITY IN THE RAT. *Ann N Y Acad Sci*. 1969 Jul 30;159(3):806–824.
  62. Takeda H, Tsuji M, Akaike A. *Jissen ko<sup>-</sup>do<sup>-</sup> yakurigaku : jikken yakurigaku*. The Japanese Pharmacological Society, editor. *Kinpo<sup>-</sup>do<sup>-</sup>*; 2010.
  63. Stefanello N, Schmatz R, Pereira LB, Rubin MA, da Rocha JBT, Facco G, et al. Effects of chlorogenic acid, caffeine, and coffee on behavioral and biochemical parameters of diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2014 Mar;388(1–2):277–286.
  64. Park I, Ochiai R, Ogata H, Kayaba M, Hari S, Hibi M, et al. Effects of subacute ingestion of chlorogenic acids on sleep architecture and energy metabolism through activity of the autonomic nervous system: A randomised, placebo-controlled, double-blinded cross-over trial. *Br J Nutr*. 2017;117(7):979–984.
  65. Ristikankare M, Julkunen R, Laitinen T, Wang SX, Heikkinen M, Janatuinen E, et al. Effect of conscious sedation on cardiac autonomic regulation during colonoscopy. *Scand J Gastroenterol*. 2000 Sep;35(9):990–996.

66. Vogel LR, Muskin PR, Collins ED, Sloan RP. Lorazepam reduces cardiac vagal modulation in normal subjects. *J Clin Psychopharmacol*. 1996 Dec;16(6):449–453.
67. Farmer MR, Vaile JC, Osman F, Ross HF, Townend JN, Coote JH. A central gamma-aminobutyric acid mechanism in cardiac vagal control in man revealed by studies with intravenous midazolam. *Clin Sci (Lond)*. 1998 Sep;95(3):241–248.
68. Agelink MW, Majewski TB, Andrich J, Mueck-Weymann M. Short-term effects of intravenous benzodiazepines on autonomic neurocardiac regulation in humans: a comparison between midazolam, diazepam, and lorazepam. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5):997–1006.
69. Goldstein DS. Stress-induced activation of the sympathetic nervous system. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1987 May;1(2):253–278.
70. Komatsu T, Singh PK, Kimura T, Nishiwaki K, Bando K, Shimada Y. Differential effects of ketamine and midazolam on heart rate variability. *Can J Anaesth*. 1995 Nov;42(11):1003–1009.
71. Salomé N, Ngampramuan S, Nalivaiko E. Intra-amygdala injection of GABAA agonist, muscimol, reduces tachycardia and modifies cardiac sympatho-vagal balance during restraint stress in rats. *Neuroscience*. 2007 Aug;148(2):335–341.
72. Neckel H, Quagliotto E, Casali KR, Montano N, Dal Lago P, Rasia-Filho AA. Glutamate and GABA in the medial amygdala induce selective central sympathetic/parasympathetic cardiovascular responses. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 May;90(5):525–536.
73. Cloos JM, Bocquet V. [Benzodiazepines : known risks and recent data]. *Rev Med Liege*. 2013;68(5–6):303–310.
74. Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Repérant C, et al. Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology*. 2008 Nov;55(6):1006–1014.
75. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*. 2018 Apr;38(3):579–593.
76. Stringer TP, Guerrieri D, Vivar C, Van Praag H. Plant-derived flavanol (-)epicatechin mitigates anxiety in association with elevated hippocampal monoamine and BDNF levels, but does not influence pattern separation in mice. *Transl Psychiatry*. 2015;5(1):e493-499.
77. Ma J, Wang F, Yang J, Dong Y, Su G, Zhang K, et al. Xiaochaihutang attenuates depressive/anxiety-like behaviors of social isolation-reared mice by regulating

- monoaminergic system, neurogenesis and BDNF expression. *J Ethnopharmacol.* 2017 Aug;208:94–104.
78. Savignac HM, Corona G, Mills H, Chen L, Spencer JPE, Tzortzis G, et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. *Neurochem Int.* 2013 Dec;63(8):756–764.
  79. Rosa SG, Quines CB, Stangherlin EC, Nogueira CW. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters. *Physiol Behav.* 2016 Mar;155:1–8.
  80. Schaaf MJM, De Kloet ER, Vreugdenhil E. Corticosterone effects on BDNF expression in the hippocampus. Implications for memory formation. *Stress.* 2000 May;3(3):201–208.
  81. Murray F, Smith DW, Hutson PH. Chronic low dose corticosterone exposure decreased hippocampal cell proliferation, volume and induced anxiety and depression like behaviours in mice. *Eur J Pharmacol.* 2008 Mar;583(1):115–127.
  82. Sterner EY, Kalynchuk LE. Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010 Jun;34(5):777–790.
  83. Soya H, Deocaris CC, Yamaguchi K, Ohiwa N, Saito T, Nishijima T, et al. Extract from *Acanthopanax senticosus* harms (Siberian ginseng) activates NTS and SON/PVN in the rat brain. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008 Sep;72(9):2476–2480.
  84. Miyazaki S, Oikawa H, Takekoshi H, Hoshizaki M, Ogata M, Fujikawa T. Anxiolytic Effects of *Acanthopanax senticosus* HARMS Occur via Regulation of Autonomic Function and Activate Hippocampal BDNF–TrkB Signaling. *Molecules.* 2018 Dec;24(1):132.
  85. Lau K-M, Yue GG-L, Chan Y-Y, Kwok H-F, Gao S, Wong C-W, et al. A review on the immunomodulatory activity of *Acanthopanax senticosus* and its active components. *Chin Med.* 2019;14(1):25.
  86. Lu X, Xiao-Qing C. Eleutheroside E attenuates isoflurane-induced cognitive dysfunction by regulating the  $\alpha 7$ -nAChR-NMDAR pathway. *Neuroreport.* 2019;30(3):188–194.
  87. Gao L, Li X, Meng S, Ma T, Wan L, Xu S. Chlorogenic acid alleviates A $\beta$ 25-35-induced autophagy and cognitive impairment via the mTOR/TFEB signaling pathway. *Drug Des Devel Ther.* 2020 May;14:1705–1716.
  88. Shi X, Zhou N, Cheng J, Shi X, Huang H, Zhou M, et al. Chlorogenic acid protects PC12 cells against corticosterone-induced neurotoxicity related to inhibition of

- autophagy and apoptosis. *BMC Pharmacol Toxicol.* 2019 Dec;20(1):56.
89. Kumar G, Mukherjee S, Paliwal P, Singh S Sen, Birla H, Singh SP, et al. Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019;392(10):1293–1309.
90. Reinhart V, Bove SE, Volfson D, Lewis DA, Kleiman RJ, Lanz TA. Evaluation of TrkB and BDNF transcripts in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum from subjects with schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. *Neurobiol Dis.* 2015 May;77:220–227.
91. Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;122:169–192.
92. Serra MP, Poddighe L, Boi M, Sanna F, Piludu MA, Corda MG, et al. Expression of BDNF and trkB in the hippocampus of a rat genetic model of vulnerability (Roman low-avoidance) and resistance (Roman high-avoidance) to stress-induced depression. *Brain Behav.* 2017;7(10):e00861.
93. Popova NK, Ilchibaeva T V., Naumenko VS. Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry (Mosc).* 2017 Mar;82(3):308–317.
94. Williams SN, Undieh AS. Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroreport.* 2009 Apr;20(6):606–610.
95. Haynes LE, Griffiths MR, Hyde RE, Barber DJ, Mitchell IJ. Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience.* 2001;104(1):57–69.
96. Schaaf MJ, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E. Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res.* 1998 Nov;813(1):112–120.
97. Chao HM, Sakai RR, Ma LY, McEwen BS. Adrenal steroid regulation of neurotrophic factor expression in the rat hippocampus. *Endocrinology.* 1998 Jul;139(7):3112–3118.
98. Molteni R, Calabrese F, Cattaneo A, Mancini M, Gennarelli M, Racagni G, et al. Acute stress responsiveness of the neurotrophin BDNF in the rat hippocampus is modulated by chronic treatment with the antidepressant duloxetine. *Neuropsychopharmacology.* 2009 May;34(6):1523–1532.
99. Warembourg M. Radioautographic study of the rat brain after injection of [1,2-

- 3H]corticosterone. *Brain Res.* 1975 May;89(1):61–70.
100. Chen LW, Sun D, Davis SL, Haswell CC, Dennis EL, Swanson CA, et al. Smaller hippocampal CA1 subfield volume in posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety.* 2018;35(11):1018–1029.
  101. Kozlovsky N, Matar MA, Kaplan Z, Kotler M, Zohar J, Cohen H. Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion correlates with PTSD-like behavioural stress response. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007 Dec;10(6):741–758.
  102. de Flores R, La Joie R, Chételat G. Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer’s disease. *Neuroscience.* 2015 Nov;309:29–50.
  103. Nakahara S, Matsumoto M, van Erp TGM. Hippocampal subregion abnormalities in schizophrenia: A systematic review of structural and physiological imaging studies. *Neuropsychopharmacol reports.* 2018;38(4):156–166.
  104. Chen J-X, Li W, Zhao X, Yang J-X. Effects of the Chinese traditional prescription Xiaoyaosan decoction on chronic immobilization stress-induced changes in behavior and brain BDNF, TrkB, and NT-3 in rats. *Cell Mol Neurobiol.* 2008 Aug;28(5):745–755.
  105. Majnooni MB, Fakhri S, Shokoohinia Y, Mojarrab M, Kazemi-Afrakoti S, Farzaei MH. Isofraxidin: Synthesis, biosynthesis, isolation, pharmacokinetic and pharmacological properties. *Molecules.* 2020 Apr;25(9).
  106. Cho JY, Nam KH, Kim AR, Park J, Yoo ES, Baik KU, et al. In-vitro and in-vivo immunomodulatory effects of syringin. *J Pharm Pharmacol.* 2001 Sep;53(9):1287–1294.
  107. Liu KY, Wu YC, Liu IM, Yu WC, Cheng JT. Release of acetylcholine by syringin, an active principle of *Eleutherococcus senticosus*, to raise insulin secretion in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2008 Mar;434(2):195–199.
  108. Bai Y, Tohda C, Zhu S, Hattori M, Komatsu K. Active components from Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) for protection of amyloid  $\beta$ (25-35)-induced neuritic atrophy in cultured rat cortical neurons. *J Nat Med.* 2011 Jul;65(3-4):417–423.
  109. Tohda C, Ichimura M, Bai Y, Tanaka K, Zhu S, Komatsu K. Inhibitory effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts on amyloid beta(25-35)-induced neuritic atrophy and synaptic loss. *J Pharmacol Sci.* 2008 Jul;107(3):329–339.
  110. He Y, Wang Y, Zhang X, Zheng Z, Liu S, Xing J, et al. Chemical characterization of small-molecule inhibitors of Monoamine oxidase B synthesized by the *Acanthopanax senticosus* root with affinity ultrafiltration-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass*

- Spectrom. 2019;e8694.
111. Sun H, Lv H, Zhang Y, Wang X, Bi K, Cao H. Pharmacokinetics of isofraxidin in rat plasma after oral administration of the extract of *Acanthopanax senticosus* using HPLC with solid phase extraction method. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2007 Sep;55(9):1291–1295.
  112. Cui Y, Zhang Y, Liu G. Syringin may exert sleep-potentiating effects through the NOS/NO pathway. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015 Apr;29(2):178–184.
  113. Kumar A, Chanana P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target. *Vitamins and Hormones*. 2017;103:147-167.
  114. Spiaccijr A, Kanamaru F, Guimaraes F, Oliveira R. Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Jan;88(3):247–255.
  115. Schultz HD. Nitric oxide regulation of autonomic function in heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2009 Jun;6(2):71–80.
  116. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics*. 2018 Jan;50(1):1–9.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科 藤川 隆彦 教授に深謝の意を表します。

本研究に際し、研究遂行に対する御指導、御激励を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 薬理・動態学分野 及川 弘崇 助教に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、ご協力をいただいた鈴鹿医療科学大学薬学部 藤田 快男 助教、三重大学 理事・副学長 緒方 正人教授、筑波大学 体育専門学群 兼 ヒューマン・ハイ・パフォーマンス先端研究センター センター長 征矢 英昭 教授、サシクロレラ株式会社 竹腰 英夫 様、星崎 昌子 様 に深く感謝いたします。

本論文の作成に際し、ご助言を賜りました北海道医療大学薬学部生薬学研究室 西部 三省名誉教授に深謝の意を表します。

本論文の審査過程に数々のご助言とご指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科 里見 佳子 教授、三輪 高市 教授、大倉 一人 教授、郡山 恵樹 准教授、ならびに坂 晋 准教授に深く感謝いたします。

研究生生活においてご助力をいただき、お世話になりました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科の先生方および、事務面で大変お世話になりました大学院担当 水井 智子 氏をはじめ鈴鹿医療科学大学の職員の方々、分子予防薬理学教室の皆様にご感謝申し上げます。



## 英文要旨

Stress caused by changes in the external environment affects the autonomic nervous system (ANS) and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The ANS is divided into two parts: sympathetic nervous system (SNS) and parasympathetic nervous system (PNS). Anxiety (psychological stress) induces SNS activation and PNS suppression. Chronic stress (e.g., long-term anxiety) induces gastric ulcers and depression via sustained activation of the HPA axis and the ANS. In addition, the total number of patients with depression and other mood and stress-related disorders are increasing every year, and there are significant social problems that are not represented in national health expenditures, such as the large number of potential patients with mild and untreated conditions. In addition, it is suggested that early detection and treatment (intervention) of mental diseases can prevent its progression, as in the case of lifestyle-related diseases such as hypertension and diabetes. Therefore, it is important to alleviate stress in daily life to prevent the onset and progression of mental diseases.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is involved in neurogenesis, is known to induce anxiolytic-like behavior via the overexpression in the hippocampus. It has been reported that BDNF is down-regulated in the hippocampus by corticosterone administration and stress. The BDNF/TrkB signaling is important for the antidepressant effects, suggesting that activation of hippocampal BDNF/TrkB signaling may be important for stress reduction.

*Acanthopanax senticosus* HARMS (ASH) is a deciduous shrub in the family Araliaceae, which grows in abundance in various regions of Russia, China, Korea and Japan. ASH is described in classic herbalism literature such as Shennong Ben Cao Jing and Compendium of Materia Medica, and has been used in China for more than 2,000 years as a tonic and treatment for rheumatoid arthritis. In recent years, ASH was also reported to increase resistance to stress and fatigue as an adaptogen, and is widely used as an alternative medicine in Western countries. ASH was reported to inhibit the onset of gastric ulcers by restrained cold water stress and have antidepressant effects in rodents. However, the evidence of the reduction of mental stress by ASH is not sufficient.

In the present study, I investigated the anxiolytic effects of ASH extract and its components on behavioral and autonomic activity in anxiety-sensitive rats and their effects on hippocampal BDNF/TrkB signaling by analyzing hippocampal protein expression.

Chapter 1: Anxiolytic effect and the effect on hippocampal BDNF/TrkB signaling in

anxiety-high sensitive rats by oral administration of ASH extract.

I assessed the behavior and the ANS activity by electrocardiogram analysis, using the behavioral pharmacology test (the novel environmental feeding inhibition test [NSF] and the improved elevated beam walking [IEBW] test, a modified version of the elevated plus maze) to examine the anxiolytic effects of ASH in anxiety-high sensitive rats. I also analyzed hippocampal BDNF/TrkB signaling-related protein expression. In the NSF test, ASH extracts mitigated the changes of feeding behavior in the novel environment, and 5%ASH administration had an autonomic stabilizing effect. In the IEBW test, ASH extract showed anxiolytic-like behavior and ameliorated the increase of SNS activity and the inhibition of PNS activity in anxiety-high sensitive rats. Furthermore, 5%ASH administration activated hippocampal BDNF/TrkB signaling. These results suggest that ASH extract, which has an anxiolytic effect, may be a beneficial supplement or preventive agent in mental health.

Chapter 2: Anxiolytic effects and the effects on hippocampal BDNF/TrkB in anxiety-high sensitive rats by ASH extract 's components.

In chapter 1, the anxiolytic effects of ASH administration to anxiety-high sensitive rats were revealed. Therefore, I evaluated the effects on the behaviors and the autonomic nervous activity by eleutheroside E (SYG) and chlorogenic acid (CHA), which are the most abundant constituents of ASH extract, using the open-field test (OFT) and IEBW test in anxiety-high sensitive rats. I also analyzed hippocampal BDNF/TrkB signaling-related protein expression.

In the OFT, SYG and CHA alone did not show significant behavioral changes. However, the combination of SYG and CHA significantly improved behavioral inhibition in the open field, as did ASH. In the IEBW, SYG improved SNS activation and PNS suppression, while CHA improved anxiety-like behavior. Furthermore, the combination of SYG and CHA showed very similar results to those of ASH in the IEBW test.

Furthermore, the behavioral and autonomic activities of eleutheroside B (SYR) and isofraxidin (ISO), which are the next most abundant constituents of ASH, were evaluated in the IEBW test in anxiety-high sensitive rats to determine their anxiolytic effects. In the IEBW test, SYR improved anxiety-like behavior and PNS suppression, but ISO showed no significant changes on behavior and autonomic nervous activity at the dose based on the ASH intake in chapter 1. Therefore, SYR may partially contribute to the anxiolytic effects of ASH in terms of behavioral and autonomic activity in the IEBW test, but the contribution of ISO may be low. In this study, only the combination of CHA and SYG was studied. But it is necessary to study the activity of the combination of these

components because the combination of ASH's components may have an anxiolytic effect, as the combination of SYG and CHA.

These results suggest that ASH is effective against mental stress, and SYG and CHA may be the main anxiolytic components of ASH. The results also suggest a partial contribution of SYR. It was suggested that ASH, which has limited side effects, may be very suitable for a supplement or preventive agent against mental stress. Future investigations of its anxiolytic effects in humans and clarification of its mechanism are needed.