

ラットの個性を考慮した改良型高架試験における エゾウコギエキスの抗不安作用の検討

宮崎 翔平¹⁾, 藤川 隆彦²⁾

1) 広島国際大学 薬学部 薬学科

2) 鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

研究紹介

ラットの個性を考慮した改良型高架試験における エゾウコギエキスの抗不安作用の検討

宮崎 翔平¹⁾, 藤川 隆彦²⁾

1) 広島国際大学 薬学部 薬学科

2) 鈴鹿医療科学大学 薬学部 薬学科

キーワード： 個性, エゾウコギ, 抗不安作用, 交感神経, 副交感神経

要 旨

近年, うつ病などのストレスに関連した疾患の総患者数は増加してきている。うつ病などでは医療費には現れない社会的損失が大きいことが知られており, 発症や重症化の予防には日常的なストレスケアが重要である。そこで本研究では, 古来より中国で精神安定に用いられたエゾウコギ (ASH) の抗不安作用について検討した。個性判別したラットを用いた改良型高架装置での行動試験と心拍変動解析による自律神経活動測定を行い解析した。ASH エキスは, 高架上での不安行動を減弱し, 交感神経の興奮及び副交感神経の抑制を改善させた。また, ASH エキスの抗不安作用における有効成分を探索したところ, エレウテロサイド E (SYG) が自律神経活動を安定化し, クロロゲン酸 (CHA) 及びシリニン (SYR) は, 高架上での不安行動を改善し, 副交感神経活動を活性化することが明らかとなった。以上のことから, ASH エキスは精神的ストレスに有効であり, その有効成分は SYG と CHA である可能性が示唆された。また, SYR の部分的な寄与の可能性も示唆された。

1. はじめに

近年、日本ではうつ病などの精神的ストレスに関連した疾患の患者数は増加の一途をたどっている¹⁾。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、日本では精神的ストレスに関連すると考えられるうつ病や双極性障害、自殺・自傷がワースト 20 に入っており²⁾、医療費に現れない社会的損失が大きいことが示唆されている。こうした精神的ストレスに関連した疾患の予防・治療法の開発は、日本の医療において急務であると考えられる。そこで本研究では、古来より中国で滋養強壮や精神安定を目的に用いられ、現代においては抗疲労効果を有することが報告されている³⁾ エゾウコギに着目し、その精神的ストレス緩和作用について心拍変動解析と行動薬理試験を組み合わせた手法を用いて解析を行った。

2. エゾウコギについて

エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus* HARMS: ASH) は、ロシアや中国の北東部、日本の北海道などの寒冷な地域に広く自生しているウコギ科の植物である。古来より中国では、ASH の根皮 (五加皮) や根及び根茎 (刺五加) が高血圧やリウマチ性関節炎の治療や滋養強壮を目的として伝統的に使用されてきた^{4,5)}。本草学の古典である神農本草経や本草綱目などに収載されている。また、本草綱目の序文には「一掴みの五加 (エゾウコギ) は馬車いっばいの金銀財宝にも勝る」と記載されており、重宝されていたことがうかがえる。さらに、近年の研究により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が報告されている⁶⁾。ASH エキスのストレスに対する作用としては水浸拘束ストレスによる胃潰瘍発生抑制作用が報告されているが⁷⁾、精神的ストレスに対する作用は十分には解明されていないため、本研究では ASH エキスの不安行動への影響について検討した。

3. ストレスと自律神経

不安などの精神的ストレスは、交感神経を活性化し副交感神経が抑制することが知られている⁸⁾。交感神経の活性化は心拍数・血圧の上昇などを誘導し、副交感神経の抑制は消化管運動を抑制する⁹⁾。また、多くの臓器は交感神経と副交感神経の両方から制御を受けており (自律神経の二重支配)、そのバランスは外界の変化に適応して調節されている。心臓においても、交感神経と副交感神経の二重支配をうけており、心拍間隔の周波数解析により各々の寄与度を評価することができるため心拍変動解析が自律神経活動の評価に用いられている¹⁰⁾。時系列 R-R 間隔変動の周波数解析およびパワースペクトル密度の算出には、高速フーリエ変換アルゴリズムを用いた。得られたパワースペクトルは各周波数に応じて高周波数域 (high frequency [HF]: 0.6-3.0 Hz)、低周波数域 (low frequency [LF]: 0.2-0.6 Hz)、および超低周波数域 (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。本実験では、7 週齢雄性 Sprague-Dawley ラット (SLC Inc. より購入) の腹腔内に心電図の送信機を埋め込むことで自由行動下での心電図を取得し、心拍変動解析を行うことで行動試験中のラットの自律神経活動を評価した。

4. 改良型高架試験と個性判別

不安行動の評価に一般的に用いられる高架式十字迷路上での自律神経活動を評価したところ飼育ケージ内と比較して交感神経活動の上昇がみられたが、その変化はばらつきが大きく有意ではなかった (Fig. 1, 2)。また、装置上から飛び降りるラットもいたため、より安定した不安行動を示す行動試験が必要とされた。そこで 2 × 4 の板材 (180 cm × 3.8 cm × 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 × 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 × 8.9 cm × 28.5 cm) からなる改良型高架装置 (Fig. 1) を

作成した。改良型高架装置上においては、交感神経活動の有意な上昇と副交感神経活動の有意な低下が観察されたこと (Fig. 2) から不安行動の評価には改良型高架試験を用いることとした。さらに、高架上での行動から 60 秒以内にクローズドアームに入るラットを S タイプ、クロー

ズドアームに 61 秒以上かけて入るラットを L タイプと分類し、高架上での自律神経活動を測定すると L タイブラットに比べて S タイブラットは交感神経活動の有意な上昇と副交感神経活動の有意な低下が観察された (Fig. 3)。これまでの実験において、S タイプと L タイプの比はおよ

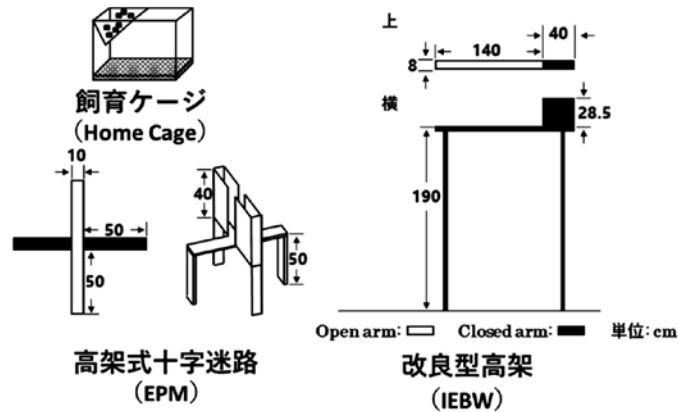


Fig. 1 Improved elevated beam walking (IEBW) as an improved version of the elevated plus maze (EPM)

This figure is adapted from reference ¹¹⁾.

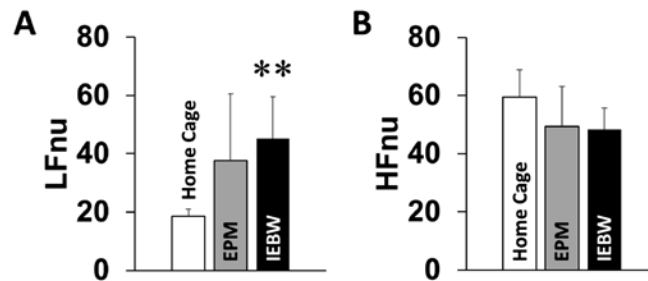


Fig. 2 Analysis of the heart rate variability (HRV) in home cage, improved elevated beam walking (IEBW), and elevated plus maze (EPM)

(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. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 6$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HC (repeated measures ANOVA). This figure is adapted from reference ¹¹⁾.

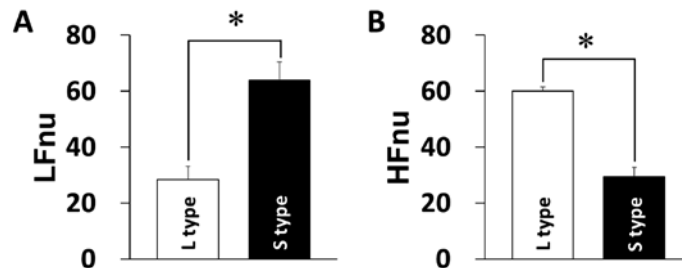


Fig. 3 S type rat shows higher sensitivity to anxiety in the IEBW test than L type rat

(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. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 4$; * $p < 0.05$ vs. L type (unpaired student t test).

そ4:6で、搬入時期によっても異なることが確認されている (data not shown)。以上のことからエゾウコギの抗不安作用について高架上での不安感受性の高いSタイプラットを用いて改良型高架試験を行い解析した。

5. 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ルは、鈴鹿医療科学大学動物実験倫理委員会の承認を得ている (2016年4月1日第1号)。

6. エゾウコギエキスの抗不安作用の検討

ASHエキス (株式会社サシクロ様より提供, Lot. 8142) を1%もしくは5%含む飼料を1週間投与し、行動薬理試験を行った。また、本実験では、ポジティブコントロールとしてベンゾジアゼピン系薬であるクロキサゾラム (CLO, SepazonTM, 0.2 mg/kg) を使用した。

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 (Fig. 4A)。次に自律神経活動を解析すると、飼育 (Home Cage: HC) 条件では、投与群間で有意な変化はみられなかったが、高架上にラットをのせることによってCont群ではLFnuの有意な上昇に加えてHFnuの有意な低下が観察された (Fig. 4B, C)。ASHエキス投与によりCont群で観察された高架条件による各指標の変化は減弱された (Fig. 4)。また、高架条件において、Cont群と比較してLFnuの有意な低下に加えてHFnuの有意な増加が観察された (Fig. 4B, C)。さらに、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、滞在時間において有意な変化をもたらさなかった (Fig. 4A)、自律神経活動においてはHFnuを有意に増加させ、LFnuを有意に減少させた (Fig. 4B, C)。

Cloosらの報告によると、ベンゾジアゼピン系薬剤の作用 (鎮静作用、筋弛緩作用、抗痙攣作用、抗不安作用)

は、薬剤ごとに各作用の強さが異なり¹³⁾、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ためポジティブコントロールとして本実験で使用した。しかし、不安感受性の高いSタイプラットにCLOを投与した場合、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た。

CLOは自律神経活動を調節したが、鎮静や筋弛緩も引き起こしている可能性が考えられた。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た。一方で、ASHエキスはCLOのような行動抑制を生じずに高所ストレスに対して緩和作用を示すことが高架上での行動および自律神経活動の面から示唆された。

7. エゾウコギエキス含有成分の抗不安作用の検討

次に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。エキス中の主要成分について高速液体クロマトグラフィーを用いて分離・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 (別名シリングアレジノール 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)、シリングイン (SYR: 325.2 mg/100 g) を含有していた (Fig. 5)。

前項の実験におけるASH5%群での飼料摂取量をもとにエキス摂取量を算出し各成分の相当量 (CHA [Sigma-Aldrich, C3878]: 40 mg/kg, SYG[ASHエキスより抽出]: 32 mg/kg, Mix: CHA+SYG, ISO[FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 099-03651]: 5 mg/kg, SYR[Toronto Research Chemicals, S920050]: 16 mg/kg) を1週間強制経口投与し、改良型高架装置上での行動および自律神経活動への影響を評価した。

CHA群とMix群、SYR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増加した (Fig. 5A)。また、SYGを投与したラットでもオープンアームでの滞在時間が増加したが、統計学的に有意な変化ではなかった (Fig. 6A)。

HC条件において、各群間で自律神経活動に差は見ら

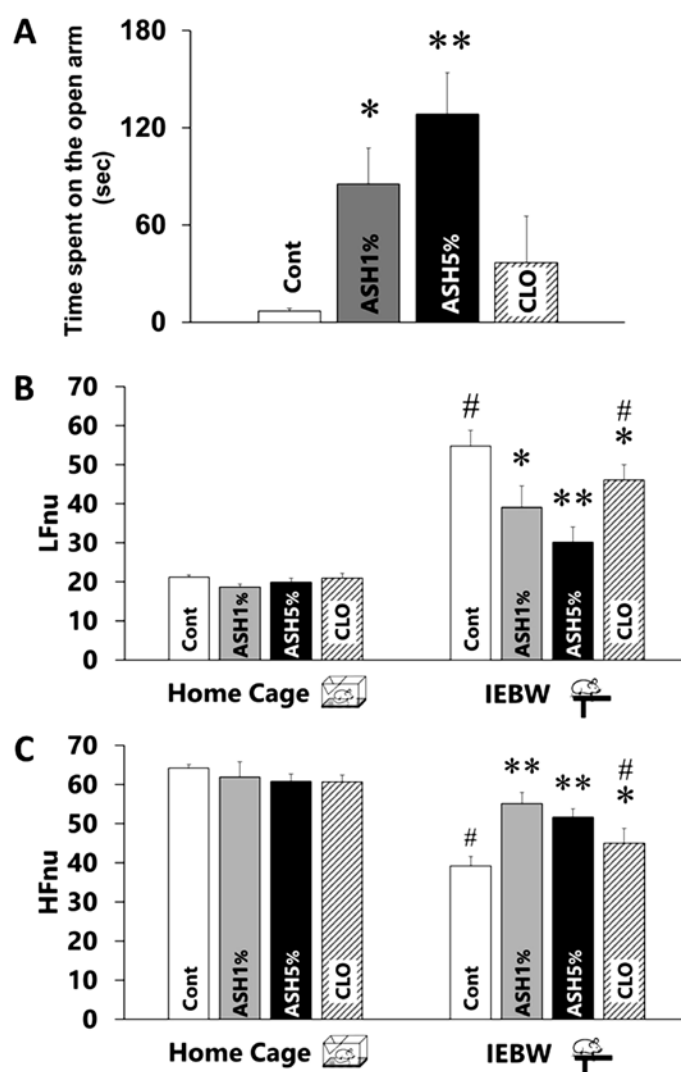


Fig. 4 Effects of ASH extract on anxiety-like behaviors and the autonomic nervous system control of heart rate in the IEBW test

(A) Time spent in the open arm (sec) are shown. (B) LFnu (normalized unit of the LF value) indicates the sympathetic nervous system activity. (C) HFnu (normalized unit of the HF value) indicates the parasympathetic nervous system activity. Data are presented as the mean $\pm$ SE; n = 6-8; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Cont. (Dunnett's *t*-test), #p < 0.05 vs. home cage (paired *t*-test). This figure is adapted from reference^{11,12)}.

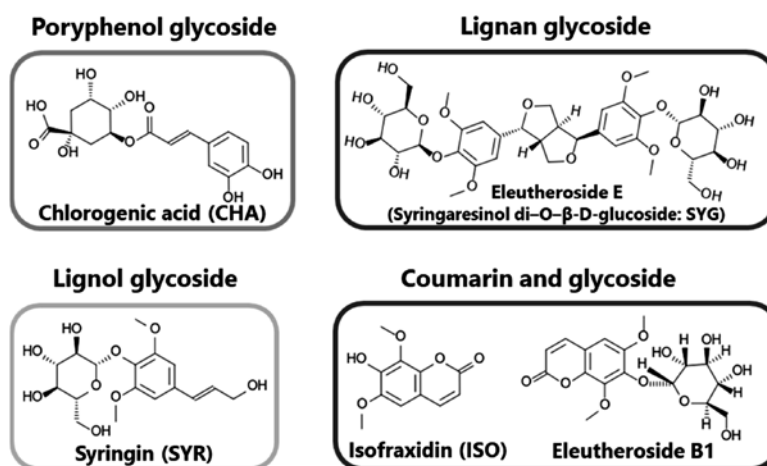


Fig. 5 The structures of *Acanthopanax senticosus* HARMS's major components

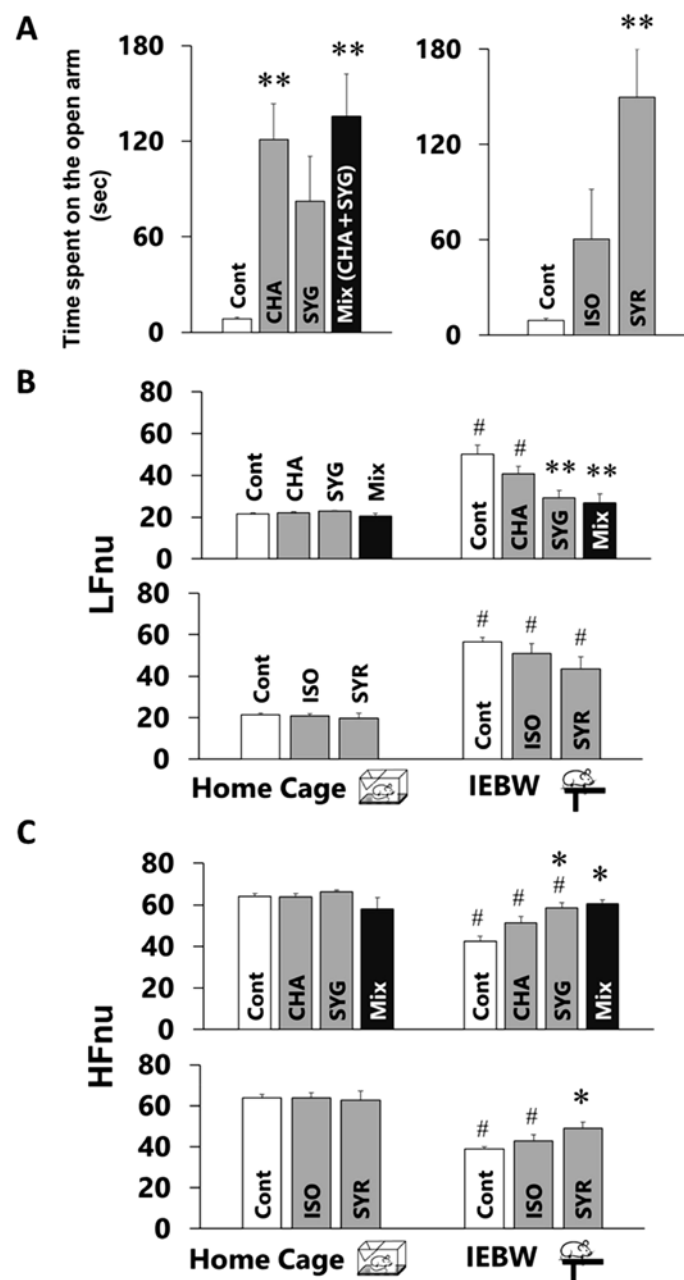


Fig. 6 Effects of the major components of *Acanthopanax senticosus* HARMs (chlorogenic acid [CHA], eleutheroside E [SYG], a mixture of both [Mix], isofraxidin [ISO], and syringin [SYR]) on anxiety-like behaviors and the autonomic nervous system control of heart rate in the IEBW test

(A) Time spent in the open arm (sec) are shown. (B) LFnu (normalized unit of the LF value) indicates the sympathetic nervous system activity. (C) HFnu (normalized unit of the HF value) indicates the parasympathetic nervous system activity. Data are presented as mean $\pm$ SE; $n = 5-8$; ** $p < 0.01$, vs. Cont. (Dunnett's t test), # $p < 0.05$ vs. Home Cage (paired t -test). This figure is adapted from reference ^{12, 14}.

れなかった (Fig. 6B, C)。その後、高架条件で自律神経活動を測定した。高架条件において Cont 群と比較して SYG 群、Mix 群、HFnu 値が有意に増加し、LFnu 値が有意に減少した (Fig. 6B, C)。SYR 群では、HFnu が有

意に増加した (Fig. 6C)。しかし、CHA 群および ISO 群では有意な変化は見られなかった (Fig. 6B, C)。

これまでに、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高架式十字迷路試験

において抗不安作用を発揮することが報告されており¹⁵⁾, 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, SYG は, 海馬のセロトニンや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¹⁶⁾ 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を有すること¹⁷⁾ が報告されており, 本実験において示された心臓自律神経活動調節作用に関与していると考えられる。SYR は神経末端からのアセチルコリン放出促進作用が報告されており¹⁸⁾, 今回の実験においてもこの作用が関与している可能性が示唆された。また, SYR の経口投与は, 一酸化窒素 (NO) 濃度及び一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性を低下させることが報告されている¹⁹⁾。中枢性の NO/NOS は自律神経の調節に関与しており, NOS 阻害剤が高架式十字迷路試験において抗不安作用を示したという報告²⁰⁾ から, SYR の NO/NOS への影響が抗不安作用にも関与していると考えられる。

以上のことから, 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 ASH エキスと同様の行動学的作用が見られ, 自律神経活動に対しては副交感神経のみに影響を与えたことから ASH エキスの抗不安作用に部分的に関与していることが示唆された。

8. 終わりに

ASH は, ストレス感受性の高いラットにおいて精神的ストレスを緩和させ, その有効成分が SYG と CHA, SYR であることが行動試験および自律神経活動解析の結果から示唆された。また, 限られた副作用しか持たない ASH は, 精神的ストレスに対するサプリメントや予防薬として有用である可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 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 [internet]. 東京: 厚生労働省. Available from: <https://www.mhlw.go.jp/kokoro/speciality/data.html>.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Shougaku-kan. *Chuyaku Encyclopedia*. 2nd ed. Tokyo: Shanghai Science Technology Publishing Company; 1985.
- 5) Ren CC. *Zusetsu Kanpo-Iyaku Daijiten* (1). Tokyo: Kodansha; 1982.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Friedman BH, Thayer JF. Anxiety and autonomic flexibility: a cardiovascular approach. *Biol Psychol*. 1998 Mar;47(3):243-263.
- 9) Kreibig SD. Autonomic nervous system activity in emotion: A review. *Biol Psychol*. 2010;84(3):394-421.
- 10) Zhu J, Ji L, Liu C. Heart rate variability monitoring for emotion and disorders of emotion. *Physiol Meas*. 2019 Jul 1;40(6):064004.
- 11) 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* (Basel, Switzerland), 2018;24(1):132.
- 12) Miyazaki S, Fujita Y, Oikawa H, et al. Combination of syringaresinol-di-*O*- β -D-glucoside and chlorogenic acid shows behavioral pharmacological anxiolytic activity and activation of hippocampal BDNF-TrkB signaling. *Sci Rep*. 2020;10(1):18177.
 - 13) Cloos JM, Bocquet V. [Benzodiazepines: known risks and recent data]. *Rev Med Liege*. 2013;68(5-6):303-310.
 - 14) Miyazaki S, Oikawa H, Takekoshi H, et al. Novel Pharmacological Effects of Syringin on Anxiety Behavior and Autonomic Nervous System Activity. *Rec Nat Pro*. 2020;15(2):136-141.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 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.

— プロフィール —

宮崎 翔平 広島国際大学薬学部薬学科・助教 博士(薬学)

〔経歴〕 2017 年鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科卒業, 2021 年鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科博士課程修了, 2021 年より現職。〔専門〕 行動薬理学, 生化学。

藤川 隆彦 鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科・教授 博士(医学)

〔経歴〕 1996 年三重大学大学院医学系研究科博士課程短縮修了, 1999 年三重大学医学部生化学講座 講師, 2008 年三重大学大学院医学系研究科ゲノム再生医学講座 准教授, 2009 年鈴鹿医療科学大学薬学部 教授, 2013 年より現職。〔専門〕 生薬薬理学, 行動薬理学, 神経内分泌学。

Studies on the anxiolytic effects of *Acanthopanax Senticosus* HARMS extract and its components in the improved elevated beam walking test with consideration of rat's individual characteristics

Shouhei MIYAZAKI¹⁾, Takahiko FUJIKAWA²⁾

1) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima International University

2) Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science

Key words: individual characteristic, *Acanthopanax senticosus* HARMS, anxiolytic effect, sympathetic nervous, parasympathetic nervous

Abstract

In today's stressful society, the total number of patients suffering from stress-related illnesses like depression increases each year. It is known that stress-related diseases cause significant social losses that are not appear in health expenditures, thus daily stress care is important to prevent the onset and exacerbation of such diseases. In this study, we investigated the anxiolytic effect of *Acanthopanax senticosus* HARMS (ASH), which was used for mental stabilization in China since antiquity. The results showed that ASH extract ameliorated anxiety behavior and improved sympathetic nerve excitement and parasympathetic nerve suppression in the improved elevated beam walking (IEBW) test. The search for active ingredients in the anxiolytic effect by ASH extract revealed that Eleutheroside E (SYG) stabilized autonomic nervous activity, while chlorogenic acid (CHA) and syringin (SYR) improved anxiety behavior and activated parasympathetic nerve activity in the IEBW test. These results suggest that ASH extract with limited side effect is effective against mental stress and its active components may be SYG and CHA. The possibility of partial contribution of SYR was also suggested.