

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）

大学院薬学研究科博士課程

恐怖条件付けストレス反応に対する抑肝散および
フルボキサミンの併用効果とそのメカニズム

平成 29 年度

医療・生命薬学専攻

学籍番号：14R3001 氏名：大野 凜太郎

研究指導教員：武田 弘志 教授

副研究指導教員：辻 稔 教授

【目次】

和文要旨	-----	1
英文要旨	-----	2
緒言	-----	3
方法	-----	6
結果	-----	11
考察	-----	22
総括	-----	27
出版目録	-----	29
謝辞	-----	30
引用文献	-----	31

【和文要旨】

恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動に対するフルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) の抑制効果は、抑肝散 (0.3 および 1 g/kg, p.o.) を 1 日 1 回 6 日間前投与することにより増強した。また、この増強効果が認められたマウスの脳内では、前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現量が有意に減少していた。さらに、内側前頭前皮質に選択的 5-HT_{2A} 受容体遮断薬であるケタンセリン (5 nmol/mouse) を局所投与することでも、すくみ行動の発現が抑制された。一方、シグマ-1 受容体作動薬である SA4503 (1 mg/kg, i.p.) の投与により誘発されるすくみ行動の増強は、抑肝散を 1 日 1 回 6 日間前投与することで抑制された。

これらの結果より、抑肝散の反復投与は、前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体を介した情報伝達の低下を引き起こすことにより、フルボキサミンの抗不安様効果を増強することが示唆された。また、他のメカニズムとして、シグマ-1 受容体を介した情報伝達の低下が一部関与している可能性も併せて示唆された。したがって、既存の薬物治療では十分な効果が得られない不安障害の患者に対して、フルボキサミンと抑肝散の併用投与が有用である可能性が考えられる。

キーワード：抑肝散、フルボキサミン、恐怖条件付け、5-HT_{2A} 受容体、シグマ-1 受容体

【英文要旨】

The inhibitory effect of fluvoxamine (5 mg/kg, i.p.) on the freezing behavior of mice induced by fear conditioning was synergistically enhanced by repeated pretreatment with yokukansan (0.3 and 1 g/kg, p.o.) once a day for 6 days. Western blot analysis revealed that, in the brain of mice in which the enhancing effect of fluvoxamine with yokukansan was observed, the expression level of 5-HT_{2A} receptor was specifically decreased in the prefrontal cortex. Furthermore, microinjection of the 5-HT_{2A} receptor antagonist ketanserin (5 nmol/mouse) into the medial prefrontal cortex significantly suppressed freezing behavior. In addition, the enhancing effect of SA4503, a selective sigma-1 receptor agonist, on freezing behavior was significantly attenuated in mice that had been repeatedly pretreated with yokukansan (1 g/kg, p.o.) once a day for 6 days.

The present findings indicate that repeated treatment with yokukansan synergistically enhances the anxiolytic-like effect of fluvoxamine in the contextual fear conditioning paradigm in mice in conjunction with a decrease in 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling in the prefrontal cortex. Furthermore, downregulation of σ_1 receptor-mediated signaling, which positively modulates the conditioned fear response, may be related, at least in part, to the mechanism of the synergistic interaction between yokukansan and fluvoxamine regarding anxiety. Therefore, combination therapy with fluvoxamine and yokukansan may be beneficial for the treatment-resistant anxiety disorders.

Key words: yokukansan, fluvoxamine, contextual fear conditioning, 5-HT_{2A} receptor, sigma-1 receptor

【緒言】

ヒトを含め動物は、恐怖を経験するとその場所や状況などを長期間記憶し、再び同様の環境にさらされると、直接的な恐怖の原因が存在しなくても様々なストレス反応を呈する。このような恐怖記憶に基づいて出現するストレス反応は「恐怖条件付けストレス反応」と呼ばれ、本来は生得的な防御反応として必要不可欠なものであるが、過剰になるとうつ病や不安障害などのストレス性精神疾患の発症につながると考えられている。また、恐怖記憶のメカニズムおよび強迫性障害や外傷後ストレス障害を含む恐怖に関連した不安障害の病態生理には、脳内セロトニン(5-HT)神経系が深く関与していることが示唆されており¹⁾、これらの疾患の治療には、フルボキサミン、パロキセチンおよびセルトラリンなどの、5-HT神経系に選択的に作用する抗うつ薬である選択的5-HT再取り込み阻害薬が有効とされている^{2,3)}。

恐怖条件付けとは、不快感や恐怖感を誘発する無条件刺激と空間や音などの条件刺激を関連付けた記憶が形成され、無条件刺激に対する連合学習が獲得される現象であり、実験動物でも再現することが可能である⁴⁾。例えば、げっ歯類における恐怖条件付けでは、一定環境下の実験装置の中で回避不可能な電撃刺激を負荷すると、条件刺激(実験装置の環境)と無条件刺激(電撃刺激)とを関連付けた記憶が形成される。その結果、げっ歯類を再び同じ実験装置に入れると、恐怖条件付けストレス反応としてすくみ行動(呼吸運動以外の体動を示すことなく身体をすくませる防御反応)の発現が認められる。このすくみ行動は、以前より基礎研究では恐怖記憶に関連する不安の指標として用いられており⁵⁾、且つ、選択的5-HT再取り込み阻害薬の投与により抑制されることから⁶⁻¹⁰⁾、臨床における不安障害に対する選択的5-HT再取り込み阻害薬の治療効果を予測する上で有用な指標と考えられている。

選択的5-HT再取り込み阻害薬は、5-HTトランスポーターに加えて、シグマ-1受容体にも親和性を有することが知られている¹¹⁾。シグマ-1受容体は、小胞体のmitochondria-associated ER membrane(MAM)に特異的かつ高濃度に発現しているシャペロンタンパク質であり¹²⁾、脳内では辺縁系領域に豊富に存在し¹³⁾、マウスを用いた行動薬理学的検討ではシグマ-1受容体作動薬が

抗うつ様効果や認知機能改善効果を示すことから^{14,15)}、情動性や認知機能の調節において重要な役割を担っていることが示唆されている^{16,17)}。また、フルボキサミンは、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬のなかでも特に、シグマ-1 受容体に対して最も強い作動活性を示すことが明らかにされている¹¹⁾。さらに、positron emission tomography を用いた臨床研究では、治療量のフルボキサミンが、脳内のシグマ-1 受容体に高い親和性で結合することも見出されている¹⁸⁾。これらの報告を踏まえると、フルボキサミンが示す薬理効果のメカニズムを検討する上では、5-HT トランスポーターに加えて、シグマ-1 受容体の関与も考慮することが必要と考えられる。

近年、西洋薬の効果増強や副作用軽減を目的として、漢方薬を併用する統合医療が注目されている。精神科領域でも複数の漢方薬の有効性が確認されており、そのうちの 1 つとして抑肝散が挙げられる。抑肝散は、蒼朮（あるいは白朮）、茯苓、川芎、釣藤鈎、当帰、柴胡、甘草の 7 種の生薬で構成される漢方薬であり、従来、神経症、不眠症、小児夜なき、小児疳症などの神経の昂ぶりに対する適応を有する。また、最近の臨床研究では、アルツハイマー病をはじめとする認知症患者で認められる、不安、幻覚、興奮、睡眠障害などの行動および心理的症状（Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: BPSD）に対して、抑肝散が改善効果を示すことが報告されている¹⁹⁾。一方、基礎研究では、ヒト 5-HT_{1A} 受容体を強制発現させた細胞を用いた^{[35S]GTPγS} 結合実験において、抑肝散が 5-HT_{1A} 受容体に対して部分作動活性を有することが明らかにされている²⁰⁾。また、抑肝散の反復投与は、前頭前皮質において 5-HT_{1A} 受容体の発現を増加させ、反対に 5-HT_{2A} 受容体の発現を減少させることも報告されている²¹⁻²³⁾。これらの知見より、抑肝散は 5-HT_{1A} 受容体を介した情報伝達を促進させる一方、5-HT_{2A} 受容体を介した情報伝達は抑制する薬理作用を有することが示唆される。

現在、5-HT 受容体には、5-HT₁ から 5-HT₇ の 7 種類のタイプが存在することが明らかにされており、さらにこれら受容体タイプは、構造的及び薬理的に異なる 14 種類のサブタイプに細分類されている²⁴⁾。これら 5-HT 受容体を介して発現する 5-HT の生理作用は多岐にわたるが、中枢神経系においては、特に 5-HT_{1A} および 5-HT_{2A} 受容体が不安の発現調節に深く関わっており、且つ、両受容体は逆の役割を担っていることが示唆されている。すなわち、5-HT_{1A} 受容体に対して

は刺激作用を有する薬物が、また 5-HT_{2A} 受容体に対しては遮断作用を有する薬物が、抗不安効果を示すことが報告されている^{10,25-27)}。したがって、上記した抑肝散が 5-HT_{1A} および 5-HT_{2A} 受容体機能に及ぼす影響²⁰⁻²³⁾を踏まえると、本漢方薬は不安障害の治療に有効であることが期待される。実際に、最近のラットを用いた行動薬理学的研究では、生得的なあるいは恐怖記憶に基づく不安様行動に対して、抑肝散が抑制効果を示すことが報告されている²⁸⁻³⁰⁾。

現在、臨床では、不安障害に対する標準治療薬の 1 つとして、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬が用いられている^{2,3)}。しかし、本治療薬のみでの奏成功率は 40～60 % であり、ベンゾジアゼピン系抗不安薬や非定型抗精神薬を併用しても、追加で得られる奏成功率は 5 % 程度であることが報告されている³¹⁾。そこで、本研究では、既存の薬物治療で十分な効果が得られない治療抵抗性の不安障害に対する抑肝散の有用性を見出すことを目的として、マウスの恐怖条件付けストレス試験を用いて、フルボキサミンの抗不安作用に対する抑肝散の併用効果について検討した。また、メカニズムの解明を目的として、恐怖条件付けストレス試験後のマウス脳内における 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体の発現量の変化について生化学的に検討し、さらに、抑肝散がシグマ-1 受容体機能に及ぼす影響についても行動薬理学的に検討した。

【方法】

本研究は本学の国際医療福祉大学動物実験委員会の承認のもと、「国際医療福祉大学動物実験規程」ならびに「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して、適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した。

1. 実験動物および飼育条件

実験には、6週齢（実験開始時）のICR系雄性マウス（日本エスエルシー株式会社、静岡）を使用した。動物は恒温恒湿室（ $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 $50\pm 5\%$ ）にてプラスチックケージ内で飼育し、7:00点灯、19:00消灯の12時間サイクルの明暗条件下で飼育した。尚、摂餌（ラボMRストック、日本農業工業株式会社、横浜）および飲水（水道水）はともに自由とした。

2. 使用薬物

抑肝散水製乾燥エキス（以下、抑肝散と記す）は、以前の報告^{20,32-34}と同様の方法で製造された。蒼朮（4.0 g）、茯苓（4.0 g）、川芎（3.0 g）、釣藤鈎（3.0 g）、当帰（3.0 g）、柴胡（2.0 g）、甘草（1.5 g）の割合で秤量・混合した原料生薬（約 500 kg）を精製水（6,000 L）で煎じ、得られた抽出液を遠心分離機で濾過した後に低温濃縮した。その後、スプレードライ装置にて、濃縮液を噴霧乾燥させることでエキス粉末を得た。エキス粉末の品質の同等性は、品質指標成分（生理活性成分）であるグリチルリチン、サイコサポニン b₂、フェニラ酸の含量を、高速液体クロマトグラフィーにより定量分析して確認した。本研究で用いたエキス粉末の定量分析の結果を Fig. 1 に示す。これらの製造および品質管理は、厚生労働省が定める適正製造規範（Good Manufacturing Practices: GMP）に則って実施された。

抑肝散およびフルボキサミンマレイン酸塩（以下、フルボキサミンと記す）は、それぞれ株式会社ツムラ（東京）および明治製菓ファルマ株式会社（東京）より提供された。また、ケタンセリン酒石酸塩（以下、ケタンセリンと記す）および 1-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-4-(3-

phenylpropyl)-piperazine dihydrochloride (以下、SA4503 と記す) は、それぞれ Sigma-Aldrich 社 (MO, USA) および Tocris Bioscience 社 (Bristol, UK) より購入した。抑肝散は精製水に、フルボキサミンおよび SA4503 は生理食塩液に溶解した。ケタンセリンは 30 % Tween 80 を含む生理食塩液に懸濁させた。各薬物の用量および投与方法は、以前の報告^{8,9,33,35,36})に基づいて設定した。

3. 恐怖条件付けストレス試験

恐怖条件付けストレス試験は、以前の我々の報告^{8,37})に従い、条件付けとテストの 2 セッションで実施した。条件付けでは、床面に電撃刺激用のグリッドを設けた実験箱 (20 × 18 × 30 cm) にマウスを入れ、電撃刺激 (1 mA, 1 秒) を 1-10 秒間隔で 36 回与えることにより、恐怖記憶を獲得させた。テストは条件付け 24 時間後あるいは 1 週間後に実施し、条件付けを行った実験箱に再びマウスを入れ、電撃刺激を負荷しない状態で、マウスがすくみ行動を示す時間を 6 分間測定した。すくみ行動の発現時間は、実験箱の上方に設置した赤外線センサー (SUPER-MEX; 室町機械株式会社) により記録した。フルボキサミン (5, 10, 20 mg/kg)、SA4503 (1 mg/kg) および生理食塩液 (10 mL/kg) は、テスト開始 30 分前に腹腔内投与 (i.p.) した (Fig. 2A, 3A, 8A, 9A)。抑肝散 (0.3, 1 g/kg) および精製水 (10 mL/kg) は、条件付けの翌日から 1 日 1 回 6 日間にわたり経口投与 (p.o.) した (Fig. 3A, 4A, 9A)。ケタンセリン (5 nmoL/0.1μL) および溶媒は、テスト 40 分前に内側前頭前皮質に局所投与した (Fig. 7A)。

4. 手術およびマイクロインジェクション

マウスをペントバルビタール (80 mg/kg, i.p.) により麻酔し、脳定位固定装置 (David Kopf; Tujunga, CA, USA) に固定した。マウスの脳図譜³⁸)に従い、内側前頭前皮質 (ブレグマより前方に 2.0 mm、左方に 0.2 mm、下方に 2.0 mm) にガイドカニューレ (26 ゲージ) を挿入し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。恐怖条件付けは術後 5~7 日目に行い、その 24 時間後にテストを行なった。ケタンセリン (5 nmoL) および溶媒は、3 %セボフルランによる吸入麻酔下において、テストを行う 40 分前にガイドカニューレに挿入したインターカニューレ (33 ゲージ) を介して

微量注入した。なお、ケタンセリンおよび溶媒の投与容量は 0.1 μ L/mouse、投与速度は 0.1 μ L/min とした。

恐怖条件付けストレス試験終了後、ペントバルビタールナトリウム (80 mg/kg, i.p.) 深麻酔下にて、マウスの左心室より 4 %パラホルムアルデヒドを全身灌流させ、全脳を摘出した。全脳より内側前頭前皮質を含む厚さ 100 μ m の脳切片を作成し、顕微鏡下でカニューレの挿入位置を確認した。実験結果には、内側前頭前皮質へのカニューレの挿入が確認できた (Fig .7B) マウスより得られたデータのみを採用した。

5. ウェスタンブロットティング

5.1. サンプルの作成

ウェスタンブロットティングは、以前の我々の報告^{39,40)}に従って実施した。恐怖条件付けストレス試験においてすくみ行動を測定した直後に全脳を摘出し、氷上で前頭前皮質、海馬および扁桃体を分画した。前頭前皮質には 500 mL、海馬および扁桃体には 300 mL の radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、50mM Tris-HCl (pH 8.0) 、1% Triton、5 mM EDTA) を加え、専用のホモジナイザー (PELLET PESTLES[®] Cordless Motor; テクノケミカル株式会社) を用いてホモジナイズした。ホモジナイズされた組織を遠心分離 (6,000 xg, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清サンプルを -70 $^{\circ}$ C で凍結保存した。サンプル中のタンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量した。

5.2. 標的タンパク質の検出および定量

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法 (SDS-PAGE 法) に従って、上記の方法で調整したサンプル中の抗原タンパク質を分子量の差に基づいて分離した。次いで、電気泳動した抗原タンパク質を、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン (Millipore, Billerica, MA, USA) に電氣的に移行させた。抗原タンパク質を移行させたメンブレンは、室温下で 1 時間、ブ

ロックンブッファァー (20 mM Tris-HCL (pH 7.6)、137 mM 塩化ナトリウム、0.05 % Tween 20、5 % スキムミルク) 中で振とうさせることによりブロッケングし、さらに、抗 5-HT_{2A} 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; diluted 1:500) または抗 5-HT_{1A} 抗体 (Abcam, UK; diluted 1:1000) と 4°C で一晚インキュベァトした。その後、メンブレンを 0.05% Tween を含む Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl) の中で繰り返し洗浄し、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 標識 2 次抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratories, PA, USA) と室温で 1 時間インキュベァトした。標的タンパク質は、ケミルミノエッセンス法に従い蛍光発色性の基質 (Santa cruz biotechnology) を用いて、Chemi Doc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて検出した。検出したタンパク質の濃度は Image J を用いて解析し、結果は内標準タンパク質であるグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の濃度に対する標的タンパクの濃度の比として表した。

6. 統計解析

値は全て平均±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は、GraphPad InStat あるいは GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA) を用いて行った。2 群間の比較は Student's t-test、3 群間以上の比較は一元配置分散分析および post-hoc test (Dunnett's あるいは Student-Newman-Keuls 多重比較検定) を用いて行った。また、経時変化を伴う群間の比較は、二元配置分散分析および post-hoc test (Bonferroni 多重比較検定) を用いて行った。いずれの検定においても、危険率 5 % 未満 ($P < 0.05$) を有意差ありと判定した。

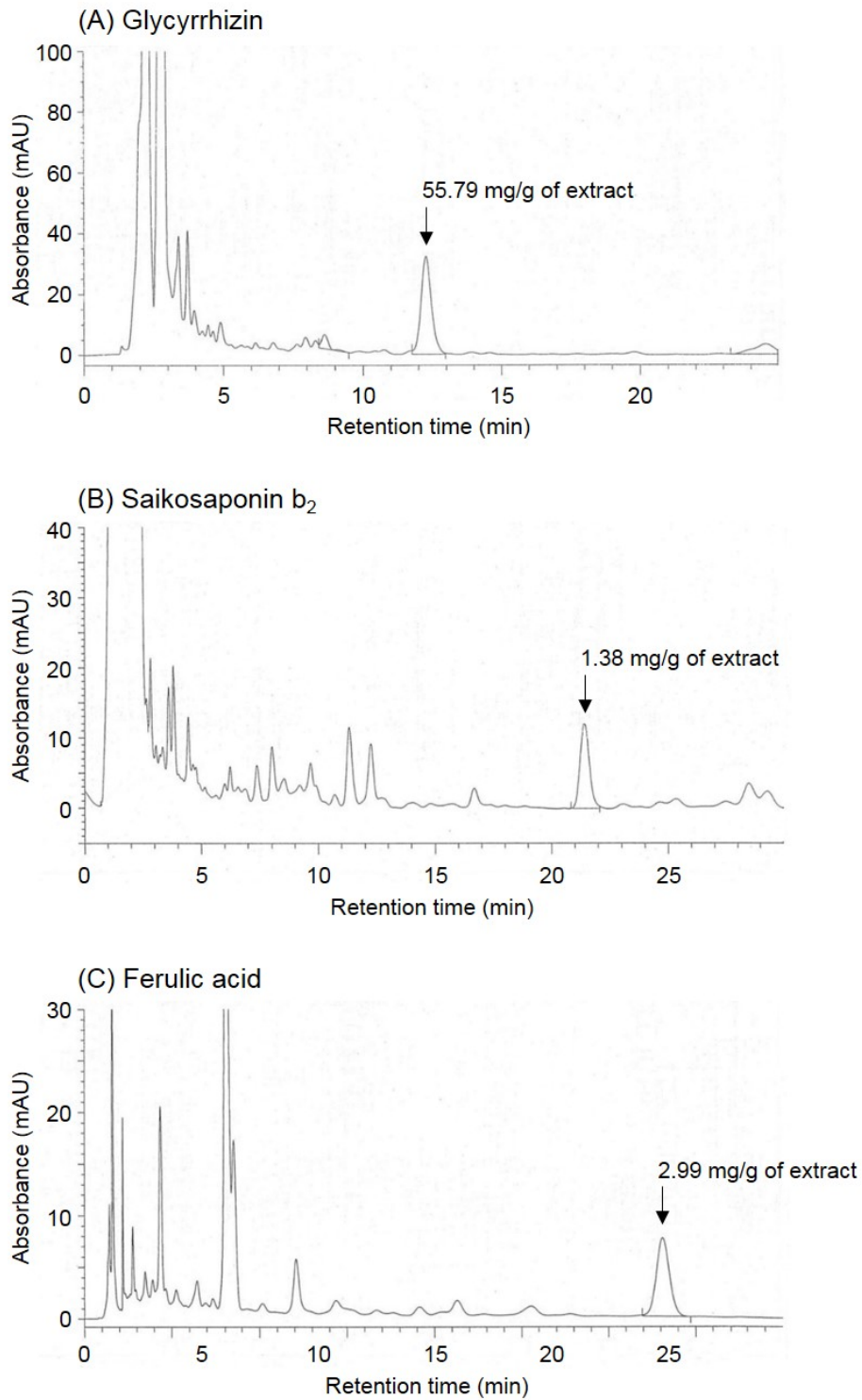


Fig. 1. Typical chromatograms and contents for glycyrrhizin (A), saikosaponin b₂ (B) and ferulic acid (C) contained in the yokukansan extract used in the present study. The amounts of each ingredients was expressed in milligram per gram of yokukansan extract.

【結果】

1. 恐怖条件付けストレス反応に対するフルボキサミンの効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対するフルボキサミンの効果について Fig. 2 に示した。恐怖条件付け 24 時間後にフルボキサミンを腹腔内投与し、30 分後よりすくみ行動の出現時間を 1 分ごとに 6 分間測定した (Fig. 2A)。その結果、測定開始 1 分後では全ての用量のフルボキサミン投与群において、2 分後ではフルボキサミン (10 および 20 mg/kg, i.p.) 投与群において、有意なすくみ行動の抑制が認められた (Fig. 2B)。また、6 分間におけるすくみ行動の総出現時間は、フルボキサミン (10 および 20 mg/kg, i.p.) 投与群で有意に抑制された (Fig. 2C)。

2. 恐怖条件付けストレス反応に対するフルボキサミンおよび抑肝散の併用効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対するフルボキサミンおよび抑肝散の併用効果について Fig. 3 に示した。恐怖条件付け 24 時間後より抑肝散を 1 日 1 回 6 日間経口投与し、その 24 時間後にテストを行った。テストではフルボキサミンを腹腔内投与し、30 分後よりすくみ行動の出現時間を 1 分ごとに 6 分間測定した (Fig. 3A)。その結果、測定開始 1 分後では、フルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) 単独投与群および抑肝散 (0.3 および 1 g/kg, p.o.) とフルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) の併用投与群において、有意なすくみ行動の抑制が認められた。また、測定開始 3 分後では、抑肝散 (1 g/kg, p.o.) とフルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) の併用投与群においてのみ、すくみ行動が有意に抑制された (Fig. 3B)。さらに、6 分間におけるすくみ行動の総出現時間は、フルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) 単独投与群では有意な変化が認められなかったものの、抑肝散 (0.3 および 1 g/kg, p.o.) とフルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) の併用投与群で有意に抑制された (Fig. 3C)。

3. 恐怖条件付けストレス反応に対する抑肝散の効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対する抑肝散の効果について Fig. 4 に示した。恐怖条件付け 24 時間後より抑肝散を 1 日 1 回 6 日間経口投与し、その 24 時間後にテストを行った。

テストでは生理食塩液を腹腔内投与し、30分後よりすくみ行動の出現時間を1分ごとに6分間測定した (Fig. 4A)。その結果、測定開始後1分ごとにおけるすくみ行動の出現時間、および6分間におけるすくみ行動の総出現時間いずれに対しても、抑肝散 (1 g/kg, p.o.) の反復投与は有意な影響を及ぼさなかった (Fig. 4B および 4C)。

4. 脳内 5-HT_{2A} 受容体の発現量に対するフルボキサミンと抑肝散の併用効果

脳内 5-HT_{2A} 受容体の発現量に対するフルボキサミンと抑肝散の併用効果を Fig. 5 に示した。恐怖条件付けストレス試験が終了した直後での前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現量は、フルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) 単独投与群では有意な変化は認められなかったが、フルボキサミン (5 mg/kg, i.p.) と抑肝散 (0.3 および 1 g/kg, p.o.) の併用投与群では有意に減少した (Fig. 5A)。一方、海馬および扁桃体においては、いずれの群においても 5-HT_{2A} 受容体の発現量に有意な変化は認められなかった (Fig. 5B および 5C)。

5. 前頭前皮質における 5-HT_{1A} 受容体発現量に対するフルボキサミンと抑肝散の併用効果

前頭前皮質における 5-HT_{1A} 受容体の発現量に対するフルボキサミンと抑肝散の併用効果を Fig. 6 に示した。恐怖条件付けストレス試験が終了した直後での前頭前皮質における 5-HT_{1A} 受容体の発現量は、いずれの群においても有意な変化は認められなかった。

6. 恐怖条件付けストレス反応に対するケタンセリン内側前頭前皮質投与の効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対する選択的 5-HT_{2A} 受容体拮抗薬ケタンセリンの内側前頭前皮質投与の効果について Fig. 7 に示した。恐怖条件付け 24 時間後にケタンセリンを内側前頭前皮質に局所投与し、40 分後にすくみ行動を測定した (Fig. 7A)。その結果、測定開始 1 分後および 6 分後におけるすくみ行動が、ケタンセリン (5 nmol) 投与群において有意に抑制された (Fig. 7C)。また、6 分間におけるすくみ行動の総出現時間も、ケタンセリン (5 nmol) 投与群において有意に抑制された (Fig. 7D)。

7. 恐怖条件付けストレス反応に対する SA4503 の効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対する選択的シグマ-1 受容体作動薬 SA4503 の効果について Fig. 8 に示した。恐怖条件付け 24 時間後に SA4503 を腹腔内投与し、30 分後にすくみ行動を測定した (Fig. 8A)。その結果、測定開始 1 分後におけるすくみ行動が、SA4503 (1 mg/kg, i.p.) 投与群において有意に増強した (Fig. 8B)。また、また、4 分間におけるすくみ行動の総出現時間も、SA4503 (1 mg/kg, i.p.) 投与群において有意に増強した (Fig. 8C)。

8. 恐怖条件付けストレス反応に対する SA4503 および抑肝散の併用効果

恐怖条件付けにより誘発されるすくみ行動に対する SA4503 および抑肝散の併用効果について Fig. 9 に示した。恐怖条件付け 24 時間後より抑肝散を 1 日 1 回 6 日間経口投与し、その 24 時間後にテストを行った。テストでは SA4503 を腹腔内投与し、30 分後よりすくみ行動の出現時間を 1 分ごとに 6 分間測定した (Fig. 9A)。その結果、測定開始 1 分後におけるすくみ行動が、SA4503 (1 mg/kg, i.p.) 単独投与群において有意に増強し、この行動変化は、抑肝散 (1 g/kg, p.o.) と SA4503 (1 mg/kg, i.p.) の併用投与群において有意に抑制された (Fig. 9B)。また、4 分間におけるすくみ行動の総出現時間は、SA4503 (1 mg/kg, i.p.) 単独投与群で有意に増強したが、抑肝散 (1 g/kg, p.o.) と SA4503 (1 mg/kg, i.p.) の併用投与群では有意な変化は認められなかった (Fig. 9C)。

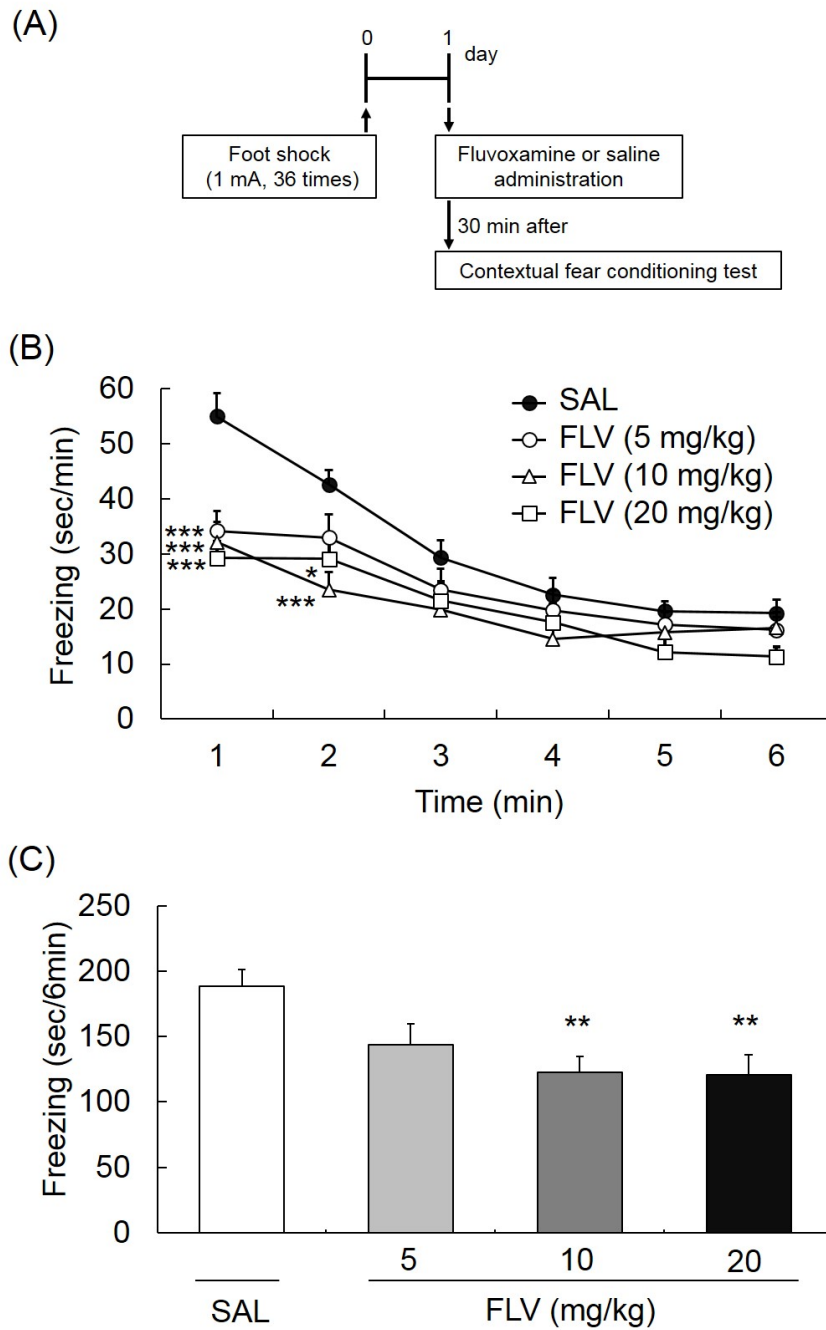


Fig. 2. A: Experimental schedule. B and C: Effects of fluvoxamine on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. SAL: saline, FLV: fluvoxamine. Values are the mean \pm SEM of 20-22 mice. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. SAL group.

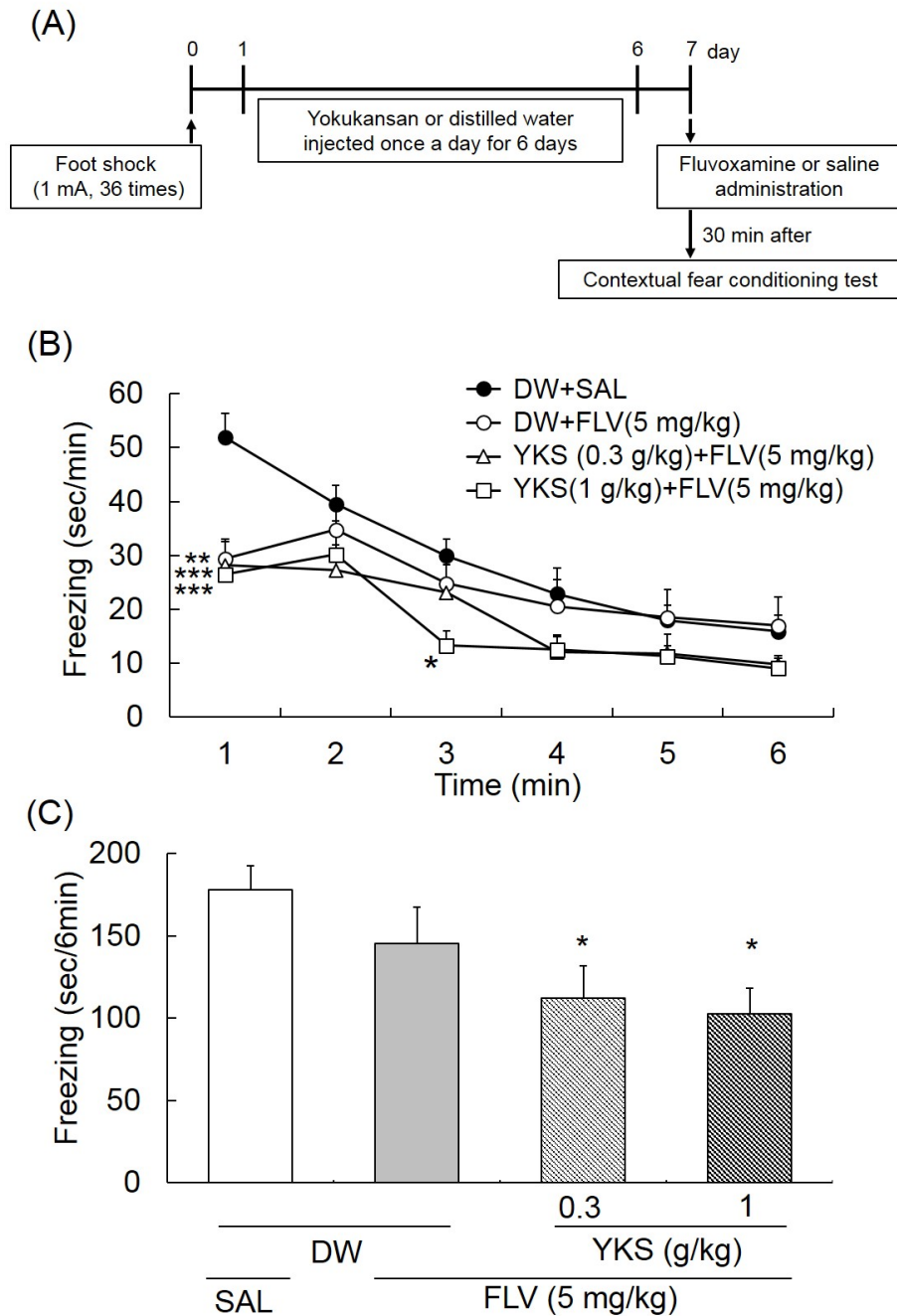


Fig. 3. A: Experimental schedule. B and C: Influence of repeated pretreatment with yokukansan for the effect of fluvoxamine on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. DW: distilled water, SAL: saline, YKS: yokukansan, FLV: fluvoxamine. Values are the mean \pm SEM of 10-11 mice. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. DW+SAL group.

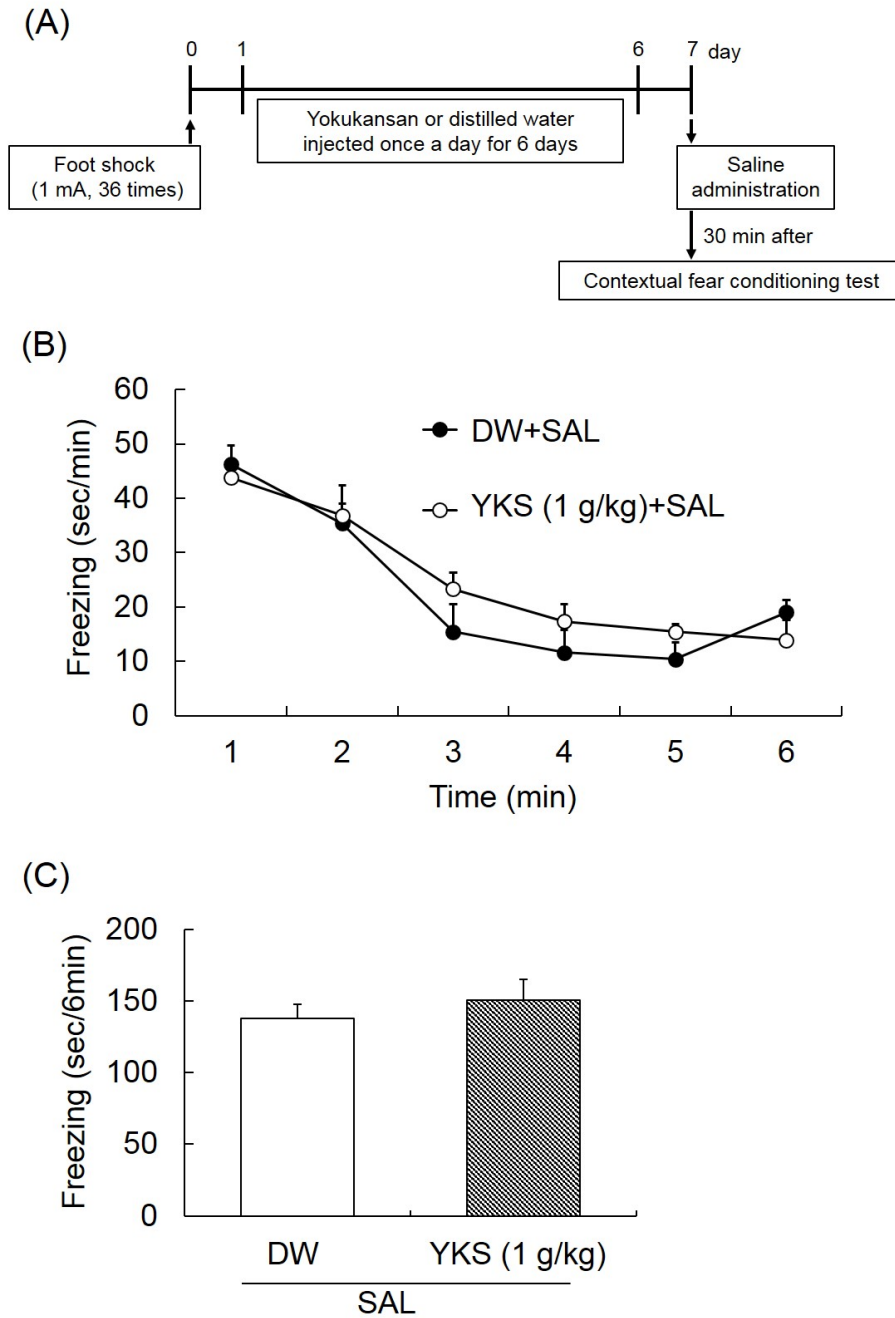


Fig. 4. A: Experimental schedule. B and C: Effects of yokukansan on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. DW: distilled water, SAL: saline, YKS: yokukansan. Values are the mean \pm SEM of 8-10 mice.

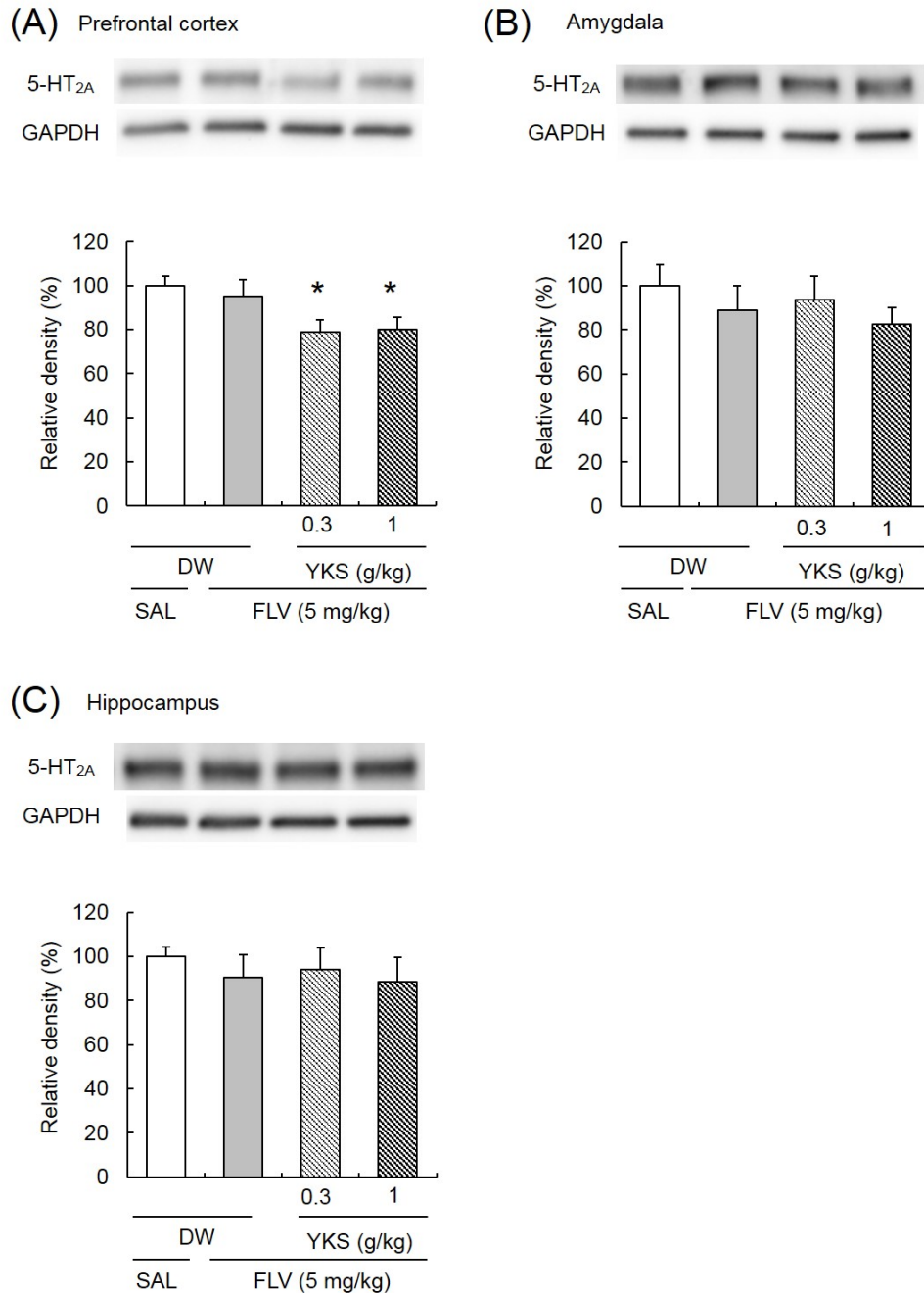


Fig. 5. Effects of co-treatment with yokukansan and fluvoxamine on the expression of 5-HT_{2A} receptor in the prefrontal cortex (A), amygdala (B) and hippocampus (C). Photographs show representative western blots of 5-HT_{2A} receptor. Graphs show the relative densities of bands. Quantitative data were normalized and expressed as a percentage of the expression of 5-HT_{2A} receptor in the DW plus SAL group. DW: distilled water, SAL: saline, YKS: yokukansan, FLV: fluvoxamine. Values are the mean \pm SEM of 9-11 mice. * p <0.05 vs. DW+SAL group.

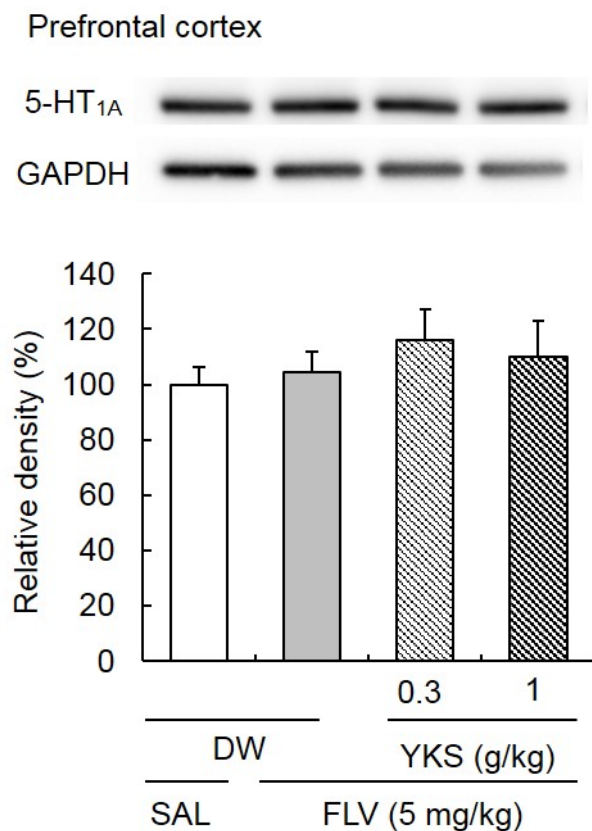


Fig. 6. Effects of co-treatment with yokukansan and fluvoxamine on the expression of 5-HT_{1A} receptor in the prefrontal cortex in mic. Photographs show representative western blots of 5-HT_{1A} receptor. Graph shows the relative densities of bands. Quantitative data were normalized and expressed as a percentage of the expression of 5-HT_{1A} receptor in the DW plus SAL group. DW: distilled water, SAL: saline, YKS: yokukansan, FLV: fluvoxamine. Values are the mean \pm SEM of 9-11 mice.

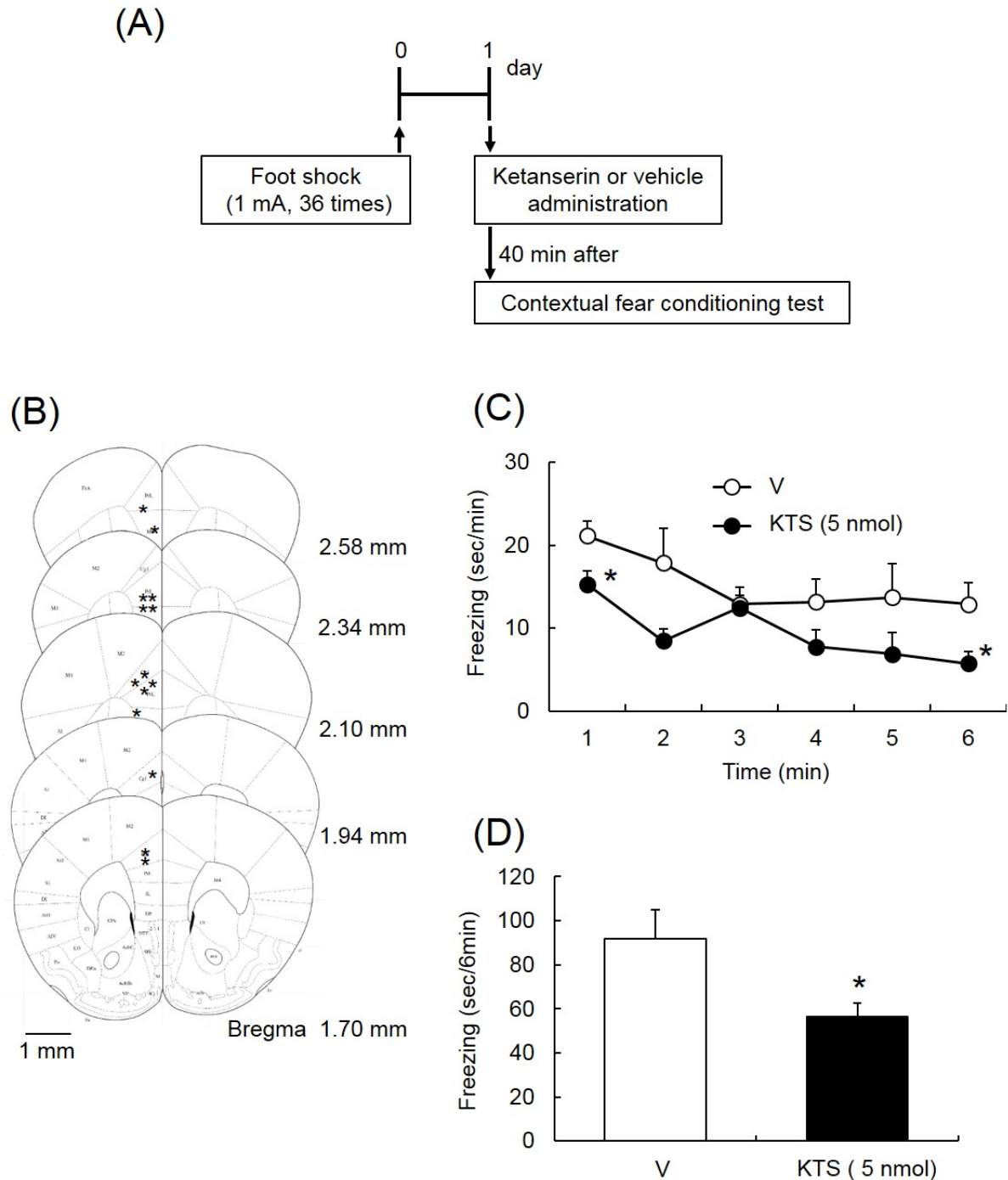


Fig. 7. A: Experimental schedule. B: Schematic diagram of microinjection sites within the prefrontal cortex of mice used in the present study. The injection sites are indicated by asterisks. C and D: Effects of microinjection of ketanserin into the medial prefrontal cortex on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. V: vehicle, KTS: ketanserin. Values are the mean \pm SEM of 7 mice. * p <0.05 vs. V group.

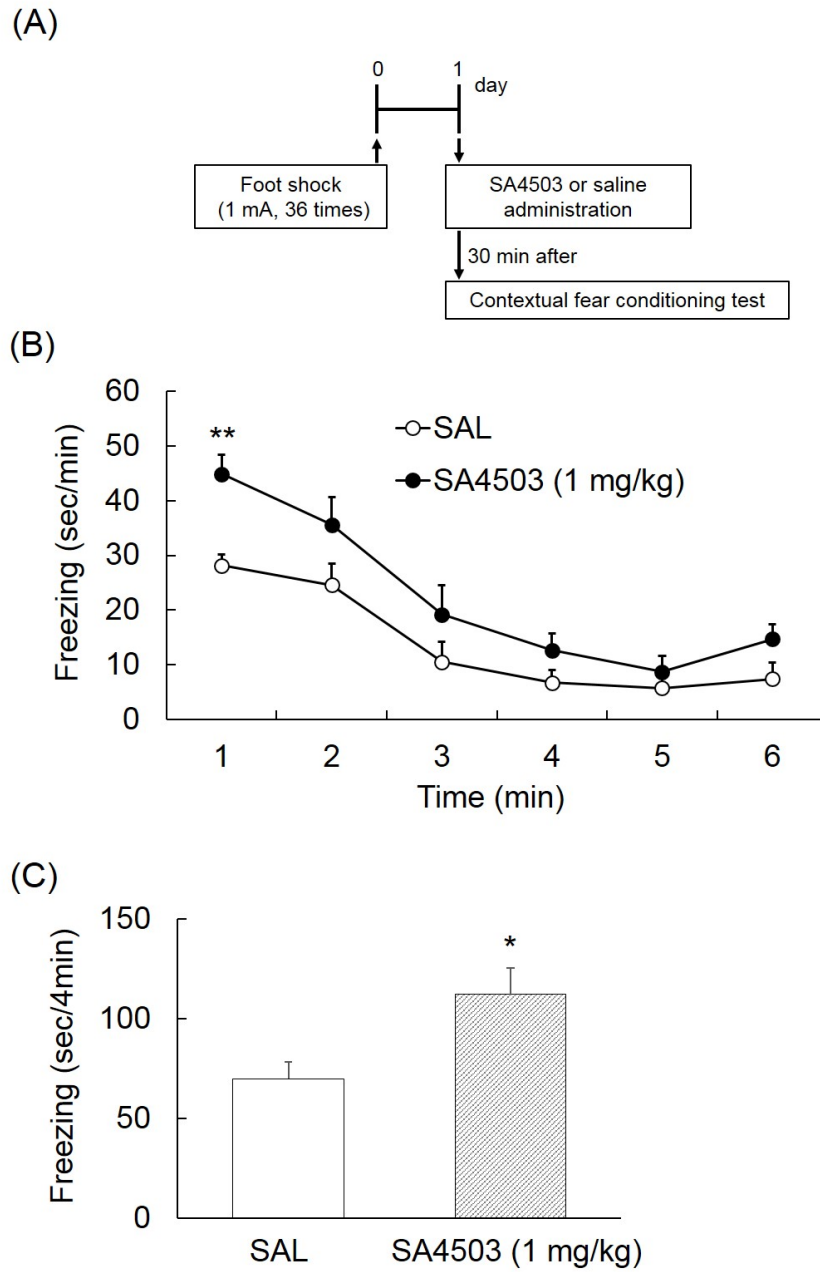


Fig. 8. A: Experimental schedule. B and C: Effects of SA4503 on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. Values are the mean \pm SEM of 9-10 mice. SAL: saline. * p <0.05, ** p <0.01 vs. saline group.

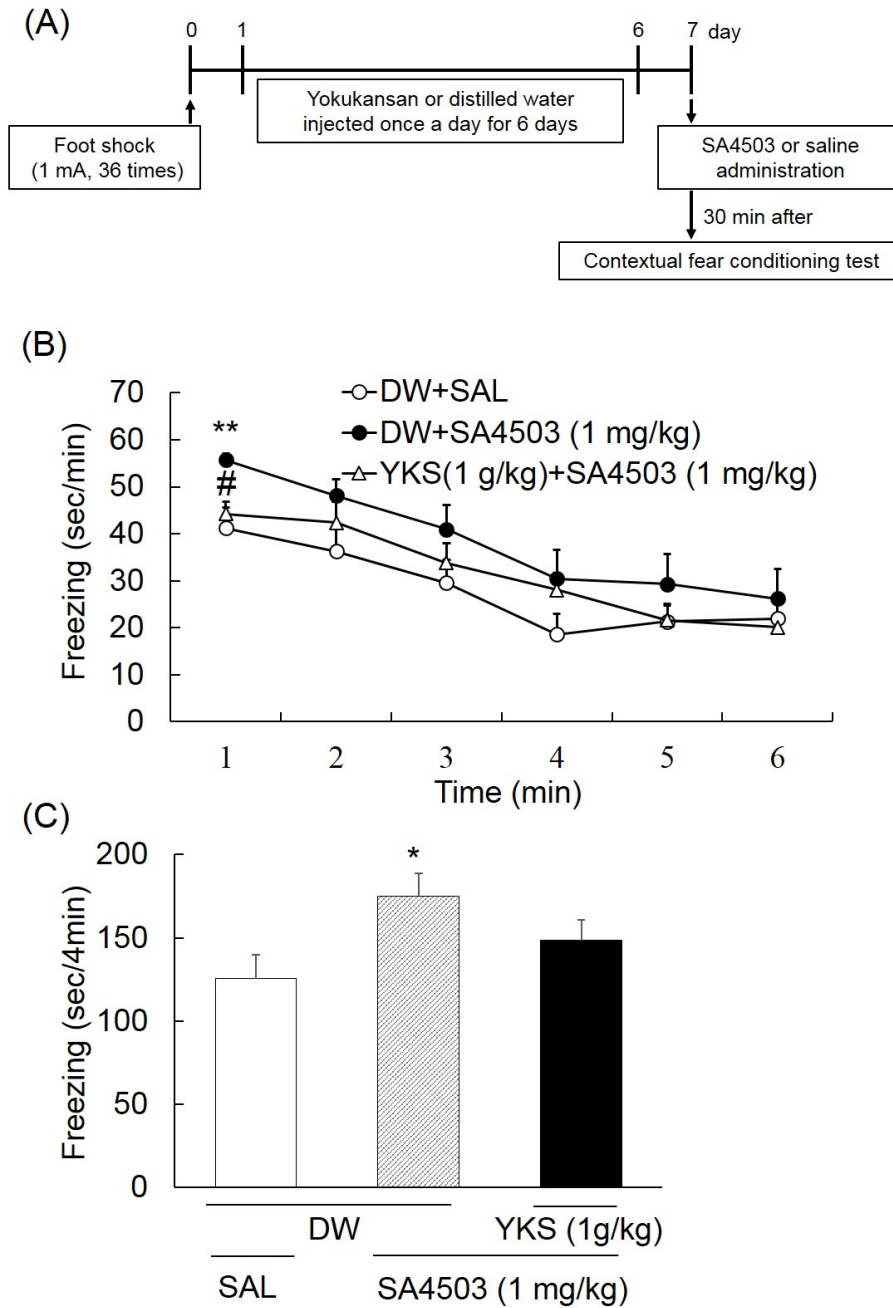


Fig. 9. A: Experimental schedule. B and C: Influence of repeated pretreatment with yokukansan for the effect of SA4503 on the time-course of changes (B) in and total duration (C) of freezing behavior induced by contextual fear conditioning in mice. DW: distilled water, SAL: saline, YKS: yokukansan. Values are the mean \pm SEM of 10-11 mice. * p <0.05, ** p <0.01 vs. DW+SAL group. # p <0.05 vs. DW+SA4503 (1 mg/kg) group.

【考察】

本研究において、恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動は、テスト前に選択的 5-HT 再取り込み阻害薬であるフルボキサミンを投与することにより、用量依存的かつ有意に抑制された (Fig. 2)。この結果は、これまでの先行研究における結果^{6,10)}と一致するものであり、5-HT の再取り込み阻害により脳内 5-HT 濃度を高めることが、不安の軽減に有効であることを示唆する。また、この仮説は、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬がうつ病のみならず、不安障害の治療にも臨床使用されている事実²⁾からも裏付けられる。

これまでに、恐怖条件付けストレス反応の発現には、海馬、内側前頭前皮質および扁桃体間の神経ネットワークが重要な役割を担っており、これら脳部位には 5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体がともに高発現していることが明らかにされている^{41,42)}。一般に 5-HT は、作用する 5-HT 受容体のサブタイプにより異なった生理作用を示すと考えられるが、5-HT_{1A} 受容体刺激は恐怖条件付けストレス反応を抑制する一方、5-HT_{2A} 受容体刺激は増強させることから^{6,43)}、両 5-HT 受容体サブタイプは不安の発現機構において相反する役割を担っていることが示唆される。このことを踏まえると、フルボキサミンの抗不安様効果の発現には、少なくとも一部は 5-HT_{1A} 受容体の活性化が関与しているが、5-HT_{2A} 受容体の活性化はむしろ、フルボキサミンの抗不安様効果の発現を抑制していることが示唆される。

次に、恐怖条件付けストレス反応に対するフルボキサミンおよび抑肝散の併用効果について検討した。これまでに、ラットに抑肝散を 14 日間反復投与することにより、恐怖条件付けストレス試験におけるすくみ行動が抑制されるとの報告がある²⁹⁾。一方、本研究の目的は、フルボキサミンに対する抑肝散の増強効果に関する検証であることを踏まえ、抑肝散の用量および投与期間は、単独投与では有意な効果を示さないと想定された 6 日間に設定した。その結果、フルボキサミンおよび抑肝散の併用効果に関する検討では、恐怖条件付けの翌日よりテストの前日まで抑肝散を 6 日間反復投与したマウスにおいて、単独では無効な用量のフルボキサミンをテスト前に投与することにより、すくみ行動の有意な抑制が認められた (Fig. 3)。一方、抑肝散の反復投与のみで

は、すくみ行動の発現に特筆すべき影響を及ぼさなかった (Fig. 4)。これらのことから、恐怖条件付けストレス反応に対するフルボキサミンの抑制効果は、抑肝散を併用することにより増強することが明らかとなった。近年、抑肝散は、重篤な副作用を発現させることなく、アルツハイマー病をはじめとする認知症患者が示す不安、幻覚、興奮、睡眠障害などの行動および心理的症状 (BPSD) を改善することが明らかとなっている¹⁹⁾。また、ごく最近では、抑肝散が鎮静効果を示すことなく、術前の不安を改善することも報告されており^{44,45)}、これらの臨床的知見は、モデル動物の不安様行動を抑肝散が抑制するという基礎研究の結果²⁸⁻³⁰⁾により裏付けられている。これらの報告に加えて、抑肝散の単独投与では有意な抑制効果が得られなかったものの、本研究で得られた知見は、不安障害に対するフルボキサミンの治療効果の増強という、抑肝散の新たな臨床的有用性を示唆するものと考えられる。

5-HT が作用する 14 種類の 5-HT 受容体サブタイプ²⁴⁾のうち、特に情動性の調節や情動障害との関連が強く示唆されている受容体としては、5-HT_{1A} および 5-HT_{2A} 受容体が考えられる⁴⁶⁾。そこで本研究では、恐怖条件付けストレス試験終了直後のマウスの脳内における、5-HT_{1A} および 5-HT_{2A} 受容体の発現量について検討した。その結果、すくみ行動の有意な抑制が認められた抑肝散とフルボキサミンの併用群において、前頭前皮質特異的かつ有意な 5-HT_{2A} 受容体発現量の減少が認められた (Fig. 5)。本知見は、抑肝散をマウスに反復経口投与することにより、前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現量が減少するという以前の報告²¹⁾を支持するものである。また、別の報告では、隔離飼育ストレスにより誘発される前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現増加が、抑肝散の反復投与により抑制されることが示されていることから²³⁾、抑肝散が前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体機能を低下させる作用を有することが示唆される。前頭前皮質の 5-HT_{2A} 受容体が不安の発現において重要な役割を果たしていると考えられている⁴⁷⁾ことを考慮すると、本研究結果は、精神障害に対する抑肝散の有効性のメカニズムを説明する一助になるかもしれない。すなわち、以前の遺伝子改変動物を用いた検討では、5-HT_{2A} 受容体ノックアウトマウスで不安様行動が抑制され、この情動性の異常は前頭前皮質特異的に 5-HT_{2A} 受容体を発現させることにより正常化することが示されている⁴⁸⁾。また、高架式十字迷路試験および恐怖条件付けストレス試験を

用いた行動薬理的検討では、5-HT_{2A} 受容体拮抗薬であるケタンセリンを内側前頭前皮質へ局所投与することで、抗不安様効果が発現することが報告されている⁴⁹⁾。本研究においても、テスト前に内側前頭前皮質に選択的5-HT_{2A} 受容体拮抗薬であるケタンセリンを局所投与することにより、恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動が抑制されることを確認できたため (Fig. 7)、内側前頭前皮質に発現する 5-HT_{2A} 受容体は、不安の発現に深く関わっていることが示唆される。また、5-HT_{2A} 受容体の減少や遮断は、フルボキサミンによりシナプス間隙において増加した 5-HT が、抗不安効果の発現に重要と考えられる 5-HT_{1A} 受容体により効率的に結合できる環境を作り上げることになる。これらのことを踏まえると、抑肝散の反復投与により誘発される内側前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の減少が、フルボキサミンの抗不安様効果の発現増強に関与していることが示唆される (Fig. 10)。尚、抑肝散の構成生薬のうち、5-HT_{2A} 受容体の発現減少は、柴胡、釣藤鈎、当帰および甘草の協力作用によるものであることが明らかにされている²³⁾。したがって、本研究で認められた不安に対する抑肝散とフルボキサミンの抑制効果にも、これらの構成生薬が関与している可能性が推察される。尚、ケタンセリンの内側前頭前皮質投与の効果を検討した結果 (Fig. 7) では、本研究における他の検討結果と比較して、溶媒投与群におけるすくみ行動の出現時間が短かった。その理由としては、内側前頭前皮質に薬物投与用のガイドカニューレを挿入した手術の影響、薬物投与時に施した吸入麻酔の影響、あるいは溶媒に含まれる高濃度の Tween 80 の影響等が考えられる。

さらに、前頭前皮質における 5-HT_{1A} 受容体の発現量についても検討したところ、5-HT_{2A} 受容体とは異なり特筆すべき変化が認められなかった (Fig. 6)。しかしこれまでに、抑肝散の反復投与は、マウスの前頭前皮質における 5-HT_{1A} 受容体の mRNA やタンパク質の発現量には影響を与えないものの、受容体結合実験により測定される 5-HT_{1A} 受容体量は増加させることが見いだされている²²⁾。また、行動薬理的検討では、前頭前皮質の 5-HT_{1A} 受容体が発現に関わっていると考えられている 5-HT_{1A} 受容体作動薬により誘発される立ち上がり行動⁵⁰⁾が、抑肝散の反復投与により増加することが報告されている²²⁾。さらに、抑肝散およびその構成生薬の釣藤鈎に含まれる活性物質である geissoschizine methyl ether は、5-HT_{1A} 受容体に対する部分作動活性を有することも

明らかにされている^{20,51)}。一方、5-HT_{1A}受容体の活性化は、一貫して恐怖条件付けストレス反応におけるすくみ行動を抑制することが知られている⁶⁾。したがって、抑肝散によるフルボキサミンの抗不安様効果の増強に、前頭前皮質における5-HT_{1A}受容体の活性化が関与している可能性も考えられるが、この仮説を証明するにはさらなる詳細な検討が必要である。

本研究では、フルボキサミンがシグマ-1受容体に対して強い作動活性を有すること¹¹⁾を考慮して、選択的シグマ-1受容体作動薬^{52,53)}であるSA4503が、マウスの恐怖条件付けストレス反応に及ぼす影響についても検討した。その結果、恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動は、テスト前にSA4503を投与することにより増強した (Fig. 8)。したがって、シグマ-1受容体が、恐怖条件付けストレス反応の発現を促進的に制御している可能性が示唆された。これまでに、シグマ-1受容体は、認知機能において重要な役割を担っていることが報告されている。例えば、フルボキサミンはマウスにおいて、グルタミン酸NMDA受容体依存性の認知機能を促進させるが、この効果はシグマ-1受容体拮抗薬の併用により抑制される⁵⁴⁾。また、最近では、ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬により誘発されるマウスの認知機能障害が、シグマ-1受容体機能を促進させるアロステリックモジュレーターである(4R,5S)-2-(5-methyl-2-oxo-4-phenyl-pyrrolidin-1-yl)-acetamide (E1R)により改善することが見出されている⁵⁵⁾。恐怖条件付けにより誘発されるマウスのすくみ行動は、条件付けにより獲得した恐怖記憶を想起することにより生じる情動反応である⁴⁾ことを踏まえると、本研究結果より、シグマ-1受容体は認知機能の調節に加えて、不安の発現につながる恐怖記憶の想起にも関与している可能性が示唆される。

一方、抑肝散を恐怖条件付けの翌日よりテストの前日まで6日間反復投与したマウスでは、SA4503によるすくみ行動の増強効果は有意に抑制された (Fig. 9)。したがって、抑肝散の反復投与により、シグマ-1受容体を介した情報伝達の低下が生じる可能性が示唆された。また、フルボキサミンがシグマ-1受容体に対する作動活性を有する¹¹⁾ことを考慮すると、このシグマ-1受容体の機能低下が、恐怖条件付けストレス反応に対する抑肝散とフルボキサミンとの相互作用のメカニズムの一部に関与している可能性が考えられる (Fig. 10)。抑肝散の反復投与がシグマ-1受容体機能に影響を及ぼすメカニズムについては未だ不明であるが、1つの可能性としては、抑肝散が

5-HT_{1A} 受容体に対して有する部分作動活性の関与が推察される。実際に、近年の行動および神経化学的検討では、5-HT_{1A} 受容体とシグマ-1 受容体が前頭前皮質において相乗的に相互作用し、脳機能に影響を及ぼしていることを示唆する知見が得られている^{56,57)}。したがって、抑肝散の反復投与により 5-HT_{1A} 受容体が持続的に刺激された結果、代償的にシグマ-1 受容体のダウンレギュレーションが生じた可能性が推察されるが、この仮説の証明には今後さらなる詳細な検討が必要である。

【総括】

フルボキサミンは、シナプス前膜に存在する 5-HT トランスポーターに選択的に作用し、5-HT 神経終末への 5-HT 再取り込みを阻害する。これによりシナプス間隙の 5-HT 濃度が上昇し、5-HT_{1A} 受容体および 5-HT_{2A} 受容体が刺激される。恐怖条件付けストレス反応の発現に対して、5-HT_{1A} 受容体の刺激は抑制的に働くが、反対に、5-HT_{2A} 受容体の刺激は促進的に働く。また、フルボキサミンは、シグマ-1 受容体を直接刺激し、この作用も恐怖条件付けストレス反応の発現に対して促進的に働く。フルボキサミンの抗不安様効果は、これら多様な薬理作用が統合された結果と考えられる。

恐怖条件付けストレス反応に対する抑肝散とフルボキサミンの併用効果のメカニズムに関する模式図を Fig. 10 に示した。抑肝散の反復投与は、前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体の発現を抑制し情報伝達を低下させる。また、シグマ-1 受容体を介した情報伝達も、抑肝散の反復投与により低下する。これら、恐怖条件付けストレス反応の発現を促進的に制御している受容体の役割が減弱することにより、フルボキサミンの抗不安様効果が増強すると考えられる。

以上、本研究の結果より、抑肝散の反復投与は前頭前皮質における 5-HT_{2A} 受容体を介した情報伝達の低下を引き起こすことにより、フルボキサミンの抗不安様効果を増強することが示唆された。また、他のメカニズムとして、シグマ-1 受容体のダウンレギュレーションが一部関与している可能性も併せて示唆された。したがって、既存の薬物治療では十分な効果が得られない不安障害の患者に対して、フルボキサミンと抑肝散の併用投与が有用である可能性が考えられる。

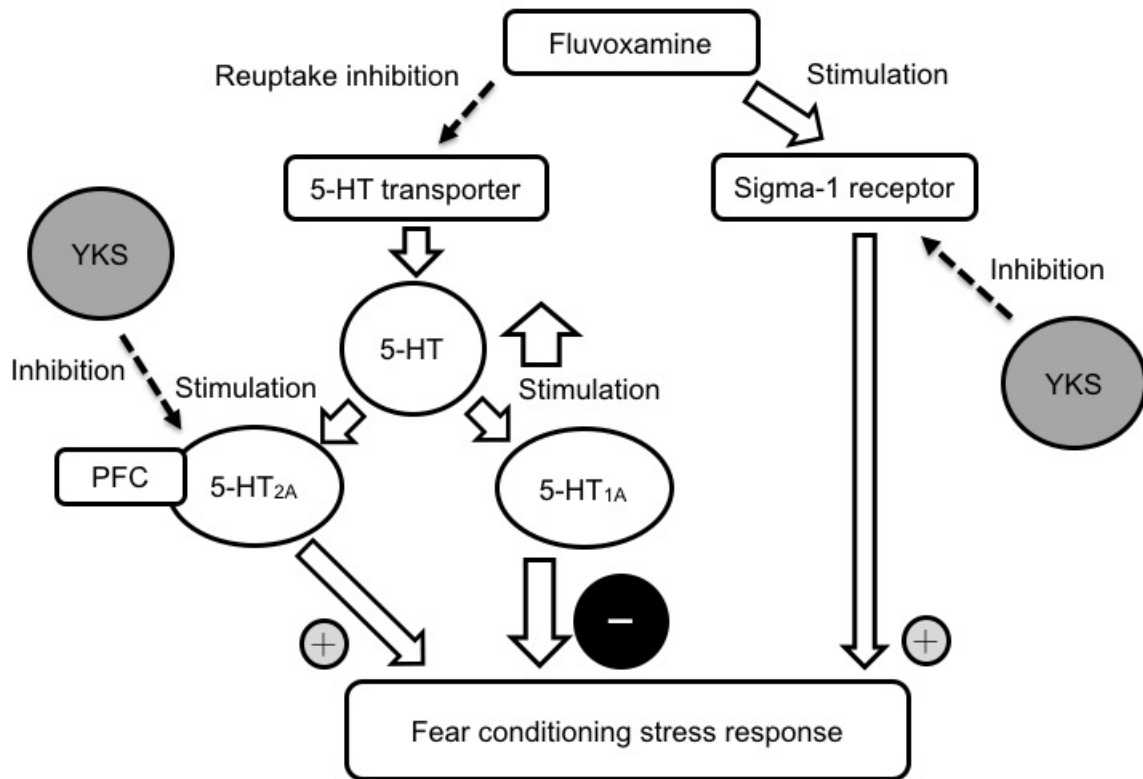


Fig. 10. Schematic diagram on the mechanism of the combined effect of fluvoxamine and yokukansan on fear conditioning stress response in mice. PFC: prefrontal cortex, YKS: yokukansan. +: acceleration of fear conditioning stress response (anxiogenic action). -: suppression of fear conditioning stress response (anxiolytic action).

【出版目録】

本論文は、次の論文を基礎とするものである。

1. Rintaro Ohno, Hiroko Miyagishi, Minoru Tsuji, Atsumi Saito, Kazuya Miyagawa, Kazuhiro Kurokawa, Hiroshi Takeda. Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, enhances the anxiolytic effect of fluvoxamine and reduces cortical 5-HT_{2A} receptor expression in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 216, 89-96, 2018.
2. Rintaro Ohno, Hiroko Miyagishi, Minoru Tsuji, Atsumi Saito, Kazuya Miyagawa, Kazuhiro Kurokawa, Hiroshi Takeda. Repeated treatment with yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, suppresses the increase in the conditioned fear response induced by sigma₁ (σ_1) receptor agonist in mice. *Journal of the International University of Health and Welfare*, in press.

【謝辞】

本稿を終えるに臨み、本研究に際し、終始厳しく暖かいご指導とご助言を賜り、本稿のご閲覧を頂きました国際医療福祉大学 薬学部 薬理学分野の武田 弘志 教授に深く感謝しますとともに、謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、格別たるご指導とご鞭撻を賜り、本稿のご校閲を頂きました 辻 稔 教授 に深く感謝いたしますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行ならびに本稿作成にあたり、適切なお助言とご指導さらにはお心強い励ましを賜りました 宮岸 寛子 助教に深く感謝いたしますとともに、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、お心強い励ましとご協力を賜りました 宮川 和也 講師、黒川 和宏 講師ならびに 齋藤 淳美 助手に深く感謝しますとともに、心より御礼申し上げます。

本研究にあたり、多大なご協力を賜りました、大学院生ならびに卒論生諸氏に深く感謝申し上げます。

本研究により失われた多くの命に哀悼の意を表し、心よりご冥福を御祈り致します。

最後に、4年間の貴重な大学院生活の場を与えて下さり、いかなる時も慈しみの心を持って、温かく見守って下さった両親をはじめ、家族の皆様に心より感謝致します。

【引用文献】

- 1) Bauer EP. Serotonin in fear conditioning processes. *Behav. Brain Res.* 2015;277:68-77
- 2) Figgitt DP, McClellan KJ. Fluvoxamine. An updated review of its use in the management of adults with anxiety disorders. *Drugs.* 2000;60:925-954
- 3) Zohar J, Westenberg HG. Anxiety disorders: a review of tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors. *Acta Psychiatr. Scand. Suppl.* 2000;403:39-49
- 4) Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2006;30:188-202
- 5) Fanselow MS, Helmstetter FJ. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. *Behav. Neurosci.* 1988;102:233-243
- 6) Inoue T, Kitaichi Y, Koyama T. SSRIs and conditioned fear. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2011;35:1810-1819
- 7) Hashimoto S, Inoue T, Koyama T. Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. *Psychopharmacology.* 1996;123:182-186
- 8) Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, et al. Pretreatment with diazepam suppresses the reduction in defensive freezing behavior induced by fluvoxamine in the conditioned fear stress paradigm in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000;409:81-84
- 9) Miyamoto J, Tsuji M, Takeda H, et al. Characterization of the anxiolytic-like effects of fluvoxamine, milnacipran and risperidone in mice using the conditioned fear stress paradigm. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;504:97-103
- 10) Nishikawa H, Inoue T, Izumi T, et al. Koyama, T. Synergistic effects of tandospirone and selective serotonin reuptake inhibitors on the contextual conditioned fear stress response in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2007;17:643-650

- 11) Ishima T, Fujita Y, Hashimoto K. Interaction of new antidepressants with sigma-1 receptor chaperones and their potentiation of neurite outgrowth in PC12 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 2014;727:167-173
- 12) Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 2007;131:596-610
- 13) Alonso G, Phan V, Guillemain I, et al. Immunocytochemical localization of the sigma₁ receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 2000;97:155-170
- 14) Urani A, Roman FJ, Phan VL, et al. The antidepressant-like effect induced by sigma-1-receptor agonists and neuroactive steroids in mice submitted to the forced swimming test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;298:1269-1279
- 15) Hashimoto K, Fujita Y, Iyo M. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of fluvoxamine: role of sigma-1 receptors. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:514-521
- 16) Bermack JE, Debonnel G. The role of sigma receptors in depression. *J. Pharmacol. Sci.* 2005;97:317-336
- 17) Hashimoto K. Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication. *J. Pharmacol. Sci.* 2015;127:6-9
- 18) Ishikawa M, Ishiwata K, Ishii K, et al. High occupancy of sigma-1 receptors in the human brain after single oral administration of fluvoxamine: a positron emission tomography study using [¹¹C]SA4503. *Biol. Psychiatry* 2007;62:878-883
- 19) Matsuda Y, Kishi T, Shibayama H, et al. Yokukansan in the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum. Psychopharmacol.* 2013;28:80-86
- 20) Terawaki K, Ikarashi Y, Sekiguchi K, et al. Partial agonistic effect of yokukansan on human *Ethnopharmacol.* 2010;127:306-312

- 21) Egashira N, Iwasaki K, Ishibashi A, et al. Repeated administration of Yokukansan inhibits DOI-induced head-twitch response and decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors in the prefrontal cortex. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008;32:1516-1520
- 22) Ueki T, Mizoguchi K, Yamaguchi T, et al. Yokukansan increases 5-HT_{1A} receptors in the prefrontal cortex and enhances 5-HT_{1A} receptor agonist-induced behavioral responses in socially isolated mice. *Evid. Based Complement Alternat. Med;*2015;726471
- 23) Ueki T, Mizoguchi K, Yamaguchi T, et al. Yokukansan, a traditional Japanese medicine, decreases head-twitch behaviors and serotonin 2A receptors in the prefrontal cortex of isolation-stressed mice. *J. Ethnopharmacol.* 2015;166:23-30
- 24) Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002;71:533-554
- 25) Motta V, Maissonette S, Morato S, et al. Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology.* 1992;107:135-139
- 26) Griebel G. Variability in the effects of 5-HT-related compounds in experimental models of anxiety: evidence for multiple mechanisms of 5-HT in anxiety or never ending story? *Pol. J. Pharmacol.* 1996;48:129-136
- 27) Olivier B, Soudijn W, van Wijngaarden I. The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Prog. Drug. Res.* 1999; 52: 103-165
- 28) Mizoguchi K, Tanaka Y, Tabira T. Anxiolytic effect of a herbal medicine, yokukansan, in aged rats: involvement of serotonergic and dopaminergic transmissions in the prefrontal cortex. *J. Ethnopharmacol.* 2010;127:70-76
- 29) Yamaguchi T, Tsujimatsu A, Kumamoto H, et al. Anxiolytic effects of yokukansan, a traditional Japanese medicine, via serotonin 5-HT_{1A} receptors on anxiety-related behaviors in rats experienced aversive stress. *J. Ethnopharmacol.* 2012;143:533-539

- 30) Shoji H, Mizoguchi K. Brain region-specific reduction in c-Fos expression associated with an anxiolytic effect of yokukansan in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2013;149:93-102
- 31) Patterson B, Van Ameringen M. Augmentation strategies for treatment-resistant anxiety disorders: a systematic review and meta-analysis. *Depress Anxiety.* 2016;33:728-736
- 32) Mizukami K, Asada T, Kinoshita T, et al. A randomized cross-over study of a traditional Japanese medicine (kampo), yokukansan, in the treatment of the behavioural and psychological symptoms of dementia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2009;12:191-199
- 33) Tsuji M, Takeuchi T, Miyagawa K, et al. Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, alleviates the emotional abnormality induced by maladaptation to stress in mice. *Phytomedicine.* 2014;21:363-371
- 34) Nakatani Y, Tsuji M, Amano T, et al. Neuroprotective effect of yokukansan against cytotoxicity induced by corticosterone on mouse hippocampal neurons. *Phytomedicine.* 2014;21:1458-1465
- 35) Nunes-de-Souza V, Nunes-de-Souza RL, Rodgers RJ, et al. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behav. Brain Res.* 2008;187:72-79
- 36) Dobi A, Sartori SB, Busti D, et al. Neural substrates for the distinct effects of presynaptic group III metabotropic glutamate receptors on extinction of contextual fear conditioning in mice. *Neuropharmacology.* 2013;66:274-289
- 37) Takeda H, Tsuji M, Miyamoto J, et al. Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. *Psychopharmacology.* 2002;164:233-235
- 38) Paxinos G, Franklin K. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Second edition. Academic Press. 2001
- 39) Miyagishi H, Kosuge Y, Ishige K, et al. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in the spinal cord in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Sci.* 2012;118:225-236

- 40) Miyagishi H, Tsuji M, Saito A, et al. Inhibitory effect of yokukansan on the decrease in the hippocampal excitatory amino acid transporter EAAT2 in stress-maladaptive mice. *J Tradit Complement Med.* 2017;7:371-374
- 41) Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, et al. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol.* 1999;409:187-209
- 42) Parsey RV, Oquendo MA, Simpson NR, et al. Effects of sex, age, and aggressive traits in man on brain serotonin 5-HT_{1A} receptor binding potential measured by PET using [C-11]WAY-100635. *Brain Res.* 2002;954:173-182
- 43) Zhang G, Ásgeirsdóttir HN, Cohen SJ, et al. Stimulation of serotonin 2A receptors facilitates consolidation and extinction of fear memory in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology.* 2013;64:403-113
- 44) Arai Y, Kawanishi J, Sakakima Y, et al. The effect of the kampo medicine yokukansan on preoperative anxiety and sedation levels. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014;965045
- 45) Wada S, Inoguchi H, Hirayama T, et al. Yokukansan for the treatment of preoperative anxiety and postoperative delirium in colorectal cancer patients: a retrospective study. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2017;47:844-848
- 46) Jones BJ, Blackburn TP. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002;71:555-568
- 47) Aznar S, Klein AB, Regulating prefrontal cortex activation: an emerging role for the 5-HT_{2A} serotonin receptor in the modulation of emotion-based actions? *Mol Neurobiol.* 2013;48:841-853
- 48) Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, et al. Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science.* 2006;313:536-540
- 49) León, LA, Castro-Gomes V, Zárate-Guerrero S, et al. Behavioral effects of systemic, infralimbic and prelimbic injections of a serotonin 5-HT_{2A} antagonist in Carioca High- and Low-conditioned Freezing rats. *Front. Behav. Neurosci.* 2017;11:117

- 50) Bert B, Fink H, Hörtnagl H, et al. Mice over-expressing the 5-HT_{1A} receptor in cortex and dentate gyrus display exaggerated locomotor and hypothermic response to 8-OH-DPAT. *Behav. Brain Res.* 2006;167:328-341
- 51) Nishi A, Yamaguchi T, Sekiguchi K, et al. Geissoschizine methyl ether, an alkaloid in *Uncaria hook*, is a potent serotonin _{1A} receptor agonist and candidate for amelioration of aggressiveness and sociality by yokukansan. *Neuroscience.* 2012;207:124-136
- 52) Matsuno K, Nakazawa M, Okamoto K, et al. Binding properties of SA4503, a novel and selective sigma 1 receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 1996;306:271-279
- 53) Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology* 2004;174:301-319
- 54) Maurice T, Privat A. SA4503, a novel cognitive enhancer with sigma1 receptor agonist properties, facilitates NMDA receptor-dependent learning in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1997;328:9-18
- 55) Zvejniece L, Vavers E, Svalbe B, et al. The cognition-enhancing activity of E1R, a novel positive allosteric modulator of sigma-1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2014;171:761-771
- 56) Skuza G, Rogóz Z. Antidepressant-like effect of combined treatment with selective sigma receptor agonists and a 5-HT_{1A} receptor agonist in the forced swimming test in rats. *Pharmacol. Rep.* 2007;59:773-777
- 57) Ago Y, Hasebe S, Hiramatsu N, et al. Involvement of GABA_A receptors in 5-HT_{1A} and σ_1 receptor synergism on prefrontal dopaminergic transmission under circulating neurosteroid deficiency. *Psychopharmacology* 2016;233:3125-3134