

ゼブラフィッシュを用いた奥田脳神経薬の再評価

The reevaluation of the Okuda cranial nerve medicine by using a zebrafish

奥田正¹⁾²⁾, 守金大蔵¹⁾, 臧黎清¹⁾, 山田知美¹⁾, 西村訓弘¹⁾

*Tadashi Okuda¹⁾²⁾, Daizo Morikane¹⁾, Liqing Zang¹⁾, Tomomi Yamada¹⁾,
Norihiro Nishimura¹⁾*

1) 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻環境社会医学講座トランスレーショナル医科学

2) 奥田製薬株式会社

1) Translational Medical Science, Social and Environmental Medicine,

Graduate School of Medicine, Mie University

2) OKUDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 疾患モデルを評価系に利用するホール・アニマル・ドラッグ・スクリーニング法を適用することで奥田脳神経薬の薬効に記されていない肥満抑制効果について評価を行った。検討では、ゼブラフィッシュの肥満誘導課程に、奥田脳神経薬および奥田脳神経薬の各主成分を4週間投与することで肥満抑制効果を調べた。この結果、肝臓組織の Oil Red O 染色からサンソウニンが肝臓への脂肪沈着を抑制することが示唆された。長期間の販売実績によって安全性が立証されている奥田脳神経薬の再評価を行うことで、主成分として処方されている各成分に、これまで知られていなかった新たな薬効が保有されている可能性を示すことができた。

奥田脳神経薬は、1956(昭和31)年に奥田製薬株式会社より発売された生薬と洋薬の複合系の薬剤であり、耳鳴り、めまい、頭痛などに対して効果が認められている。奥田脳神経薬の鎮静作用は、主としてブロムワレリル尿素によるものと考えられているが、耳鳴り、めまいに対する作用機序は不明な点が多い。また、奥田脳神経薬は、ルチン、インヨウカク、サンソウニン、チョウトウ、グリセロリン酸カルシウム、サイシン、ニンジン末、プロバリン、シンイ末、テンナンショウ、含水カフェインを主たる構成成分として含有する複合系薬剤であり、鎮静作用以外にも確認されていない薬効を含んでいる可能性が推察される。このため本研究では、三重大学大学院医学系研究科にて確立している肥満モデル・ゼブラフィッシュを評価系として用いることで、奥田脳神経薬が保有する肥満抑制などの新たな機能を見出すこと

を試みた。肥満抑制効果などの新たな効果を見出すことができれば、奥田脳神経薬に新たな付加価値を創出する可能性がある。

本研究は、肥満モデル・ゼブラフィッシュに奥田脳神経薬を投与することで肥満ストレスに対する反応性を定量的に解析するとともに、鎮静作用以外の確認されていない薬効(肥満抑制等)について探索を行うことで、奥田脳神経薬の高付加価値化に寄与する新たな知見を得ることを目的として実施した。

方法

肥満ゼブラフィッシュの誘導

肥満ゼブラフィッシュを作出するための個体として生後3ヶ月齢の AB strain のメス個体を用いた。肥満モデル作成は、4週間の食餌抑制を施した後、6週間、高脂肪食を1日に3回与えることで、肥満誘導を行った。この誘導を

行う肥満ゼブラフィッシュに供試成分を肥満誘導 2 週間目から投与することで、供試成分による肥満に対する応答性を評価した。

供試成分を含有する餌の作製

奥田脳神経薬の用量である「大人(体重 60 kg)に対して 1 日に 10 錠(2700 mg)」を換算することでゼブラフィッシュ(体重 600 mg)への投与用量を算出した。換算値として算出したゼブラフィッシュ用の用量を基に、10 倍用量、100 倍用量の奥田脳神経薬、及び、奥田脳神経薬の各主成分がそれぞれ 100 倍用量となる供試成分含有餌を、グルテン、ヒカリクレストキャット粉末(味付け餌)、水を加えて混合し、固体状に成形し、 -80°C で一晩静置することで作製した。このように作製した供試成分含有餌をフリーズドライヤー DC400(ヤマト科学株式会社)で 1 日凍結乾燥し、乳鉢で 0.5~1 mm ほどに粉砕することで、ゼブラフィッシュへの投与用の各成分の供試成分含有粉餌とした。

供試成分の評価

4 か月齢のゼブラフィッシュを 15 群(正常コントロール、肥満コントロール、ルチン、インヨウカク、サンソウニン、チョウトウ、グリセロリン酸カルシウム、サイシン、ニンジン末、プロバリン、シンイ末、テンナンショウ、含水カフェイン、10 倍量奥田脳神経薬、100 倍量奥田脳神経薬)、各 5 匹に分け、別々の水槽で飼育した。肥満誘導開始から 2 週間後から、コントロール群へはグルテンと、ヒカリクレストキャット粉末の練り餌を投与し、それ以外は各群に各々の薬剤を練り込んだ餌を 1 日 3 回とし、4 週間与えた。

肥満誘導食の摂食量測定

供試成分等による摂食への影響を確認するために試験期間中の各試験群における高脂肪食の摂食量を測定した。高脂肪食原液中の

個数を顕微鏡下で計数し、この値から摂食後の各水槽水に含まれる高脂肪食残数を差し引くことで摂取率を算出した。

体重、BMI の測定

肥満誘導時(0 週)から毎週の体重、体長を測定した。体重は検体の水分を拭き取った後、電子天秤で測定し、体長は検体の頭部から尾部までを測定した。測定した体重、体長から体重増加率および BMI 増加率を算出した。

血液生化学分析

各検体から Heparin をコートしたガラスキャピラリーで約 3 μL を採血した。このうち 1 μL から、グルテスト Neo センサー(三和化学研究所)によって血糖値を測定した。残りの 2 μL から、トリグリセライドキット(L タイプワコー TG・M:和光純薬工業)、LDL コレステロールキット(L タイプワコー LDL-C・M:和光純薬工業)を用いることで、トリグリセライド濃度、LDL 濃度を測定した。なお、採血後の検体は開腹し 4%ホルマリン固定液にて 4°C で一晩保存した。

肝臓組織の脂肪染色

各検体から肝臓の連続切片を、クリオスタット HM550(Microm)を用いて作製した。肝臓は乗法に従い、Oil Red O で染色した。染色後の肝臓組織は、Aquatex(メルク社)を用いて封入し、顕微鏡(Olympus BX51)下で観察した。

統計解析

体重増加率、BMI 増加率、摂食量、血液生化学分析において肥満コントロールと各薬剤投与群でマンホイットニー U 検定を行った。

結果と考察

供試成分による摂食量への影響

供試成分投与前で肥満誘導群のいずれも

約 8 割を摂取しており、各個体群の摂食意欲に大きな差はなかった。同様に、供試成分投与後で食欲が大きく減退した個体群は見られず、各投与成分による食欲抑制の有意差は認められなかった。以上から、本試験群において有意に食餌誘導による肥満形成が行われていることが確認された。

供試成分による体重増加への影響

体重増加の比較からは、肥満誘導開始から 2 週目において正常コントロール群の体重(約 0.30g) に対して、全ての肥満誘導群が有意に体重増加(約 0.45g)し、試験群での肥満誘導に成功していることが確認できた(Fig.1-A)。供試成分投与後(2~6 週)の体重増加率の比較からは、テンナンショウ、グリセロリン酸カルシウムを供与した個体群で体重増加が低下することが確認された(Fig.1-B)。

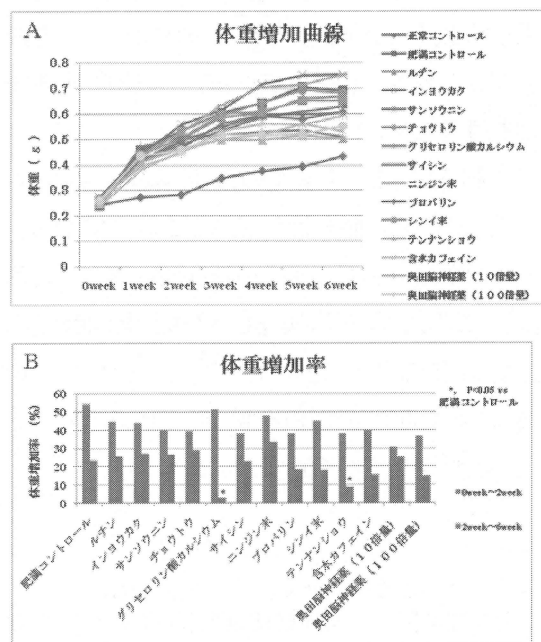


Fig.1 各群の体重増加

各個体の BMI は、供試成分投与前(0~2 週)に正常コントロール群で約 0.30g/cm²、肥満誘導群で約 0.40g/cm² であり、2 週間で有

意に肥満誘導されていることが BMI 測定値からも確認された。グリセロリン酸カルシウム、プロバリン、シイタケ末、テンナンショウ、含水カフェイン、奥田脳神経薬(100 倍)の投与群が、肥満コントロールに比較して BMI 増加率が有意に低いことが確認され、これらの成分が BMI 増加を抑制する可能性が示唆された。

血液生化学分析

実験終了時の各検体から採血を行い、血中の血糖値、LDL 濃度、TG 濃度を各群 n=5 で測定した。尚、奥田脳神経薬(10 倍量)は 5 週目の体長体重測定時に死亡したため n=4 となった。正常コントロール群と肥満コントロール群間、および肥満コントロール群と供試成分投与群間でマンホイットニー U 検定を行った。この結果、肥満コントロールに対し、テンナンショウ、奥田脳神経薬(100 倍量)において血糖値させる傾向が確認された。LDL の分析結果からは、肥満コントロールに対し、チョウトウは LDL 濃度を低下させ、テンナンショウは LDL 濃度を増加させることが分かった。トリグリセライド(TG)の分析からは、正常コントロールと肥満コントロール間、及び、肥満コントロールと各成分の間のいずれでも有意差は認められなかった。

肝臓組織の脂肪染色

実験終了後の各検体より採取した肝臓組織標本に対して Oil Red O 染色を行った。各群で 3 検体ずつ染色した。正常コントロール(Fig.2 参照)に対し、肥満コントロール(Fig.3 参照)では肝臓組織細胞内に脂肪が顕著に沈着していることが観察された。一方、供試成分投与群では、サンソウニンを投与した個体において肝臓組織細胞への脂肪沈着がほとんど観察されず、サンソウニンによる肝臓組織への脂肪沈着に対する抑制作用が示唆された(Fig.3)。

尚、脂肪沈着の判定は3検体中2検体が一致するものとした。

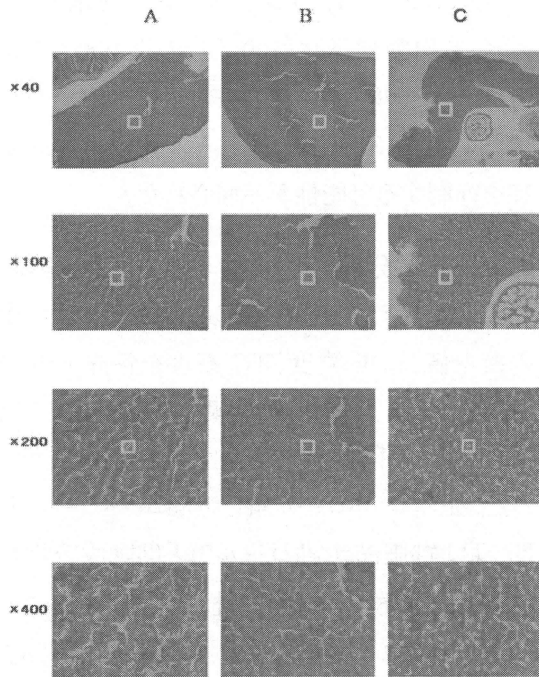


Fig.2 正常コントロールの肝臓脂肪染色

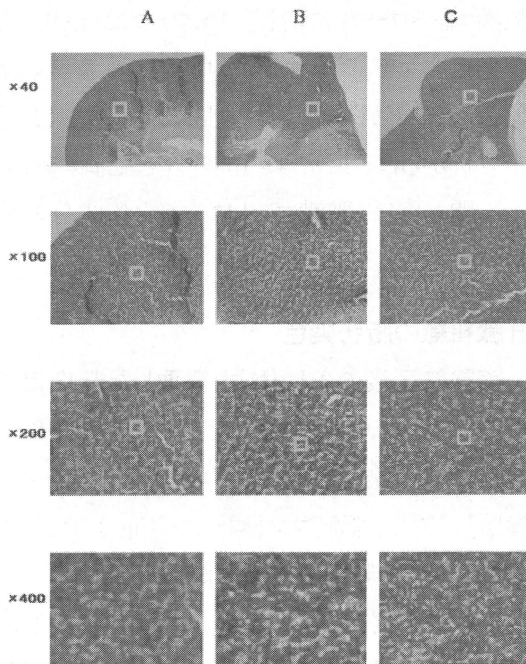


Fig.3 肥満コントロールの肝臓脂肪染色

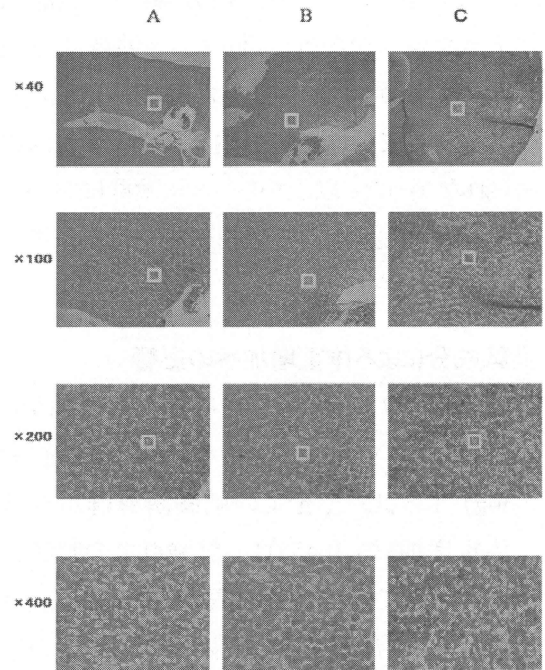


Fig.3 サンソウニン供試群の肝臓脂肪染色

以上のように、奥田脳神経薬の肥満抑制効果を再検証した結果、新しい知見として、主成分であるサンソウニンが肝臓への脂肪沈着を抑制することが見出された。

本研究では、長期間の販売実績がある「古い薬」でも再評価を行うことで、これまで知られていなかった新たな薬効が見出されることを示した。このような新事実をしっかりと現代医学の評価方法によって裏付けていくことが、「古い薬」に新たな付加価値を賦与し、ビジネスの拡大へと繋がっていくかもしれない。

謝辞

本研究は、全国中小企業団体中央会のものづくり中小企業製品開発等支援補助金(実証等支援事業)の支援を基に行ったものであり、ここに感謝申し上げます。