

ラフマ葉の睡眠・記憶への調節作用

臨床ではラフマ葉を主に高血圧の治療に使われている^[1]。近年の研究ではラフマ葉エキス中に色々な薬用効果の成分がある^[2-4]。高脂血症と動脈硬化^[5]、血管内皮細胞障害の保護^[6]、抗うつ^[7]などの作用は報告された。ラフマ葉抗うつ作用は、脳内モノアミン系伝達物質と monoamine oxidase 活性に関与していることが報告されている^[8-10]。本研究では、ラフマ葉エキスを用いて動物の睡眠と記憶機能への作用を観察し、ラフマ葉エキスの中樞神経に対する作用を分析したものである。

一. 研究目的

保健食品機能評価の動物実験法により、ラフマ葉エキスの睡眠及び記憶機能への影響を確認すること。

二. 実験材料

1.1 被験物及び試薬

ラフマ葉エキス：褐色粉末、和漢生薬研究所提供。ペントバルビタールナトリウム(pentobarbital sodium)、上海化学試薬公司、ロット番号：F2030816。亜硝酸ナトリウム、上海試薬一廠、ロット番号：840809。Scopolamine Butylbromide、上海禾豊製薬公司、ロット番号：960513。5-HT、Sigma 社、ロット番号：097K1450。1, 2-Phthalic dicarboxaldehyde、上海五聯化工廠、ロット番号：20080301。L-Cysteine、上海康達アミノ酸廠、ロット番号：920305。EDTA-Na₂、蘇州金城試薬廠、ロット番号：850320。

1.2 動物

ICR マウス、♂、清潔級、体重 18-23g、許可番号：SCXK(浙)2003-0001

Balb/c マウス、♂、清潔級、体重 18-22g、許可番号：SCXK(浙)2003-0001

1.3 主要設備

DS-2 条件反射測定装置、浙江寧海白石薬検機器廠。

YLS-IA マルチマウス動き記録装置、山東省医学科学院設備供給社。

SMG-2 水迷路装置 (行動解析ソフト装備)、中国アカデミー薬物研究所。

RF-540 蛍光分光光度計、島津製作所。

三. 研究結果

(一) ラフマ葉エキスの鎮静、睡眠誘導作用の研究

文献により、ラフマエキスの中樞神経への作用範囲は 60~200mg/kg^[11-12]。エキスの抽出純度などを考慮し、当実験の投与量を 0.25、0.5、1.0g/kg に設定し、実験結果に従って調整する。

1. マウスの活動への影響

ICR マウス 60 匹、♂、体重 21~23g、無作為に対照組、ラフマ多量組 (1g/kg)、ラフマ中量組 (0.5g/kg)、ラフマ少量組 (0.25g/kg) にし、15 匹/組。溶液投与量 20ml/kg、対照組に同量の生理食水を投与する。1 回目投与後、40 日連続投与、最終回 1 時間後、マウスの活動 (5min) を YLS-1A マルチマウス動き記録装置で測定する。

結果：ラフマ各組のマウス活動は、1 回投与及び 40 日連続投与による影響が見られなかった。多量投与組の体重減少は現われた。

表1.ラフマ葉エキスのマウス活動への影響 X±SD, n=15

組分け	投与 40 日目 体重 (g)	1 日投与 活動回数	40 日連続投与 活動回数
対照組	33.8±2.2	207±43	206±38
ラフマ多量組	30.9±2.7*	195±41	208±28
ラフマ中量組	33.1±1.7	222±36	207±31
ラフマ少量組	34.0±1.6	210±31	189±37

*P<0.05、対照組と比べ

2. ラフマ葉エキスのペントバルビタールナトリウムによる睡眠時間への影響

試験1：ICR マウス 60 匹、♂、体重 22~25g、上述の試験から 1g/kg の投与量はマウスの体重に影響があるため、全てラフマエキス組の投与量を 1 ランク下げた。無作為に対照組、ラフマ多量組 (0.5g/kg)、ラフマ中量組 (0.25g/kg)、ラフマ少量組 (0.125g/kg) にし、15 匹/組。溶液投与量 20ml/kg、対照組に同量の生理食水を投与する。1 日 1 回、60 日に連続投与する。40 日目と 60 日目の投与 1 時間後、マウスに pentobarbital sodium 50mg/kg を腹腔注射する。正向反射を指標として、マウスの睡眠潜時 (Sleep Latent Period) と睡眠時間を測定し、比較する。

結果：ラフマエキスは pentobarbital sodium による ICR マウスの睡眠潜時と睡眠時間に対して、影響が無かった。

表2.ラフマ葉エキスのペントバルビタールナトリウムによる ICR マウス睡眠への影響

X±SD, n=15

組分け	40 日目	60 日目	40 日目	40 日目	60 日目	60 日目
	体重 (g)	体重 (g)	睡眠潜時(s)	睡眠時間(s)	睡眠潜時(s)	睡眠時間(s)
対照組	35.6±2.6	37.7±2.6	499±243	2271±1280	417±122	2722±1219
ラフマ多量組	34.3±3.0	36.1±3.1	470±252	2223±1009	431±196	2905±753
ラフマ中量組	35.9±2.4	38.1±2.6	350±88	1769±799	412±105	2847±1044
ラフマ少量組	35.3±2.4	37.6±2.7	407±146	2304±1219	378±89	3380±1459

試験2：Balb/c マウス 64 匹、♂、体重 20~23g、無作為に対照組、ラフマ 0.5g/kg 組、ラフマ 0.25g/kg 組、ラフマ 0.125g/kg 組を分け、投与量は 20ml/kg にし、対照組に等量の精製水を投与する (上述の試験から多量投与組の体重減少は現われたため、霊芝の投与量を 1 ランク下げた)。1 日 1 回、30 日連続投与する。最終回投与後 1 時間、マウスに pentobarbital sodium 50mg/kg を腹腔注射し、マウスの正向反射、睡眠潜時と睡眠時間を測定し、比較する。

結果：ラフマ葉エキスは pentobarbital sodium による Balb/c マウスの睡眠潜時と睡眠時間に対して、影響が無かった。

表3 ラフマ葉エキスのペントバルビタールナトリウムによる Balb/c マウス睡眠への影響

組分け	動物数	X±SD		
		30 日目 体重(g)	30 日目 睡眠潜時(s)	30 日目 睡眠時間(s)
対照組	25	23.5±1.8	408±202	3434±978
ラフマ 0.5g/kg	13	22.0±1.4	570±331	2685±1331
ラフマ 0.25g/kg	13	23.1±0.9	559±239	2333±860
ラフマ 0.125g/kg	13	23.0±1.1	428±128	2464±995

3. ラフマ葉エキスの pentobarbital sodium 域値下縁睡眠への影響

試験 1.

60 匹 ICR マウス、♂、無作為に対照組、ラフマ 0.5g/kg 組、ラフマ 0.25g/kg 組、ラフマ 0.125g/kg 組 (15 匹/組) を分け、投与量は 20ml/kg にし、対照組に等量の精製水を投与する。1 日 1 回、40 日連続投与する。最終回投与 1 時間後、マウス腹腔に pentobarbital sodium 30mg/kg を注射し、マウスの正向反射、睡眠潜時と睡眠時間を測定し、比較する。

結果：ラフマ葉エキスの pentobarbital sodium 域値下縁 (subliminal fringe) の睡眠潜時に対して少量組と中量組に短縮現象が現われた、睡眠時間の顕著な延長が見出された。

表4.ラフマ葉エキスの域値下縁ペントバルビタールナトリウムによる ICR マウス睡眠への影響

組別	動物数	睡眠動物数	X±SD	
			睡眠潜時(s)	睡眠時間(s)
対照組	15	8	636±180	374±401
ラ 0.5g/kg 組	15	7	626±174	317±413
ラ 0.25g/kg 組	15	8	609±163	532±462*
ラ 0.125g/kg 組	15	13	524±183*	759±624*

*p<0.05 対照組と比較 ラ：ラフマ葉エキス

試験 2.

64 匹 Balb/c マウス、♂、無作為に対照組、ラフマ 0.5g/kg 組、ラフマ 0.25g/kg 組、ラフマ 0.125g/kg 組を分け、投与量は 20ml/kg にし、対照組に等量の精製水を投与する。1 日 1 回、40 日連続投与する。最終回投与 1 時間後、マウス腹腔に pentobarbital sodium 30mg/kg を注射し、マウスの正向反射、睡眠潜時と睡眠時間を測定し、比較する。

結果：ラフマ葉エキスの pentobarbital sodium 域値下縁 (subliminal fringe) の睡眠潜時に関して、少量組は短縮になった現象が現われ、睡眠時間は明らかに延長された事が見出された。

表 5 ラフマ葉エキスの域値下縁ペントバルビタールナトリウムによる Balb/c マウス睡眠への影響

組別	動物数	体重(g)	X±SD		
			睡眠潜時(s)	睡眠時間(s)	睡眠動物の比率
対照組	15	24.0±1.5	999±478	444±705	12/15(匹)
ラ 0.5g/kg 組	13	22.6±1.4	692±368*	1091±831**	11/13(匹)
ラ 0.25g/kg 組	13	23.9±1.1	818±472	750±649*	10/13(匹)
ラ 0.125g/kg 組	13	22.9±1.2	703±396*	1302±793**	11/13(匹)

*p<0.05, **p<0.01 対照組と比較 ラ:ラフマ葉エキス

(二) ラフマの学習・記憶への促進作用

1. 正常 ICR マウス学習・記憶機能への影響(Shuttle box 法)

ICR マウス 60 匹を無作為に対照組、ラフマ多量組 (0.5g/kg)、ラフマ中量組 (0.25g/kg)、ラフマ少量組 (0.125g/kg) にする (15 匹/組 × 4 組)。投与量 20ml/kg、対照組に同量の水を投与。1 日 1 回、30 日連続投与、31 日目投与後 1 時間、マウスを Shuttle box に入れ、20s 適応させ、5s 光当たって後、50v 電気で刺激し、マウスは Shuttle box の反対側に逃げ出す行動を起こす (受動逃避反応)。マウスの受動逃避回数を記録、学習成績とする。毎日 10 回訓練し、4 日間連続に行われる。訓練停止 72 時間後マウスの逃避回数及び逃避潜伏期を測定、記憶成績とする。

結果：Shuttle box 試験中、2、3、4 日目、ラフマ各組マウスの受動逃避潜伏期は対照組より明らかに短縮したことから、ラフマ葉エキスは学習促進作用があると考えられる。

表6. ラフマ葉エキスの正常マウス学習・記憶力への影響
(Shuttle box 法)

X±SD, n=15

組別	学習成績(受動逃避潜伏期・秒)				訓練停止 72 時間 後の成績(秒)
	一日目	二日目	三日目	四日目	
対照組	12.1±10.3	7.4±4.4	5.5±6.7	3.1±3.3	3.2±2.9
ラ 0.5g/kg 組	8.9±4.7	5.1±4.5	2.5±1.2	2.2±0.8	3.9±3.3
ラ 0.25g/kg 組	11.9±11.3	4.9±3.5	3.0±2.0	2.1±1.3	2.6±3.5
ラ 0.125g/kg 組	7.5±8.8	5.7±4.8	2.7±1.4	2.3±0.7	2.9±1.5

ラ:ラフマ葉エキス

2. 正常 ICR マウス学習・記憶能力への影響 (Y 型迷路法)

ICR マウス 60 匹を無作為に対照組、ラフマ多量組 (0.5g/kg)、ラフマ中量組 (0.25g/kg)、ラフマ少量組 (0.125g/kg) にする (15 匹/組 × 4 組)。投与量 20ml/kg、対照組に同量の水を投与。1 日 1 回、30 日連続投与、31 日目投与後 1 時間、マウスを Y 型迷路に入れ、20s 適応させた後、50v 電気で刺激するとマウスが、左或は右側に逃げる。左側は電気側、右側は安全側である。マウスの誤った方向から逃避回数、正しい方向への逃避時間を測定し、成績とする。毎日 10 回訓練し、4 日間連続に行われる。訓練停止 72 時間後マウスの誤った逃避回数及び正しい方向の逃避時間を測定、記憶成績とする。

結果: Y 型迷路試験中、ラフマ多量組、中量組のマウス学習能力の変化が見られなかった。少量組マウスでは訓練停止 3 日後の記憶力の向上、誤る回数の減少、受動逃避潜伏期の短縮が見られた。ラフマ葉エキスは正常マウスの記憶力増進作用があると考えられる。

表7 ラフマ葉エキスのマウス学習・記憶能力への影響(Y型迷路)

X±SD, n=15

組別	学習成績(受動逃避)								記憶成績(受動逃避)	
	一日目		二日目		三日目		四日目		訓練停止 72 時間	
	誤る回数	潜伏期	誤る回数	潜伏期	誤る回数	潜伏期	誤る回数	潜伏期	誤る回数	潜伏期
対照組	6.6±3.9	4.4±2.2	2.4±2.2	5.9±4.3	0.6±1.0	3.9±4.1	1.1±1.7	2.9±2.7	2.7±3.3	6.7±6.3
ラ 0.5g/kg	6.3±5.2	6.9±5.5	2.1±2.1	7.2±9.0	2.0±2.3	5.1±5.1	0.7±1.6	4.0±5.7	1.9±2.2	4.0±3.2
ラ 0.25g/kg	7.6±8.4	5.5±4.7	1.1±1.2	9.6±11.4	1.1±1.5	5.4±5.3	1.9±2.9	6.9±7.6	3.1±3.4	6.0±4.4
ラ 0.125g/kg	5.2±3.8	5.1±4.9	2.1±2.5	3.7±1.6	0.7±0.8	2.8±1.9	0.4±0.9	2.5±2.0	0.5±1.1*	2.9±3.0

*p<0.05 対照組と比較

ラ:ラフマ葉エキス

3. 亜硝酸ナトリウム処理されたマウスの学習・記憶能力への影響 (Shuttle box)

Balb/c マウス 64 匹、無作為に正常対照組 (10 匹)、亜硝酸ナトリウム模型組 (15 匹)、ラフマ多量組 (0.5g/kg-13 匹)、ラフマ中量組 (0.25g/kg-13 匹)、ラフマ少量組 (0.125g/kg-13 匹)、投与量 20ml/kg、正常対照組と模型組に同量の水を投与する。1 日 1 回、30 日連続投与、31 日目投与後 1 時間、マウスを Shuttle box に入れ上述の試験 1 と同じ方法で学習成績を測定する。

毎日 10 回訓練し、4 日間連続に行われる。訓練停止 4 日後受動逃避回数及び逃避潜伏期を測定、記憶成績とする。次の日更に 1 日訓練を加えてから正常対照組以外のマウスに亜硝酸ナトリウム 120mg/kg を皮下注射し、動物模型を作成し、24 時間後に記憶成績を測定する。訓練停止 4 日間、5 日目に同量の亜硝酸ナトリウムを皮下再注射し、3 時間後に記憶成績を測定する。

結果: ラフマ葉エキス 0.25g/kg の投与により亜硝酸ナトリウム動物の記憶力の改善が見られ、模型組より顕著な差があったことから、ラフマ葉エキスは動物の記憶力に促進作用があると考えられる。

表8 ラフマ葉エキスの亜硝酸ナトリウムによるマウス学習・記憶機能障害への影響

X±SD

組別	動物数	学習成績(受動逃避時間・秒)				記憶成績(受動逃避時間・秒)		
		一日目	二日目	三日目	四日目	訓練停止 4日目	訓練停止 6日目	訓練停止4日目亜 硝酸再注射3h後
対照組	10	12.6±9.7	11.4±10.6	6.5±3.9	3.6±0.6	2.5±2.4	3.7±2.6	3.2±2.1
模型組	15	17.9±10.1	17.6±11.1	13.0±9.2	3.6±5.2	6.0±9.2	6.0±6.5	6.8±5.7
ラ0.5g/kg組	13	13.5±9.4	12.3±9.6	8.7±6.3*	3.1±4.1	2.9±1.4*	4.0±1.5	4.3±6.0
ラ0.25g/kg組	13	13.6±8.3	15.2±10.8	7.2±5.1*	3.2±2.8	2.4±1.3*	1.9±0.9**	2.3±1.0*
ラ0.125g/kg組	13	11.1±9.2	8.8±6.6**	7.3±7.1*	1.9±0.9*	2.8±2.0*	3.0±1.8*	3.9±4.7*

*p<0.05, **p<0.01

ラ:ラフマ葉エキス

模型組と比べ

4. Scopolamine によるマウス学習・記憶力の低下 (water maze test) 及び脳内 5-HT 含量への影響

Balb/c マウス 61 匹、以下の方法で学習・記憶力を評価する: SMG-2 water maze test 装置 (行動解析ソフト装備) を ABCD4 区域に設定し、F を安全終着区とする。A 開始区とする、B、C、D3 区は中間区とする。A 区から F 区に到着する正確通路は 1 本のみ、途中数本の盲端通路を設置する。マウスの初めに各区に到達時間、回遊 (泳ぐ)、盲端に入る回数を観察する。先にマウスを誘導して全過程を正確に完走 (泳ぐ) させ、記憶させる。2 時間後、正式に訓練する。2.5 分と時間を設定し、マウスを自発的に泳がせ、各項目を記録する。2.5 分間経ってもで全過程の泳ぐが終わっていないマウスに、2.5 分の結果を記録し、残り距離を人為的に泳がせる。翌日に同じ訓練をもう一回行う。

二回の訓練後、マウスを無作為に正常組 (10 匹)、模型組 (15 匹)、ラフマ葉エキス 0.5g/kg 組 (12 匹)、ラフマ葉エキス 0.25g/kg 組 (12 匹)、ラフマ葉エキス 0.125g/kg 組 (12 匹)、20ml/kg、BW で投与、対照組は同量の水を投与する。毎日一回投与、投与後 8、9、10 日目にマウスの訓練成績を特定、第 11 日目に正常組以外、全てのマウスに Scopolamine 2mg/kg を皮下注射する。注射後 15 分、24 時間、48 時間、52 時間後、マウスの成績を記録する。マウスを屠殺し、脳組織を取り出し、重量を測り、蛍光法で脳内の 5-HT 含量を測定する。

結果：

模型組マウスの学習記憶能力は明らかに低下し、盲端に入る回数と回泳回数も増加した。安全区域に着く時間も遅くなった。ラフマ各組にも顕著な差が見られなかった。

模型組の脳内 5-HT 総含量と濃度も明らかに低下した。模型組と比べ、ラフマ葉エキス各組の脳内 5-HT 総含量と濃度は上昇現象が現れた、特に 2.5g/kg 組の増加は顕著であった。5-HT は脳内重要な伝達物質として睡眠、摂食、精神状態など様々な生理反応に調節している。ラフマ組の脳内 5-HT 上昇現象から、ラフマ葉エキスは 5-HT 系神経を興奮する作用があると考えられる。

表9 ラフマ葉エキスの Scopolamine によるマウス学習・記憶力低下への影響 (water maze test)

X±SD

組別	動物数	盲端回数	投与前回遊回数	時間(s)	投与 10 日後			投与 11 日目 Scopolamine 注射 (15min)		
					盲端回数	回遊回数	時間(s)	盲端回数	回遊回数	時間(s)
正常組	10	11.5±5.9	4.2±2.5	110±54	8.4±8.5	3.7±3.4	75±60	6.9±5.7	3.6±3.1	84±61
模型組	15	10.0±5.6	4.4±2.3	105±46	6.0±7.0	2.1±2.3	51±46	21.8±11.0##	8.9±4.7##	112±51
ラ 0.5g/kg 組	12	10.5±5.0	4.7±2.6	108±50	7.3±8.6	3.1±3.8	66±58	29.8±5.4	12.7±3.6	149±48
ラ 0.25g/kg 組	12	11.0±5.4	4.7±1.9	110±52	9.8±8.8	3.6±3.3	73±56	21.9±10.9	8.7±4.9	117±51
ラ 0.125g/kg 組	12	10.1±5.4	8.5±9.3	110±51	9.4±7.4	3.0±2.5	73±58	19.6±9.9	8.3±5.2	111±56

#p<0.05、正常組と

ラ:ラフマ葉エキス

表10 ラフマ葉エキスの Balb/c マウス脳内 5-HT 含量への影響 X±SD

組別	動物数	体重(g)	脳組織重量(μ)	脳内 5-HT 総含量(μ)	脳組織 5-HT 濃度(ug/g)
正常組	10	35.9±2.8	0.365±0.018	1.01±0.11	2.75±0.26
模型組	15	36.6±2.9	0.362±0.017	0.88±0.09#	2.44±0.28#
ラ 0.5g/kg 組	12	34.6±1.1	0.352±0.018	0.92±0.08	2.62±0.22
ラ 0.25g/kg 組	12	34.6±2.9	0.357±0.027	0.96±0.14	2.67±0.24*
ラ 0.125g/kg 組	12	34.8±1.8	0.352±0.018	0.91±0.15	2.59±0.42

*p<0.05、模型組と比較、

ラ:ラフマ葉エキス

#p<0.05、正常組と比較

四. 結論

ラフマ葉エキス 0.125、0.25、0.5、1.0g/kg を1回或は40日連続マウスに投与しても、マウスの自主活動回数には影響は無い。ペントバルビタールナトリウム投与による Balb/c マウスの睡眠に睡眠時間、入眠潜伏期に影響は無いが、域値下縁ペントバルビタールナトリウム投与による ICR マウスの睡眠に 0.125、0.25g/kg のラフマ葉エキスは、睡眠時間の延長、就寝動物数の増加に作用がある。ラフマ葉エキス 0.125g/kg 投与により ICR マウスの逃避潜伏期は短縮になり、0.25g/kg 投与により亜硝酸ナトリウムによる学習・記憶機能障害に改善効果が見られた。更に、0.25g/kg 投与により Scopolamine マウス脳内総 5-HT 含量及び 5-HT 濃度の上昇が表れた。以上の結果によってラフマ葉エキスは動物に鎮静、睡眠促進作用があり、学習・記憶障害の動物に改善効果が見出された。

参考文献

1. 中国薬典. 2005, 第一部, 167
2. 薛華茂, 錢学射, 張衛明, 等. ラフマの化学成分研究進展. 中国野生植物資源, 2005, 24(4):6-9
3. 李慶華, 魏春雁, 李建東, 等. ラフマ葉の薬理作用及び臨床応用の研究進展. 中薬材, 2008, 31(5):784-787
4. 候晋軍, 韓利文, 李青山, 等. ラフマ葉の化学成分及び薬理活性研究進展. 中草药, 2006, 37(10):9-11
5. 張素琼, 燕虹, 李青山. ラフマ葉の有効部位の高脂血症及び動脈硬化への研究. 中西医结合心脑血管病誌, 2007, 5(9):831-832
6. HAO Xu-Liang, ZHANG Guan-Dong, WANG Xiao-Jian, et al. Protective Effect of Total Flavonoids of Folium Apocyni Veneti on H2O2-injured Human Umbilical Vein Endothelial Cells Injury. Chinese Journal of Natural Medicines 2009, 7(2):134-139
7. Grundmann O, Nakajima J, Seo S, et al. Anti-anxiety effects of apocynum venetum L. in the elevated plus maze test. J Ethnopharmacol. 2007, 110(3):406-411
8. Veronika B, Sansei N, Tsutomu S, et al. Antidepressant effects of apocynum venetum L. in a forced swimming test. Biol Pharm Bull, 2001, 24(7):848
9. Veronika B, Kirsten S, Shujiro S, et al. Long-term effects of an apocynum venetum extract on brain monoamine levels and b-AR density in rats. Pharm Bio & Behavior, 2003, 75(3):557-564
10. 周本宏, 李小軍, 楊鼎, 等. ラフマ葉エキスのマウス脳内 monoamine oxidase 活性への影響. 中国薬剤師誌, 2006, 9(8):689-691
11. 王維亭, 等. ラフマ葉エキスの抗うつ作用, 国外医薬・植物薬分冊, 2002, 17(5):206
12. 伊霞, 等. ラフマ葉エキスのうつラットモデル行動学への影響, 中国臨床医薬研究誌, 2007, 2:1-2