

《原 著》

抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散はニコチン依存モデルマウスにおけるニコチン離脱時の攻撃性の誘発を抑制する

長谷川景太、川島孝則、原井健司、千葉殖幹、高橋隆二

クラシエ株式会社 薬品カンパニー 漢方研究所

【目 的】 古くからさまざまな精神症状に使用されてきた抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散が、禁煙治療中に頻発する離脱症状である易怒性・暴力性の改善にも有効であるのか、動物実験による検討を行った。

【方 法】 C57BL/6Jマウスに対し、水およびニコチン含水を自由摂取させ、経時的なニコチン嗜好性の上昇およびニコチン離脱時に攻撃性を呈する依存症モデルを作製した。その後、本モデルに対し標準1日量の抑肝散加陳皮半夏または加味逍遙散を1日1回経口投与し、居住者-侵入者テストおよび攻撃行動計測システムを利用し攻撃性を評価した。

【結 果】 試験の結果、依存症モデルで高頻度の攻撃行動が確認された。一方、抑肝散加陳皮半夏または加味逍遙散投与による治療を施した個体では、有意に攻撃行動が減少していた。

【結 論】 これらの結果より、抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散が、ニコチン離脱時の攻撃性の改善にも効果的であると考えられ、今後、禁煙治療への貢献が期待される。

キーワード: 抑肝散加陳皮半夏、加味逍遙散、離脱症状、易怒性、禁煙補助薬

緒 言

近年、禁煙スペースの設置など分煙化が進み、健康に対するリスク対策から禁煙に取り組む企業も増えている。この風潮のなかで、我が国の成人喫煙率は1995年の時点で男性が52.7%、女性が10.6%だったが、2019年には男性が27.1%、女性が7.6%に減少してきている¹⁾。一方で、「タバコをやめたい」、あるいは「本数を減らしたい」と考えている人が、喫煙者のうち男性では56.7%、女性では58.7%にのぼると報告されており¹⁾、医療や健診等の場での禁煙支援や禁煙治療の更なる充実と普及を進める必要がある²⁾。

喫煙を繰り返す背景には、ニコチンの存在がある。喫煙によって摂取されたニコチンは脂溶性が高く、血漿タンパクとの結合性も低いため、血液脳関門を容易に通過し、脳内の腹側被蓋野にある $\alpha_4\beta_2$ ニコチン受容体に結合する。ニコチン結合による刺激は、腹側被蓋野から側坐核まで伝達され、神経末端から大量のドーパミンが放出されることで、喫煙者に強い快感を生じさせる³⁾。この快感を求め、ニコチンを常時摂取するようになると、ドーパミンの分泌をニコチンに委ねてしまい、非喫煙時に分泌されるドーパミン量が低下する。そのため、禁煙や、タバコを吸えない状態が続くとドーパミン分泌量低下による抑うつ状態となり、ニコチンに対する強い渴望と喫煙衝動に襲われる^{4,5)}。さらに精神症状として、易怒性や暴力性が見られることが多く、そのほかにも、抑うつ感、空腹感、落ち着きのなさ、集中力の欠如なども生じると報告されている⁶⁾。その結果、これらの精神症状から逃れようと喫煙を繰り返すため、喫煙を止めたくても止められない状態、ニコチン依存症となる。

ニコチン依存症に対する治療薬として、ニコチン受容体の部分作動薬などの禁煙補助薬が開発されてきたものの、めまい、吐気、頭痛、便秘、異常な夢、不眠などの副作用があり、服用した場合は自動車運転等の危険を伴う機械の操作に従事しないよう注意する旨の通知が出されている⁷⁾。また、ニコチン

連絡先

〒933-0856

富山県高岡市鐘紡町3-1

クラシエ株式会社 薬品カンパニー 漢方研究所

TEL: 0766-28-7954

e-mail: hasegawa_keita@kracie.co.jp

受付日 2023年7月20日 採用日 2023年12月13日

パッチによる治療方法も確立されているものの、血中ニコチン濃度が維持されることで覚醒作用が働き、不眠に陥りやすい⁸⁾。つまり、ニコチン依存症の治療薬には未だ課題が多く、副作用の少ない新たな治療法の確立が禁煙支援の充実には重要である。漢方薬は古くから多くの患者に処方されてきた薬であり、目立った副作用も少なく、また患者の体質・症状に合わせて処方される点も大きな特徴である。精神疾患に対してもいくつかラインナップを揃えており、なかでも、イライラ感を改善することが報告されている処方として、抑肝散加陳皮半夏、加味逍遙散、柴胡加竜骨牡蛎湯、加味帰脾湯などが知られている。特に抑肝散加陳皮半夏はグルタミン酸毒性から神経を保護する作用があり、認知症の周辺症状であるイライラに効果的であること^{9~12)}、また加味逍遙散においてもセロトニンの分泌を促進する効果が報告されていることから¹³⁾、これら2処方では脳神経系に作用してイライラ感を改善している可能性が考えられる。そこで我々は、この2処方を用いて、禁煙中の離脱症状、特にイライラからくる攻撃性に対する効果を評価し、禁煙治療に適応できる可能性があるのか検討を行った。

研究対象・方法

1) 実験動物

5週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本エスエルシー)導入後、個飼い条件下で12時間の明暗サイクル(明期8:00~20:00)で、7日間以上の馴化を行った後に実験に供した。本動物実験は、クラシエ株式会社「動物倫理規定(承認番号190019, 190024)」および「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に従って実施された。

2) ニコチン依存症モデルマウスの作製

滅菌水(オートクレーブ済み水道水)およびニコチン酒石酸塩二水和物(ナカライテスク)を溶解させた滅菌水(ニコチン含水; 500 μ g/mL)を用意し、1つのケージに、各々異なる2本の給水瓶にて自由摂取させた。なお、ニコチン自体は苦味を持つため、マウスが忌避行動を示すことが報告されており¹⁴⁾、そのためo-Sulfobenzimide(サッカリン、東京化成工業)をすべての給水瓶に添加した(終濃度0.3% w/v)。また、ニコチン含水への視覚からの条件付けを目的として、給水瓶にビニールテープを貼付した。投与

から4週間後に、ニコチン含水を取り除き、2本の滅菌水のみを与える離脱期間を1週間設けた。ニコチン含水投与期間および離脱期間では、2回/週の頻度ですべてのボトル重量を測定した。また、ニコチン含水投与2日目および1週間のニコチン離脱後(33日目)において動物個体の体重を測定した。

3) ニコチン嗜好性算出方法

測定したボトル重量より、滅菌水およびニコチン含水それぞれに対する、マウスの1日当たり飲水量を算出した。さらに、 $(\text{ニコチン含水消費量}) / \{ (\text{ニコチン含水消費量}) + (\text{滅菌水消費量}) \}$ の値を百分率としてニコチン嗜好性の解析に用いた。また、ニコチン離脱期間中においては条件付けビニールテープを指標とし、 $(\text{テープ給水瓶消費量}) / \{ (\text{テープ給水瓶消費量}) + (\text{テープ無し給水瓶消費量}) \}$ の値を百分率とし、ニコチン嗜好性の解析に用いた。

4) 血中ニコチン濃度の測定

ニコチン含水投与から4週間後、動物個体より血漿を回収し、1.5倍量のメタノールを加えた。これを4℃ 15,000 rpm 30 minの遠心条件にて上清を回収し、Amicon Ultra-0.5 3 kDa (Merck) を使用して4℃ 15,000 rpm 60 minの条件でさらに遠心し、HPLC分析用の試料溶液とした。

HPLC分析装置は、SHIMADZU NexeraX2 (SYSTEM CK) を用いた。カラムはYMC-Triart C18 (100 $\times$ 3.0 mm I.D., S-1.9 μ m, 12 nm, Ser.No. 0310003637) を用いた。カラムオーブンの温度は40℃に設定した。20 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 7.0) / アセトニトリル (9:1) を移動相として分析を行った。試料溶液の注入量は5 μ L、標準溶液の注入量は2 μ L、流速は0.2 mL/min、検出器はUV-Vis 検出器を用い、検出波長は254 nmに設定した。

5) 漢方薬投与による治療

試験には抑肝散加陳皮半夏エキス粉末 (Lot. 19071922、クラシエ) および加味逍遙散エキス粉末 (Lot. 19080823、クラシエ) を用いた。各処方の構成生薬は表1、表2に示す通りである。これらエキス粉末を滅菌水で懸濁し、抑肝散加陳皮半夏 (750 mg/kg/day)、加味逍遙散 (600 mg/kg/day) をヒト1日相当量にて、ニコチン離脱直後より1日1回、7日間反復経口投与 (10 mL/kg) を行った。ま

た、居住者-侵入者テストおよび攻撃行動計測システムによる攻撃性評価日では、試験実施の1時間前より投与を行った。

6) 居住者-侵入者テスト

居住者-侵入者テストは、Koolhaasらの報告を参考にし¹⁵⁾、ニコチン離脱開始より1週間後に実施した。モデルマウスを居住者側、8週齢の雄性C57BL/6Jマウスを侵入者側とし、居住者を1週間飼育したケージに侵入者を入れることで、侵入者に対する居住者の行動を観察した。試験時間は10分とし、侵入者に対して居住者が行った攻撃行動(追いかける、マウント、威嚇、噛みつく)の時間を計測した。尚、侵入者側に用意したマウス個体はテスト実施の1週間前に導入(日本エスエルシー)し、テスト実施日に8週齢となるように調整した。

7) 攻撃行動計測システム

攻撃行動計測システム(室町機械株式会社)を用いた評価は、Kuchiiwaらの報告を参考にし¹⁶⁾、ニコチン離脱開始より1週間後に実施した。試験実施直前、マウス個体を試験用シリジケースに入れ、30秒間の馴化を行った。馴化後、10秒間隔で30回(試験時間5分)、マウス腹部に刺激棒を突き出し、攻撃行動を誘発させる挑発セッションを実施した。挑発セッション後、計測セッションに移行し10秒間隔で30回(試験時間5分)、マウス眼前に刺激棒を突き出し、棒への噛みつき行為を行った場合にその強さを数値化した。マウス眼前への刺激棒の突き出しに失

敗した場合は無効回と判断し、噛みつき回数が30回となるように追加で計測を行った。攻撃性評価においては、噛みつきに明らかな攻撃性を含む回を有効とするため3 mNs (mNs: Newton × millisecond) の閾値を設定し解析を行った。

8) 統計解析

すべてのデータは平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。各群のパラメータ変化は、多群間比較の場合 One-way Analysis of Variance (One-way ANOVA) 解析の上で、post hoc testとしてTukey's multiple comparison testを実行した。また、経時的変化を評価する場合にはTwo-way repeated measures ANOVAを行い、post hoc testとしてBonferroni法により補正したPaired *t*-testを実行した。解析にはR version 3.6.3を用いて、危険率5%未満を有意水準、危険率10%未満を有意傾向として採用した。

結 果

1) ニコチン依存症モデルマウスの作製

抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散が、禁煙治療中に頻発する易怒性・暴力性の改善にも有効であるのか検討するため、まずは、ニコチン依存症モデルマウスの作製を試みた(図1)。その結果、約4週間のニコチン含水の自由選択投与では15%程度の嗜好性上昇が確認された(図2)。加えて、ニコチン摂取のバイオマーカーであるコチニンの血中濃度をUV-Vis検出器を組み合わせたHPLC装置を用いて外部標準法により分析したところ、ニコチン非投与群で

表1 抑肝散加陳皮半夏エキス粉末の構成

生薬名	重量 (g)
半 夏	5
白 朮	4
茯 苓	4
川 芎	3
陳 皮	3
当 帰	3
柴 胡	2
甘 草	1.5
釣藤鈎	3

表2 加味逍遙散エキス粉末の構成

生薬名	重量 (g)
当 帰	3
芍 薬	3
白 朮	3
茯 苓	3
柴 胡	3
牡丹皮	2
山梔子	2
甘 草	1.5
生 姜	0.5
薄 荷	1



図1 ニコチン依存症モデルマウス作製スケジュール

C57BL/6J マウスに対し滅菌水ボトルおよびニコチン含水ボトルの2本を与え、4週間自由摂取とさせた(ニコチン条件付け)。ニコチン条件付け終了後、ニコチン含水を滅菌水と入れ替え、離脱期間を1週間設定し、ニコチンへの渴望および易怒性・攻撃性を惹起した。

14.21 ± 32.39 ng/mL、ニコチン投与群で189.96 ± 132.51 ng/mLを示し、中等度以上の喫煙者に相当するモデルである可能性が推測された¹⁷⁾。また、有意傾向ではあるものの ($p = 0.059$)、ニコチン離脱期間中、ビニールテープを貼り付けた給水瓶に対する嗜好性の上昇が確認された(図2)。ニコチン含水の投与は、給水瓶への視覚的な条件付けにもなっており、離脱期間中に認められた顕著な嗜好性の上昇は、マウス個体のニコチン渴望を示している可能性が推測された。

2) ニコチン依存症モデルマウスの攻撃性評価

先述の結果は、ヒトにおける禁煙中の症状に類似しており¹⁸⁾、そのためニコチンへの渴望に付随して、攻撃性も惹起されている可能性が考えられた。そこで、攻撃性を評価すべく居住者-侵入者テストおよび攻撃行動計測システムによる評価を行った。その結果、居住者-侵入者テストでは正常個体(ニコチン未投与)と比較しニコチン投与マウス(未治療)において有意な攻撃時間の増加が確認された(図3)。また、攻撃行動計測システムを用いた評価でも、正常個体と比較しニコチン投与マウス(未治療)において有意な噛みつき強度の上昇が確認され、居住者-侵入者テストと一貫する結果となった(図4)。これらの結果より、本試験で作製したニコチン投与マウスは、ヒトの禁煙治療中に散見されるニコチンへの渴望、易怒性・暴力性を模倣したニコチン依存症モデルであると判断した。

3) ニコチン離脱による易怒性・暴力性に対する抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散の改善作用

抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散が、ニコチン

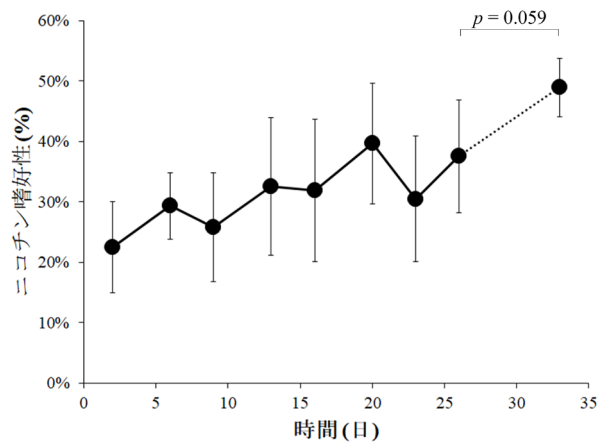


図2 攻撃性評価に用いたモデルマウスのニコチン嗜好性評価

約4週間のニコチン条件付け期間および1週間の離脱期間中におけるニコチン嗜好性の推移を示した。なお、実線はニコチン投与期間を、破線はニコチン離脱期間を表している。平均値 ± SD; $n = 5$; $p = 0.0594$ vs. day 26 as determined by paired t -test.

離脱に伴う易怒性・暴力性に対しても有効であるのか検討すべく、作製されたニコチン依存症モデルに2処方投与し、ニコチン離脱期間中の攻撃性を評価した。その結果、居住者-侵入者テストにおいて、抑肝散加陳皮半夏を投与した群では攻撃時間の減少傾向が、加味逍遙散を投与した群では有意な攻撃時間の減少が確認された(図3)。この結果と一貫するように、攻撃行動計測システムを用いた評価でも、抑肝散加陳皮半夏または加味逍遙散を投与した両群で有意な噛みつき強度の低下が認められ(図4)、ニコチン離脱で惹起される攻撃性に対し、これら2処方が改善作用を示す可能性が示された。なお、摂取量の測定は行っていないものの、ニコチン投与および

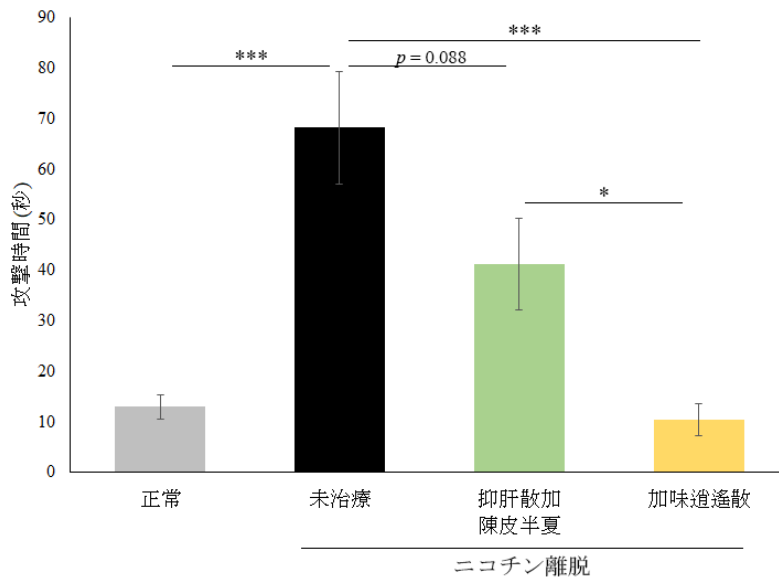


図3 居住者-侵入者テストによるニコチン離脱中の攻撃性に対する漢方薬の有効性評価
ニコチン離脱時より溶媒または漢方薬（抑肝散加陳皮半夏、加味逍遙散）を1回/日の頻度で投与し、1週間後に居住者-侵入者テストによる攻撃性評価を行った。なお、溶媒とは滅菌水のことである。
平均値±SD; n = 5 per group; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ as determined by Tukey's multiple comparison test.

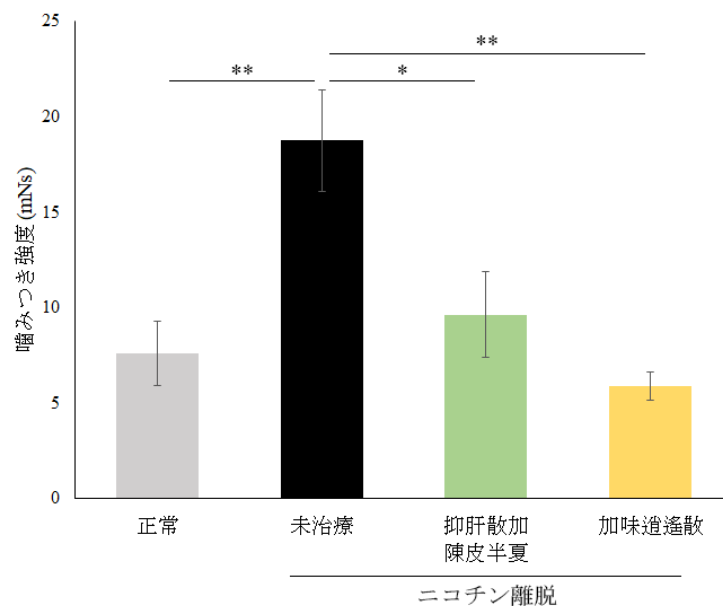


図4 攻撃行動計測システムによるニコチン離脱中の攻撃性に対する漢方薬の有効性評価
ニコチン離脱時より溶媒または漢方薬（抑肝散加陳皮半夏、加味逍遙散）を1回/日の頻度で投与し、1週間後に攻撃行動計測システムによる攻撃性評価を行った。なお、溶媒とは滅菌水のことである。
平均値±SD; n = 5 per group; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as determined by Tukey's multiple comparison test.

び漢方薬投与による体重の有意な変化は認められず、個体サイズが攻撃性評価に与えた影響はほとんどないと考えられた (Data not shown)。

考 察

抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散は、セロトニン系、Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) 系等、さまざまな脳神経系に作用することで社会的ストレス、または更年期のイライラなどを緩和する漢方

製剤であると報告されている^{19, 20)}。本試験においても、ニコチン離脱によって惹起される攻撃性に対し、これら2処方改善作用を示すことを確認しており、そのメカニズムとして脳神経系への作用が想定される。脳神経学で扱われるニコチン依存症では、中脳辺縁系および側坐核と呼ばれる脳内報酬系に焦点が当てられており、ドーパミン作動性ニューロンに着目してその形態面、機能面の議論が為される^{21, 22)}。中脳辺縁系のドーパミン作動性ニューロンは前頭葉側坐核に投射し、扁桃核や海馬を介して安心感や快楽を生み出す¹⁸⁾。これら一連の神経回路が活性化される頻度が増すと、安心感・快楽を生み出すために必要なニコチン量も増加し、一方でニコチン離脱状態になると得ていた安心感・快楽が消失するため、情動に大きな落差が生じる¹⁸⁾。ニコチン離脱による情動の不安定さは、すべてドーパミン作動性ニューロンの活性に依存していることから、抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散の機序として、ドーパミン作動性ニューロンを直接活性化する可能性や、ニコチン受容体を活性化する何らかの化合物を含んでいる可能性、あるいは先の報告のように扁桃核や海馬等の情動にかかわる周辺領域にGABAやセロトニン等を介して抑制的に作用している可能性が考えられる。

漢方薬は患者の体質や原因に合わせて使い分けることを得意としており、抑肝散加陳皮半夏と加味逍遙散においても、適応症が細かく分類される。そのため、症状の種類や患者の体質によって薬の効果感に差が生じ、実際に本試験においても居住者-侵入者テストにおいて抑肝散加陳皮半夏-加味逍遙散の間に攻撃性の減衰レベルに差が確認されている(図3)。これは各々の処方が異なる生薬によって構成されていることに起因しており、それが有効成分の違いとして薬効に影響していると考えられる。先行研究では、抑肝散加陳皮半夏に含まれる陳皮と釣藤鈎がセロトニン作動性ニューロンに、当帰と川芎がGABA受容体に作用し、認知症における攻撃性を抑制していることが報告されている^{20, 23)}。

一方、加味逍遙散においては山梔子と当帰がGABA受容体に作用し、社会性ストレスおよび更年期特有のホルモンバランスの乱れから生じるイライラを抑える効果が報告されており^{24, 25)}、生薬レベルで作用経路の違いもあると推察された。これらの報告より、ニコチン離脱に伴う攻撃性に対して抑肝散加陳皮半夏と加味逍遙散の間に認められた改善度の

差は、セロトニン作動性ニューロン、GABA作動性ニューロンへの作用機序の違いにより生じている可能性が想定された。特に本試験において、加味逍遙散は抑肝散加陳皮半夏と比較して攻撃性に対する改善度が高く、その強い薬効がGABA作動性ニューロン依存性である可能性、さらにGABAへの作用が報告されている山梔子が責任生薬である可能性が考えられることから、今後、有効成分の探索を含めて実施する予定である。

近年の依存症研究の目覚ましい発展により、ニコチンパッチやバレニクリン(商品名: チャンピックス)等の禁煙補助薬が開発され、治療方法の選択肢が広がっている。しかしながら、副作用の発現が確認されており、安全性の面において懸念が残っている^{7, 8)}。本研究では、新たな治療法として漢方薬に注目し、抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散の2処方が、ニコチン離脱による攻撃性を改善する作用を見出した。今後、臨床において確認を行っていく必要があるものの、これらの結果は、漢方薬が禁煙治療時の精神症状を緩和し、禁煙をサポートする薬となり得る可能性を示している。

本研究の限界

本研究にはいくつかの限界がある。先行研究では、ニコチン依存症モデルの作製方法として、ニコチン含水の強制投与、自由摂取、ミニポンプ埋め込みの3パターンが報告されており、投与期間も様々な設定されている^{14, 18, 26)}。本研究では、ヒト臨床に近い状況を模倣すべく、自由摂取の方法を選択し、ニコチンへの嗜好性上昇や離脱症状も認められた。しかしながら、自由摂取の場合、ニコチンの苦味が嗜好性に大きく影響するため、依存症モデルの作製に時間を要し、また嗜好性の上昇幅が小さく、他の方法に比べ依存性が弱いモデルになりやすいと報告されている²⁶⁾。本研究で認められた嗜好性の上昇も50%以下にとどまっており、ヒト臨床との類似度については懸念が残る。また、喫煙と禁煙を繰り返すことでニコチンへの欲求がさらに増大することも臨床では確認されており^{27, 28)}、これら報告にある種々のニコチン依存症モデルが示すニコチン依存の程度を評価し、ヒト臨床との類似性について検討する必要がある。血中ニコチン濃度の分析においても先行研究の報告結果と比較して低い値が示され¹⁴⁾、ELISA法(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)とHPLC

による分析法で感度や精度に差異が生じている可能性が考えられる。

攻撃行動計測システムを用いた攻撃性の評価では、個体の噛みつき強度をニコチン離脱によるイライラの指標として扱った。先行研究では噛みつき強度に加えて噛みつき回数の解析も行っており、それらの相関も報告しているが¹⁶⁾、本試験ではニコチン離脱による噛みつき回数の有意な増加と、漢方薬投与による減少に有意差は認められず、傾向レベルに止まった(Data not shown)。そのため、噛みつき強度のみでは攻撃性評価として信頼性の担保が難しいと判断し、本試験では居住者-侵入者テストも実施し、2つの試験系から攻撃性を評価した。先行研究と同様の計測を行ったものの、噛みつき回数に有意性が認められなかった要因として個体差が考えられる。特に正常群における最小噛みつき回数が11回であったのに対し、最大噛みつき回数は24回と非常に幅広い分布が認められ、先行研究に比して個体数が少なかったことから、群内でのばらつきが解析結果に与えた影響は大きいと推測される。

本試験では抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散をピックアップして薬効評価を実施したが、柴胡加竜骨牡蛎湯、加味帰脾湯等、その他の処方の効果は不明なままである。特に抑肝散加陳皮半夏のベースとなっている抑肝散は、グルタミン酸に対するアストロサイトの保護効果が高いという報告もあり¹²⁾、ニコチン離脱によるイライラに対しても同様に効果を発揮するのか興味深い。さらに、既存薬であるバレニクリンと比較して抑肝散加陳皮半夏および加味逍遙散がどの程度の禁煙補助効果を備えるのか、また副作用の有無についても、漢方薬としての安全性に関する使用実績があるものの、特に喫煙者を対象とした試験は報告がないため未解明なままであり、今後バレニクリン投与群をポジティブコントロールとした比較試験が必要である。

利益相反

本研究には一切の助成金を受けておらず、関連する利益相反はない。著者はすべてクラシエ製薬株式会社の社員である。

引用文献

- 1) 厚生労働省：令和元年国民健康・栄養調査結果の概要. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/>

- 000687163.pdf (閲覧日：2022年9月25日)
- 2) 厚生科学審議会地域保健健康増進栄養部会：「健康日本21(第二次)」中間報告書(概要). <https://www.mhlw.go.jp/content/000378312.pdf> (閲覧日：2023年11月1日)
- 3) Changeux JP, Bertrand D, Corringier PJ, et al: Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Rev* 1998; 26: 198-216.
- 4) Hughes JR, Higgins ST, Bickel WK: Nicotine withdrawal versus other drug withdrawal syndromes: similarities and dissimilarities. *Addiction* 1994; 89: 1461-1470.
- 5) 宮田久嗣：ニコチンの脳科学 ニコチンと情動. *脳の科学* 2000; 22: 1003-1007.
- 6) West R, Hajek P: Evaluation of the mood and physical symptoms scale (MPSS) to assess cigarette withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 177: 195-199.
- 7) 厚生労働省：医薬食品局安全対策課長通知.「使用上の注意」の改訂について(薬食安発 0705 第1号). <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11120000-Iyakushokuhinkyoku/0000064857.pdf> (閲覧日：2022年9月25日)
- 8) Page F, Coleman G, Conduit R: The effect of transdermal nicotine patches on sleep and dreams. *Physiol & Behav* 2006; 88: 425-432.
- 9) Tabuchi M, Mizuno K, Mizoguchi K, et al: Yokukansan and Yokukansankachimpihange Ameliorate Aggressive Behaviors in Rats with Cholinergic Degeneration in the Nucleus Basalis of Meynert. *Front Pharmacol* 2017; 8: 1-10.
- 10) Tamano H, Yusuke E, Ide K, et al: Influences of yokukansankachimpihange on aggressive behavior of zinc-deficient mice and actions of the ingredients on excessive neural exocytosis in the hippocampus of zinc-deficient rats. *Exp Anim* 2016; 65: 353-361.
- 11) Katsumoto E, Ishida T, Kinoshita K, et al: Yokukansankachimpihange Is Useful to Treat Behavioral/Psychological Symptoms of Dementia. *Front Nutr* 2021; 7: 1-5.
- 12) Kawakami Z, Omiya Y, Mizoguchi K: Comparison of the Effects of Yokukansan and Yokukansankachimpihange on Glutamate Uptake by Cultured Astrocytes and Glutamate-Induced Excitotoxicity in Cultured PC12 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019; 2019: 1-11.
- 13) Igarashi K, Kuchiiwa T, Kuchiiwa S, et al: Kamishoyosan (a Japanese traditional herbal formula), which effectively reduces the aggressive biting behavior of male and female mice, and potential regulation through increase of Tph1, Tph2, and Esr2 mRNA levels. *Brain Res* 2021;

- 1768: 147580.
- 14) Zhao-Shea R, DeGroot SR, Liu L, et al: Increased CRF signalling in a ventral tegmental area-interpeduncular nucleus-medial habenula circuit induces anxiety during nicotine withdrawal. *Nat Commun* 2015; 6: 1-31.
- 15) Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, et al: The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *J Vis Exp* 2013; 77: 1-7.
- 16) Kuchiiwa S, Kuchiiwa T: A novel semi-automated apparatus for measurement of aggressive biting behavior in mice. *J Neurosci Methods* 2014; 228: 27-34.
- 17) 種瀬若菜, 内山明, 竹内貴子, ほか: 大学生の血清コチニン濃度と自己申告喫煙習慣との関連. *Jpn J School Health* 2009; 51: 33-38.
- 18) Salas R, Pieri F, De Biasi M: Decreased Signs of Nicotine Withdrawal in Mice Null for the β 4 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit. *J Neurosci* 2004; 24: 10035-10039.
- 19) Katsumoto E, Ishida T, Kinoshita K, et al: Yokukansankachimpihange Is Useful to Treat Behavioral/Psychological Symptoms of Dementia. *Front Nutr* 2021; 7: 1-5.
- 20) Takamatsu K, Ogawa M, Higuchi T, et al: Effects of Kamishoyosan, a Traditional Japanese Medicine, on Menopausal Symptoms: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020; 2020: 1-9.
- 21) Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, et al: Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med* 2010; 3: 1-6.
- 22) Lai I-C, Dulcis D: Nicotine-induced dopamine plasticity: a gateway to neurotransmitter replacement? *Neural Regen Res* 2020; 15: 73-74.
- 23) Egashira N, Nogami A, Iwasaki K, et al: Yokukansan Enhances Pentobarbital-Induced Sleep in Socially Isolated Mice: Possible Involvement of GABA(A) – Benzodiazepine Receptor Complex. *J Pharmacol Sci* 2011; 116: 316-320.
- 24) Egashira N, Iba H, Kuwano H, et al: Kamishoyosan reduces conditioned fear-induced freezing behavior in socially isolated ovariectomized rats. *J Pharmacol Sci* 2016; 131: 279-283.
- 25) Toriizuka K, Kamiki H, Ohmura N (Yosikawa), et al: Anxiolytic effect of Gardeniae Fructus-extract containing active ingredient from Kamishoyosan (KSS), a Japanese traditional Kampo medicine. *Life Sci* 2005; 77: 3010-3020.
- 26) Matta SG, Balfour DJ, Benowitz NL, et al: Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology (Berl)* 2007; 190: 269-319.
- 27) Bagdas D, Diester CM, Riley J, et al: Assessing nicotine dependence using an oral nicotine free-choice paradigm in mice. *Neuropharmacology* 2019; 157: 1-32.
- 28) Conklin C, Perkins K, Sheidow A, et al: The return to smoking: 1-year relapse trajectories among female smokers. *Nicotine Tob Res* 2005; 7: 533-540.

Yokukansankachimpihange and Kamishoyosan attenuate aggressive behavior induced by nicotine withdrawal in mice

Keita Hasegawa, Takanori Kawashima, Kenji Harai, Shigeki Chiba, Ryuji Takahashi

Abstract

Objectives: We aimed to examine the ameliorative effects of Yokukansankachimpihange (YKSCH) and Kamishoyosan (KSS), traditional Japanese medicines prescribed for irritability, on nicotine withdrawal-induced aggressive behaviors in mice.

Methods: We established a nicotine self-administration model in C57BL/6J mice, which show increased nicotine preference and aggressive behavior after nicotine withdrawal. In this model, either YKSCH (750 mg/kg) or KSS (600 mg/kg) was administered orally once daily for 7 days after nicotine withdrawal. Subsequently, we assessed the ameliorative effects of YKSCH and KSS on aggressive behavior during nicotine cessation by administering the resident-intruder test and measuring aggressive biting behavior.

Results: Nicotine-treated mice exhibited aggressive behavior more frequently than wild-type mice. However, in the resident-intruder test, the duration of aggressive behavior was significantly reduced in KSS-treated mice, but not in nicotine-treated mice ($p < 0.001$). Moreover, YKSCH-treated mice tended to decrease the total offence time ($p = 0.088$). Consistent with these findings, either YKSCH or KSS treatment improved the intensity of aggressive biting behavior as measured by the Aggression Response Meter (YKSCH: $p < 0.05$, KSS: $p < 0.01$).

Conclusions: YKSCH and KSS attenuated nicotine withdrawal-induced aggressive behaviors, suggesting that these traditional medicines may provide a new supportive intervention for smoking cessation.

Key words

Yokukansankachimpihange, Kamishoyosan, withdrawal symptoms, irritable mood, smoking cessation agents

Kampo Research Laboratories, Pharmaceutical Company, Kracie, Ltd.