

〔総 説〕

閉経周辺期の抑うつ状態を対象とした動物モデルの開発

別 宮 直 子¹⁾ 吉 村 裕 之²⁾

¹⁾ 人間環境大学松山看護学部精神看護学領域

²⁾ 人間環境大学松山看護学部基礎看護学領域

(2018年10月16日受理)

【要旨】

閉経周辺期の女性は、程度に個人差はあるが、劇的な身体的変化あるいは抑うつ気分や意欲の低下など不定愁訴と総称される多様な行動変容を経験する。医療的には、エストロゲン補充療法が広く適用されてきたが、生殖器や心機能に対する危険性が警告され、補完代替医療を含めた新たな治療法の科学的検証が課題となっている。抑うつ状態の罹患率は男性より女性に高く、抗うつ薬の改善効果にも性差があるにも関わらず、抗うつ薬の前臨床評価には雄性動物が使用され、雌性動物での報告は極めて少ない。著者らは、抗うつ効果が雄性動物の強制遊泳法における不動時間を短縮することから評価試験法とされていることに着目、雌性動物の卵巣を摘出すれば不動時間が延長するののかという素朴な疑問を抱き、実験を重ねてきた。その結果、卵巣摘出が再現性良く不動時間を延長すること、しかも女性ホルモンや抗うつ薬の投与によって改善されることを証明した。これまでの成果と今後の展開について述べる。

キーワード：女性の抑うつ状態，卵巣摘出，伝承的天然物，方法論の開発

I. 緒言

閉経周辺期 (peri-menopausal period) の女性は、更年期障害と総称される熱感・冷感、発汗、頻脈・徐脈などの身体的変化、易疲労感、意欲や活動性の低下・喪失、抑うつ状態などの行動変容、いわゆる不定愁訴と呼ばれる心身の変調に遭遇し、個人差はあるものの、悩みを抱え込む場合が多い。抑うつ状態は、文字通りにうつ病と呼ばれていたが、気分障害 (DSM-IV-TR) を経て、その後、抑うつ障害群 (DSM-V) と変遷した歴史をもつ精神症状であり、通例、配偶者あるいは周囲の人々までも巻き込み、重症となると語調が低く対話は困難となる。その罹患率は男性に比べて女性が2倍以上高いこと、卵巣機能の減退による女性ホルモンの低下と抑うつ状態の発現には密接な関連があることは明らかであり (Steiner et al., 2003)、卵巣機能の低下によるエストロゲン分泌の減少に起因することから、エストロゲン補充療法が適用されてきた。しかし、長期のホルモン補充療法は、生殖器および心臓に深刻な有害作用をひき起こすことが大規模臨床試験によって警告されている (Rossouw et al., 2002)。ホルモン補充療法に代わる薬物療法の開発と、長い摂取の歴史で淘汰され伝承されてきた天然物による代替医療の科学的検証は、喫緊の課題になっている。



Jumping/Exploration



Swimming/Struggle



Characteristic posture of immobility

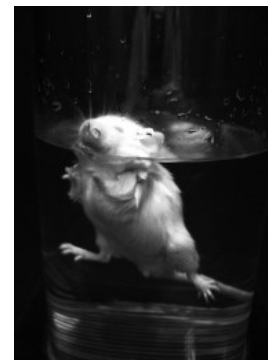


Fig.1 The most salient acts and postures shown by a female mouse during the forced swimming test.

セリグマン (Seligman, 1972) は、抑うつ状態を体系的に動物およびヒトで実験的研究を重ね、学習性絶望感 (learned helplessness) の理論を確立した。ポーソルトは、このセリグマンの理論を発展させ、マウスやラットで強制遊泳法 (forced swimming test) を確立している (Porsolt et al., 1977)。この方法は、逃避および対処不可能な状況として、一定温度の水を満した円筒形の容器にマウスやラットを入れると、最初は逃れようともがいたり泳いだりするが、やがて水面に頭だけをだして浮遊した不動姿勢を維持する (Fig. 1)。簡易で再現性も高く、臨床的に抗うつ効果を示すほとんどの薬物を検出可能なことから、抗うつ薬の前臨床評価試験法として現在も汎用されている。しかしながら、この前臨床評価法には、雄性動物のみが使われ、雌性動物は性周期による内分泌の変動が得られた実験成績の理解を複雑にするとの通俗的理由から、ほとんど適用されてこなかった。人における気分障害の罹患率は男性よりも女性が高いこと、性差が存在し抗うつ薬に対する反応が異なること (Khan et al., 2005)、また、女性ホルモンの変動する時期 (思春期、周産期、閉経期) に顕在化することなどから、抑うつ状態の発現には女性ホルモンが影響している可能性は十分示唆されてきた。それにもかかわらず、雄性動物を用いた評価試験から開発された薬物が女性に適用されており、男性と同様の効果が期待できるのか極めて疑問が残る。

Okada et al. (1997) は、雌性ラットの両側卵巣を摘出し人為的に閉経状態を惹起させると、強制遊泳法での不動時間が延長することを報告した。既報 (Porsolt et al., 1978) のように、ラットの場合には、前日に一度 15 分間の遊泳テストを経験させ、翌日、再び 5 分間の遊泳テストを行う必要があった。従って、マウスと異なり、学習や記憶の関与は排除できない (Su et al., 2013)。雄性マウスの場合には強制遊泳法を単回試行で薬効評価ができ、強制遊泳法は抗うつ薬の薬効評価に有用であり、信頼性および予測妥当性が優れていることが指摘されている (Petit-Demouliere et al., 2005)。そこで、著者らは、雌性マウスを用い実験的に閉経を惹起することで、抑うつ状態が発現するか否か、換言すれば、強制遊泳法における不動時間の延長現象が確認できるか否かを詳細に検証した (Bekku and Yoshimura, 2005)。さらに、研究者間で異なっていた強制遊泳の方法論を検討するなど、動物モデルとしての有用性を多角的に検証した (Bekku et al., 2006)。ここでは、閉経周辺期の抑うつ状態を対象とした動物モデルを確立するまでの資料とともに、閉経後の不動時間の延長 (抑うつ状態) 現象の脳内機序について述べる。

II. 閉経周辺期の抑うつ状態を対象とした動物モデルの開発

II -1. 卵巣摘出による不動時間の延長現象

現在、臨床的に使用されている抗うつ薬は、雄性のマウスやラットの強制遊泳法による不動時間を有意に短縮する効果を有する。このことが、抑うつ状態の発現が女性に顕著であるという臨床像を顧慮せず、雄性マウスを使用することに繋がったのかも知れない。そこで、女性に抑うつ状態を惹起することが知られている両側卵巣摘出術を雌性マウスに適用し、まず、不動時間に影響があるか否かを検証した。非手術群、腹部切開だけで卵巣を摘出しない偽手術群、両側の卵巣を摘出した群とで比較検討した。その結果、卵巣摘出群は優位に不動時間を延長することが判明した (Fig. 2-a)、卵巣摘出により内因性エストロゲンが急激に減少して子宮が退縮し、卵巣摘出群では著明に子宮重量が減少していた (Fig. 2-b)。次に、両側卵巣を摘出後、いつ頃から、その不動時間の延長現象が観察されるのかを検討した。卵巣摘出した後、7, 10, 12, 14, 16, 18, 21, 28, 35 日経過した手術群と偽手術群を設定し、不動時間を比較した。その際に、反復測定による影響を排除するために、それぞれの時期に独立群を設定した。その結果、10 日目から 18 日目までに有意な不動時間の延長現象が認められ、21 日目以後は、偽手術群との間に有意差が認められなくなった (Fig. 2-c)。そこで、卵巣摘出の 2 週間後に強制遊泳テストを行うことにし、薬物の慢性投与は、この 2 週間毎日行うことにした。最近の研究 (Saravi et al., 2016; Heydarpour et al., 2013) においても、卵巣摘出 10 日後に不動時間の延長現象が観察されており、著者らの結果と一致する。また、21 日目以降に、不動時間の延長現象が消失したことは、ヒトの場合も、外科的あるいは自然閉経した女性の抑うつ状態は、多くの場合、一過性のものであり、その後、女性ホルモンの枯渇した状態に適応することを考慮すれば、極めて興味深い。卵巣摘出による不動時間の延長現象は、卵巣摘出による自発運動の変化による二次的な影響ではないのかという疑問が残るので、その行動特異性を確認するため、高架式十字迷路試験や自発運動量を測定したが、どちらの評価法においても卵巣摘出後、自発運動は変容しないことを確認した (Bekku et al., 2006)。Saravi et al. (2016) や Heydarpour et al. (2013) などの研究でも、自発運動に対する影響は認められていない。卵巣摘出したマウスの強制遊泳法における不動時間の延長は、卵巣摘出による特異な行動変容と考える。

II -2. 性差、性周期が不動時間に与える影響

強制遊泳法における不動時間には性差があることから、雌性動物の場合、性周期によって行動が変容するのではないかという疑問 (Alonso et al., 1991) が提出されていたので、性差や性周期による行動変容を検討した。まず、約 10 週齢の雌雄マウスを用いて、健常マウスの強制遊泳法において観察される不動時間を検討したが、性差は認

められなかった。また、雌性マウスの性周期 (proestrus, estrus, metestrus, diestrus) による変動を測定したが、不動時間に有意差は認められなかった (Bekku et al., 2006)。最近, Carrier et al. (2015) からも同様の報告がなされた。

II -3. 強制遊泳法における装置の直径と水深が不動時間に与える影響

強制遊泳法の装置は、極めて簡便であり、ポリカーボネート製の円筒状の容器に一定の水を満し、その中に1匹のマウスを入れ、強制的に遊泳させるだけである。著者らは、高さ 25cm×直径 10cmのポリカーボネート製のシリンダーを用い、その中に 24℃の水を 10～12cmまで満し (系統により体調が異なるので)、6分間遊泳させている。6分間のうち、2分後から4分間を行動解析の対象とし、ビデオを観察しながらイベントレコーダーを操作して不動状態の累積時間を指標としている。マウスは、水に入れられた直後は、逃れようともがいたり泳いだりするが、その後、逃避不可能を学習したかのように頭部を水面に出して浮遊し不動化 (immobilization) する。簡単であるが、論文を精査すると、装置の直径と水深により異なって結果が導かれている。そこで、容器の直径と水深を変え、不動時間の測定を試みた。直径 10cmの容器で、水深を 10cmと 20cmに設

定したところ、マウスの累積不動時間に有意差はなかった。次に、直径を変え、直径 20cmの容器に、水深 10cmと 20cmで測定したところ、水深 10cm, 20cmともに不動時間が有意に短くなった。容器の直径が 10cmであれば、足が底に付かなくとも、身体 (とくに尾) が容器のどこかに触れて、安定した不動状態が可能となるが、直径が大きくなると安定した浮遊状態が難しくなり、動く回数が増えることが判明した (Bekku et al., 2006)。

II -4. 系統差が不動時間に与える影響

実験動物において、抗うつ薬の効果や反応性には系統差のあることが指摘されていた (Petit-Demouliere et al., 2005; Porsolt, 1978; Lucki et al., 2001)。著者らは、SPF (specific pyrogen free) の標準化された ICR マウスを使用しているが、他の系統でも同じ現象が観察できるのか、比較を試みた。その結果、卵巣摘出による不動時間の延長現象は、C57BL/6J 系および CD-1 系でも再現できた (Fig. 2-d)。ところが、DBA 系雌マウスでは、卵巣を摘出しても、不動時間の有意な延長は認められなかった。DBA 系のマウスは、鎮痛効果の実験系でも他の系統と異なることが知られており、注意が必要と考える。

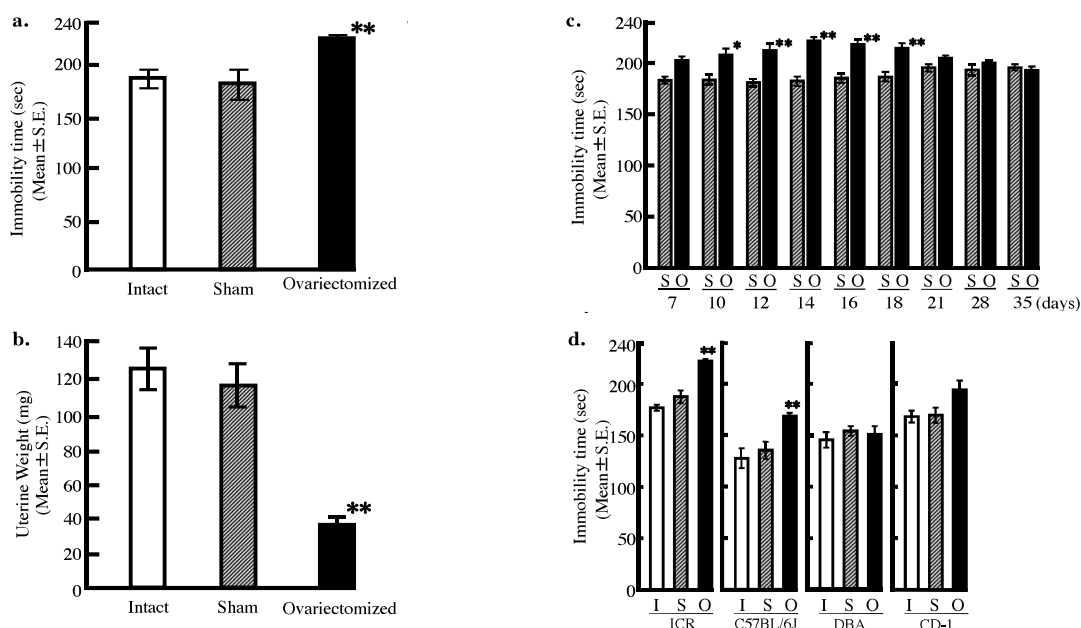


Fig.2. Effects of ovariectomy in female mice. (a) : the duration of immobility time. (b) : uterine weight. (c) : effect of the time interval between ovariectomy and testing on the immobility time. (d) : Strain differences on the duration of immobility. Vertical lines indicate the mean ± SE. I: intact group, S: sham-operated control group, O: ovariectomized group. *p < 0.05, **p < 0.01; Significantly different from the sham-operated group. (Bekku & Yoshimura, 2005 ; 2006.)

II -5. 17β - エストラジオールの卵巣摘出後の不動時間と子宮重量への影響

閉経周辺期女性の抑うつ状態に対して、ホルモン補充療法が適用されているが、生殖器腫瘍を誘発する危険性もあり、注意が必要である。Fig.3-a に示すように、17β -エ

ストラジオールを卵巣摘出後から毎日1回皮下注射すると、2週間後には用量依存的に不動時間の延長現象が抑制され、15および30μgでは、偽手術群のレベルまで短縮された。Walf and Frye (2010) は、加齢雌マウス (24カ月) を用い、17β -エストラジオール (10μg) 投与による不動

時間の短縮効果を確認している。エストロゲンの潤渇による不動時間の延長に対する 17β -エストラジオールの改善効果（抗うつ効果）と推察でき、ヒトの場合の卵巣摘出術や加齢によって発現する抑うつ状態と同様であることは興味深い。

一方、著者らが行った 17β -エストラジオールの不動時間短縮効果が認められた有効量（3, 15, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）では、子宮重量が著明に増加し、偽手術群との間に有意差が認められた（Fig. 3-b）。雌性ラットの場合にも同様の効果が認められており（Okada et al., 1997）、ヒトにおけるエストラジオール長期投与の危険性を裏付けるものであろう。

II -6. 卵巣摘出による不動時間の延長に対する向精神薬の影響

抗うつ薬候補物質のスクリーニング法でもう一つ重要なことは、臨床的に精神疾患が薬物の単回急性投与で治癒する例は極めて稀であり、一定期間の反復投与が必要であることである。ここにも、隘路が存在しており、実験動物による抗うつ薬の薬効評価は、多くの場合、単回の急性投与実験で為されていることに注意が必要である。精神科領域で、この視点は極めて重要であり、ここに紹介した卵巣摘出による不動時間の延長現象は、急性効果（卵巣摘出後2週間目に薬物を投与）と慢性効果（卵巣摘出後2週間毎日薬物を投与）を比較評価できる実験系であることは利点となる。慢性投与の期間が短いと感じられる読者は、雌マウスの性周期が4日であること（ヒトの場合は約28日）を考慮されれば、理解されるであろう。臨床的に抑うつ状態の改善に有効な既存の抗うつ薬（イミプラミン、フルボ

キサミン、ミルナシプラン）は、慢性投与した場合、用量依存的に卵巣摘出による不動時間の延長現象を抑制した（Fig. 3-c）。特異性を検討するため、健忘作用を有するスコポラミンやジアゼパムの慢性効果を検討したが、卵巣摘出による不動時間の延長現象に有意な影響を与えなかった。これらの薬物は、ラットを用いた強制遊泳テストでは、不動時間の短縮効果を示すが、マウスでは不動時間に影響しないことが報告（Bourin et al., 1991; Biala, 1998）されており、ラットの実験手続きに学習・記憶の要因が含まれていることが原因と思われる。卵巣摘出による不動時間の延長現象を抑制した抗うつ薬が、卵巣摘出していない雌性マウスの不動時間に影響するのとも検討したが、不動時間に影響はなく、特異的な効果と考えている。これらの抗うつ薬を単回投与した急性効果を検討したところ、イミプラミン（15mg/kg）の単回投与のみで有意な不動時間の短縮効果がみられた。

エストロゲンは脳内の神経伝達、とくにセロトニン（5-HT）受容体の活動を調節すること、エストロゲンの働きには 5-HT_{2A} 受容体の関与が指摘されていること（Sipe et al., 2004）、などから、卵巣摘出によるエストロゲンの潤渇が 5-HT 受容体のシグナル伝達を変化させている可能性がある。そこで、 5-HT 受容体サブタイプのうち、 5-HT_{1A} アゴニストの 8-OH-DPAT と 5-HT_{2A} アゴニストの DOI を用いて、卵巣摘出による不動時間への影響を検討した。この二つの薬物の慢性効果をみたところ、DOI で不動時間の短縮効果がみられ、 8-OH-DPAT では有意な影響は認められなかった。急性効果でも、慢性効果と同様に DOI でのみ不動時間の短縮がみられた。従って、卵巣摘出後の不動時

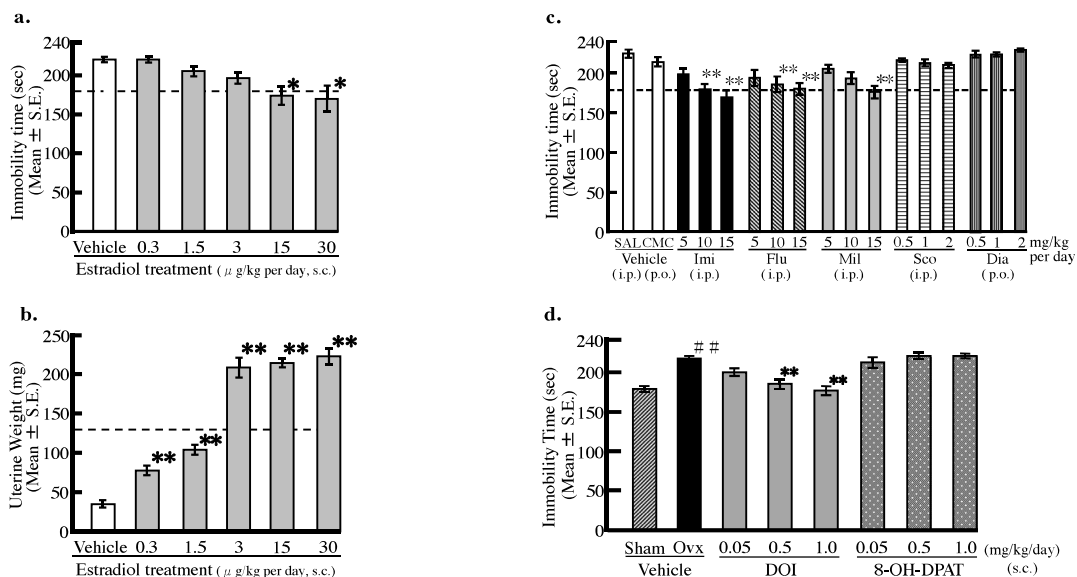


Fig.3 Chronic effect of estradiol on the duration of immobility time (a) and the uterine weight (b) in ovariectomized mice. Chronic effect of psychoactive drugs (c) and DOI, S-OH-DPAT (d) of immobility time in ovariectomized mice. Imi: imipramine, Flu: fluvoxamine, Mil: milnacipran, Sco: scopolamine, Dia: diazepam. The dotted line shows control level in the sham-operated mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Significantly different from the vehicle-treated group. ## $p < 0.05$; Significantly different from the sham-operated group. (Bekku & Yoshimura, 2005 ; 2006.)

間の延長現象には、エストロゲンの涸渇とともに5-HT_{2A}受容体が重要な役割を担っていることが推察された。

Ⅲ. 今後の展望

女性ホルモンには、エストロゲンだけでなくプロゲステロンが含まれ、プロゲステロンが気分障害やストレス反応に関与するとの報告がなされている (Maurice et al., 2001). Frye (2011) は、卵巣摘出マウスを用い、プロゲステロンの抗うつ効果を研究し、プロゲステロンが不動時間を短縮することを見出しているが、著者らもプロゲステロンの慢性投与は卵巣摘出による不動時間の延長現象を抑制し、また、エストロゲンと異なり、子宮重量の増加を惹起しないことを見出している (未発表).

閉経週期の抑うつ状態を含む更年期障害は、世界各国の女性に共通してみられる症状であることから、古来、世界の多くの国や地域に伝承的あるいは民族的な対処法が存在する。東南アジアでは高麗人参や甘草、中近東ではローヤルゼリーやペルシャザクロ、欧州ではリンデンフラワー、インドシナ半島ではガウクルアやココナッツなど天然物に由来するものが用いられてきた (吉村ら, 2010). しかし、これらの天然物を利用する科学的根拠は少なく、歴史的に淘汰され、今日まで適用されてきたという事実しかない (吉村ら, 2010). 閉経週期の抑うつ状態の動物モデルを用い、Yamada et al. (2011) は、*Panax ginseng* C.A.Meyer (オタネニンジン) の抗うつ効果を検証し、含有有効成分として ginsenoside Rb1 と compound K を同定に成功し、エストロゲン涸渇による抑うつ状態改善への補完代替物質としての可能性を見出している (Yamada et al., 2011). また、ここに紹介した動物モデルを利用して、種々の候補物質の有効性を検討しつつある。精神疾患の予防や改善に伝承的な天然物や食品の科学的根拠が、例えば、インド蛇木から精神病の薬物治療の道を拓いたレセルピンのような医薬品のように、得られることを願っている。

文 献

Alonso SJ, Castellano MA, Afonso D, Rodriguez M (1991) Sex differences in behavioral despair: relationships between behavioral despair and open field activity. *Physiol Behav*, 49 (1), 69-72.

Bekku N, Yoshimura H (2005) Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. *psychopharmacology*, 183 (3), 300-307.

Bekku N, Yoshimura H, Araki H (2006) Factors producing a menopausal depressive-like state in mice following ovariectomy. *187* (2), 170-180.

Biala G (1998) Antidepressant-like properties of some serotonin receptor ligands and calcium channel antagonists

measured with the forced swimming test in mice, *Pol J Pharmacol*, 50 (2), 117-124.

Bourin M, Colombel MC, Malinge M, Bradwejn J (1991) Clonidine as a sensitizing agent in the forced swimming test for revealing antidepressant activity. *J Psychiatry Neurosci*, 16 (4), 199-203.

Carrier N, Wang X, Sun L, Lu XY (2015) Sex-Specific and Estrous Cycle-Dependent Antidepressant-Like Effects and Hippocampal Akt Signaling of Leptin, *Endocrinology*, 156 (10), 3695-3705.

Frye CA (2011) Progesterone attenuates depressive behavior of younger and older adult C57/BL6, wildtype, and progesterone receptor knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 99 (4), 525-531.

Heydarpour P, Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Rahimian R, Fakhfoury G, Khosravi M, Khoshkish S, Gharedaghi MH, Ghasemi M, Dehpour AR (2013) Estradiol reduces depressive-like behavior through inhibiting nitric oxide/cyclic GMP pathway in ovariectomized mice, *Horm Behav*, 63 (2), 361-369.

Khan A, Brodhead AE, Schwartz KA, Kolts RL, Brown WA (2005) Sex differences in antidepressant response in recent antidepressant clinical trials. *J Clin Psychopharmacol*, 25 (4), 318-324.

Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ (2001) Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 155 (3), 315-322.

Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P (2001) The interaction between neuroactive steroids and the sigma receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res Rev*, 37, 116-132.

Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, Inukai T (1997) Influences of ovariectomy and continuous replacement of 17beta-estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Jpn J Pharmacol*, 73 (1), 93-96.

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 177 (3), 245-255.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, 47 (4), 379-391.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229 (2), 327-336.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288 (3), 321-333.

Saeedi Saravi SS, Arefidoust A, Yaftian R, Saeedi Saravi SS, Dehpour AR (2016) 17 α -ethinyl estradiol attenuates

- depressive-like behavior through GABAA receptor activation/nitroergic pathway blockade in ovariectomized mice, *Psychopharmacology (Berl)*, 233 (8), 1467-1485.
- Seligman ME (1972) Learned helplessness, *Annu Rev Med*, 23, 407-12.
- Sipe K, Leventhal L, Burroughs K, Cosmi S, Johnston GH, Deecher DC (2004) Serotonin 2A receptors modulate tail-skin temperature in two rodent models of estrogen deficiency-related thermoregulatory dysfunction, *Brain Res*, 1028 (2), 191-202.
- Steiner M, Dunn E, Born L (2003) Hormones and mood: from menarche to menopause and beyond, *J Affect Disord*, 74 (1), 67-83.
- Su J, Hato-Yamada N, Araki H, Yoshimura H (2013) Test-retest paradigm of the forced swimming test in female mice is not valid for predicting antidepressant-like activity: participation of acetylcholine and sigma-1 receptors, *J Pharmacol Sci*, 123 (3), 246-255.
- Walf AA, Frye CA (2010) Estradiol reduces anxiety-and depression-like behavior of aged female mice, *Physiol Behav*, 99 (2), 169-174.
- Yamada N, Araki H, Yoshimura H (2011) Identification of antidepressant-like ingredients in ginseng root (*Panax ginseng* C.A. Meyer) using a menopausal depressive-like state in female mice: participation of 5-HT_{2A} receptors, *Psychopharmacology (Berl)*, 216 (4), 589-599.
- 吉村裕之, 山田典子, 城賀本晶子 (2010) 加齢とうつ病 更年期の抑うつ状態に対する代替医療の可能性, *アンチ・エイジング医学 - 日本抗加齢医学会雑誌*, 6 (6), 56 (844) -60 (848).
- 【付記】 本論文の研究内容における利益相反は存在しない。

Animal model of menopausal depressive-like state in female mice. *Journal of Nursing Science in Human Life*, 1: 1- 6 (2018) . Naoko Bekku¹⁾ and Hiroyuki Yoshimura²⁾ (Psychiatric and Mental Health Nursing Laboratory¹⁾ and Fundamental Nursing Laboratory²⁾, Faculty of Nursing at Matsuyama Campus, University of Human Environments)