

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08901

研究課題名(和文) アクアポリンを介した五苓散の下痢改善効果に関する研究

研究課題名(英文) Research on diarrhea-improving effect of Goreisan via the expression of aquaporins in intestine

研究代表者

柴原 直利 (Shibahara, Naotoshi)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授

研究者番号：10272907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：五苓散の下痢改善作用と腸管AQPの関連を解明するため、正常ラットと硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットを用い、五苓散が糞中水分含有量と腸管AQPタンパク質発現量に及ぼす影響について検討した。正常ラットにおいては、五苓散は糞中水分含有量には影響せず、大腸および空腸のAQP3およびAQP4を有意に増加させた。回腸のAQP3タンパク質発現量は五苓散投与により用量依存的に減少したが、AQP4タンパク質発現量は有意な変化を示さなかった。MgSO₄誘発下痢モデルラットにおいては、五苓散により糞中水分含有量は有意な減少を示し、大腸AQP3タンパク質発現量及びAQP4タンパク質発現は有意な増加を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to elucidate the relationship between diarrhea-improving effect and intestinal aquaporins (AQPs). Using normal rats and magnesium sulfate-induced diarrhea model rats, the influence of goreisan on the fecal water content and intestinal AQPs protein expression were examined. In normal rats, goreisan significantly increased AQP3 and AQP4 protein expression in colon and jejunum. The AQP3 protein expression in the ileum decreased dose-dependently by administration of pentobarbital administration, but the AQP4 protein expression showed no significant change. In MgSO₄-induced diarrhea model rats, goreisan decreased AQP3 protein expression and increased AQP4 protein expression in colon significantly.

研究分野：漢方医学

キーワード：下痢 五苓散 アクアポリン 生薬 漢方薬

1. 研究開始当初の背景

下痢は一般臨床において比較的高頻度に遭遇する症状であり、医学的には「糞便中の水分量が200mL/日以上または水様便を3回/日以上排泄する場合」と定義されている。その原因としてはウイルスや細菌といった感染症、抗生剤や抗癌剤などの薬剤性、免疫異常や腸管機能異常など様々である。一般的に、小腸の最大水分吸収能力は1日あたり約7~8L、大腸の最大水分吸収能力は約2Lとされており、この最大吸収能力を超える水分摂取・分泌、あるいは最大吸収能力の低下を来すと腸管内は水分過多となり、下痢を生じることとなる。下痢の治療は、その原因によって異なるが、整腸薬や収斂薬、吸着薬、殺菌薬、腸管運動抑制薬などが用いられている。

現在、漢方薬はプライマリケアの場において頻用され、下痢に対しても様々な漢方薬が用いられている。これは、2000年ほど前に記された漢方医学の古典である「傷寒論」が感染性腸炎を主とした感染症に対する治療を記したものであることに関係しており、下痢は発熱や食欲低下、便秘などととも漢方薬の治療対象となる症状の中でも重要であり、且つ効果を期待し得る症状である。下痢に対して頻用される漢方薬として半夏瀉心湯や五苓散、黄連湯、人參湯などが挙げられ、その中でも五苓散は、急性下痢に頻用される代表的漢方薬であり、小児感冒性胃腸症^{1,2)}や急性感染性腸炎³⁾、放射線性腸炎⁴⁾に起因する下痢に有効であることが示されており、基礎研究においても塩類下剤誘発性下痢モデルマウスに対する効果^{5,6)}が報告されている。

下痢は腸管における水分吸収、あるいは排泄の異常であり、水分恒常性維持機構の破綻と考えられる。人体における約60~70%は水であり、すべての生命活動において水は重要な役割を果たすことから、生体内で水の供給や排泄を調節することは非常に重要であり、この水分恒常性維持に重要な役割を担っているのがアキアポリン(aquaporins; AQP)である。便の水分量に大きく関わる大腸にはAQP3が粘膜上皮細胞に発現しており、AQP3の発現異常が便秘異常発症に関与し⁷⁾、一部の瀉下剤はAQP3発現を低下させると報告されている⁸⁾。止痢薬についてはAQP発現に対する影響が明確ではないが、今後の下痢に対する治療戦略を考える上で、AQPはターゲットとなり得るものであると考えられる。我々は、5/6腎摘ラット、およびピオグリタゾン投与糖尿病モデルラットの腎組織においてAQP発現が五苓散により調節されることを報告しており⁹⁾、下痢に対する五苓散の作用機序においてもAQPが関与している可能性が高いと考えられる、AQPを介した五苓散の止痢作用についての検討はなされていない。

2. 研究の目的

下痢の発症・治療の過程で鍵となる腸管の

AQPsに及ぼす五苓散の効果を基礎的に研究し、下痢の治癒機構とAQPsとの関連性、およびそれに関わる五苓散の作用を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 五苓散料エキス調製

五苓散料エキスは、沢瀉：桂皮：茯苓：猪苓：白朮 = 6 : 3 : 4.5 : 4.5 : 4.5の比率で生薬を混合し、常法により得られた煎液を凍結乾燥法により作製した。構成生薬単味エキスは、沢瀉・桂皮・茯苓・猪苓・白朮のそれぞれについて、常法により煎出し、得られた煎液を凍結乾燥法により作製した。

(2) 五苓散料エキス投与量

凍結乾燥した五苓散料エキスは水道水に懸濁したものを70mg/kg・140mg/kg・280mg/kgの濃度になるように調製して投与した。

(3) 正常ラットにおける群分けおよび投与方法

ラットは無作為にControl群(水道水, n=7)、Low群(五苓散料エキス 70mg/kg/日, n=7)、Medium群(五苓散料エキス 140mg/kg/日, n=7)、High群(五苓散料エキス 280mg/kg/日, n=7)の4群に群分けした。本実験開始直前まで自由摂水・自由摂食とし、実験中は絶食絶水とした。薬剤投与は、水道水2ml、あるいは五苓散料エキスの投与量を水道水2mlに懸濁し、胃ゾンデを用いて強制経口投与した。

(4) 糞中水分含有量の測定

五苓散料エキスを投与後より1時間毎に8時間後まで経時的に糞便を採取し、赤外線水分計を用いて糞中水分含有量を算出した。

(5) Western Blot法によるAQPsタンパク質発現量の測定

凍結したラット腸管粘膜100mgに細胞溶解バッファー800 μ lとComplete Mini Protease Inhibitor Cocktailを加えた後に3回ホモジナイズし、遠心分離したサンプルの上清を廃棄し、200 μ lのRIPA Bufferを加えて超音波で沈殿物を溶解し、沈殿物2 μ lに蒸留水38 μ lを加えてタンパク質含有量を測定した。

電気泳動はLaemmli法に基づいて行ない、タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動にアプライし、分離されたタンパク質はトランスプロットTurbo転写システムを用いて転写した後に5%スキムミルクと1時間反応させた。その後Rabbit anti-rat AQP3とAQP4 antibodyを4 μ gで一晩反応させた後に、Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP antibodyを1時間反応させ、化学発光検出器LAS 4000を用いてバンドを検出し、Image J 1.34s softwareで定量した。AQP3は、27kDaと30~40kDa総和をAQP3タンパク質の発現量として解析した。

(6) 硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラッ

トにおける群分けおよび投与方法

ラットを無作為にD-Sham群（水道水）、D-Control群（水道水）、D-Low群（五苓散料エキス 70mg/kg/日）、D-Medium群（五苓散料エキス 140mg/kg/日）、D-High群（五苓散料エキス 280mg/kg/日）の5群に振り分け、実験開始直前までは自由摂水・自由摂食とし、実験中は絶食絶水とした。実験当日にD-Sham群には水道水を、D-Control群・D-Low群・D-Medium群・D-High群には硫酸マグネシウム (5g/kg) を投与し、9時間後にD-Sham群とD-Control群には水道水を、D-Low・D-Medium・D-High群には五苓散料エキスをそれぞれ70mg/kg、140mg/kg、280mg/kgの濃度で強制経口投与した。

4. 研究成果

(1) 正常ラットにおける五苓散料エキスの糞中水分含有量及びAQPタンパク質発現量

正常ラットにおける8時間後までの総糞中水分含有量は、各群間に有意な変化は認めず（図1）、1時間毎に測定した経時的な糞中水分含有量についても有意な変化は示さなかった。

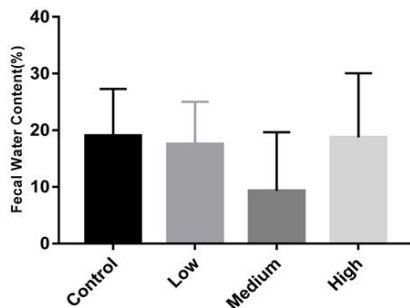


図1 五苓散料エキスが正常ラットの総糞中水分含有量へ与える影響

正常ラットに五苓散を投与したところ、大腸AQP3タンパク質発現量は用量依存的に増加を示し、High群ではControl群と比較して有意な増加が認められた（図2）。大腸AQP4タンパク質発現量についても、用量依存的に増加し、High群ではControl群と比べ有意な増加を示した（図3）。

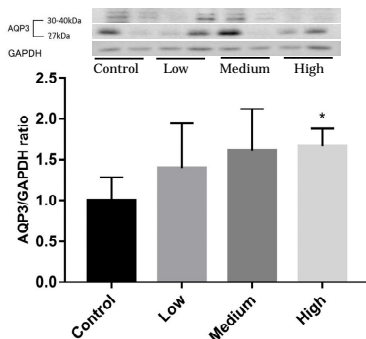


図2 正常ラットの大腸粘膜AQP3タンパク質発現量に与える五苓散料エキスの影響

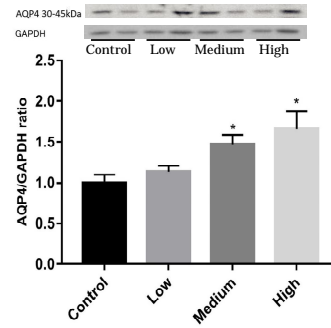


図3 正常ラットの大腸粘膜AQP4タンパク質発現量に与える五苓散料エキスの影響

空腸におけるAQP3タンパク質発現量は、五苓散料エキスLow群とHigh群がControl群と比較して有意に増加し（図4）、AQP4タンパク質発現量は、五苓散料エキスMedium群とHigh群がControl群と比較し有意な増加を示した（図5）。

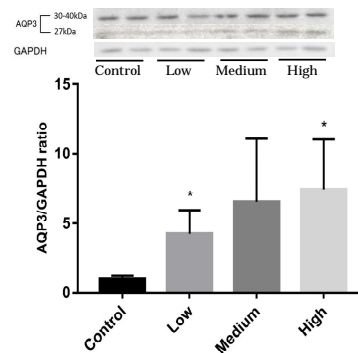


図4 正常ラットの小腸粘膜AQP3タンパク質発現量に与える五苓散料エキスの影響

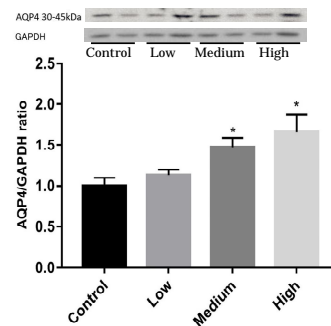


図5 正常ラットの小腸粘膜AQP4タンパク質発現量に与える五苓散料エキスの影響

正常ラットに五苓散料エキスを投与した際の回腸におけるAQP3タンパク質発現量は用量依存的に減少し、Medium群とHigh群ではControl群と比較して有意な減少を示した（図6）。AQP4タンパク質発現量には有意な変化はみられなかった。

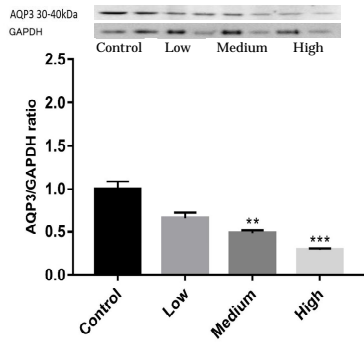


図6 正常ラットの回腸粘膜AQP3タンパク質発現量に与える五苓散料エキスの影響

(2) 硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットにおける五苓散料エキスの中水分含有量及びAQPタンパク質発現量

硫酸マグネシウムを3g/kg・4g/kg・5g/kgの用量でラットに経口投与して瀉下活性を検討したところ、5g/kgの濃度において明らかな瀉下活性を認めたことから、下痢誘発に用いる硫酸マグネシウムは5g/kgとした。

また、投与開始より10時間、便性状観察したところ、投与7時間後まではほとんど下痢状の糞を認めなかったが、投与8～9時間後より下痢状の糞の排出を認めた。

そこで、硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットの試験では、硫酸マグネシウム投与量は5g/kgとし、投与7時間後より糞便を採取し、硫酸マグネシウム投与9時間後に水道水あるいは五苓散を投与することとした。

硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットでは硫酸マグネシウム投与8時間後までの総糞中水分含有量は有意に増加し、五苓散料エキスではD-Low群で低下したが有意差はみられなかった(図7)。経時変化については、五苓散投与2時間後ではD-High群が有意な減少を示し、投与4時間後ではD-Low群で、投与6時間後ではD-Low群とD-Medium群で、投与8時間後はD-Low群で有意な減少を認めた(図8)。

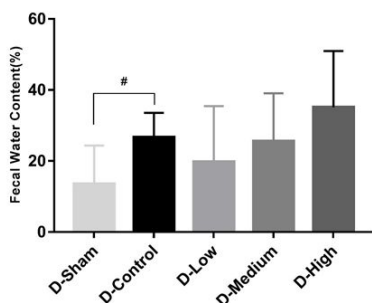


図7 下痢モデルラットの総糞中水分含有量に与える五苓散料エキスの影響

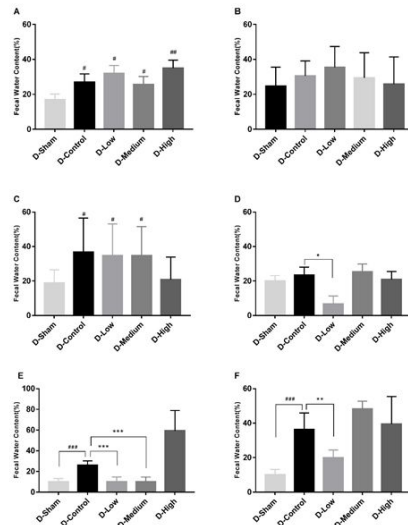


図8 下痢モデルラットの糞中水分含有量に対する五苓散料エキスの影響

五苓散料エキスが硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットのAQP3タンパク質発現量に対する影響については、五苓散料エキス投与10分後ではD-Low群およびD-Medium群は有意に増加し(図9 AB)、投与4時間後では、D-Low群で有意に増加し(図9 CD)、投与8時間後では、D-Low群とD-High群で有意な増加を示した(図9 EF)。

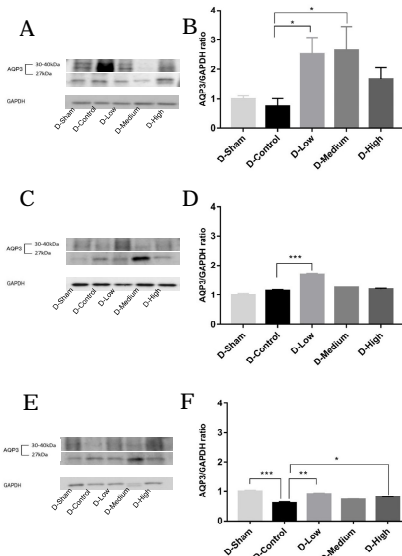


図9 硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットにおける大腸AQP3タンパク質発現量に対する五苓散料エキスの影響

硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットにおけるAQP4タンパク質発現量に対する五苓散料エキスの影響については、すべての測定時間において、五苓散料エキスを投与したすべての群のAQP4タンパク質発現量は、有意な増加を示した(図10 AB, CD, EF)。

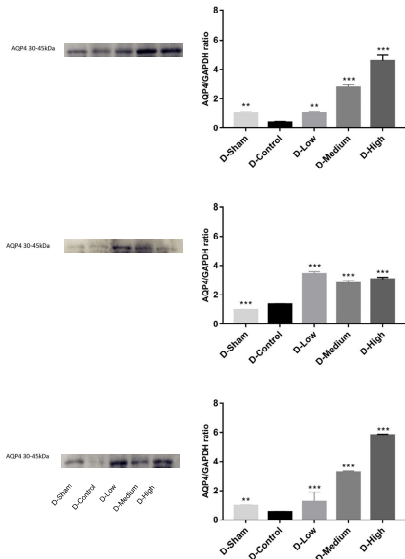


図10 硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットにおける大腸AQP3タンパク質発現量に対する五苓散料エキスの影響

(3) 硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットにおける五苓散構成生薬エキスの糞中水分含有量及びAQPsタンパク質発現量

硫酸マグネシウム誘発下痢モデルラットに、5種類の五苓散構成生薬エキスを投与したが、すべての生薬エキスで糞中水分含有量及び経時の変化に有意な変化は認めず、大腸AQP3およびAQP4についても変化は得られなかった。

正常ラットを用いて五苓散が糞中水分含有量に与える影響を経時的に観察したところ、五苓散は正常ラットにおける糞中水分含有量には影響を与えないことが示された。腸管内のAQPsタンパク質発現量については、大腸粘膜では五苓散の高用量投与においてのみ有意にAQP3およびAQP4タンパク質発現量を増加させた。一方、小腸では、五苓散は空腸粘膜のAQP3タンパク質発現量は増加させるが、空腸粘膜のAQP4および回腸粘膜のAQP3タンパク質発現量は減少させ、これらの作用は用量依存的であった。このことは、AQP3あるいはAQP4を五苓散の標的とした場合、その存在部位、あるいはタンパク種により異なる可能性を示唆するものである。

硫酸マグネシウムにより誘発した下痢モデルラットの実験においては、五苓散が有意な止瀉作用を示し、特に70mg/kgの低用量で投与した際に最も糞中水分含有量が減少した。五苓散は硫酸マグネシウム誘発下痢モデルマウスにおいて止瀉効果を示したが、その効果は逆ベルシェイプ型で、140mg/kgが最も強い止瀉作用を示したと報告されている⁵⁾。今回の実験に用いた五苓散の構成生薬量は異なっているが、構成生薬量および収率から換算すると、今回の70mg/kgは岡村らの140mg/kgに相当するものであり、矛盾するも

のではない。

今回の実験では、糞中水分含有量が低下した低用量の五苓散投与は大腸AQP3タンパク質発現量を増加させた。大腸管腔内の浸透圧は血管側の浸透圧と比較して低いため、水は浸透圧勾配に従って腸管側から血管側へ輸送される。この水の移動は、大腸粘膜上皮細胞膜に発現しているAQP3を介しており、大腸内の水輸送量はAQP3の発現量に依存していると報告されている¹¹⁾。このことは、五苓散投与により大腸AQP3タンパク質発現量が上昇し、これにより腸管側から血管側への水輸送が促進され、腸管内の水分がAQP3を介して体内へ吸収されるため、下痢が抑制されるのではないかと考えられた。

AQP4については、五苓散は用量依存的に大腸AQP4の発現を増加させた。下痢とAQP4タンパク質発現量については、ロタウイルス感染性や食物アレルギー誘発、5-FU誘発、センノシドA誘発といった下痢モデルにおいて、AQP4タンパク質発現量は減少すると報告されている¹²⁾。今回の実験で用いた硫酸マグネシウム誘発下痢モデルにおいても、大腸AQP4タンパク質発現量は減少しており、これまでの下痢モデルにおけるAQP4の挙動と矛盾しない結果であった。一方、五苓散は硫酸マグネシウム誘発下痢モデルにおいて、大腸AQP4タンパク質発現量を用量依存的に増加させた。しかし、AQP4タンパク質発現量が最も増加した高用量の五苓散は、硫酸マグネシウムで誘発した下痢に対して改善効果を示さなかったことから、五苓散の下痢改善効果がAQP4タンパク質発現量増加のみではないことを示すものと考えられた。

本研究の結果から、五苓散には下痢改善効果があり、その機序の一旦として、大腸AQP3及びAQP4タンパク質発現量増加作用が関連する可能性が示唆された。センノサイド誘発性下痢モデルラットではAQP3及びAQP4に変化を見いだせなかったことから、他の便秘改善薬がAQPsに対する影響についても検討する必要がある。しかし、五苓散がAQPsを介した作用を有することが明らかとなり、下痢に対する新規治療戦略を考える上でAQPsは治療ターゲットとしたとなり得るものであると考えられた。

<引用文献>

- 1) 吉田政己: 五苓散坐剤の効果: 日本小児東洋医学会誌, 19: 13-17, 2003
- 2) 鈴木順造, ほか: 乳幼児のウイルス性胃腸炎に対する五苓散の注腸療法の効果について. 小児科臨床, 58: 77-80, 2005.
- 3) 三浦陽子, ほか: 感染性下痢症に対する漢方治療の効果に関する検討. 産婦人科漢方研究のあゆみ, 28: 102-104, 2011
- 4) 尾崎正時: 放射線照射による下痢に対する五苓散の効果. 日本東洋医学雑誌, 63: 255-260, 2012

- 5) 岡村信幸: 塩類下剤誘発下痢モデルマウスに対する五苓散の効果. 日本東洋医学雑誌, 60: 493-501, 2009
- 6) Selim Ahmed, et al.: Evaluation of the Safety and Adverse Effects of Goreisan/Wulingsan, a Traditional Japanese-Chinese Herbal Formulation (Kampo), in a Rat Model: a Toxicological Evaluation. Tropical Medicine and Health, 42: 127-132, 2014
- 7) Ikarashi N., et al.: The Elucidation of the Function and the Expression Control Mechanism of Aquaporin-3 in the Colon. YAKUGAKU ZASSHI, 133: 955-961, 2013
- 8) Ikarashi N., et al.: Effects of Magnesium Sulphate Administration on Aquaporin 3 in Rat Gastrointestinal Tract. Biol Pharm Bull 34: 238-242, 2011
- 9) Jo M., et al.: Effect of goreisan on urinary concentrating ability and expression of aquaporin-2 in 5/6 nephrectomized rats. Journal of Traditional Medicines, 30: 145-157, 2013
- 10) 岡村信幸, ほか: 塩類下剤誘発モデルマウスに対する五苓散の効果. 日東医誌, 60(5): 493-501, 2009
- 11) Ikarashi N., et al.: Aquaporins in the Colon as a New Therapeutic Target in Diarrhea and Constipation. Int J Mol Sci., 17(7): pii: E1172, 2016
- 12) Yamamoto T. et al.: Downregulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy. Life Sci., 81(2): 115-120, 2007

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

呉 伊羲、木村 真梨、成田 絢香、サラ
ンチチグ、江藤 武志、入矢 美沙、条 美
智子、柴原 直利、正常ラット腸管における
五苓散のAQPsを介した水分調節に対する検
討、第34回和漢医薬学会大会、2017、福岡。
柴原 直利、シンポジウム「五苓散の基礎
と臨床～ 脳外科領域での有用性について」
五苓散の効果発現におけるアクアポリンの
関与、第34回和漢医薬学会大会、2017、福岡。
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴原 直利 (SHIBAHARA, Naotoshi)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
研究者番号: 10272907

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

木村 真梨 (KIMURA, Mari)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・技術職
員

呉 伊羲 (WU, Yixi)

富山大学・大学院医学薬学教育部博士前期
課程・大学院生

サランチチグ 伊羲 (SAREN, Qiqige)
富山大学・大学院医学薬学教育部博士前期課
程・大学院生