

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659056

研究課題名(和文) 廃棄される柿の蒂の天然資源としての可能性に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of Kaki Calyx as natural resources

研究代表者

石井 康子 (ISHII, YASUKO)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：00106436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 吃逆の治療に使われる柿蒂(Kaki Calyx)のラット脳脊髄液中神経伝達物質に及ぼす影響を検討したところ、GABAの変動は観察されなかったが、アスパラギン酸やグリシン、更に、ドパミンの代謝物であるDOPACやHVA濃度に影響を及ぼすことが示唆された。今後、これらを指標として、日本産の柿の蒂から有効成分の探索を行う予定である。また、柿蒂液の治療効果を処方異なる施設で後ろ向きに調査したところ、化学療法の施行により発症する吃逆の治療に、高濃度の柿蒂液の服用が適している可能性が示唆されたため、前向き調査によって確認する予定である。

研究成果の概要(英文)： Effects on neurotransmitter of Shitei (Kaki Calyx), a hiccups remedy, were examined in rat. The levels in rat cerebrospinal fluid of not GABA but aspartic acid, glycine, DOPAC and HVA, dopamine metabolites, changed after oral administration of shitei-decoction. Basing these results, we are going to screen effective components in calyx of kaki native to Japan. On the other hand, as clinical approach to clarifying the action mechanism of shitei, the clinical efficacy of shitei-decoction was retrospectively evaluated in some hospital adopting the different recipe, and it was suggested that high-concentration shitei-decoction was appropriate for treatment of hiccups developed after chemotherapy. Therefore, we will plan to confirm it by a prospective study.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：柿蒂 吃逆 がん患者 神経伝達物質 臨床効果

## 1. 研究開始当初の背景

吃逆(しゃっくり)は、日常ほとんどの人が経験するありふれた症状である。しかし、持続性・難治性吃逆は、様々な原因で発生し、化学療法を受けているがん患者や脳梗塞の既往がある高齢者で発症頻度が高く、患者のQOLを著しく低下させ、主疾患の治療の妨げにもなる。その治療法は確立されておらず、クロルプロマジン製剤や呉茱萸湯に適応があるが、抗精神病薬や抗痙攣薬・バクロフェン等が適応外で経験的に使用されている例が多く、対象の多くががん患者や高齢者であることから、より安全で有効性の高い治療薬の開発が望まれる。

柿の蒂(柿蒂\*)は、吃逆(しゃっくり)に対して有効性が高く安全とされ、民間や漢方薬\*\*として古くから使われて来た。院内にて柿蒂液を調製している聖隷浜松病院にてレトロスペクティブに予備調査を行った結果でも、中枢や末梢性の吃逆に対して高い改善効果を認めている。しかし、臨床現場での使用は限定されており、この原因として、調製の煩雑さばかりではなく、柿蒂の作用メカニズムの解明が行われていないことがあげられる。

これまでの研究では、吃逆は、舌咽神経咽頭枝が求心路となり、延髄弧束核に入った刺激が延髄網様体を経て、横隔神経、迷走神経の遠心路へ出力し、横隔膜・声門に伝達され(Clinical Neurosci 23,464-465,2005) 吸気運動(横隔膜収縮)と声門閉鎖運動(声門閉鎖筋運動)が協調して起こるもの(吃逆反射)であり、横隔膜の痙攣だけでは発生しないとされている。また、バクロフェンが吃逆を抑制することから(Neurosci Res. 30, 287-93, 1998) その発生機序に、アミノ酪酸(GABA)抑制系の関与が示唆され、柿蒂エキスに、GABA受容体の阻害剤により惹起される痙攣を抑制する抗痙攣作用があることがマウスを用いて報告(Am J Chin Med, 27,107-15,1999., Phytomedicine, 7, 69-72, 2000)されている。嘔吐と同様にマウス・ラットでは吃逆は観察されないことから、基礎研究から作用メカニズムの解明を図ることは困難であり、これまで柿蒂に関する研究は、横隔膜の痙攣作用に注目したものに限定されている。

\* 柿蒂(シテイ)は局外生規に収載されている生薬で、カキノキ *Diospyros kaki* Thunberg (*Ebenaceae*) の成熟した果実の宿存したぐくである。

\*\* 漢方では柿蒂湯として、丁子1.5g、柿蒂5.0g、生姜1.0gを煎じることによって調製する。

## 2. 研究の目的

柿はその廃棄される部分である果皮・葉・未熟実などに様々な生理作用が報告されているが、これらはタンニンなどのポリフェノールによる効果を期待したものがほとんどで、必ずしも柿特有の成分や効果ではない。しかし、完熟した柿の蒂は、局外生規に収載されている生薬であり、吃逆の治療に漢方では柿蒂湯として、柿蒂単独で煎じて民間薬としても長きにわたって使われて来た。現在の臨床現場においても、柿蒂単独で煎じた柿蒂液が、持続性・難治性吃逆の治療に処方されている。柿蒂湯には、胃腸の消化機能の促進や体を温める作用がある丁子や生姜が含まれており、これらを含まない柿蒂液では適応症例が異なる可能性もある。更に、時代の変遷に伴い、従来は対象では無かった化学療法の施行患者への適用が増加しているにもかかわらず、発症原因の区別なく処方されている。柿蒂の作用メカニズム解明のためにも、臨床効果の詳細な解析により柿蒂液の適応症例を明らかにすることが望まれる。

本研究は、抑制性神経伝達物質であるGABAや興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸(Glu)などのアミノ酸に加え、嘔吐・嚥下・咳嗽等の反射に密接な役割を果たすサブスタンスPの生成に関わるドーパミンなど、脳内神経伝達物質の動態に柿蒂が及ぼす影響を明らかにすることによって、柿蒂の生理活性成分を探索するための指標を見出し、活性成分を単離・同定することを目的とする。更に、柿蒂を処方された吃逆患者の症例を詳細に解析することによって、探索の指標とした要因の妥当性についても評価を行う。

本研究を通して、柿蒂から新たな生理活性成分を見出すことが出来れば、廃棄される柿の蒂の有効利用につながるばかりではなく、がん患者や高齢者のQOLを著しく低下させる持続性・難治性吃逆に対するより安全で有効性の高い治療薬開発に寄与するものと考えらる。

## 3. 研究の方法

### (1) 柿蒂投与後の神経伝達物質の測定

#### ① 神経伝達物質の測定方法

測定対象は、抑制性神経伝達物質であるGABA・グリシン(Gly)、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸(Glu)アスパラギン酸(Asp)、一酸化窒素の生成源であるアルギニン(Arg)に加え、嘔吐・嚥下・咳嗽等の反射に密接な役割を果たすサブスタンスPの生成に関わるドーパミン(Dp)とその代謝物であるDOPACとHVA、ノルエピネフリンの代謝物

である MHPG, セロトニンとその代謝物 (5-HIAA) とした。

アミノ酸の測定は、バクロフェンを内部標準とし、NBD-F で蛍光誘導体化後セミマイクロ HPLC 法により行った。反応後 24 時間までの測定値の変動は 2.2% 以下で、安定性に問題が無いことを確認した。

モノアミンとその代謝物の測定は、電気化学検出 (ECD) セミマイクロ HPLC 法により行った。

ラット生体試料中神経伝達物質の測定

ラットに柿蒂液を経口投与後、一定時間後に得た脳脊髄液 (CSF) と血漿を限外ろ過して HPLC 用の試料とした。アミノ酸の測定には CSF と血漿を、その他の測定は CSF を対象とした。なお、臨床現場で吃逆の治療に処方されるガバペンチン (Gp) を比較対照薬とし、Gp の効果を裏付けるために、生体試料中の濃度を、アミノ酸と同様の方法で測定した。Gp が CSF 中に血漿の約 3-4% の濃度で存在していることを確認した。

#### (2) 柿蒂液の臨床効果の後ろ向き調査研究

柿蒂液の調製法が異なる静岡県下 3 病院において、柿蒂液を処方された吃逆患者を対象に、カルテから、その治療効果に加え、性別、BMI、喫煙・飲酒歴、主疾患、基礎疾患、既往歴、発症契機・時期、柿蒂液処方前後の治療症・症状、吃逆継続期間、検査値等について調査を行った。

なお、本調査研究は、静岡県立大学並びに調査対象とした県下 3 病院の臨床研究倫理委員会の承認を得て実施している。

## 4. 研究成果

### (1) 柿蒂の神経伝達物質に及ぼす影響

#### ① 柿蒂液のアミノ酸濃度に及ぼす影響

柿蒂に含有されるアミノ酸が吸収されて直接的に効果を示す可能性もあることから、はじめに柿蒂液中の GABA と Glu 濃度を確認した。柿蒂 10g を使って調製した柿蒂液に含まれる GABA 量は 1 mg 以下、Glu は 0.1 mg 以下と極めて微量であった。次いで、柿蒂液あるいは Gp がラット CSF や血漿中アミノ酸 (GABA・Gly・Glu・Asp・Arg) 濃度に及ぼす影響を確認した。対照群と比べて、柿蒂・Gp のいずれの投与群においても、CSF 中の GABA・Arg・Glu の濃度に影響は認められなかったが、CSF 中 Gly 濃度の低下に加え、Asp 濃度の低下傾向が認められた。

柿蒂液のモノアミン濃度に及ぼす影響

柿蒂液あるいは Gp が、ラット CSF 中モノアミンとその代謝物 (Arg・DOPAC・HVA・MHPG・5-HIAA) 濃度に及ぼす影響を確認した。対照群と比べて、柿蒂のみに CSF 中ドパミンの代謝物である DOPAC と HV 濃度の上昇傾向が認められた。

### 柿蒂中生理活性成分の探索研究

現在、日本国内に流通している柿蒂は中国産に限られているが、臨床現場での使用経験から日本産がより有効であったとの情報もあることから、柿の分類を代表する品種を、静岡県産を中心として選び、未熟な時期と完熟期の時期の蒂を採取し抽出エキス試料を作成した。今後、本研究で見出された指標となる神経伝達物質に対するこれら試料の影響を確認することによって探索に最も適した試料を選定し、有効成分の探索を行う予定である。

#### (2) 柿蒂液の臨床効果の後ろ向き調査研究

静岡県内を中心とする 17 病院 (がん診療連携拠点病院ないし地域がん診療連携推進病院 10 施設を含む) を対象に、柿蒂湯ないし柿蒂液の調製の有無を確認したところ、柿蒂湯の調製は 1 施設のみで、柿蒂液は 9 施設で調製され、柿蒂液の調製方法に施設間差があることが分かった。そこで、調製方法に差がある 3 施設を対象に、柿蒂液の臨床効果をレトロスペクティブに調査した。効果判定が困難な症例が多く、また、解析に必要な症例数に達していないが、予備調査結果と同様に、持続性・難治性吃逆の発症率が著しく男性で高く、性差が認められ、柿蒂液の改善効果が高いことを確認でき、副作用は特に認められなかった。また、高濃度の柿蒂液の服用により、化学療法の施行後に発症する吃逆の治療効果が高まる可能性があることが示唆されたため、今後、前向き調査により明らかにして行く予定である。

また、調査から吃逆発症の原因と推定された医薬品が、脳内神経伝達物質に及ぼす影響を確認し、柿蒂中の有効成分探索指標の妥当性も評価する。

#### (3) 柿蒂に関するその他の研究

柿に関する研究は、タンニンなどポリフェノールによる効果を期待し、未熟果や葉を対象に行われている。ポリフェノール等が、本実験系に影響を及ぼす可能性もあるが、蒂に関する情報が乏しいのが現状である。そこで、本実験系への基礎データを得ることに加え、蒂の資源としての可能性の探索を目的として、生理活性成分探索用に準備した試料を対象として、ポリフェノール含量や、ポリフェノールの効果を期待したアッセイ系による活性成分の探索も合わせて検討を行っている。凍結乾燥粉末中のポリフェノール含量は、一品種で未熟果と蒂で同程度だったが、他の品種は全て未熟・完熟を問わず、蒂の方がかなり高く、天然資源として可能性が期待できるものと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 石井 康子、谷澤 久之、狩倉 正実、宮瀬 敏男、賀川 義之：脳脊髄液中神経伝達物質に及ぼす柿蒂液の影響、US フォーラム(静岡、要旨集 p48、2012 年 9 月 25 日  
古谷 翔太、石井 康子、鈴木 祐介、木村 正幸、加藤 有希、野毛 一郎、林 秀樹、伊藤 邦彦、賀川 義之：日本人閉経後乳がん患者におけるアロマターゼ阻害薬の PK と PD に関する研究、日本薬学会第 135 年会(神戸)、要旨集 4、p195、2015 年 3 月 26 日  
鈴木 祐介、石井 康子、古谷 翔太、加藤 有希、野毛 一郎、木村 正幸、賀川 義之：日本人閉経後乳がん患者のアロマターゼ阻害薬による副作用と エストロゲン濃度に関する研究、日本薬学会第 135 年会(神戸)、要旨集 4、p195、2015 年 3 月 26 日  
石井 康子、梅原 薫、高橋 忠伸、野口 博司、鈴木 隆、賀川 義之：柿の非可食部の機能性評価方法に関する検討【発表確定】、US フォーラム(静岡)、2015 年 9 月 29-30 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

石井 康子 (ISHII YASUKO)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号：00106436

### (2)研究分担者

梅原 薫 (UMEHARA KAORU)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号：40185070

### (3)研究協力者

野毛 一郎 (NOGE ICHIRO)  
沼津市立病院・薬剤部・部長

加藤 有希 (KATO YUKI)  
沼津市立病院・薬剤部・薬剤師