

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460912

研究課題名(和文) 漢方薬に由来するイオンチャネル修飾成分の探索

研究課題名(英文) Investigation of ion channel modulators in Japanese Kampo.

研究代表者

鬼頭 佳彦 (Kito, Yoshihiko)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60381787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：六君子湯と茯苓飲は用量依存的にマウス胃幽門部輪走筋の自発収縮を抑制し、六君子湯と茯苓飲の共通構成生薬の中で、蒼朮、陳皮、人參が自発収縮抑制作用を示した。六君子湯はマウス胃幽門部輪走筋の膜を脱分極させた後にスローウェーブを消失させた。一方、茯苓飲は膜を過分極させスローウェーブの発生頻度と振幅を減少させた。同実験において、蒼朮は膜をわずかに脱分極させたがスローウェーブの発生頻度に影響を及ぼさなかった。陳皮および人參は膜を過分極させたが、陳皮のみがスローウェーブの発生頻度を減少させた。以上の結果から、六君子湯と茯苓飲は異なる機序にてマウス胃幽門部輪走筋の自発収縮を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rikkunshito and Bukuryouin dose-dependently inhibited spontaneous contractions in circular muscles of the mouse gastric antrum. In the common constitutive herbs among the above two Japanese Kampo, *Atractylodis lanceae rhizoma*, *aurantiinobilis pericarpium* and *ginseng radix* inhibited those contractions. Rikkunshito depolarized the membrane and abolished slow waves recorded from circular muscles of the mouse gastric antrum. In contrast, Bukuryouin hyperpolarized the membrane and decreased the frequency and amplitude of slow waves. *Atractylodis lanceae rhizoma* slightly depolarized the membrane, but had no effect on the frequency of slow waves. *Aurantiiinobilis pericarpium* and *ginseng radix* hyperpolarized the membrane. *Aurantiiinobilis pericarpium* also decreased the frequency of slow waves. These results suggest that Rikkunshito and Bukuryouin inhibited spontaneous contractions in circular muscles of the mouse gastric antrum with different mechanisms.

研究分野：消化管運動

キーワード：漢方薬 生薬 消化管運動 電気的自発活動

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで六君子湯、半夏瀉心湯および桂枝加芍薬湯が消化管運動に及ぼす効果について研究を行い(六君子湯: Kito&Suzuki, Am J Physiol, 2010、半夏瀉心湯: Kito&Teramoto, Am J Physiol, 2012、桂枝加芍薬湯: Kito&Teramoto, Am J Physiol, 2012)、これらの漢方薬がイオンチャネル活性を修飾することで消化管運動抑制効果を発現することを示唆する結果を得た。すなわち、(1)六君子湯および桂枝加芍薬湯がアパミン感受性K(SK3)チャネルの活性化を介して消化管運動を抑制すること、(2)六君子湯および半夏瀉心湯がアゴニスト収縮を選択的に抑制すること、(3)半夏瀉心湯がテトロドトキシン(TTX)非感受性かつアパミン非感受性に自動運動を抑制することである。これらの結果は、(1)六君子湯と桂枝加芍薬湯の共通成分にはSK3チャネル活性成分が含まれること、(2)六君子湯と半夏瀉心湯の共通成分には消化管平滑筋において受容体作動性Caチャネルとして機能するTRPCチャネル抑制成分が含まれること、(3)半夏瀉心湯に特有の成分にはカハールの存在細胞(ICC-MY)における電気活動の発生を抑制する成分が含まれることを示唆する。

## 2. 研究の目的

マウスおよびラット消化管輪走筋の自発活動およびアゴニスト刺激に対する各種漢方薬(六君子湯、茯苓飲、桂枝加芍薬湯、半夏瀉心湯、芍薬甘草湯)とこれらの漢方薬の構成生薬の効果を解析し、イオンチャネル修飾成分の探索をおこなう。

## 3. 研究の方法

(1)筋張力測定:マウス胃底部、胃幽門部、近位結腸、遠位結腸およびラット胃底部、遠位結腸から輪走筋標本を作製し、等尺性張力を測定した。自発性収縮反応とアゴニスト誘発性収縮反応に対する漢方薬および構成生薬の効果を解析した。

(2)細胞内電位記録の測定:細胞内誘導法によってマウス胃幽門部、空腸、回腸、遠位結腸から記録される膜電位変化に対する漢方薬、構成生薬およびイオンチャネル阻害薬の効果を解析した。

## 4. 研究成果

(1)マウスおよびラット消化管輪走筋収縮反応に対する漢方薬および構成生薬の効果

胃底部:六君子湯(0.1 ~ 5 mg/ml)はマウス胃底部輪走筋標本におけるアゴニスト収縮(カルバコール、スルプロストンおよびクロプロステノール)を用量依存的に抑制した。六君子湯の構成生薬のうち、茯苓、蒼朮、半夏、生姜および大棗には抑制効果が見られず、陳皮、人參および甘草に弱い抑制効果が観察された。六君子湯および茯苓飲(いずれも5 mg/ml)はラット胃底部輪走筋標本におけるアゴニスト収縮(クロプロステノール)を抑制したが、茯苓飲のほうが六君子湯よりも強い抑制効果を示した。茯苓飲による抑制効果はTTX、NO合成酵素阻害薬(L-NNA)によって影響されなかった。六君子湯と茯苓飲に共通する構成生薬である茯苓はアゴニスト収縮を一過性に増強させ、蒼朮および陳皮はアゴニスト収縮を抑制した。蒼朮と陳皮の同時投与によって抑制効果は増強された。

胃幽門部:六君子湯はラットおよびマウス胃幽門部において輪走筋の自発収縮を静止張力の上昇を伴って抑制したが、標本によっては自発収縮の発生頻度を増大させた。一方、茯苓飲はラット胃幽門部においては輪走筋の自発収縮を静止張力を変化させずに抑制し、マウス胃幽門部においては自発収縮を静止張力の上昇を伴って抑制した。

近位結腸:半夏瀉心湯および芍薬甘草湯(0.1 ~ 5 mg/ml)はマウス近位結腸輪走筋標本における自発収縮(L-NNA存在下)および神経刺激誘発性収縮(アトロピン感受性成分)を用量依存的に抑制した。半夏瀉心湯の構成生薬のうち、黄芩、人參および乾姜が自発収縮を抑制したが、いずれも神経刺激誘発性収縮(アトロピン感受性成分)に対しては抑制効果を示さなかった。芍薬甘草湯の構成生薬である芍薬には抑制効果は見られず、甘草のみが抑制効果を示した。桂枝加芍薬湯(5 mg/ml)はマウス近位結腸輪走筋標本における自発収縮を抑制したが、神経刺激誘発性収縮(アトロピン感受性成分)は抑制しなかった。マウス近位結腸輪走筋標本における神経刺激誘発性収縮(アトロピン感受性成分)に

対する抑制効果の強さは半夏瀉心湯 > 芍薬甘草湯 > 桂枝加芍薬湯の順であった。

遠位結腸：芍薬甘草湯および半夏瀉心湯 (0.1 ~ 5 mg/ml) はラット遠位結腸輪走筋標本における自発収縮 (L-NNA 存在下)、神経刺激誘発性収縮 (アトロピン感受性成分) およびニフェジピン存在下での神経刺激誘発性収縮を用量依存的に抑制した。また、半夏瀉心湯は芍薬甘草湯よりも強い抑制効果を示した。

(2) マウスおよびラット消化管輪走筋膜電位変化に対する漢方薬および構成生薬の効果

胃幽門部：マウス胃幽門部輪走筋標本において、桂枝加芍薬湯および芍薬甘草湯 (いずれも 5 mg/ml) は膜を脱分極させ、スローウェーブの発生頻度、振幅および持続時間を抑制した。半夏瀉心湯 (5 mg/ml) は膜を脱分極させるとともにスローウェーブを消失させた。六君子湯 (5 mg/ml) は膜を脱分極させ、スローウェーブの発生頻度を一過性に増加した後にスローウェーブを消失させた。茯苓飲 (5 mg/ml) は膜を過分極させ、スローウェーブの発生頻度と振幅を減少させた。茯苓は膜を脱分極させ、スローウェーブの発生頻度を増加させた。蒼朮は膜をわずかに脱分極させたが、スローウェーブの発生頻度に影響を及ぼさなかった。陳皮は膜を一過性に過分極させ、スローウェーブの発生頻度を減少させたが、スローウェーブの振幅は変化させなかった。以上の結果から、六君子湯と茯苓飲は異なる機序にて胃幽門部の運動を抑制することが示唆された。また、茯苓飲による胃幽門部自発収縮抑制作用はスローウェーブに対する作用のみでは説明できないことから、未知の作用にて胃幽門部の自発収縮を抑制する可能性が示唆された。

回腸：マウス回腸輪走筋標本において、半夏瀉心湯、桂枝加芍薬湯および芍薬甘草湯 (いずれも 5 mg/ml) は膜を脱分極させ、スローウェーブの発生頻度、振幅および持続時間を抑制した。スローウェーブに対する抑制効果の強さは半夏瀉心湯 > 芍薬甘草湯 > 桂枝加芍薬湯の順であった。

遠位結腸：マウス遠位結腸輪走筋標本において、芍薬甘草湯 (5 mg/ml) は膜を脱分極させ自発一過性過分極を抑制した。桂枝加芍薬湯 (5 mg/ml) は膜を過分極させ、この作用は L-NNA にて抑制された。半夏瀉心湯 (5 mg/ml) は膜を過分極させ、この作用は L-NNA 抵抗性であり、TTX にて抑制された。

(3) マウス空腸における waxing and waning の発生機序：粘膜層を除去したマウス空腸輪走筋から振幅 20 ~ 30 mV のスローウェーブが記録され、静止膜電位は 60 ~ 70 mV であった。筋間神経叢に分布するカハールの介在細胞 (ICC-MY) からは振幅 50 mV 以上で立上りが速い巨大なスローウェーブが記録され、静止膜電位は 60 ~ 70 mV と輪走筋同様安定であった。一方、粘膜層を温存した標本の縦走筋、輪走筋およびから ICC-MY はスローウェーブとともに静止膜電位の周期的な脱分極反応である waxing and waning が記録された。waxing and waning は TTX 抵抗性であり、シクロオキシゲナーゼ阻害薬であるジクロフェナクによって抑制された。waxing and waning は Cl<sup>-</sup> チャンネル阻害薬あるいは Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共役輸送体 (NKCC1) の阻害剤によって抑制された。以上の結果から、マウス空腸においては粘膜あるいは粘膜下層からプロスタグランジンが産生されて waxing and waning を誘発している可能性が示唆された。

(4) マウス空腸におけるアドレナリン作動薬の効果：マウス空腸輪走筋標本において、フェニレフリンおよびアドレナリン (1 ~ 30 μM) は濃度依存的に膜を過分極させ、スローウェーブの振幅および持続時間を抑制した。フェニレフリンの作用はプラゾシンおよびアパミンにより完全に抑制された。一方、アドレナリンによる過分極において一過性の早い過分極はプラゾシンおよびアパミンにより抑制され、持続性の過分極はプロプラノロールにて抑制された。

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 3件)

Sanders KM, Kito Y, Hwang SJ, Ward SM.

Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. Physiology (Bethesda). 2016, Sep; 31(5): 316-26. (査読有)

Kito Y, Mitsui R, Ward SM, Sanders KM. Characterization of slow waves generated by myenteric interstitial cells of Cajal of the rabbit small intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015 Mar 1; 308(5): G378-88. (査読有)

Kito Y, Kurahashi M, Mitsui R, Ward SM, Sanders KM. Spontaneous transient hyperpolarizations in the rabbit small intestine. J Physiol. 2014 Nov 1; 592(21): 4733-45. (査読有)

[学会発表](計 7件)

鬼頭 佳彦、マウス小腸の自発性電気活動における粘膜の役割、第 90 回日本薬理学会年会、2017.3.15、長崎ブリックホール(長崎県)

Kito Y. Properties of waxing and waning in the mouse small intestine. The 68th Annual Meeting of the Korean Physiological Society, 2016.11. 4, Gwang-ju (Korea)

鬼頭 佳彦、マウス小腸における waxing and waning の発生機序、第 18 回日本神経消化器病学会、2016.9.10 北海道大学(北海道)

鬼頭 佳彦、小腸線維芽細胞における自発一過性過分極の発生機構、第 57 回日本平滑筋学会総会、2015.8.27 山口大学(山口県)

鬼頭 佳彦、三井 烈、ラット小腸の電氣的自発活動の性質、第 57 回日本平滑筋学会総会、2015.8.27 山口大学(山口県)

Kito Y. Properties of slow waves<sub>ICC</sub> recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the rat small intestine. Symposium on Multicellular inputs Regulating Muscle Excitability. 2015.6.16 Tahoe City, CA (USA)

鬼頭 佳彦、三井 烈、ラット小腸におけるカハール介在細胞の自発性電気活動、第 88 回日本薬理学会年会、2015.3.19、名

古屋国際会議場(愛知県)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 佳彦 (KITO, Yoshihiko)

佐賀大学医学部薬理学・准教授

研究者番号：60381787