

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590660

研究課題名(和文)三黄瀉心湯による抗メタボリックシンドローム作用の解明

研究課題名(英文)Elucidation of anti-metabolic syndrome effects by San'oshashinto

研究代表者

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI, Mayuko)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80363662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：更年期障害治療に用いる三黄瀉心湯は、雌性閉経モデルラットにおいて、総コレステロールの増加と食後高血糖を抑制し、メタボリックシンドローム(MetS)の発症を予防した。さらに三黄瀉心湯は、心臓の虚血再灌流障害を改善した。(心臓の虚血再灌流障害とは、心臓の血管内を血液が一時的に流れなくなり、再度流れた時におこる心筋の傷害で、MetSが発症の一因となる。)これらの有益な作用には、三黄瀉心湯の含有成分エモジンが関与しており、特に虚血再灌流後の心機能障害の改善は、エモジンの女性ホルモン様作用を介することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：San'oshashinto is one of the herbal medicines used for climacteric disorder. In ovariectomized female rats as a model of menopausal women, San'oshashinto reduces increased total cholesterol level and postprandial hyperglycemia, and so prevents the development of metabolic syndrome (MetS). Furthermore, San'oshashinto improves cardiac ischemia reperfusion injury that is the myocardial damage caused when blood supply returns to the tissue after a period of ischemia. (Cardiac ischemia reperfusion injury may develop as the result of the onset of MetS.) Emodin, one of the ingredients of San'oshashinto, participates in these beneficial effects. Especially, emodin's estrogen-like effect is involved in the cardioprotective effects on ischemia reperfusion injury.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：漢方薬 東洋医学 虚血性心疾患 メタボリックシンドローム 薬理学 循環器学

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MetS) は、高脂血症、耐糖能異常、高血圧のうち2つ以上を伴う動脈硬化易発生状態と定義されている。発症率と年齢の関係には性差が介在し、男性は30代で発症率が増加しはじめる一方、女性は50代以降に急激な増加が認められる。更年期以降の女性における MetS の発症増加には、閉経によるエストロゲン枯渇の関与が示唆されている。エストロゲンは、排卵制御のみならず、脂質代謝制御や心筋保護を示すため、更年期以降の女性ではこれらの有益な作用が消失し、MetS を発症すると考えられている。

我々は、更年期障害患者の不快症状を軽減しつつ、同時に脂質代謝異常や耐糖能異常、およびそれらが引き金となって発症する虚血性心疾患を改善するような薬物がないかと考え、漢方薬に着目した。その理由は、漢方薬が西洋薬とは異なる多成分系で、構成生薬中に含まれる多様な成分の有益な作用が、相加的にあらわれるためである。これまでに、黄連の薬効成分であるベルベリンには脂質低下作用が、黄芩の薬効成分バイカレインにはインスリン抵抗性の改善が報告されていることから、我々は、これらの生薬を含む漢方薬に MetS の予防・改善作用が期待できるのではないかと予測した。そこでこれらの生薬を含む処方を検索し、黄連、黄芩、大黄の三生薬からなる「三黄瀉心湯」による抗 MetS 作用に関する研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、三黄瀉心湯が、更年期以降の女性で MetS 発症の原因となる脂質代謝異常や耐糖能異常におよぼす影響を検討し、さらにこれらの異常が誘発要因となりうる虚血再灌流心機能障害の改善作用の機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 手術および薬物投与

実験では、閉経モデルとして卵巣摘出ラットを用いた検討を行った。雌性 Wistar ラッ

ト (九動) 8 週齢は、1 週間の予備飼育後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) に、両側卵巣全摘出術 (OVX) あるいは偽手術を施した。術後 10 日目より三黄瀉心湯 (ツムラ) 150 mg/day を 4 週間強制経口投与した。対照群には、溶媒である水を投与した。フルベストラント (AdooQ BioScience) 併用投与群では、10% ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したフルベストラント 10 mg/kg を毎週 1 回皮下投与した。エモジン (AdooQ BioScience) 投与群では、10% DMSO に溶解したエモジン 1.7 mg/day を 4 週間強制経口投与した。

(2) Langendorff 灌流心臓実験

摘出心臓標本は、Langendorff 法に従い、37 °C の酸素飽和化 Krebs-Henseleit 液にて定圧灌流を行った。実験では、冠灌流量ならびに左室機能の指標として左室発生圧、左室拡張末期圧、左室圧一次微分最大値および最小値を測定した。60 分間の平衡化の後、自己心拍数の 110% のレートでペーシングを施し、ペーシング開始から 15 分後に標本を完全虚血状態とした。30 分間虚血に続き 60 分間の再灌流を行い、再灌流終了時に灌流液と心筋を採取し、以下の実験に供した。

心筋の梗塞巣の測定

再灌流終了直後の心臓標本を 2 mm 径にスライスし、2% トリフェニルテトラゾリウムクロライド液に 37 °C で 15 分間インキュベートした。染色後の標本画像は、ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

心筋の酸化ストレスの検討

再灌流終了直後の左室心筋を用いて、ルシゲニン化学発光法により superoxide 産生量を測定した。また、SOD Assay kit (同仁化学研究所) を用いて、manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) 活性を測定した。

一酸化窒素代謝物 (NOx) の測定

灌流液中の NOx (Nitrite+Nitrate) 含有量は、HPLC-Griess reaction system (ENO-20 型: エイコム) にて測定した。

心筋のタンパク発現の検討

再灌流終了後の左室心筋を用いて SDS-PAGE を行い、Western blot 法により一酸化窒素合成酵素 (NOS) ならびにチロシンニトロ化タンパク発現を解析した。1 次抗体は、anti-inducible NOS (BD Transduction Laboratories), anti-nitrotyrosine (Merck Millipore), anti-GAPDH (Sigma-Aldrich) 抗体を、2 次抗体は、HRP 標識 anti-mouse IgG (BD Transduction Laboratories) または anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) 抗体を使用し、化学発光法で検出した。電気泳動画像は、multi gage ソフトウェア (FUJI FILM) を用いて解析した。

(2) 血中脂質の測定

薬物投与終了後の各処置群のラットは、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) に、下大静脈より採血した。血清サンプルの総コレステロール値は、富士ドライケム (ドライケム 4000 : FUJI FILM) にて測定した。

(3) 腹腔内グルコース負荷試験による耐糖能の検討

薬物投与終了後の各処置群のラットは、16 時間の絶食後に実験に供した。ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) にグルコース (2 g/kg) を腹腔内投与し、0, 30, 60, 120 分後に尾静脈より採血を行い、グルコカードマイダイア (アークレイ) を用いて血糖値を測定した。

4 . 研究成果

(1) 研究の主な成果

三黄瀉心湯が摘出灌流虚血再灌流心臓におよぼす影響

対照である水投与偽手術ラットに比して、水投与 OVX ラットでは、虚血再灌流による左室機能障害の増悪と心筋の梗塞サイズの増加を認めた。三黄瀉心湯を投与した OVX ラットでは、これらが有意に改善され、三黄瀉心湯による虚血再灌流心臓の機能的および形態学的保護作用が確認された。再灌流後の心筋を用いて酸化ストレス状態の検討したところ、水投与 OVX ラットでは、superoxide 産生の増加と Mn-SOD 活性の低下を認めたが、三黄瀉心湯投与 OVX ラットでは、これらの増

悪した酸化ストレス状態が有意に改善していた。また、水投与 OVX ラットでは、灌流液中の NOx 量と心筋の誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 発現の増加を認めたが、三黄瀉心湯投与 OVX ラットでは、これらの増加は有意に抑制された。水投与 OVX ラットで NOx と superoxide 産生が増加していたことから、superoxide と NO の反応物 peroxynitrite による心筋組織傷害を検討するために、心筋タンパクのチロシンニトロ化を検討したところ、Mn-SOD と見られるタンパクを含む複数のタンパクのチロシンニトロ化の増加を認めた。三黄瀉心湯を投与した OVX ラットでは、これらタンパクのチロシンニトロ化が有意に抑制された。

三黄瀉心湯による心保護作用の機序を明らかにするために、エストロゲン受容体拮抗薬フルベストラントを用いた検討を行った。三黄瀉心湯とフルベストラントを併用投与した OVX ラットでは、左室機能障害および心筋の梗塞サイズが水投与 OVX ラットと同程度であり、三黄瀉心湯単独投与群に比して有意に増悪していた。このことから、三黄瀉心湯の心保護作用の機序には、エストロゲン様作用が関与することが示唆された。次に、心保護作用の有効成分の解明を試みた。三黄瀉心湯の構成生薬「大黄」の含有成分で植物エストロゲン作用を示すエモジンを OVX ラットに投与すると、水投与群に比して左室機能障害の増悪および心筋の梗塞サイズの増加の抑制を認めた。

以上より三黄瀉心湯は、虚血再灌流心臓において iNOS により産生される NO と superoxide の産生増加を抑制することで、これらの反応物 peroxynitrite が引き起こす心筋傷害を軽減し、Mn-SOD の活性低下を抑制し心保護作用を示すことが明らかとなった。さらに、三黄瀉心湯の心保護作用の機序には、含有成分エモジンの植物エストロゲン作用が関与することが示唆された。

三黄瀉心湯が脂質代謝におよぼす影響

水を投与した OVX ラットでは、対照群の偽手術ラットに比して総コレステロール値が有意に増加しており、脂質代謝異常を呈する

ことが確認された。OVX ラットに三黄瀉心湯を投与すると、水投与ラットに比して総コレステロール値の有意な低下を示し、三黄瀉心湯による脂質低下作用が確認された。さらに、三黄瀉心湯の含有成分であるエモジンを OVX ラットに投与すると、三黄瀉心湯投与群と同様に、水投与 OVX ラットに比して総コレステロール値の有意な低下が認められた。そこで、三黄瀉心湯による脂質低下作用が主にエストロゲン様作用を介したのか否かを確認するために、OVX ラットにフルベストラント（エストロゲン受容体拮抗薬）と三黄瀉心湯を併用投与した。その結果、併用投与群の総コレステロール値は、三黄瀉心湯単独投与群と同様に、水投与群に比して有意な低値を示した。

以上より、三黄瀉心湯による脂質代謝異常改善作用の一部にはエモジンが関与するが、その主要な機序は、エストロゲン様作用以外の経路を介する可能性が高いことが示唆された。

三黄瀉心湯が耐糖能におよぼす影響

空腹時血糖値は、水投与 OVX ラット群と水投与偽手術ラット群、および三黄瀉心湯投与 OVX ラット群間で有意差は認められなかった。腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を行ったところ、水投与 OVX ラット群は、水投与偽手術ラット群に比してグルコース投与 30 分後の血糖値が有意に高値を示し、耐糖能異常を呈することが確認された。一方、三黄瀉心湯を投与した OVX ラット群のグルコース投与 30 分後の血糖値は、水投与 OVX ラット群に比して有意に低値を示した。エモジンを投与した OVX ラットにおいても、三黄瀉心湯投与群と同様に、水投与 OVX 群に比してグルコース投与 30 分後の血糖値の上昇の有意な抑制が認められた。また、フルベストラントと三黄瀉心湯を併用投与した OVX 群のグルコース投与 30 分後の血糖値は、水投与群と同程度であり、有意差は認められなかった。

以上より、三黄瀉心湯による耐糖能異常改善の一部にはエモジンが関与するが、その作用にはエストロゲン様作用を介さない機序が関与する可能性が示唆された。

(2) 得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究では、更年期の女性が「更年期障害の治療で三黄瀉心湯を服用すること」、さらに「MetS 発症は、更年期障害発症よりも後に起こること」を想定し、卵巣摘出術後、比較的早期に三黄瀉心湯の経口投与を開始し、長期間投与を行った。すなわち、本実験系は、卵巣摘出術により正常状態にあったモデル動物が、MetS の病的状態に陥る前の段階から、三黄瀉心湯を投与していることを特徴とする。

漢方薬を用いた既存の研究は、既に病的状態にあるモデルに対して、治療効果を検討した報告が多い。本研究は、三黄瀉心湯が脂質代謝異常や耐糖能異常、虚血性心疾患の発症を予防しうるか否か（東洋医学における「未病」を治す可能性）を検討した点に、新規性および学術的意義がある。

本研究により三黄瀉心湯は、更年期女性でおこる脂質代謝異常や耐糖能異常の発症を抑制し、虚血性心疾患の症状を軽減する可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、今後の臨床において、更年期女性の MetS 発症の抑制の一助となるものと期待される。今後は、三黄瀉心湯が脂質代謝異常と糖代謝異常を抑制する機序を解明し、有効成分の特定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mayuko Sakanashi, Toshihiro Matsuzaki, Katsuhiko Noguchi, Junko Nakasone, Makiko Sakanashi, Taro Uchida, Mika Kina-Tanada, Haruaki Kubota, Kumiko Arakaki, Akihide Tanimoto, Nobuyuki Yanagihara, Matao Sakanashi, Yusuke Ohya, Hiroaki Masuzaki, Shogo Ishiuchi, Kazuhiro Sugahara, Masato Tsutsui.

Long-Term Treatment With San'o-Shashin-To, a Kampo Medicine, Markedly Ameliorates Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury in Ovariectomized Rats via the

Redox-Dependent Mechanism.
Circulation Journal, vol. 77, No.7, 2013,
pp.1827-37 査読有り
DOI:10.1243/circj.CJ-12-1434

〔学会発表〕(計9件)

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「三黄瀉心湯が実験的閉経モデルラットの心臓虚血再灌流障害におよぼす影響: エモジンの関与」日本薬学会第134回年会(熊本)2014年3月28日

Mayuko Sakanashi, Toshihiro Matsuzaki et al. 「The cardioprotective effects of San'oshashinto on ischemia/reperfusion injury in ovariectomized rats: involvement of emodin」第87回日本薬理学会年会(仙台)2014年3月20日

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「閉経モデルラットの心臓虚血再灌流障害に対する三黄瀉心湯の心保護作用: emodinの関与」第66回日本薬理学会西南部会(福岡)2013年11月16日

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「三黄瀉心湯の長期投与レドックスに依存した機序を介して卵巣摘出ラットの心臓虚血再灌流障害を改善する」第13回日本N0学会学術集会(沖縄)2013年6月28日

Mayuko Sakanashi, Toshihiro Matsuzaki et al. 「San'o-shashin-to, a Kampo Medicine, Ameliorates Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Ovariectomized Rats via Suppression of Peroxynitrite Formation and Restoration of Manganese Superoxide Dismutase Activities」第86回日本薬理学会年会(福岡)2013年3月15日

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「卵巣摘出ラットの心臓虚血再灌流障害に対する三黄瀉心湯の心保護作用」第65回日本薬理学会西南部会(熊本)2012年11月23日

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「三黄瀉心湯は卵巣摘出ラットの心臓虚血再灌流障害を改善する」第12回日本N0学会学術集会(神戸)2012年6月29-30日

Mayuko Sakanashi, Toshihiro Matsuzaki et al. 「San-o-shashinto reduces cardiac

ischemia-reperfusion injury in ovariectomized rats through selective activation of manganese superoxide dismutase」第85回日本薬理学会年会(京都)2012年3月16日

坂梨まゆ子, 松崎俊博 他「三黄瀉心湯の長期経口投与は高脂肪食負荷ラットの血管内皮機能障害および高脂血症を改善する」第84回日本薬理学会年会(誌上開催/東日本大震災のため)2011年3月

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂梨 まゆ子 (SAKANASHI, Mayuko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 80363662

(2)研究分担者

松崎 俊博 (MATSUZAKI, Toshihiro)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 50244330