

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 教授 牧野 利明

## NOS阻害剤による消化器障害モデル

Kidoら<sup>1)</sup>は、NO合成酵素(NOS)阻害剤であるN<sup>G</sup>-ニトローL-アルギニン(L-NNA)によるラット消化器障害に対する六君子湯の作用を検討している。ラットにL-NNAを経口投与し、その6時間後と22時間後にそれぞれ医療用六君子湯エキス原末(RKT)を0.25、0.5g/kg(ヒト1日量の約3、6倍)経口投与した。L-NNAを経口投与した24時間後に色素を経口投与し、その15分後に消化管を摘出して胃内容物排出速度を測定した。その結果、RKTは用量依存的にL-NNAによる胃内容物排出速度の低下を改善し、0.5g/kgの用量で正常レベルまで回復した。RKTを80%エタノール可溶部と不溶部に分画したところ、可溶部(低分子有機化合物を含む)において胃内容物排出速度低下に対する有意な改善作用が認められた。この画分に含まれる既知の低分子有機化合物1.0mg/kgにおける有効性を比較検討したところ、陳皮に含まれるフラボノイド配糖体のヘスペリジンに強い改善作用が認められた。RKT 0.5g/kgに含まれる量に相当するヘスペリジンをラットに経口投与すると、胃内容物排出速度の低下は正常レベルまで回復した。以上のことから、RKTの消化管運動促進作用は陳皮に含まれるヘスペリジンが重要な役割を果たしていることが示唆された。

## ピルフェニドンによる消化器障害モデル

Itohら<sup>2)</sup>は、消化器症状の副作用のある肺線維症治療薬ピルフェニドンによるラットの胃腸障害に対する六君子湯の作用を検討している。ラットにピルフェニドン、次いで「六君子湯」(由来に関する記載なし)を経口投与し、1時間後に色素を経口投与してその15分後に消化管を摘出し、胃内容物排出速度を測定した。その結果、ピルフェニドンによる胃内容物排出速度の低下が、六君子湯により用量依存的に回復した。このときピルフェニドンの血中濃度には影響は無かった。このことから、六君子湯は薬物による食欲不振、消化不良などの消化器症状に対して有用性を示すことが示唆された。

## 糖尿病による消化器障害モデル

Sakaiら<sup>3)</sup>は、糖尿病モデルラットで見られる胃平滑筋運動障害に対する六君子湯の作用を検討している。ストレプトゾトシン(STZ)は膵臓のβ細胞に損傷を与えて1型糖尿病を発症させる。これをラットに静脈内投与して糖尿病モデルとし、RKTを1.0%含む食餌(ヒト1日量の約11倍)で2週間飼育した。STZ投与から6週間後、糖尿病モデル群の血糖値、飲水量、

尿量は、コントロール群に対し有意に上昇し、RKT投与群も同様に有意に上昇していた。次に胃の組織を摘出し、平滑筋におけるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)活性を測定したところ、糖尿病モデルでは胃平滑筋におけるDGK活性は有意に増加していたが、RKT投与群ではこれが有意に回復していた。このことから、六君子湯は血糖値に影響することなく、糖尿病にみられる胃平滑筋運動障害に対して改善作用を示すことが認められた。

## セロトニンによる消化器障害モデル

Tominagaら<sup>4)</sup>は、セロトニンによる消化器障害モデルに対する六君子湯の作用を検討している。ラットにセロトニン、ドパミンを腹腔内投与した2時間後にRKT 0.5g/kg(ヒト1日量の約6倍)を単回経口投与し、24時間絶食とした後、色素を含む餌を与え15分後に開腹し、胃内容物排出速度を測定した。その結果、RKTはセロトニンによる胃内容物排出速度の低下を有意に回復したが、ドパミンによる低下には作用しなかった。セロトニン3型(5-HT<sub>3</sub>)受容体作動薬の腹腔内投与後の胃内容物排出速度低下に対してもRKTは改善作用を示した。六君子湯の構成生薬である陳皮の含有成分ヘスペリジン3.0mg/kgでも、同様の作用が認められた。そして、このRKTによる胃内容物排出速度の改善作用は、アトロピンの前投与により消失した。以上のことから、六君子湯の食欲不振改善作用には、セロトニン受容体を介するコリン作動性神経系に対する拮抗作用が関与することが示唆された。

## シスプラチンによる消化器障害モデル

Takedaら<sup>5)</sup>は、シスプラチンを投与したラットの食欲不振に対する六君子湯の作用を検討している。ラットにシスプラチンを腹腔内投与し、2時間後に採血したところ、血漿中の活性型グレリンであるアシルグレリン量が減少し、6時間の累積摂餌量も減少していた。シスプラチン投与16時間前にRKT 1.0g/kg(ヒト1日量の約13倍)を経口投与した群では、それらの減少が有意に回復していた。この摂餌量の改善は、シスプラチンと同時にグレリン受容体遮断薬を投与することにより阻害された。六君子湯の含有成分の中では、ヘプタメトキシフラボンやヘスペリジンあるいはイソクイリチゲニン各4.0mg/kgの経口投与で血漿中グレリン濃度の有意な回復が認められた。

Yakabiら<sup>6,7)</sup>は、シスプラチンによる食欲不振に対する六君子湯の改善作用におけるセロトニンの関与を報告している。

ラットにシスプラチンを腹腔内投与した24時間後にRKT 0.5g/kg(ヒト1日量の約6倍)を経口投与し、その1時間後に視床下部を摘出してグレリン量を測定したところ、シスプラチンによる視床下部内グレリン量の低下が、六君子湯により正常レベルまで回復していた。またラットにシスプラチンを腹腔内投与と同時にRKT 1.0g/kg(ヒト1日量の約13倍)を経口投与した6時間後の視床下部におけるグレリン受容体(GHS-R1a)の発現量は、シスプラチン投与により有意に減少していたが、RKT投与により有意に回復していた。このとき血漿中のグレリンの濃度には変化はなかった。摂餌量についての検討では、ラットにセロトニン1B/2C(5-HT<sub>1B/2C</sub>)受容体作動薬であるm-クロロフェニルピペラジン(mCPP)の腹腔内投与とRKT 1.0g/kgの経口投与を同時に行い、その後1時間の摂餌量を測定したところ、mCPP投与により有意に減少した摂餌量が、RKT投与により有意に回復していた。ラットにシスプラチンを腹腔内投与し、その後6時間の摂餌量を測定したところ、シスプラチンによる摂餌量の減少が、RKT 1.0g/kgまたは六君子湯の含有成分の一つであるヘスペリジン、イソリクイリチゲン各5.0mg/kgの経口投与で有意に改善し、それらの作用はグレリン受容体遮断薬の脳室内投与により阻害された。以上のことから、六君子湯は視床下部においてセロトニン神経系の抑制を介してグレリンの分泌を刺激することにより、食欲不振を改善することが推測された。

さらにSadakane<sup>8)</sup>は、六君子湯の作用機序および有効成分を検討している。24時間絶食したラットにシスプラチンを腹腔内投与し、直後にRKT 1.0g/kg(ヒト1日量の13倍)を経口投与した。その2時間後に採血したところ、血漿中のアシルグレリンの濃度はシスプラチン投与により有意に減少していたが、RKT投与により有意に回復していた。また別に、ラットにRKT 1.0g/kgまたはその含有成分である10-ギンゲロール 20mg/kgを経口投与し、さらに1時間後グレリンを腹腔内投与したところ、20分後の血漿中のアシルグレリン濃度は、有意に増加していた。

森元<sup>9)</sup>は、六君子湯の各生薬の作用について検討している。絶食したラットに白朮を使用したRKT 1.0g/kg(ヒト1日量の約13倍)を経口投与し、その1時間後にシスプラチンを腹腔内投与した。さらに30分後に色素を経口投与し、その20分後に開腹して胃内容物排出速度を測定したところ、シスプラチンによる有意な胃排出速度の低下はRKTにより有意に改善していた。つぎに六君子湯を構成する各生薬エキス0.2g/kg(ヒト1日量に対して、人參は約8倍、白朮は約9倍、茯苓は約280倍、半夏は約66倍、陳皮は約20倍、大棗は約15倍、甘草は約60倍、生姜は約153倍)について同様に検討したところ、白朮、人參、茯苓、陳皮の順で強い有意な改善作用が認められた。また白朮と蒼朮の各エキス0.2g/kg(ヒト1日量で白朮は約9倍、蒼朮は約8倍)では、白朮エキスで有意な改善作用が認められたが、蒼朮エキスでは認められなかった。



さらにRKTと白朮エキスは、ラットにセロトニンを腹腔内投与したときの胃内容物排出速度の低下に対しても有意な改善作用を示したが、蒼朮エキスでは認められなかった。これらの結果は白朮の含有成分であるアトラクチレノリドⅢについても同様で、0.5mg/kgの経口投与で有意な改善作用が認められた。

以上のことから、シスプラチンによる食欲不振に対する六君子湯の改善作用には、アシルグレリンの分解抑制によってグレリンの安定性が亢進することが関与し、その有効成分として陳皮に含まれるフラボノイド類と生姜に含まれる10-ギンゲロールが作用するほか、白朮を用いた六君子湯では白朮の役割が重要であることが示唆された。

## 十二指腸狭窄による胃食道逆流症モデル

Miwa<sup>10)</sup>は、ラットでの胃食道逆流症(GERD)モデルにおける六君子湯の作用を報告している。ラットの胃噴門を結紮し十二指腸上部を狭窄することで、GERDモデルを作成し、その後、RKTを0.6%含む飲水(ヒト1日量の約7倍)で飼育した。10日後に摘出された食道粘膜には潰瘍が認められ、RKTを投与しても有意な回復は認められなかった。一方、食道粘膜の非潰瘍部位の上皮組織では、細胞間隙の拡大が確認され、また粘膜上皮における細胞間隙を構成するタンパク質であるクロードイン3のタンパク発現量が有意に減少していたが、それらはRKT投与により有意に回復していた。以上のことから六君子湯のGERDに対する作用は、食道粘膜病変への直接的作用ではなく、粘膜上皮に対するバリア機能の改善によることが推測された。



Nahata<sup>11)</sup>は、同じモデルを用いて、さらに作用機序を報告している。ラットに外科的処置をしてGERDモデルとし、RKTを1.2%含む飲水を与えて(≒1.0g/kg/日、ヒト1日量の約13倍)10日間飼育した。GERDモデルで見られた胃でのフェーズⅢ収縮頻度の減少、胃内容物排出速度の減少は、RKT投与群でも有意な回復は認められなかった。手術の10日後にグレリンを静脈内に投与しても、収縮頻度の減少、胃内容物排出速度の減少に回復は認められなかったが、RKTとグレリンを併用するとそれらは有意に回復した。このことから、六君子湯はグレリンに関わるシグナル伝達の障害を改善することで、胃の機能不全を回復させることが推測された。

## 担癌モデル

Fujitsuka<sup>12)</sup>は、担癌ラットにおける食欲不振、悪液質症状に対する六君子湯の効果を報告している。ラットに腹水肝癌細胞を腹腔内投与し、その後RKT 1.0g/kg/日(ヒト1日量の約13倍)を餌に混合して投与した。5日後に見られた担癌ラットにおける自発的摂餌量および自発的運動量の減少は、RKT投与群で有意に回復していた。7日後において担癌ラットで見られた体重および腓腹筋と脛骨筋の重量の減少、絶食時における胃のフェーズⅢ収縮頻度の減少も、RKT投与により

有意に回復した。その後の生存曲線も、RKT投与群において有意に延長していた。担癌ラットでは消化管ホルモンであるグレリンの受容体活性の減少が見られ、RKTで認められた作用の一部はグレリン静脈内投与時に見られる作用と同様であったことや、絶食したラットに食欲抑制薬であるフェンフルラミンを腹腔内投与した90分後の血漿中グレリン濃度の有意な低下が、フェンフルラミンの投与30分前にRKT 1.0g/kgを経口投与することにより有意に回復したことなどから、がん罹患時における食欲不振、悪液質にはグレリンの機能低下が関与し、六君子湯はグレリン濃度を増加させることにより、食欲不振、悪液質を改善することが示唆された。

Itoら<sup>13)</sup>は、マウスを用いて西洋薬との薬物相互作用を起こす可能性を検討している。マウスにRKT 1.0g/kg/日(ヒト1日量の約13倍)を餌に混合して15日間投与した後、トリアゾラムまたはジゴキシンを腹腔内投与して、それらの血漿中濃度推移を測定した。その結果、RKTはそれら薬物の血漿中濃度に影響を与えなかったことから、六君子湯は薬物の体内動態に影響する薬物代謝酵素Cyp3aやP糖タンパク質には影響を与えないことが示唆された。

表 各種モデルに対する試験結果(まとめ)

	著者	使用動物	投与量 (有意差のあった最少用量のみ記載)	結果 (一部抜粋)
消化器障害モデル	NOS阻害剤誘発	Kidoら <sup>1)</sup> SD系ラット(♂) (6週齢, n = 8~9×3~6群)	RKT 0.5g/kg 単回経口投与	胃内容物排出速度の低下を改善 陳皮成分ヘスペリジンで強い改善作用
	ピルフェニドン誘発	Ittohら <sup>2)</sup> SD系ラット(♂) (7週齢, n = 8×6群)	六君子湯 0.5g/kg 単回経口投与	胃内容物排出速度の低下を改善
	糖尿病モデル	Sakaiら <sup>3)</sup> Wistar系ラット(♂) (8週齢, n = 5~16/4群)	RKT 1.0% 混合餌投与(2週間)	胃平滑筋運動障害を改善
	セロトニン誘発	Tominagaら <sup>4)</sup> Wistar系ラット(♂) (9週齢, n = 8×5群)	RKT 0.5g/kg 単回経口投与	胃内容物排出速度低下を改善(ヘスペリジンでも改善) アトロピン存在下では効果消失
	シスプラチン誘発	Takedaら <sup>5)</sup> SD系ラット(♂) (7週齢, n = 8×4~5群)	RKT 1.0g/kg 単回経口投与	血漿中アシルグレリン量・摂餌量低下を改善 グレリン受容体遮断薬存在下では効果消失
		Yakabiら <sup>6,7)</sup> SD系ラット(♂) (7週齢, n = 5~8×4~8群)	RKT 1.0g/kg 単回経口投与	視床下部グレリン受容体発現量と分泌量の低下を改善 mCPPによる摂餌量低下を改善 ヘスペリジン、イソリクイリチゲニンに摂餌量改善作用
		Sadakaneら <sup>8)</sup> SD系ラット(♂) (7週齢, n = 8×3~5群)	RKT 1.0g/kg 10-ギンゲロール 20mg/kg 単回経口投与	血漿中アシルグレリン量低下を改善
		森元ら <sup>9)</sup> SD系ラット(♂) (6週齢, n = 10×4~10群)	RKT 1.0g/kg 各構成生薬エキス 各0.2g/kg 単回経口投与	胃内容物排出速度の低下を改善 白朮成分アトラクチレノリドⅢに改善作用
	GERDモデル	Miwaら <sup>10)</sup> Wistar系ラット(♂) (6~7週齢, n = 5~9×3~4群)	RKT 0.6% 混合水投与(10日間)	食道粘膜上皮細胞間隙の拡大を改善 クローディン3蛋白質量の減少を改善
		Nahataら <sup>11)</sup> Wistar系ラット(♂) (8週齢, n = 5~12×4群)	RKT 1.2%(≒1.0g/kg/日) 混合水投与(10日間)	胃のフェーズⅢ収縮頻度と胃内容物排出速度の減少をグレリン併用で改善
担癌モデル	Fujitsukaら <sup>12)</sup> Wistar系ラット(♂) (200~250g, n = 6~10×2~4群)	RKT 1.0g/kg/日 混合餌投与(5日間)	体重、筋肉量、胃のフェーズⅢ収縮頻度およびグレリン濃度の減少を改善 生存曲線の延長	
薬物相互作用	Itoら <sup>13)</sup> ddY系マウス(♂) (5~7週齢, n = 4×3群)	RKT 1.0g/kg/日 混合餌投与(15日間)	Cyp3a、P糖タンパク質に影響を与えない	

## 【参考文献】

- 1) Kido T, et al.: Effects of rikkunshi-to, a traditional Japanese medicine, on the delay of gastric emptying induced by N<sup>6</sup>-nitro-L-arginine, J Pharmacol Sci, 98(2): 161-167, 2005
- 2) Ittoh T, et al.: Ameliorative effects of mosapride or rikkunshi-to on the suppression of gastrointestinal motility by pirfenidone in rats, Jpn Pharmacol Ther, 40(5): 405-411, 2012
- 3) Sakai Y, et al.: A traditional herbal medicine, rikkunshi-to(TJ-43), prevents intracellular signaling disorders in gastric smooth muscle of diabetic rats, Am J Chin Med, 32(2): 245-256, 2004
- 4) Tominaga K, et al.: The traditional Japanese medicine rikkunshito promotes gastric emptying via the antagonistic action of the 5-HT<sub>3</sub> receptor pathway in rats, Evid Based Complement Alternat Med, 248481, 2011
- 5) Takeda H, et al.: Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonism, Gastroenterol, 134(7): 2004-2013, 2008
- 6) Yakabi K, et al.: Reduced ghrelin secretion in the hypothalamus of rats due to cisplatin-induced anorexia, Endocrinology, 151(8): 3773-3782, 2010
- 7) Yakabi K, et al.: Rikkunshito and 5-HT<sub>2c</sub> receptor antagonist improve cisplatin-induced anorexia via hypothalamic ghrelin interaction, Regul Pept, 161(1-3): 97-105, 2010
- 8) Sadakane C, et al.: 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation, Biochem Biophys Res Commun, 412(3): 506-511, 2011
- 9) 森元康夫 ほか: シスプラチンによるラット胃排出低下に対する六君子湯の作用, 日東医誌, 64(3): 150-159, 2013
- 10) Miwa H, et al.: Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, may relieve abdominal symptoms in rats with experimental esophagitis by improving the barrier function of epithelial cells in esophageal mucosa, J Gastroenterol, 45(5): 478-487, 2010
- 11) Nahata M, et al.: Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 303(1): G42-53, 2012
- 12) Fujitsuka N, et al.: Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival, Transl Psychiatry, 1, e23, 2011
- 13) Ito K, et al.: Effects of kampo medicines on Cyp3a and p-glycoprotein activity in vivo, J Trad Med, 26(3): 131-135, 2009