

# 漢方薬大建中湯の胃粘膜血流増大作用に 関する薬理学的研究

—温度感受性 Transient receptor potential チャネル  
の関与および投与時の溶液温度による効力変化—

2022 年 3 月

城西国際大学大学院 薬学研究科  
医療薬学専攻

吉久保 匡甫

## 目次

序論	6
背景	6
目的	14
本論	
第一章 温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルを介するラット胃粘膜血流増大の検討	
第一節 緒言	16
第二節 実験方法	17
第三節 結果	22
第四節 考察	28
第五節 小括	29
第二章 大建中湯のラット胃粘膜血流に対する作用とその機序解析	
第一節 緒言	30
第二節 実験方法	32
第三節 結果	36
第四節 考察	47
第五節 小括	52
第三章 大建中湯のラット胃粘膜血流増大作用における溶液温度の検討	
第一節 緒言	53
第二節 実験方法	55
第三節 結果	57
第四節 考察	62
第五節 小括	63
総括	64
結論	67
参考文献	69
謝辞	79

論文目録-----81

主査、副査名-----82

本論文では以下のような略名を用いた。

ADM : adrenomedullin アドレノメデュリン

AITC : allyl isothiocyanate アリルイソチオシアネート

BCTC : *N*-(4-*t*-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide

CGRP : calcitonin gene-related peptide カルシトニン遺伝子関連ペプチド

CMC : carboxymethyl-cellulose sodium カルボキシメチルセルロース

DKT : daikenchuto 大建中湯

DMSO : dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド

DW : distilled water 精製水

GMBF: gastric mucosal blood flow 胃粘膜血流

L-Arg : L-arginine L-アルギニン

L-NAME : N (omega) -nitro-L-arginine methyl ester

NO : nitric oxide 一酸化窒素

NOS : nitric oxide synthase 一酸化窒素合成酵素

SP : substance P サブスタンス P

PG : prostaglandin プロスタグランジン

VIP: vasoactive intestinal peptide 血管作動性腸管ペプチド

TRP : transient receptor potential

TRPA1 : transient receptor potential ankyrin 1

TRPV1 : transient receptor potential vanilloid 1

論文中の初出で括弧内に略名を示し、以後は略名を使用した。

## 序論

## 背景

### 背景 1. 薬剤師による漢方薬の服薬指導について

調剤薬局で処方箋応需をして困る事の1つに処方医の処方意図が分からないことが挙げられる。中でも、漢方薬は西洋薬のように単一成分の薬剤とは異なり添付文書に記載されている効能だけでは、その効果のすべてを理解することは難しい。事実、2008年病院と薬局薬剤師を対象としたアンケート調査結果では薬剤師859名中78.1%が漢方薬に興味・関心を寄せている一方で、漢方薬の服薬指導に苦手意識を抱いている薬剤師が72.2%にも達していた<sup>1)</sup>。そして、それら薬剤師が漢方薬の服薬指導時に最も困ったこととして、①漢方薬の有効性、②服用期間、および③医師の処方意図が分からない、の3つがそれぞれ約20%を占め、医師の処方意図を把握できていない割合が全体の37.1%を占めていた。さらに、「漢方薬の服薬指導に際して情報をどこに求めているか」の質問に対する回答として「添付文書」が最も多く45.0%だった (Fig. 1)<sup>2)</sup>。これらの結果より、現場の薬剤師は西洋薬と同様に添付文書の情報を頼りに漢方薬の服薬指導を行っていることが推察された。

現在最も使われている漢方薬の1つである大建中湯について考えてみると、その添付文書の効能と効果は「腹が冷えて痛み、腹部膨満感のあるもの」

と記載されているが、具体的な症状や部位に用いるのかについての記述はない。一方、東洋医学の古典「金匱要略（きんきようりやく）」、「勿誤藥室方函口訣（ふつごやくしつほうかんくけつ）」、「類聚方広義（るいじゅほうこうぎ）」には、大建中湯の名前は“「大」はひどい症状、「建中」は中焦、つまりお腹の機能を建て直し、「湯」は温める。”という意味が含まれているとの記述がある。そのため、大建中湯は現在臨床応用される下部消化管症状の改善効果だけでなく、口から肛門までの消化管を1本の管として温めて立て直す漢方薬であると考えた。そして、古典での服用法はお湯（温かい物）として服用するようにと読み解くことができる。しかし、西洋薬的な作用メカニズムを主に学んできた医師・薬剤師にとって、漢方薬も薬理学的な作用メカニズムに関する科学的根拠がないと理解し難く、自信をもって患者に服薬指導できない状況に陥ることになる。そのため、大建中湯は製薬メーカーの提供資料による下部消化管以外に上部消化管にも作用するのではないか？さらに服用方法は温かい方がさらに効くのではないか？という発想に至った。

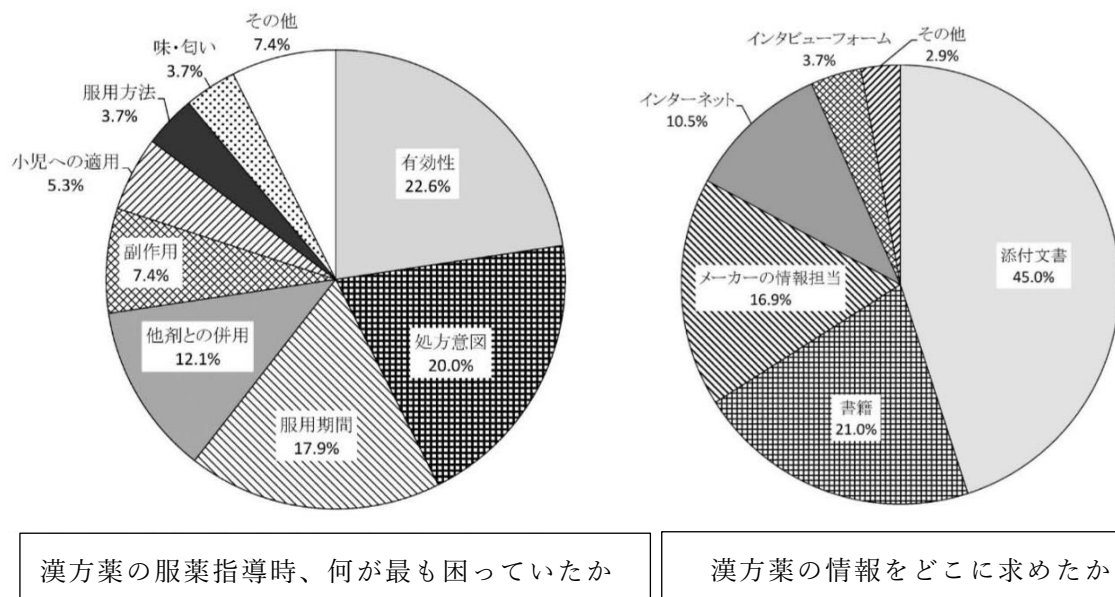


Fig. 1 漢方薬の服用時に苦手意識を抱いている薬剤師の割合について<sup>2)</sup>

しかし、添付文書には薬剤師が情報を求めていた薬理学的な科学的根拠の記載が十分されていないため理解しづらいのであろうと考えた。それで、漢方薬の効き方に関して薬理学的に検討し、その作用機序を明らかにすることが肝要であると考えた。



## 背景 2. 温度感受性 Transient receptor potential (TRP) チャンネル

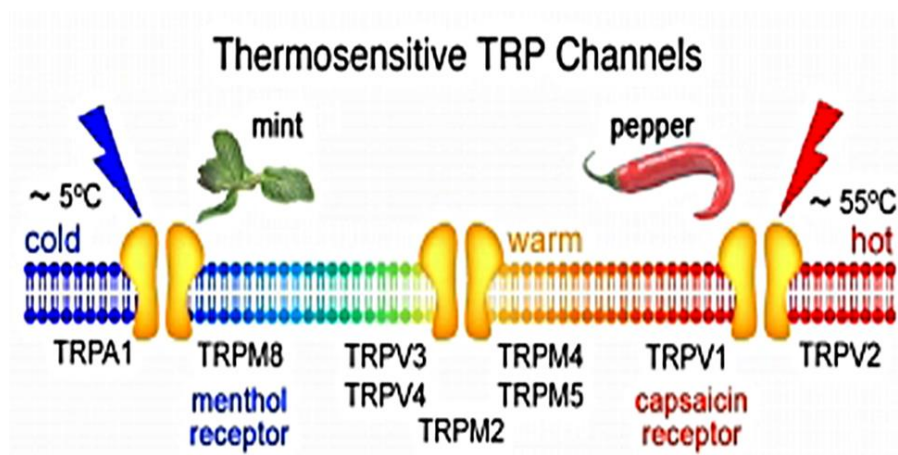


Fig. 2 温度センサーとして機能する TRP チャンネルの種類<sup>3)</sup>

Transient receptor potential (TRP)チャンネルは脂質膜上に存在する膜タンパク質であり、4量体を形成することでイオンチャンネルとして機能している。TRPチャンネルは、一般的にナトリウムイオンやカリウムイオンだけでなくカルシウムイオンも透過させる非選択的なカチオンチャンネルである。膜電位、温度、浸透圧などの物理的な刺激や細胞の酸化還元状態、カプサイシンやメントールなどの外来化学物質、カルモジュリン、ホスファチジルイノシトールなどの細胞内メッセンジャー分子といった内在性化学物質によってイオン透過性が制御される。上述のさまざまな刺激に応答した細胞内へのカルシウムイオン流入を担っており、これらの細胞内応答を介して味覚・温度・痛みの受容をはじめとした感覚受容機能、生体内のカルシウムイオンなどの恒常性維持、カルシウムイオンを必要とする運動機能（筋収縮、血管運動など）などの生理機能に

重要な役割を果たしている。哺乳類の TRP チャンネルはさらに TRPA (ankyrin)、TRPC (canonical)、TRPM (melastatin)、TRPV (vanilloid)、TRPML (mucolipin) そして TRPP (polycystin) の 6 つのファミリーに分類されている<sup>3,4,5)</sup>。

TRP チャンネルの中でも、温度センサーとして機能しうるのは TRPV1 (熱刺激受容 42°C以上)、TRPA1 (冷刺激受容 17°C以下)、および、TRPM8 (温刺激受容 25°C以上)である (Fig2)<sup>3)</sup>。これらは温度だけでなく、TRPV1 はトウガラシの辛味成分カプサイシンや酸、TRPA1 はワサビの辛味成分アリルイソチオシアネート (AITC) やシナモンの芳香成分シンナムアルデヒド、そして、TRPM8 はペパーミントの芳香成分メントールによって活性化することが知られている<sup>6,7,8)</sup>。

漢方薬大建中湯はこれら温度感受性 TRP チャンネルに作用することが報告されており<sup>9)</sup>、本研究でも温度感受性 TRP チャンネルを漢方薬の作用点の一つと考え検討した。

### 背景 3. 大建中湯 Daikenchuto (DKT)

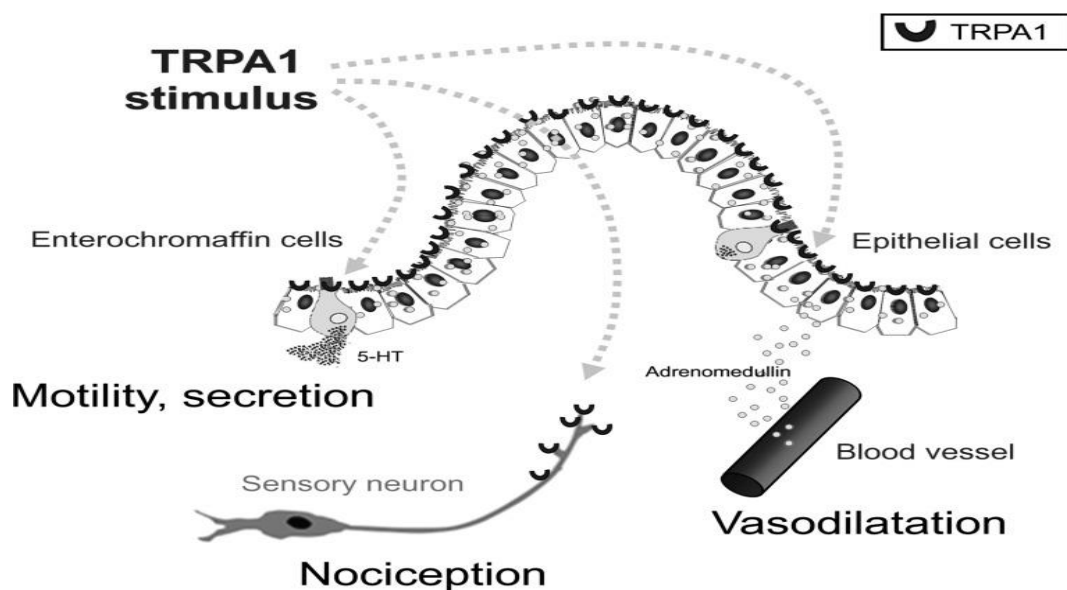


Fig. 3 大建中湯による小腸粘膜における TRPA1、ADM の役割<sup>16)</sup>

大建中湯 (DKT) は、日本で最も処方されている漢方薬であり<sup>10)</sup>、乾姜 (カンキョウ)、人参 (ニンジン)、山椒 (サンショウ)、および膠飴 (コウイ) を 5 : 3 : 2 : 80 の比率で加工したものの 4 つの生薬で構成されている。DKT にはカンキョウ由来の [6] -ショーガオール、およびサンショウ由来のヒドロキシサンショオール類 ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) が含有されているため温度感受性チャネル TRPV1 および TRPA1 のリガンドが含まれていることになる<sup>11,12,13)</sup>。DKT は、腹部の冷感の治療や、運動性腸炎や術後腸イレウスなどの腸の運動性および炎症の治療に使用される。現在報告されている下部消化管に対する薬

理作用とその機序は以下の3つである。これらの報告のデータを解析し、本検討を行った。

#### ① 腸管血流量増加作用

DKT は、外界センサーとして機能する transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1)、transient receptor potential ankyrin1 (TRPA1) チャネルに対してアゴニスト活性を示すショウガオールおよびヒドロキシ  $\alpha$  ショオール等の成分を含有し、同チャネル刺激で遊離される血管拡張ペプチドのアドレノメデュリン (ADM) およびカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を介して、腸管血流量増加作用を発現する<sup>14)</sup>。ADM は TRPA1 チャネル刺激によって、腸管上皮細胞から粘膜下層に遊離され、微小血管を拡張する (Fig.3)<sup>15,16)</sup>。CGRP は、血管平滑筋に分布する C 線維ニューロンの神経終末からサブスタンス P (SP) と共に遊離され、腸管の血管内皮細胞に作用し、一酸化窒素 (NO) を産生させ、強力な血管拡張作用を示す<sup>17)</sup>。

#### ② 小腸運動作用

DKT が TRPV1 を活性化することで、モチリン、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、CGRP などの遊離を介してモルモットの小腸運動、イヌ結腸運動を改善することが示されている<sup>9,18)</sup>。

### ③ 抗炎症作用

DKT はイレウスによる腹痛、腹部膨満感の改善に臨床応用されているが、イレウス病態の中には、閉塞部位の口側で強い炎症を伴う場合があり、DKT の抗炎症作用が寄与すること示唆されている。DKT は、腸管上皮細胞に発現する TRPA1 に作用することで、腸管上皮細胞内の ADM の分泌を促す<sup>16,19)</sup>。ADM は抗炎症作用や抗菌作用等の多様な生理作用を有するペプチドであり、大建中湯の抗炎症作用発現の一部を担う。また、DKT は、炎症因子等で誘導される COX-2 の活性を阻害することから<sup>20)</sup>、プロスタグランジン(PG) E<sub>2</sub> に起因する炎症を抑制する可能性が考えられる。

## 目的

近年、漢方薬の効き方に関する科学的エビデンスが蓄積され漢方薬の有効性と安全性が診療ガイドラインにも掲載が増えてきたことで、臨床現場での使用頻度が増えてきた<sup>9)</sup>。現在、医療用漢方薬として全国の病院で用いられ、使用量も最も多いのが大建中湯 (DKT) である<sup>21)</sup>。中国古典医学書である金匱要略には DKT が消化管の症状を改善するとあり、一部は現代の科学的な解明により進展した<sup>22)</sup>。しかし、その薬理作用は十分には解明されていない。

著者は、DKT が下部消化管だけでなく消化管全域に作用して効果を現わすと考えた。薬理的な知見に基づく現代解釈を加えて、DKT が腹部の冷えを改善するのは温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルの刺激を介して胃や腸管粘膜血流を増大させることによるという仮説を立て検証した。

また、現代において医療用漢方薬の主流はエキス製剤であり、水またはぬるま湯で服用することが多く、古典のように温めて服用することは殆どない。即ち、服用時の温度に関する検討がなされていない。そこで、DKT によるそのような薬理作用が漢方薬特有の温服という投与方法によって変化するかに関しても薬理的な解析を行った。これらの検討から金匱要略の記載について薬理的な解釈を試みた。

本論文では第一章から第三章に分けて上述の検討事項に関する研究結果を記載した。

第一章では、麻酔下ラットにおける温度感受性 TRPV1 と TRPA1 チャンネル活性化薬による胃粘膜血流の増大反応について検討を行った。

第二章では、麻酔下ラットにおける胃粘膜血流の増大反応に対する DKT の効果について TRPV1 と TRPA1 チャンネルの関連から検討を行った。

第三章では、麻酔下ラットにおける DKT による胃粘膜血流の増大反応に対する溶液温度の効果について検討を行った。

## 本論

### 第一章 温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルを介するラット胃粘膜血流増大の検討

#### 第一節 緒言

##### 温度感受性チャンネル TRPV1・TRPA1 とラット胃粘膜血流との関係

TRPV1 チャンネルが活性化するとその神経終末から血管拡張因子である一酸化窒素(NO)及びカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)が遊離することで消化管粘膜血流を増大させることが知られている<sup>23,24,25)</sup>。また、TRPA1 チャンネル活性化によっても同様の効果が現れる。Kondo らはラット胃体部切片において TRPA1 発現神経が胃粘膜層および粘膜下層の血管周囲に存在し、TRPA1 発現神経のおよそ 80%が TRPV1 と共存することを明らかにしている<sup>26)</sup>。

そこで、ラット胃粘膜血流における TRPV1 および TRPA1 チャンネルの役割を検討することを目的とした。

第一章ではラット胃粘膜の TRPV1 と TRPA1 チャンネルの活性化により血流増大が誘起されるのかについて検討を行った。



## 第二節 実験方法

### 1. 使用動物

動物は、雄性 Sprague-Dawley 系ラット (SLC, 浜松, 日本) で体重 180～220 g のものを使用した。それら動物は、制御された環境条件 ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , 午前 7 時から午後 7 時の明暗サイクル) の下で飼育され、ラット固形飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京, 日本) を与えた。動物は、糞食を防ぐために網底が隆起した個々のケージに入れ、実験前に 18 時間絶食を行った。飼養中は自由摂水とした。動物実験は、日本薬理学会が承認した「動物実験に関する日本薬理学会指針」および城西国際大学動物実験・動物実験倫理委員会 (#52) の承認を得て実施された。使用した動物数は、データの解釈に必要な最小限の例数に抑えた。

### 2. 使用薬物

試薬：

カプサイシンは富士フィルム和光純薬 (東京, 日本) から購入した。カプサイシンは 0.5%カルボキシメチル水溶液に溶解した。AITC は東京化成工業 (東京, 日本) から購入した。AITC は生理食塩水に希釈した。BCTC [N-(4-t-ブチルフェニル)-4-(3-クロロピリジン-2-イル) テトラヒドロピラジン-1 (2H)-カルボキサミド (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-N-[4-(1,1-dimethylethyl)

phenyl] -1-piperazinecarboxamide) ]は、BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA) から購入した。BCTC は蒸留水で希釈した $\beta$ -シクロデキストリン溶液で溶解し、 $\beta$ -シクロデキストリンの最終濃度が10.0%未満になるように調製した。 $\beta$ -シクロデキストリンは Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)から購入した。A-967079 は、Tocris 社 (Minneapolis, MN, USA) から購入した。A-967079 は DMSO とクレモフォルで溶解した後、それらの最終濃度が5.0%未満になるように蒸留水で調製した。

### 3.胃粘膜血流 (GMBF) の測定

胃粘膜血流はウレタン (1.25g/kg, ip) 麻酔をしたラット胃を ex-vivo チェンバーに装置し、カプサイシンもしくは AITC を胃内に 30 分間適用した際の粘膜血流変化を接触型レーザードップラー血流計 (Advance, Model ALF-21N, 東京, 日本) で測定した。なお、粘膜血流の変化率はカプサイシンもしくは AITC 適用前の値に対するパーセント (%) で示した。薬物は TRPA1 ブロッカーA-967079 (10 mmol/L) と TRPV1 ブロッカーBCTC (2.7 mmol/L) をカプサイシンもしくは AITC 適用 20 分前から胃内適用した。

#### 4. ラット胃体部の免疫組織化学的解析

ラット胃体部は、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中の新鮮な 4%パラホルムアルデヒドに 4°Cで 2 時間浸して固定し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄した。それらを、20%スクロースを含む 0.1 mol/L リン酸緩衝液中で一晩凍結保護した。組織を凍結組織切片作製用 Tissue-Tek O.C.T.培地 (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に包埋凍結し、クライオスタット (Leica, Hemel Hempstead, UK) で厚さ 60  $\mu$ m に薄切した。薄切切片を MAS コートスライドガラス (MSA-15, Matsunami Glass, Osaka, Japan) に解凍マウントした。染色する前に、スライドマウントの切片 0.3%過酸化水素を含む PBS で 30 分間インキュベートして内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させ、PBS で洗浄した。切片を、0.2% Triton X-100、0.1%アジ化ナトリウムを含む 10%正常ロバ血清、PBS 溶液で 1 時間、ポリクローナルウサギ抗 TRPV1 抗体(1 : 30,000)(NEUROMICS, MN, USA)、もしくはポリクローナルウサギ抗 TRPA1 抗体 (1:120,000)(Abcam, Cambridge, UK)で室温 40 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、切片をビオチン化ロバ抗ウサギ IgG (1 : 400; Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) で室温 90 分間インキュベートした。さらに洗浄後、切片をストレプトアビジンビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Vectastain Elite ABC Kit, Cat# PK-6100, Vector

Laboratories, CA, USA) で室温 1 時間インキュベートした後、TSA Fluorescence System (1:75; Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) によりさらにチラミドシグナルを増幅させた。なお、対照実験として、一次抗体の特異性を検証するために、染色手順から一次抗体を除き行ったが、それらでは免疫活性は観察されなかった。

**顕微鏡観察：**断面は、Y3 (TRITC) および L4 (FITC) フィルターブロックを使用した Leica 落射蛍光顕微鏡、または直立型 Zeiss 共焦点レーザー走査型顕微鏡 オリンパス FX-1000 システム (LSM510) と×20 および×40 Plan Neofluar 対物レンズのいずれかで観察した。後者のシステムでは、単一の FITC ラベル付けに単一の追跡モードを使用した。FITC (488 nm) および TRITC (543 nm) で二重標識を行った場合、セクションはマルチトラッキングモードでスキャンした (チャンネルのクロストークを回避するため)。各画像は、スタックのすべてのスライスを 1 つの平面に投影して作製した。

## 5. 統計解析

データは平均値±S.E で表示した。1 群あたり 4~7 匹のラットを使用した。2 つのグループ間の差の統計的有意性は、Student の t 検定を用いて評価した。Dunnet 法を使用した一元配置分散分析分散分析によって、単一の対照

グループに対する複数グループの比較を行った。有意水準は 0.05 に設定した。Sigma Stat 3.1 ソフトウェア (Jandel Scientific Software, CA, USA) の手順を統計分析に適用した。

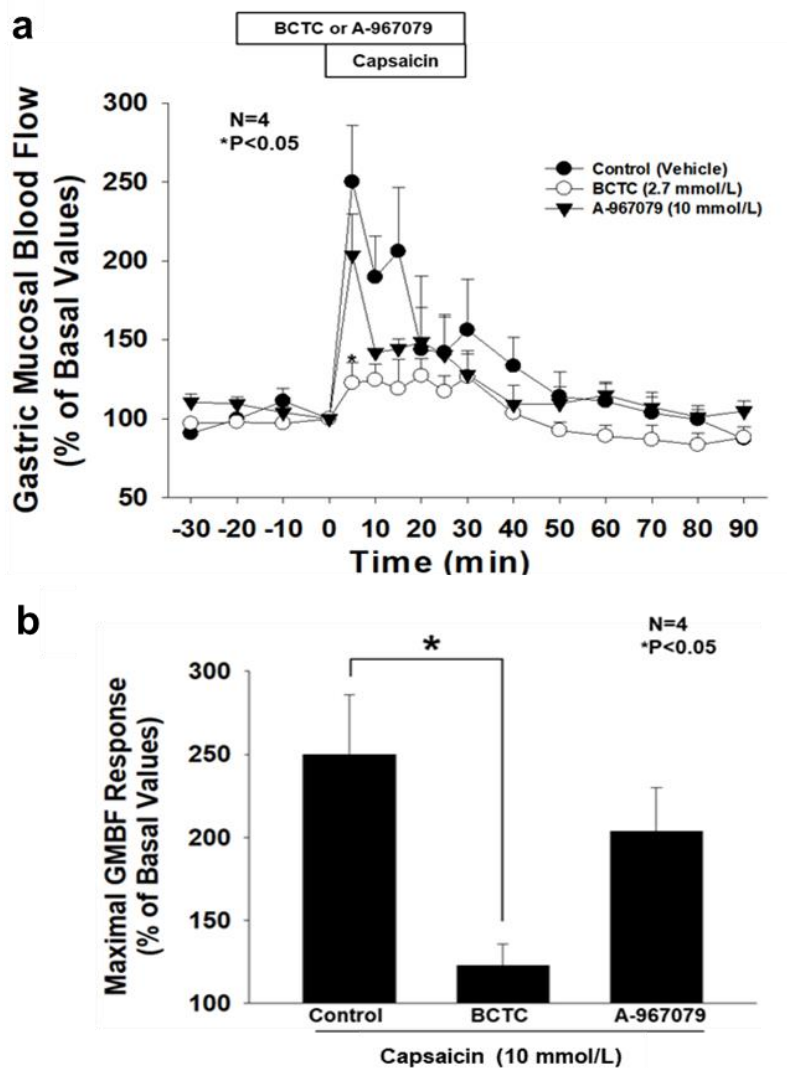
### 第三節 結果

ラット胃粘膜血流に対する TRPV1 および TRPA1 活性化薬の作用について検討した。TRPV1 活性化薬であるカプサイシン(10 mmol/L)は、粘膜適用により胃粘膜血流の増大を引き起こした。その血流増大は適用 5 分後にピークに達し、15 分まで持続した。その後、その反応は徐々に低下し適用前のレベルに戻った(Fig. 1a)。TRPV1 ブロッカー BCTC(2.7 mmol/L)はカプサイシンによる血流増大を顕著に阻害したが、TRPA1 ブロッカー A-967079(10 mmol/L)は一部だけ抑制された(Fig. 1)。

TRPA1 活性化薬アリルイソチオシアネート(AITC)は  $251.1 \pm 20.2\%$ まで急激な胃粘膜血流増大を誘発した(Fig. 2a)。その後徐々に低下し、30 分後にベースライン値に戻った。AITC の反応は TRPA1 ブロッカー A-967079(10 mmol/L)で完全に抑制されたが、BCTC によっては一部だけ抑制された(Fig. 2)。なお、BCTC、A-967079 単独では胃粘膜血流に何ら作用を示さなかった。

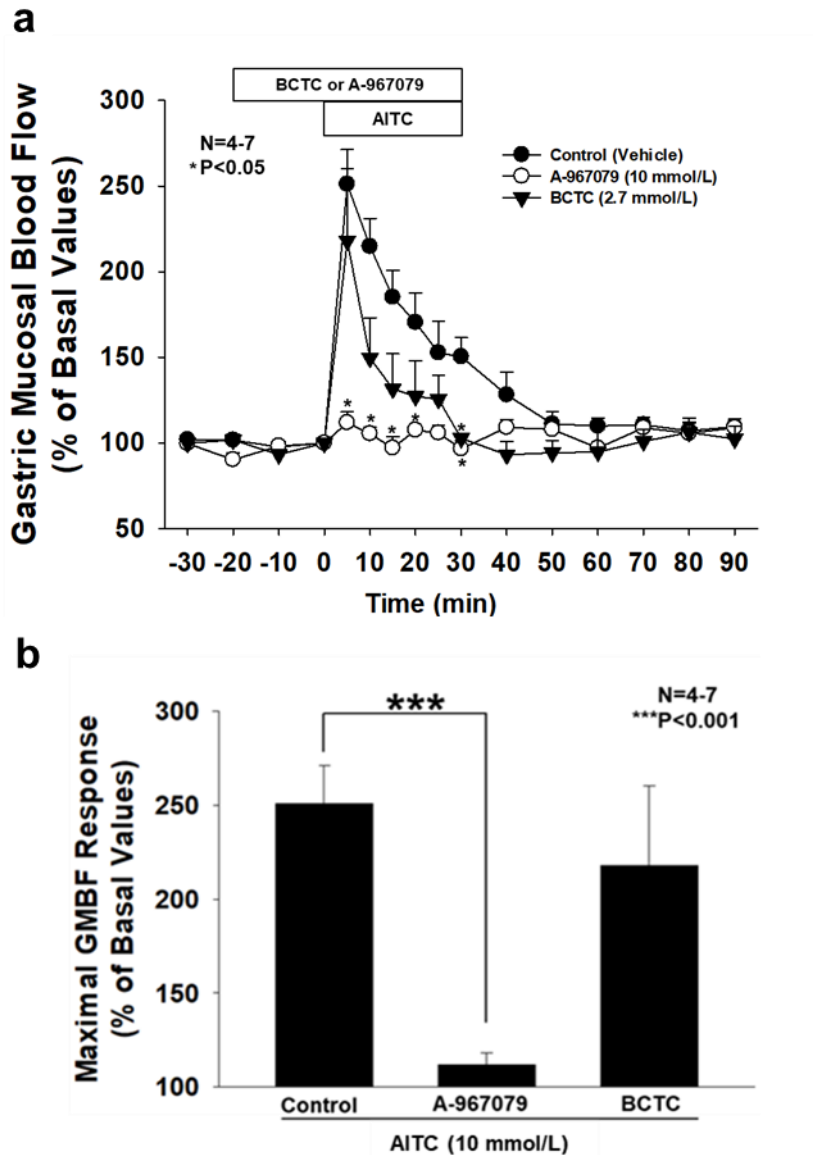
これらの結果から、カプサイシンによる胃粘膜血流の増大反応は、TRPV1 刺激を介し、AITC による胃粘膜血流は TRPA1 刺激を介して生じることが明らかとなった。

免疫化学的手法を用いてラット胃体部の粘膜、粘膜下、筋層の断面における TRPA1 と TRPV1 の局在を検討した。TRPV1 の局在は、粘膜、粘膜固有層、粘膜下層、筋層、筋間神経叢において神経線維の形状で観察された (Fig. 3a 矢印)。TRPA1 免疫活性は粘膜下、筋間神経叢において神経線維の形状で観察され (Fig. 3b 矢印)、筋間神経叢では神経細胞体も観察された (Fig. 3b 矢頭)。TRPV1 および TRPA1 発現神経線維はどちらも粘膜下の細血管に巻き付いている様子が観察された。そして、TRPA1 は、胃粘膜細胞にも免疫活性を認めた (Fig. 3b 二重矢印)。



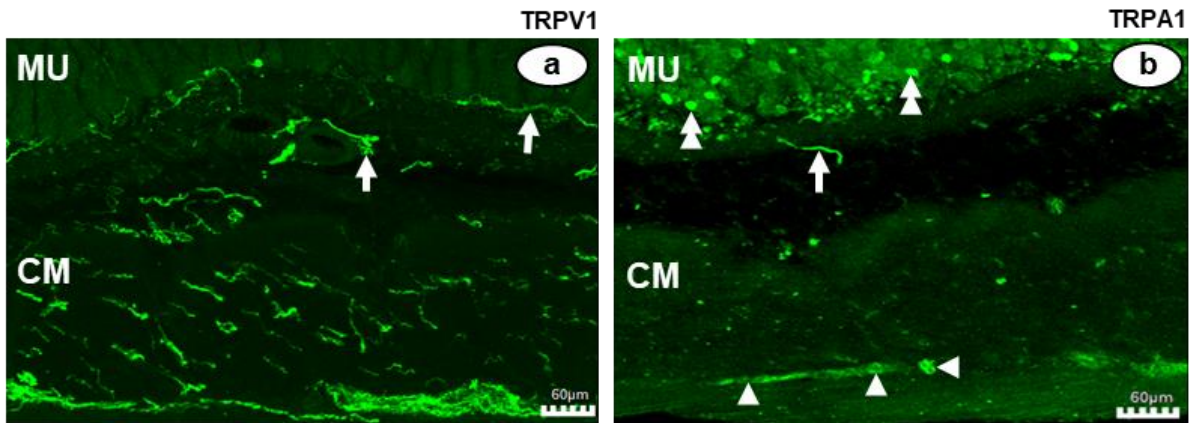
**Fig. 1** Effects of TRPV1 blocker BCTC and TRPA1 blocker A-967079 on GMBF induced by the mucosal application of capsaicin in rat stomachs. (a) Time course of GMBF response to capsaicin (10 mmol/L) in rat stomachs is shown. BCTC (2.7 mmol/L) was applied to the chamber for 50 min starting at 20 min prior to capsaicin (10 mmol/L) application. Capsaicin was topically applied to the mucosa for 30 min. The data are expressed as % increase in basal values, and represented as mean  $\pm$  S.E. of values every 5 or 10 min for 4 rats. \* $P < 0.05$  was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. (b) Maximal GMBF response induced by the mucosal application of capsaicin (10 mmol/L) in the presence of BCTC (2.7 mmol/L) or A-967079 (10 mmol/L). The data are expressed as % increase in basal values, and represented as mean  $\pm$  S.E. for 4 rats. \* $P < 0.05$  was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. Note that an increased GMBF in response to capsaicin (10 mmol/L) was almost completely inhibited by BCTC (2.7 mmol/L) but not A-967079 (10 mmol/L).





**Fig. 2** Effects of TRPA1 blocker A-967079 and TRPV1 blocker BCTC on gastric mucosal blood flow (GMBF) induced by the mucosal application of allyl isothiocyanate (AITC) in rat stomachs. (a) Time course of GMBF response to AITC (10 mmol/L) in rat stomachs is shown. A-967079 (10 mmol/L) was applied to the chamber for 50 min starting at 20 min prior to AITC (10 mmol/L) application. AITC was topically applied to the mucosa for 30 min. The data are expressed as % increase in basal values, and represented as mean  $\pm$  S.E. of values every 5 or 10 min for 4–7 rats. \* $P < 0.05$  was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. (b) Maximal GMBF response induced by the mucosal application of AITC (10 mmol/L) in the presence of A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 mmol/L). The data are expressed as % increase in basal values, and represented as mean  $\pm$  S.E. for 4–7 rats. \*\*\* $P < 0.001$  was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. Note

that an increased GMBF in response to AITC (10 mmol/L) was completely inhibited by A-967079 (10 mmol/L) but not BCTC (2.7 mmol/L).



**Fig. 3** Alteration in distribution of immunoreactivities of TRPV1 and TRPA1 in the cross section of rat stomachs. The immunoreactive fibers of TRPV1 (a) and TRPA1 (b) were found in the submucosa, myenteric plexus, and muscularis. TRPV1- and TRPA1-expressing fibers were observed around the submucosal arteriole and venule bundles (arrows) (a, b). Note that TRPA1-immunoreactive cell bodies are present in the myenteric plexus (arrowheads), and the TRPA1-immunoreactivity was also confirmed in the mucous cells of the gastric glands (two headed arrow) (b). The scale bar is 60  $\mu\text{m}$  (a, b). Two transverse sections of tissues obtained for five normal rats are stained by immunohistochemical methods. The typical photos are showed in this figure.

#### 第四節 考察

TRPV1 活性化薬であるカプサイシンによる胃粘膜血流の増大反応が、TRPV1 チャネルブロッカー-BCTC により明らかに抑制されたことから TRPV1 の活性化が胃粘膜血流の増大反応に関与することが明らかになった。

TRPA1 活性化薬である AITC による胃粘膜血流の増大反応は TRPA1 ブロッカー-A-967079 によりほぼ完全に抑制されたことから、TRPA1 の活性化も粘膜血流増大に関与することが明らかになった。

免疫組織化学的解析により、ラット胃体部切片において粘膜下層、筋間神経叢に TRPV1、TRPA1 の局在が確認され、血管を取り巻くように局在していることから血流増大に関与していることが示唆された。興味深いことに、TRPA1 発現粘膜細胞は胃粘膜においても観察された。つまり、TRPA1 は血管周囲に発現する神経だけではなく、TRPA1 を介した血管拡張因子の遊離も促して粘膜血流増大を誘起していることが推察された。以上より、AITC もしくはカプサイシンによる胃粘膜血流の増大反応には TRPA1 と TRPV1 が共発現している知覚神経と胃粘膜細胞に発現している TRPA1 が関与していることが示唆された。

## 第五節 小括

TRPV1 活性化薬であるカプサイシンと TRPA1 活性化薬である AITC の胃内適用は、それぞれラット胃粘膜血流を増大させた。また、それら増大反応は TRPV1 ブロッカー-BCTC および TRPA1 ブロッカー-A-967079 の胃内適用により抑制された。したがって、胃粘膜にある TRPV1 および TRPA1 の活性化が胃粘膜血流の増大反応を惹起することが明らかとなった。また、ラット胃粘膜には TRPV1 と TRPA1 発現神経が存在し、粘膜下層の血管周囲を取り巻くように発現していた。さらに、TRPA1 は筋間神経叢の神経細胞体にも観察された。

## 第二章 大建中湯のラット胃粘膜血流に対する作用と機序解析

### 第一節 緒言

現在臨床で最も多く使われている漢方薬は大建中湯 (DKT) である。米メイヨークリニックでの研究において DKT が健康なヒトの消化管及び結腸通過に及ぼす促進作用が報告されたことを契機に漢方薬 DKT に関する科学的エビデンスが急激に増加し<sup>27,28)</sup>、今では慢性便秘症ガイドライン 2017 にも掲載されている<sup>29)</sup>。DKT は乾姜、人参、山椒、および膠飴を 5 : 3 : 2 : 80 の比率で加工され構成されたものである。DKT の薬理作用としてラット結腸の粘膜血流増大が報告されており、その血流増大には TRPV1 および TRPA1 チャネルの関与が示唆されている<sup>14,15,16)</sup>。従って DKT は主に結腸に作用すると考えられるが、古典では DKT は腹部の冷えに使うと記載されており、金匱要略の条文 10-14 を見てみると、「心胸中大イニ寒痛シ、嘔シテ飲食スル能ワズ、腹中寒エ、上衝シテ皮起コリ、出デ見ワレテ頭足有り、上下シテ痛ミ、触レ近ヅクベカラザルハ大建中湯之ヲ主ル。大建中湯ノ方」と記載されている<sup>30)</sup>。これを読み解くと腹壁胃腸が弛緩し、腹部に冷感を覚え、嘔吐、腹部膨満感があり、腹痛の甚だしい患者に用いることで、結腸など下部消化管だけに作用する薬ではないことがわかる。そこで、DKT が上部消化管に作用している報告を調べると中永らは DKT を急性腹症 (心窩部、右側腹部疼痛) 患者に対して使用し

症状改善したことを報告している<sup>31)</sup>。また、古川らはイヌを用いた胃瘻より DKT を投与した結果、胃の収縮運動亢進を観察している<sup>32)</sup>。これらの報告から、DKT は下部消化管だけではなく、胃など上部消化管にも作用していると推察されるが、DKT の胃粘膜血流に対する作用に関しては報告がない。

第二章では、DKT が腹部の冷えを改善する効果を明らかにするために、DKT が温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルへの刺激を介して胃粘膜血流を増大させるかどうか検討した。

## 第二節 実験方法

### 1. 使用動物

動物は、雄性 Sprague-Dawley 系ラット（SLC, 浜松, 日本）で体重 180～220 g のものを使用した。それら動物は、制御された環境条件（ $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、午前 7 時から午後 7 時の明暗サイクル）の下で飼育され、ラット固形飼料 MF（オリエンタル酵母, 東京, 日本）を与えた。動物は、糞食を防ぐために網底が隆起した個々のケージに入れ、実験前に 18 時間絶食を行った。飼養中は自由摂水とした。動物実験は、日本薬理学会が承認した「動物実験に関する日本薬理学会指針」および城西国際大学動物実験・動物実験倫理委員会（#52）の承認を得て実施された。使用した動物数は、データの解釈に必要な最小限の例数に抑えた。

### 2. 使用薬物

**大建中湯（DKT）**：DKT はツムラ大建中湯の処方エキス原末（大建中湯去膠飴、膠飴）を株式会社ツムラ（東京, 日本）から研究試薬として供与していただいた。膠飴の入っていない DKT エキス原末 (Lot. 2100100010) 1 倍に対し、膠飴エキス原末 (Lot. B3020168) を 8 倍の量を加え DKT のエキス原末とし蒸留水を加えた。それらの最終濃度を 360、720、及び 1440 mg/mL に調



製した。それは温浴 (60°C) で温め膠飴が溶けるまで温めた。その後常温に戻るまで静置した。

**試薬：**カプサイシンは富士フィルム和光純薬 (東京, 日本) から購入した。カプサイシンは 0.5%カルボキシメチル水溶液に溶解した。BCTC [N-(4-t-ブチルフェニル)-4-(3-クロロピリジン-2-イル) テトラヒドロピラジン-1 (2H) -カルボキサミド (4-(3-Chloro-2-pyridinyl) -N-[4-(1,1-dimethylethyl) phenyl] -1-piperazinecarboxamide) ]は、BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA) から購入した。BCTC は蒸留水で希釈した  $\beta$ -シクロデキストリン溶液で溶解し、 $\beta$ -シクロデキストリンの最終濃度が 10.0%未満になるように調製した。 $\beta$ -シクロデキストリンは Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) から購入した。A-967079 は、Tocris 社 (Minneapolis, MN, USA) から購入した。A-967079 は DMSO とクレモフォールで溶解した後、それらの最終濃度が 5.0%未満になるように蒸留水で調製した。N (omega) -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)、および、L-アルギニンは Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) から購入し、生理食塩水に溶解した。

### 3. 実験手順

胃粘膜血流はウレタン麻酔およびイソフルラン吸入麻酔をしたラット胃を ex-vivo チェンバーに装置し、DKT (360~1440 mg/mL) を胃内に 10 分間も

しくは 30 分間適用した際の血流変化を接触型レーザードップラー血流計 (Advance, Model ALF-21N, 東京, 日本) で測定した。なお、粘膜血流の変化率は DKT 適用前の値に対するパーセントで示した。薬物は TRPA1 ブロッカー-A-967079 (10 mmol/L) と TRPV1 ブロッカー-BCTC (2.7 mmol/L) を DKT 適用 20 分前から胃内適用した。また、実験動物の一部には神経毒性用量カプサイシン処置 (計 100 mg/kg) を施し、カプサイシン感受性発現神経の退行変性を誘起した。そのほかに非選択的一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬 L-NAME (10 mg/kg) を、DKT (1440 mg/mL) 適用 20 分前に静脈内投与した。

#### 4. カプサイシン神経毒性用量の処置動物の作製

実験の 2 週間前に、カプサイシンを 1 日 1 回 3 日間皮下注射 (20, 30, および 50 mg/kg) した。すべてのカプサイシン注射はイソフルラン吸入麻酔下 (1 mL/mL) で行われ、ラットはアドレナリン  $\beta$  受容体アゴニストのイソプロテレノール (0.01 mg/kg, im) および選択的アドレナリン  $\beta_1$  アンタゴニストのアテノロール (0.01 mg/kg, im) で前処理した上で、カプサイシン適用に伴う呼吸障害を防いだ。実験に使用する際には、カプサイシン感受性知覚神経の退行性変性が生じているか有効性を検証するために 0.1 mg/mL のカプサイシン溶液を 1 滴ずつ、ラットの片方の眼に滴下し、眼への刺激に対するワイピ

ング行動で評価した<sup>33)</sup>。なお、ワイピング行動を示した動物は、カプサイシン感受性知覚神経の退行性変性が生じていないと判断して今回の実験から除外した。

### 第三節 結果

#### 1. 大建中湯 (DKT) は麻酔ラットにおける胃粘膜血流の増大反応を引き起こす

DKT の胃内適用は、濃度依存的 (360, 720, 1440 mg/mL, 2 mL) に胃粘膜血流の増大反応を引き起こし、DKT 720 mg/mL 以上の濃度で統計学的にも有意な増大が観察された (Fig. 4a)。また、チャンバーから DKT (720, 1440 mg/mL) を除去しても胃粘膜血流の増大は高いままであった。DKT (360, 720, 1440 mg/mL) の 10 分間胃内適用時による粘膜血流増大の最大反応は、 $128.9 \pm 6.2\%$ 、 $136.0 \pm 10.4\%$ 、および  $162.9 \pm 8.5\%$  であった (Fig. 4b)。なお、溶媒 (蒸留水) のみの胃内適用は、胃粘膜血流の増大反応には何ら変化を観察しなかった (Fig. 4a, b)。以降の実験では DKT の用量を 1440 mg/mL として行うことにした。

#### 2. 大建中湯 (DKT) によるラット胃粘膜血流の増大反応は、TRPA1 および TRPV1 チャネルの活性化に起因する

DKT (1440 mg/mL) を胃内適用すると、適用後 5 分から粘膜血流の増大反応が観察され、適用後 10 分に  $216.5 \pm 15.4\%$  の最大反応が観察された。適用後 30 分に  $178.0 \pm 20.1\%$  の粘膜血流まで減少した。30 分間の適用後もベースのレベルまで戻らず、実験終了時 (適用後 90 分) においても  $114.6 \pm 5.2\%$  の値を示した。DKT (1440 mg/mL) による胃粘膜血流の増大は、TRPV1 チャネルブロッカーである BCTC (2.7 mmol/L) を胃粘膜に前処置した動物におい

ても対照群と同程度の粘膜血流増大を引き起こした (Fig. 5a)。DKT 適用後 10 分間と 30 分間における増大は  $203.3 \pm 34.3\%$  と  $150.6 \pm 5.3\%$  であった (Fig. 5b, c)。TRPA1 チャネルブロッカーである A-967079 (10 mmol/L) を胃粘膜に前処置した動物では、DKT による粘膜血流増大が明らかに減弱していた (Fig. 5a)。それらは適用後 10 分では  $138.3 \pm 11.1\%$  で、適用後 30 分では  $139.1 \pm 14.3\%$  であり、適用期間中対照群に比べ有意に抑制されていた (Fig. 5b, c)。

### 3. 大建中湯 (DKT) によるラット胃粘膜血流の増大反応は、カプサイシン感受性知覚神経 (TRPV1 発現知覚神経) に起因する

DKT (1440 mg/mL) の胃内適用によって、適用後 5 分から粘膜血流の増大反応が観察され、 $159.5 \pm 12.7\%$  に達した。

一方、カプサイシン毒性用量の処置ラットの胃粘膜に DKT (1440 mg/mL) を適用した場合、適用後 10 分で最大反応  $122.5 \pm 11.1\%$  増大が認められたが (Fig. 6b)、DKT 適用中であっても適用後 15 分で胃粘膜血流の増大反応は適用前レベルにまで低下していた (Fig. 6a)。さらに、カプサイシン毒性用量の処置ラットでは DKT 適用後 30 分で対照群と比較して統計学的に有意な抑制が認められた (Fig. 6c)。神経毒性用量のカプサイシン処置ラットに DKT (1440 mg/mL) を 30 分間適用したところ、適用初期に胃粘膜血流の増加を起

こしたその後持続的な DKT 増加反応が消失し、一過性の反応に変化した。

これらの結果からカプサイシン感受性神経に発現する TRPV1 と TRPA1 は DKT 適用後の持続的な胃粘膜血流増大に関わっていることが示唆された。

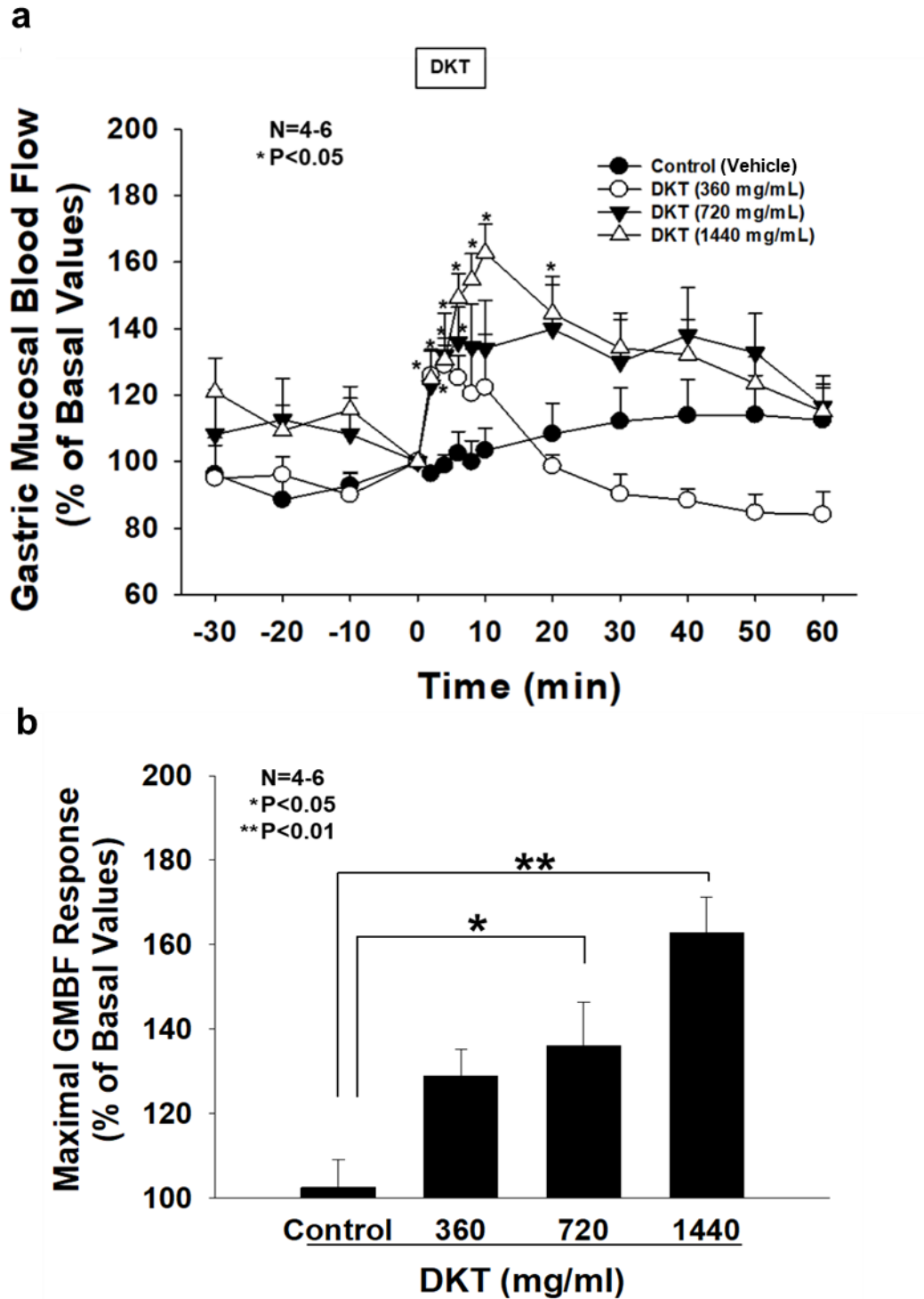
#### 4. ラット胃体部における温度感受性チャネル TRPV1 および TRPA1 の免疫組織化学的解析

ラット胃の粘膜層から筋層にかけて TRPV1 と TRPA1 チャネルを免疫染色した (Fig. 7c, d)。カプサイシンの神経毒性用量処置によって、TRPV1 発現神経は完全に消失していることが観察された (Fig. 7c)。一方、筋層や筋間神経叢にある TRPA1 発現神経は完全に消失しなかった (Fig. 7d)。これは TRPV1 発現神経に共発現している TRPA1 が消失したことによると考えられる。これらの結果から、TRPA1 および TRPV1 共発現神経が粘膜下層の細血管周囲にあり胃粘膜血流の調節機構に関与していることが推察された。TRPA1 の免疫組織化学的解析において胃粘膜細胞にも発現していることが観察され、それらはカプサイシン毒性用量でも消失しなかった (Fig. 7d 二重矢印)。

#### 5. 大建中湯 (DKT) によるラット胃粘膜血流の増大反応は、非選択的 NOS 阻害薬 L-NAME 前投与により低下する

対照群では DKT の胃内適用後、血流増大が起こり、適用後 20 分に  $152.3 \pm 14.3\%$  まで上昇したが、DKT を除去しても適用前のレベルには戻らなかった (Fig. 8a)。一方、L-NAME (10 mg/kg, iv) を前処置すると DKT による胃

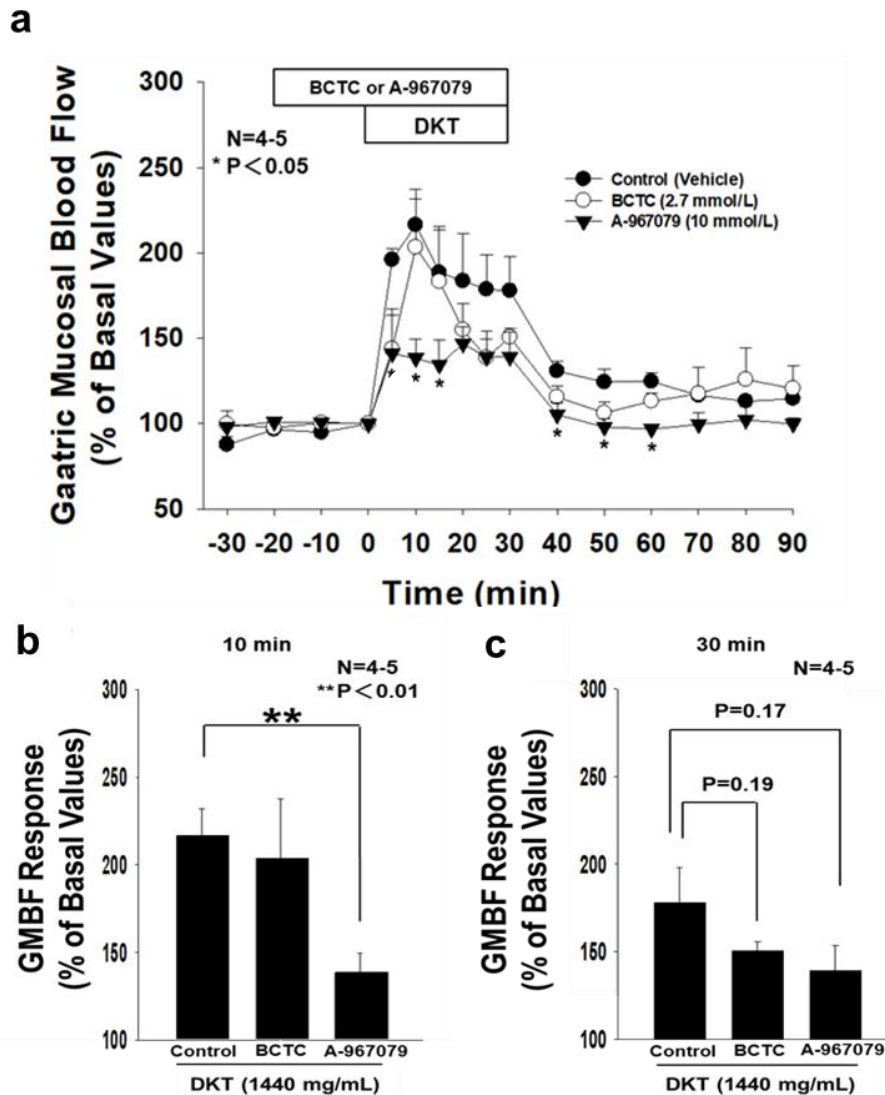
粘膜血流の増大反応が抑制された。DKT 適用後 10 分と 30 分共に対照群と比較して有意に胃粘膜血流増大が抑制され、また、DKT 除去後も血流増大変化は認められなかった (Fig. 8b, c)。しかし、L-NAME による DKT 誘起血流増大反応の減弱は、NOS の基質である L-アルギニン (L-Arg: 300 mg/kg×2) の前処置により回復し、DKT のみを胃内適用した場合と同程度の粘膜血流増大が認められた。血流増大は適用後 20 分に最大の  $157.3 \pm 25.4\%$  を示した。また、適用後 10 分と 30 分共に対照群と同様な血流増大が認められた (Fig. 8b, c)。以上の結果から、DKT による粘膜血流の増大反応には内因性 NO が関与することが示唆された。



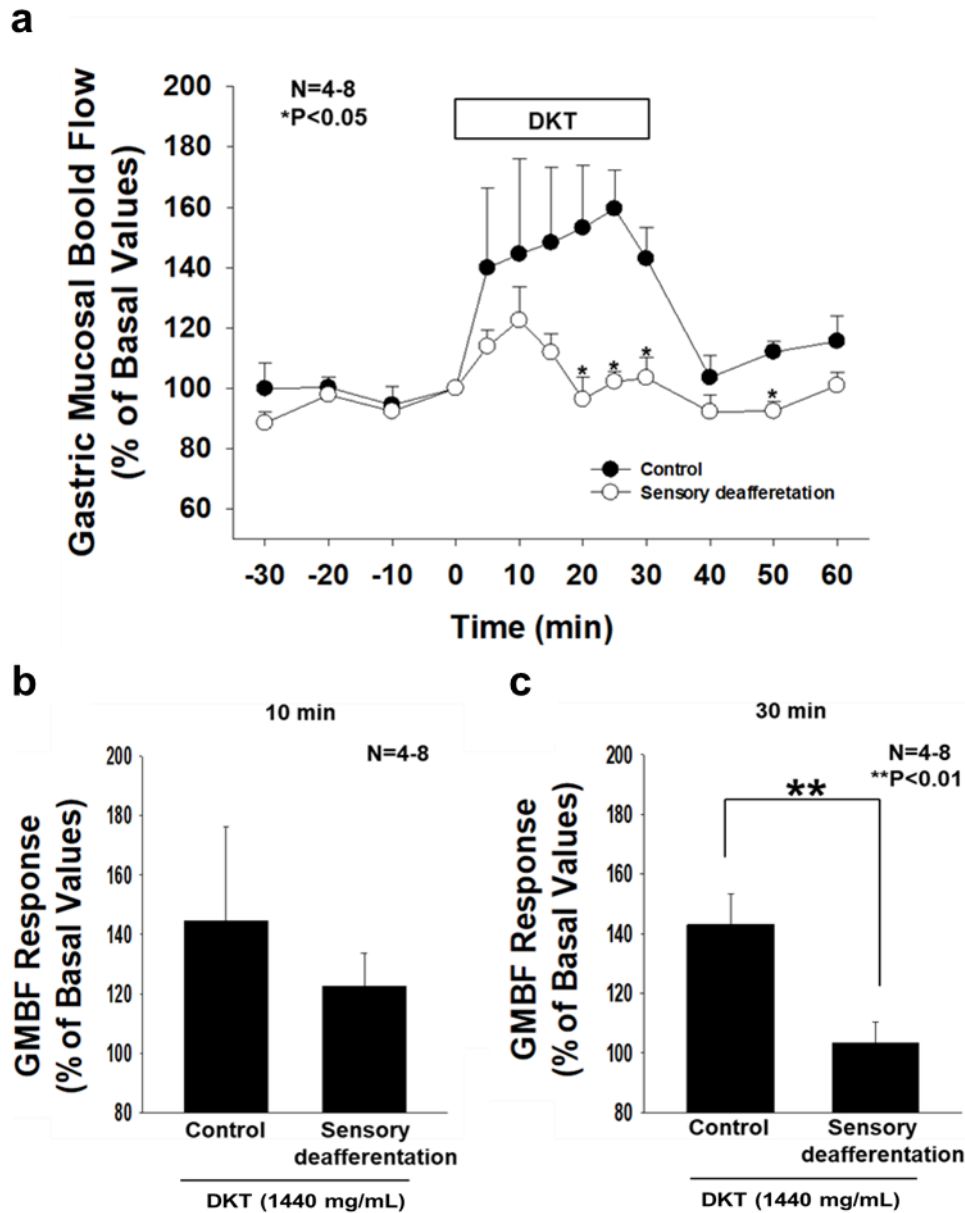
**Fig. 4** Effect of the mucosal application of daikenchuto (DKT: 360, 720, and 1440 mg/mL) on GMBF in rat stomachs. (a) Time course of GMBF response to DKT. The data are expressed as % increase in baseline values, and they represent the mean  $\pm$  SE obtained every 2 or 10 min for 4–6 rats. \* $P < 0.05$  was considered statistically significant when they compared to control group using ANOVA with Dunnet's test. (b) Maximum response of GMBF induced by the mucosal application of DKT (360, 720, and 1440 mg/mL). The data are expressed as % increase in



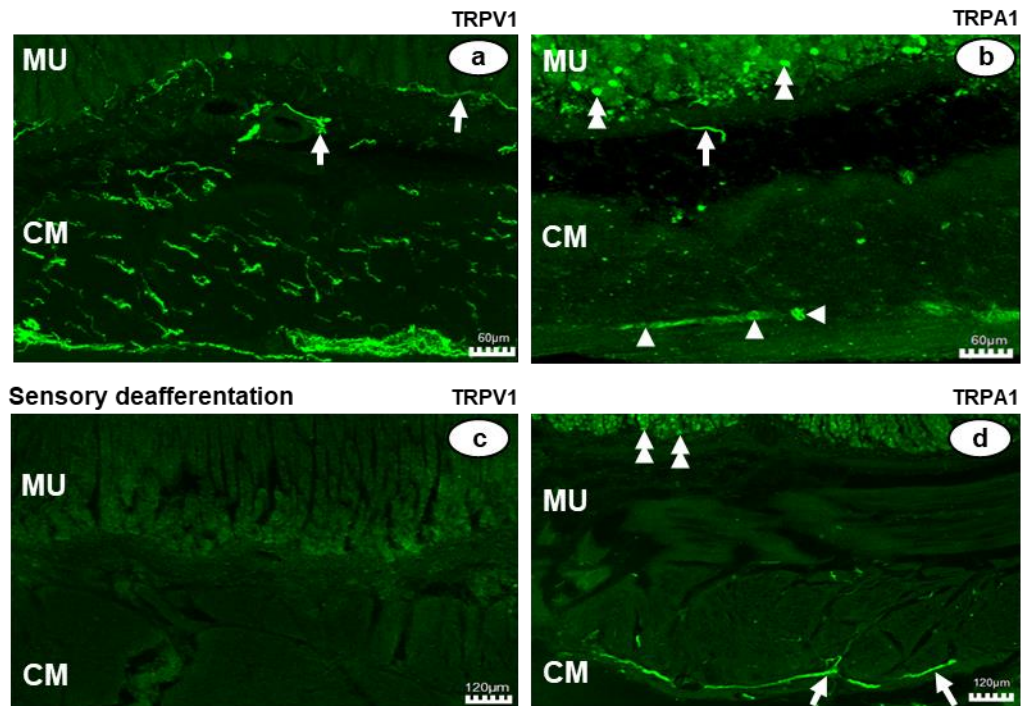
baseline value, and represented as mean  $\pm$  SE for 4-6 rats. \*P<0.05 and \*\*P<0.01 were considered statistically significant when they compared to control group using ANOVA with Dunnet's test. Note that GMBF response to DKT increases in a concentration-dependent manner.



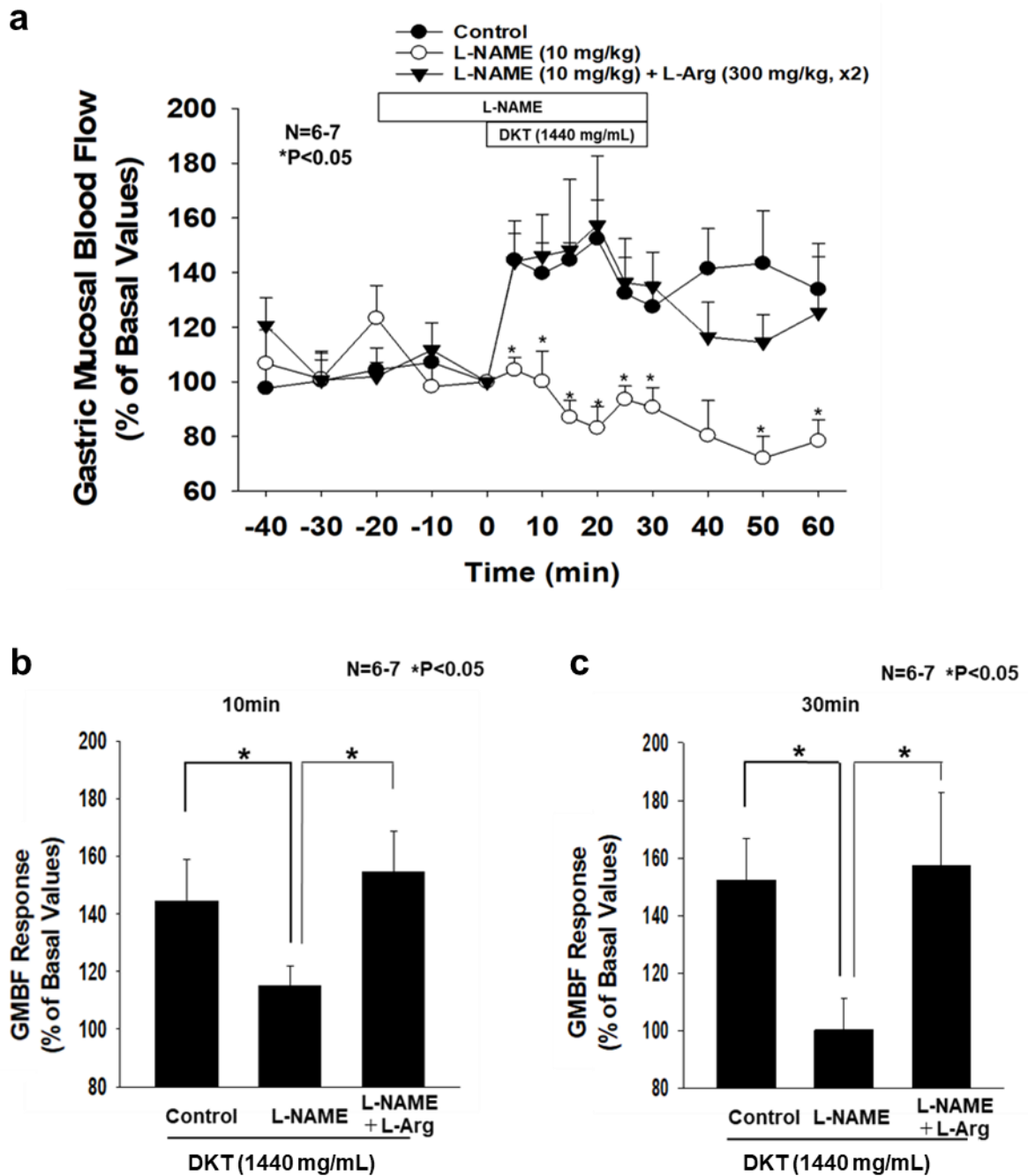
**Fig. 5** Effect of TRPV1 blocker BCTC and TRPA1 blocker A-967079 on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. (a) Time course for analysis of GMBF response to DKT (1440 mg/mL) in rat stomachs treated with either A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 mmol/L). The data are expressed as % increase in basal values, and represented as mean  $\pm$  SE. of values every 5 or 10 min for 4-5 rats. \*P<0.05 was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. (b) GMBF after 10 min of DKT administration (1440 mg/mL) in rat stomachs treated with either A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 mmol/L). (c) GMBF after 30 min of DKT (1440 mg/mL) administration in rat stomachs treated with either A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 mmol/L). The data are expressed as % increase in baseline values, and represented as mean  $\pm$  SE for 4-5 rats. \*\*P < 0.01 was considered statistically significant when compared to control group using Student's t-test. Note that the increased GMBF in response to DKT is obviously suppressed by A-967079; but not partially suppressed by BCTC in initial periods.



**Fig. 6** Effect of deafferentation of capsaicin-sensitive sensory fiber on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. DKT (1440 mg/mL) was applied topically to the mucosa for 30 min, and the stomach was perfused with saline before and after application. (a) Time course for analysis of GMBF in response to DKT (1440 mg/mL) in capsaicin-pretreated rats. Data are expressed as the % increase in baseline values, and represented as mean  $\pm$  SE values obtained every 5 or 10 min for 4-8 rats. \*P<0.05 was considered statistically significant when they compared to control group using Student's t-test. (b, c) GMBF after 10 and 30 min of mucosal application of DKT (1440 mg/mL) in capsaicin-pretreated rats, respectively. Data are expressed as the % increase in baseline values, and represented as mean  $\pm$  SE for 4-8 rats. \*\*P<0.01 was considered statistically significant when they compared to control group using Student's t-test.



**Fig. 7** Alteration in distribution of immunoreactivities of TRPV1 and TRPA1 in the cross section of rat stomach in between control and capsaicin-pretreatment. No TRPV1-expressing fiber is found in the capsaicin-pretreated rat stomach (c). Noted that TRPA1-expressing fibers around the submucosal arteriole and venule bundles are not observed in capsaicin-pretreated rats (d), although the TRPA1-immunoreactivity is observed in the myenteric plexus (arrows) and in mucous cells in the bottom of gastric glands after capsaicin pretreatment (two headed arrow). MU, mucous membrane; CM, circular muscle. The scale bar corresponds to 120  $\mu\text{m}$  (c, d). Two transverse sections of tissues obtained for five normal and capsaicin-pretreated rats are stained by immunohistochemical methods. The typical photos are showed in this figure.



**Fig. 8** Effect of a non-selective NOS inhibitor N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) with or without L-Arg (300 mg/kg, x2) on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. L-NAME (10 mg/kg, iv) was administered 20 min prior to the mucosal application of DKT (1440 mg/mL) in rat stomachs, and L-Arg (300 mg/kg, x2) was administered intravenously 40 and 60 min prior to DKT application, respectively. (a) Time course for analysis of GMBF in response to DKT (1440 mg/mL) in rats treated with L-NAME (10 mg/kg, iv) with or without L-Arg (300 mg/kg, x2). Data are expressed as the % increase in baseline values, and they

represent mean  $\pm$  SE values obtained every 5 or 10 min for 6–7 rats. \*P < 0.05 was compared with the vehicle using Student's t-test. (b, c) GMBF at 10 and 30 min after DKT administration (1440 mg/mL) in rats treated with L-NAME (10 mg/kg, iv) with or without L-Arg (300 mg/kg, x2), respectively. Data are expressed as the % increase in baseline values, and they represent mean  $\pm$  SE for 6–7 rats. \*P < 0.05 was compared with the vehicle using Student's t-test. (b, c) GMBF after 10 and 30 min of mucosal application of DKT (1440 mg / mL) in L-NAME and L-Arg pretreatment rats, respectively. The data is expressed as a % increase in baseline values and as an average  $\pm$  SE for 6 to 7 rats. \*P<0.05 was considered statistically significant when compared to the control group using Student's t-test.

#### 第四節 考 察

本研究では、DKT 誘起胃粘膜血流の増加の初期相および持続相の両方で TRPA1 ブロッカー A967079 によって阻害された。一方、TRPV1 ブロッカー BCTC によっては持続相のみが阻害された。カプサイシン神経毒性用量処理ラットでは、DKT による胃粘膜血流の増大の持続相が消失した。アドレノメデュリン (ADM) は、AITC および DKT に応答してラット小腸粘膜の TRPA1 発現腸上皮細胞から放出され、腸粘膜の血流増大を誘起することが報告されている<sup>16)</sup>。したがって、DKT による胃粘膜血流増大反応の初期段階では、TRPA1 発現胃粘膜細胞から分泌される ADM が関与することが考えられた。すなわち、DKT による胃粘膜血流増大の初期相は、知覚神経および胃粘膜細胞に発現する TRPA1 の活性化に起因すると推察された。

本章の結果から以下のことが明らかになった。DKT 胃内適用はラット胃粘膜血流の増大を引き起こし、その現象はカプサイシン感受性神経に発現する温度感受性チャネル TRPV1 と TRPA1 の活性化を介した粘膜血流の調節機構が機能したことが示唆された。DKT の濃度依存的に粘膜血流増大が観察され、その増大は TRPA1 ブロッカーの前処置により初期相から抑制され、TRPV1 ブロッカー前処置により持続相の血流増大も抑制された。カプサイシン感受性

知覚神経を退行変性させたラットにおいて DKT 胃内適用は、正常ラットと比べても適用直後の一過性血流増大に変化がなかったが、持続性の血流増大は明らかに低下していた。

さらに、NOS 阻害薬である L-NAME により DKT の血流増大作用が完全に抑制された。DKT の胃粘膜血流増大作用には、内因性 NO が関与していることが示唆された。DKT はカプサイシンと同様に一次知覚神経線維の軸索反射によってラット胃粘膜の血流を増大させると共に<sup>33)</sup>、TRPV1 に作用して活性化させ、その活性刺激が CGRP や NO の遊離を介して胃粘膜血流増大を引き起こし、胃機能の恒常性に関与していることが推察された。

免疫組織化学的解析により、TRPA1 はラット胃体部切片において粘膜下層、筋間神経叢において神経線維や神経細胞体内に存在していた。カプサイシン神経毒性用量処置ラットの胃体部において TRPV1 発現神経線維は完全に消失したが、TRPA1 は筋間神経層にある神経細胞と粘膜細胞にのみ発現が認められた。つまり、TRPA1 は TRPV1 と共発現する神経線維、TRPA1 のみ発現している神経細胞、および、TRPA1 を発現する胃粘膜細胞に発現していることが明らかになった。さらに、TRPA1 および TRPV1 が共発現している神経線維は粘膜下層にある細血管周囲を取り囲んでおり、胃粘膜血流調節に関与し



ていることが考えられた。加えて、粘膜細胞に存在する TRPA1 も AITC および DKT 刺激によりアドレノメデュリンやプロスタグランジンのような血管拡張因子の遊離によって血流増大反応に関与することが考えられた<sup>34,35)</sup>。

カプサイシン神経毒性用量処置ラットにおいて、DKT による持続的な粘膜血流増大は抑制されたが、適用直後の血流増大に関しては、TRPA1 のみ発現している神経、もしくは、胃粘膜上皮に発現している TRPA1 を介して血管拡張因子が遊離されたことが考えられた。

カプサイシンの胃内初回適用によって粘膜血流が増加することはよく知られている。しかし、カプサイシン 2 回目の胃内適用に対する増大反応は初回適用の約 3 分の 1 であり、粘膜血流増大はカプサイシンの繰り返し適用によって減弱する<sup>36)</sup>。さらに、AITC の繰り返し胃内適用によっても粘膜血流増大反応は減弱する<sup>37,38)</sup>。対照的に、DKT の 2 回目胃内適用に対する反応は、1 回目胃内適用とほぼ同じ増大反応を誘起した<sup>38)</sup>。この理由として、DKT の粘膜血流増大には TRPV1 および TRPA1 チャンネルの活性化だけでなく、2 ポアドメイン型カリウムチャンネル(KCNKs)の閉孔にも起因することが考えられる。事実、サンショウの成分であるヒドロキシ $\alpha$ -サンショオール(HAS) は TRPA1 および TRPV1 チャンネルの活性化作用の他に、KCNKs ブロッカーとして作用

することも報告されている<sup>22)</sup>。さらに、KCNKは知覚神経にも発現しており、DKTは知覚神経の興奮性KCNKsも介して調節することで消化管運動を亢進することが明らかにされている<sup>40)</sup>。したがって、DKTは、サンショウの作用によりTRPV1発現神経線維にあるKCNKを遮断し膜興奮性の増大を引き起こすことで胃粘膜血流の増大反応が生じ、脱感作がなかったと考えられる。

DKTの構成生薬である乾姜には6-ジנגゲロールと6-ショウガオールが含まれており、それらはバニロイド構造を有し、TRPV1に対してカプサイシン様刺激作用が認められている<sup>41,42)</sup>。ラット胃の粘膜下層の細動脈にはTRPV1発現神経線維が多数存在しており、カプサイシンはTRPV1神経線維を刺激してCGRP<sup>23,24,25)</sup>およびNO<sup>43,44)</sup>を放出することが明らかにされている。さらに、TRPV1とTRPA1は外来性知覚神経<sup>26)</sup>で共発現している。これらの知見を考え合わせると、DKTによるTRPA1およびTRPV1を共発現する知覚神経の活性化により胃粘膜血流の増大を誘発したことが明らかになった。

NOは胃粘膜血流を増大させる重要な血管拡張因子であり、知覚神経による胃粘膜血流の調節に重要な役割を果たしている。非選択的NOS阻害薬である

L-NAME は、カプサイシン誘起胃粘膜血流の増大反応を抑制することが知られている<sup>43,44)</sup>。カプサイシン誘発胃粘膜血流増大と同様に、DKT による粘膜血流増大も非選択的 NOS 阻害薬 L-NAME によって完全に抑制された。さらに、L-NAME と L-Arg を併用処置した群では L-NAME による抑制効果が消失した。これは大量の L-Arg を処置することで NOS の活性部位において L-NAME と競合的拮抗が生じ、L-NAME の NOS に対する薬理作用が打ち消されたためである。したがって、DKT による胃粘膜血流の増大反応には NO も関与していることが示唆された。

これらの結果より、DKT は古典にあるように下部消化管だけでなく、胃など上部消化管においても粘膜血流を増大することが見出された。そして、腹部の冷えは消化管全域の粘膜血流増大させることで改善することが考えられた。

## 第五節 小括

DKT 胃内適用はラット胃粘膜血流の増大を引き起こし、その増大は濃度依存的であった。DKT 胃内適用によるラット胃粘膜血流増大は TRPA1 ブロッカーにより初期相と持続相の両方で抑制されが、TRPV1 ブロッカーにより持続相において特に抑制された。また、免疫組織学的解析により TRPA1 と TRPV1 を共発現する神経、TRPA1 のみ発現している神経、および TRPA1 を発現する胃粘膜細胞が存在していることが明らかになった。DKT による胃粘膜血流の増大反応は、初期相において TRPA1 発現胃粘膜細胞から遊離される血管拡張因子（ADMなどを想定）に起因することが考えられた。また、持続的な胃粘膜血流においては TRPA1 と TRPV1 共発現している神経が粘膜下層にある血管周囲を取り囲んでいるため胃粘膜血流調節に関与していることが考えられた。さらに、それらは L-NAME により DKT による胃粘膜血流増大が抑制されたことから、DKT が TRPV1 と TRPA1 発現神経から NO 遊離を介した胃粘膜血流増大を引き起こすことが示唆された。

### 第三章 大建中湯のラット胃粘膜血流増大作用における溶液温度の影響の検討

#### 第一節 緒言

金匱要略の条文には DKT の服用方法として「微火に煎じ一升半を取り、分温再服す、一炊頃如りにして、粥二升を飲むべし、後に更に服す。当に一日糜を食して、之を温服すべし」<sup>45)</sup>と記載されている。これに対し、現代繁用されているエキス製剤の服用方法に関して温服、冷服の違いについて検討した報告がない。漢方薬の薬剤名にはその効能そのものが薬剤名になっている場合がある。例えば、大建中湯の「大」は症状の大小を表しており、「建中」は体の「中央(中焦)」である胃腸の機能を「建て直す」という意味があり、「湯」は煎じて服用するという意味がある。しかし、煎じ薬は準備に手間がかかり持ち運びにも不便である。そのため、漢方薬を簡単に服用できるように加工したエキス製剤と呼ばれる錠剤や粉薬が誕生した。もともと煎じて服用する湯剤をエキス製剤として服用する際の温度について検証データは乏しい。摂取する水の温度が高い場合、胃運動が増大する報告がされているため<sup>46)</sup>、エキス製剤も温度の高い状態で服用することで効力が増すと考えられる。DKT の作用点である TRPV1 と TRPA1 は温度感受性チャネルであり、43°C以上では熱感受性 TRPV1 チャネルが活性化し、17°C以下では冷感受性 TRPA1 チャネルが活性

化する<sup>5)</sup>。そのため、DKT 溶液の温度によって、DKT の薬理作用が異なることが予想された。事実、温度の高い飲食物を摂取すると体温が上がることから<sup>47)</sup> 腹部の冷えに使う大建中湯の場合、温かい状態で服用することでその効果が最大限に発揮されるのではないかと考えられる。

第三章では DKT の溶液温度が胃粘膜血流の増大反応に及ぼす影響について検討した。温度感受性チャネルである TRPV1 と TRPA1 に対する作用を考え、DKT 溶液温度変化による血流増大反応が相加的もしくは相乗的に現れると仮説を立て検討を進めた。

## 第二節 実験方法

### 使用動物

動物は、雄性 Sprague-Dawley 系ラット (SLC, 浜松, 日本) で体重 180～220 g のものを使用した。それら動物は、制御された環境条件 ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , 午前 7 時から午後 7 時の明暗サイクル) の下で飼育され、ラット固形飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京, 日本) を与えた。動物は、糞食を防ぐために網底が隆起した個々のケージに入れ、実験前に 18 時間絶食を行った。飼養中は自由摂水とした。動物実験は、日本薬理学会が承認した「動物実験に関する日本薬理学会指針」および城西国際大学動物実験・動物実験倫理委員会 (# 52) の承認を得て実施された。使用した動物数は、データの解釈に必要な最小限の例数に抑えた。

### 大建中湯 (DKT)

膠飴の入っていない DKT エキス 原末 (Lot. 2100100010) 1 倍に対し、膠飴エキス 原末 (Lot. B3020168) を 8 倍の量を加え DKT のエキス原末とし蒸留水を加えた。それら最終濃度を  $1440 \text{ mg/mL}$  に調製した。その後、それら混合物を温浴で温め膠飴が溶けるまで温めた後、常温に戻るまで静置した。同様に、温度の異なる溶液 ( $0^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ) を用意した。

## 実験手順

胃粘膜血流はイソフルラン吸入麻酔 (1 mL/mL) をしたラット胃を ex-vivo チェンバーに装置し、DKT (1440 mg/ml) を胃内に 30 分間適用した際の血流変化を接触型レーザードップラー血流計 (Advance, Model ALF-21N, 東京, 日本) で測定した。なお、粘膜血流の変化率は DKT 適用前の値に対するパーセント (%) で示した。DKT 適用時に温度を一定に保つために保温装置 (One-Channel Bipolar Temperature Controller : HCT-10, Farmingdale, NY) を使用した。0°C、22°C に関しては 10 mL の試薬を作り、胃内適用した試薬の温度を一定にできるように 0°C、22°C に冷やし灌流しながら実験を行った。

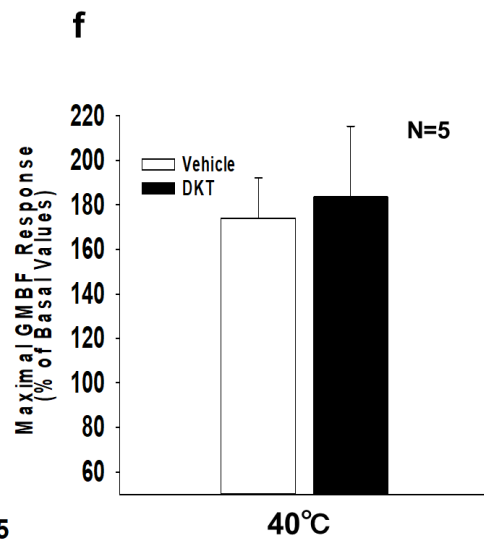
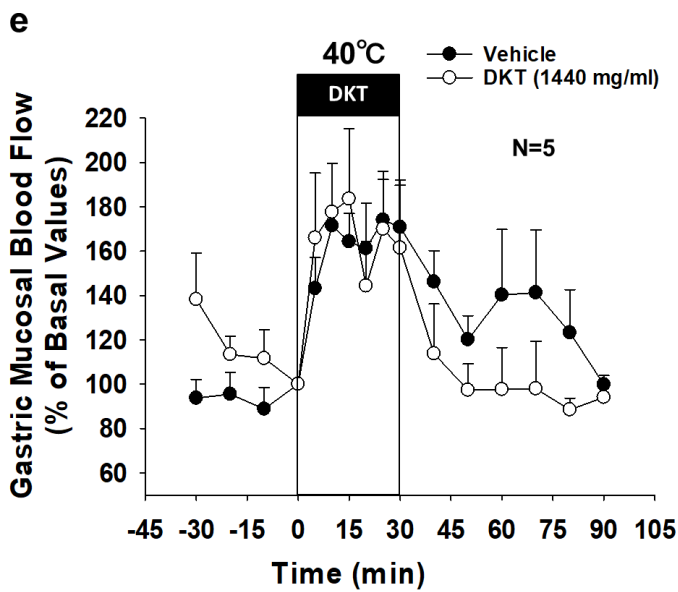
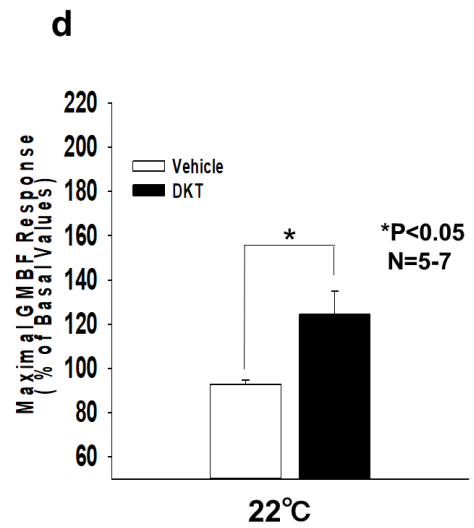
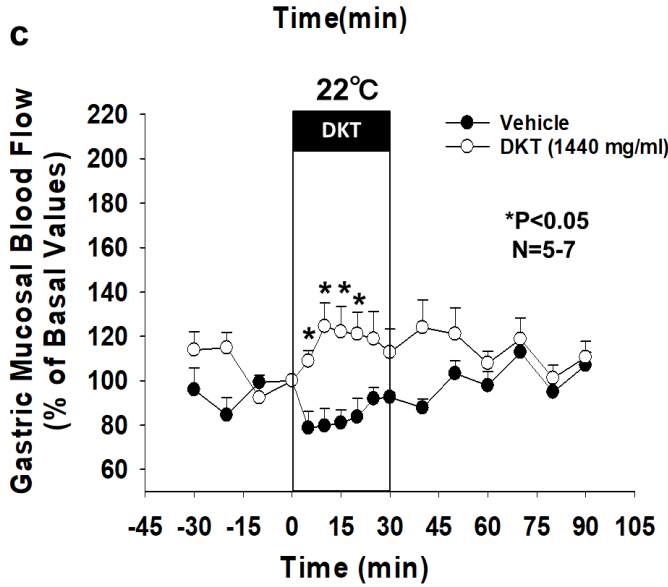
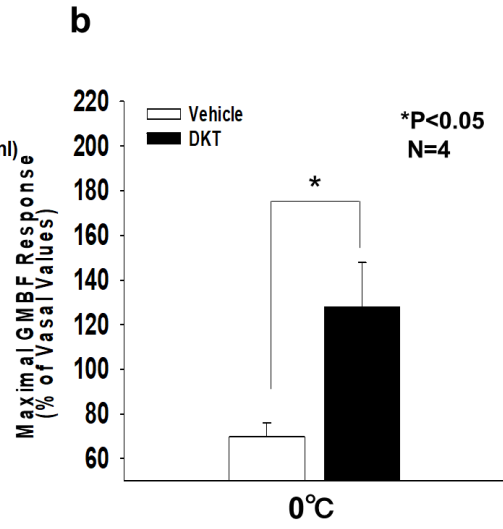
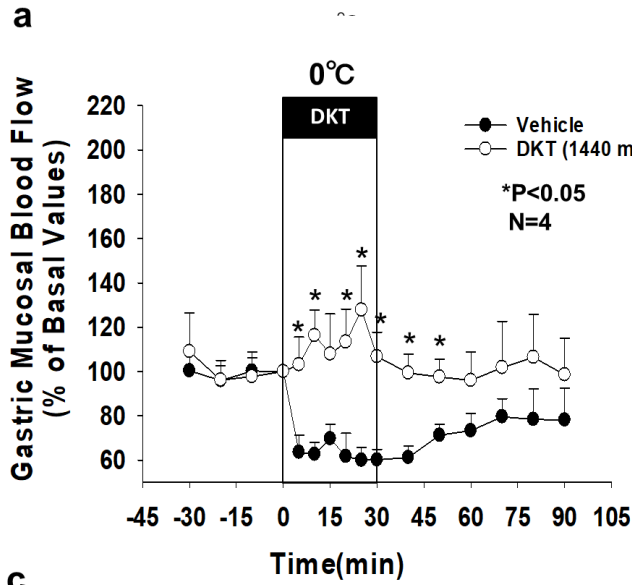


### 第三節 結果

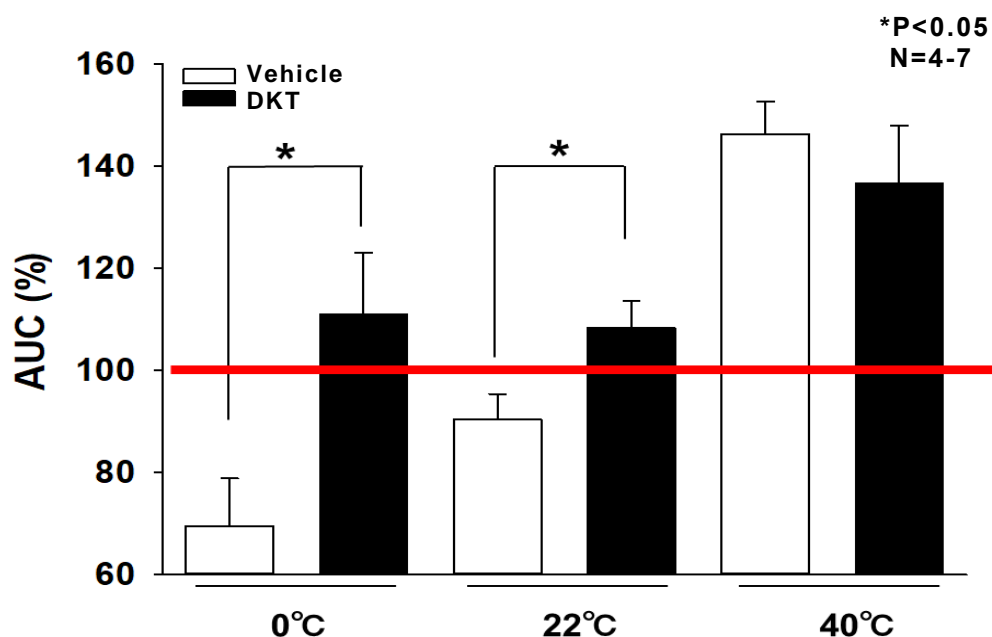
DKT による胃粘膜血流の増大作用に対する DKT の溶液温度の影響を検討した。DKT の溶液温度を 0°C（冷服）、22°C（常温）、および 40°C（温服）の 3 種類用意して実験を行った。DKT の溶媒である精製水(DW)のみを 0°C、もしくは、22°Cに調製し胃内適用した場合には粘膜血流増大が観察されず、逆に血流低下を引き起こした（最大反応 0°Cは  $69.7 \pm 6.4\%$ 、22°Cは  $92.6 \pm 2.0\%$ ）。一方、DKT 溶液を 0°C、もしくは、22°Cに調製し胃内適用したものは DKT による血流増大が観察された（最大反応：0°Cは  $127.8 \pm 20.0\%$ 、22°Cは  $124.4 \pm 10.6\%$ ）（Fig. 9b, d）。温服時の温度と考えられる 40°Cに調製した DKT 溶液は粘膜血流増大を誘起し、その最大反応は  $183.6 \pm 31.7\%$  だった。しかし、DKT の溶媒である DW のみを 40°Cにして胃内適用した場合にも血流増大が観察された（最大反応： $174.1 \pm 18.2\%$ ）。

また、適用期間 30 分間の胃粘膜血流増大における AUC をみてみると DW を 0°C、22°Cに調製して胃内適用した場合は適用前 30 分間と比べて 0°Cで  $-31.5\%$ 、22°Cで  $-10.6\%$  粘膜血流低下を引き起こしたが、40°C DW を胃内適用した場合は粘膜血流を適用前 30 分間と比べ  $+42.7\%$  増大させた。一方、DKT 溶液を 0°C、22°C、および、40°Cにそれぞれ調製したものを胃内適用したところ、0°Cでは適用前 30 分間と比べて  $+10.9\%$ 、22°Cでは  $+7.1\%$ 、および、

40°Cでは適用前 30 分間と比べて +36.2%といずれも粘膜血流増大を誘起した  
(Fig. 10)。



**Fig. 9** Effects of mucosal application of vehicle (DW) or DKT (1440 mg/ml) at 0°C, 22°C, and 40°C on GMBF in rat stomachs. (a, c, e) The time course of the GMBF in response to DKT (1440 mg/ml) or vehicle (DW) in anesthetized rats. DKT was topically applied to the mucosa for 30 min. The data are expressed as % increase in baseline values, and they represent the mean  $\pm$  SE values obtained every 5 or 10 min for 4-7 rats. \*P < 0.05 was compared with the vehicle (DW) using Student's t-test. (b, d, f) Maximum response of GMBF induced by mucosal application of vehicle (DW) or DKT (1440 mg/ml) at 0°C, 22°C, and 40°C on GMBF in rat stomachs. The data are expressed as the % increase in basal values and represented as mean  $\pm$  S.E. for 4-7 rats. \*P<0.05 is compared to vehicle (DW) using the Student's t-test. Notable, the increased GMBF in response to DKT (1440 mg/ml) was maintained even at the very low temperature such as 0°C and 22°C of the luminal solution, whereas GMBF induced by vehicle (DW) alone at 0°C and 22°C was observed the decrease immediately after mucosal application.



**Fig. 10** Changes in area under the curve (AUC) of GMBF before and during the mucosal application for 30 min of vehicle (DW) and DKT (1440 mg/ml) at 0°C, 22°C, and 40°C. The data are expressed as a % increase of AUC in the basal value, which was 30 min before the application of solution, and the mucosal application value during 30 min. They represented the mean  $\pm$  S.E. for 4-7 rats. \*P<0.05 is compared to vehicle (DW) using the Student's t-test. Notable, the AUC of GMBF responses to DKT (1440 mg/ml) was maintained even at the very low temperature such as 0°C and 22°C of the luminal solution, whereas GMBF induced by vehicle (DW) alone at 0°C and 22°C was observed the decrease immediately after mucosal application. The solution at 40°C was no changed in the increased GMBF between vehicle (DW) and DKT (1440 mg/ml).

#### 第四節 考察

DKT による胃粘膜血流の増大が、DKT の溶液温度を変化させることで作用が増強するか検討した。その結果、DKT 溶液が冷服 (0°C) および常温 (22°C) でも粘膜血流の増大反応が観察されたが、DW では粘膜血流の増大は認められず、逆に粘膜血流の低下が観察された。DKT 溶液を温服 (40°C) にした場合、粘膜血流は明らかに増大したが、その現象は DW を温服 (40°C) にしても観察された。そのため、古典の記載より期待された DKT と温湯による増強作用は認められなかった。そのため、DKT の溶液温度は、温服、もしくは、冷服でも同様の血流増大の作用発現が見られることが明らかになった。おそらく胃粘膜血流の増大作用に関して DKT と温湯との相加効果はほとんどないものと考えられる。

漢方薬には芳香性生薬が含まれていることから、温服にすると生姜の匂いがラットの消化管機能の亢進をすることも明らかにされている<sup>48)</sup>。そのため、湯剤にした漢方薬の蒸気による作用も期待ができるとすると温服するメリットは十分にあると考えられる。今後、粘膜血流の増大反応だけでなく、抗炎症作用など他の薬理作用において DKT の溶液温度変化で作用増強が現れるか検討していきたいと考えている。

## 第五節 小括

今回の実験により、温度の高い DKT を用いた方が胃粘膜血流の増大が高いことが明らかになった。0°C、22°Cの DW では胃粘膜血流を減少させたが、DKT では血流を増大させた。これは DKT の薬効によると考えられる。

しかし、40°Cの DKT 溶液による血流増大作用が 40°Cの DW と同程度であった。したがって、「お湯+DKT が相加的に胃粘膜血流増大を引き起こすだろう」という当初の仮説は証明できなかった。

おそらく胃粘膜血流増大作用に関して DKT と温湯の熱感との協力作用はほとんどないものと考えられる。しかしながら、温服で DKT を服用すると胃粘膜血流増大に対して最大限の効果を発揮できることが判明した。

## 総 括

現在、医療用漢方薬で最も使われているのは大建中湯 (DKT) である。中国古典医学書である金匱要略には DKT が下部消化管だけでなく消化管全域に作用して効果を現わすと記されている。DKT が腹部の冷えを改善する効果として温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルへの刺激を介して、上部消化管である胃粘膜血流を増大させるか検証した。

医療用漢方薬の主流であるエキス製剤について、服用時の温度に関する検証は行われていない。そこで今回、DKT によるこの薬理作用の効力が漢方薬特有の温服という投与方法によって変化するかについても薬理的検討を行った。

第一章では、麻酔下ラットにおける温度感受性 TRPV1 と TRPA1 チャンネル活性化薬による胃粘膜血流の増大反応について検討を行った。その結果、TRPV1 チャンネル作動薬であるカプサイシン、TRPA1 チャンネル作動薬である AITC は胃粘膜血流を増大させた。ラット胃粘膜には TRPV1 と TRPA1 が発現する神経線維が存在し、それが粘膜下層において細血管周囲を取り巻いていた。これらよりラット胃粘膜にある TRPV1 および TRPA1 の活性化が胃粘膜血流の増大反応を惹起することが明らかとなった。



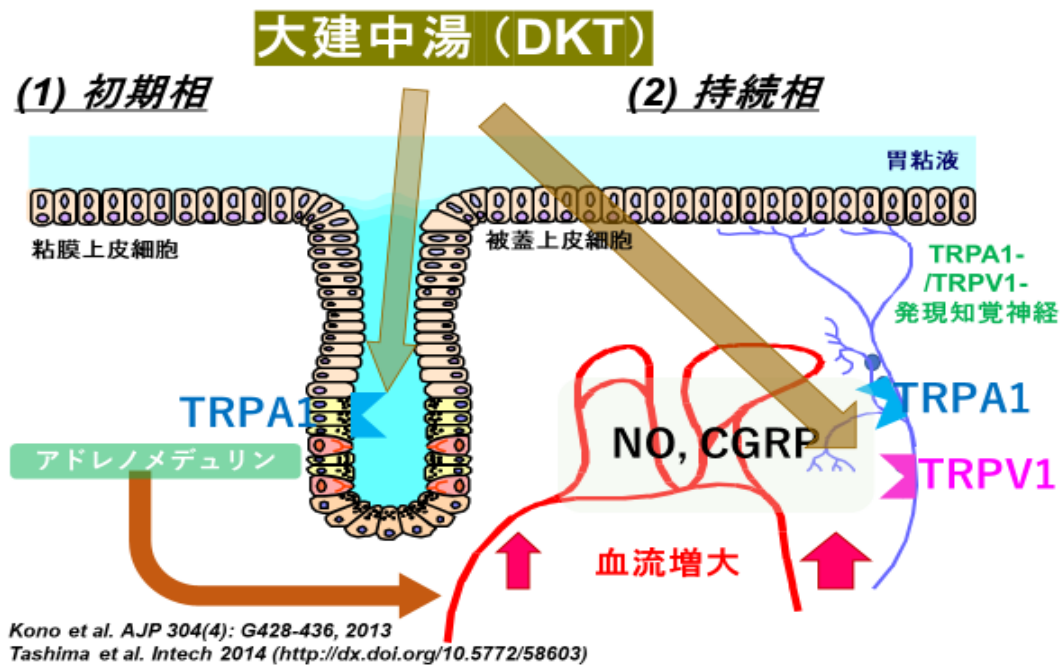
第二章では、麻酔下ラットにおける胃粘膜血流への影響の増大反応に対する DKT の効果について TRPV1 と TRPA1 チャンネルの関与を検討した。その結果、DKT による胃粘膜血流の増大は、初期相において知覚神経および胃粘膜細胞に発現している TRPA1 の活性化に起因していること、そして、持続的な胃粘膜血流増大については TRPV1 と TRPA1 共発現知覚神経に作用し胃粘膜血流を増大させていることが示唆された。また、DKT が TRPV1 と TRPA1 発現神経を活性化することで NO が遊離し胃粘膜血流を増大させることも明らかとなった。

第三章では、麻酔下ラットにおける DKT による胃粘膜血流の増大反応に対する溶液温度の効果について検討を行った。その結果、溶液温度の高い DKT を用いた方が胃粘膜血流の増大が高いことが分かった。しかし、温湯のみでも顕著な血流増大効果が認められたため、古典の記載より仮説を立てた DKT の相加効果は認められなかった。

以上のことから、DKT による胃粘膜血流の増大反応には TRPV1、TRPA1、NO が関与していることを明らかにした。また、この現象は DKT 適用直後には胃粘膜の TRPA1 を活性化することで血流を増大させ、その後、

DKT は TRPA1 と TRPV1 発現神経を活性化し、NO を遊離させることで粘膜血流増大を惹起することが示唆された。

今回の研究で DKT は下部消化管だけでなく上部消化管を含む消化管全体作用して薬理作用を現す漢方薬であることを証明した。併せて、これまで報告のなかった服用時の温度について検討し、温服が DKT の効果を引き出すことを示唆した。



## 結 論

漢方薬の服薬指導において、現在医療用漢方薬で最も使われている方剤大建中湯 (DKT) に着目し、未だ解明されていない上部消化管における薬理作用の解明を試みた。その結果、DKT が温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャネルへの刺激を介して胃粘膜血流を増大させることが明らかになり、下部消化管だけでなく消化管全域に作用して効果を現わすことが示唆された。これにより金匱要略にも記載している古典の記載への理解に繋がった。そして、DKT の効能効果である冷えに伴う腹痛に対して、これまで報告されていた DKT による小腸の血流改善に加え、胃の血流改善作用によっても腹痛を改善することが考えられた。

また、現代において医療用漢方薬の主流であるエキス製剤は、古典のように温めて服用するなどの検証を行われていなかったが、DKT による薬理作用の効力が漢方薬特有の温服という投与方法によって変化したことから冷えている者に対しては温服すると良いことが考えられた。

西洋薬的な薬理作用のメカニズムを学んできた医師・薬剤師にとって、漢方薬は作用メカニズムの根拠よりも経験的な使用で効果があった為使われてきたところが少なからずある。しかし、最近では急速に漢方薬には確固たる薬理学的な作用メカニズムを介して薬効を示していることが明らかにされつつある。

本研究では、DKTの一部の作用機序を明らかにすることができた。このような科学的根拠を蓄積していくことにより、自信をもって患者さんに漢方薬を服薬指導できるようになることを期待したい。

## 参考文献

1. Kawazoe K., Sakamoto K., Fushitani S., Abe S., Kujime T., Teraoka K., Minakuchi K., 現役薬剤師を対象とした漢方薬意識調査 – 効果的な漢方教育の実現に向けて – *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **35**, 351–359 (2009).
2. 川添和義, 薬剤師にとって「生薬学」とは, *YAKUGAKU ZASSHI*, **131**, 401–405 (2011).
3. 富永真琴, 生理学研究所 細胞生理研究部門 HP  
<https://www.nips.ac.jp/research/group/post-4/>.
4. Caterina MJ., Schumacher MA., Tominaga M., Rosen TA., Levine JD., Julius D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816–824 (1997).
5. Bandell M., Macpherson LJ., Patapoutian A., From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **17**, 490–497 (2007).
6. 辛島裕士, 炎症性疼痛と TRPA 1, *日本ペインクリニック学会誌*, **24**, 308-317 (2017).

7. Peier MA., Moqrich A., Hergarden CA., Reeve JA., Andersson AD, Story MG., Earley JT., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A., A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell*, **108**, 705-715 (2002).
8. Story GM., Peier AM., Reeve AJ., Eid SR., Mosbacher J., Hricik TR., Earley TJ., Hergarden AC., Andersson DA., Hwang SW., McIntyre P., Jegla T., Bevan S., Patapoutian A., ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell*, **112**, 819-829 (2003).
9. Kikuchi D., Shibata C., Imoto H., Naitoh T., Miura K., Unno M., Intragastric Dai-Kenchu-To, a Japanese herbal medicine, stimulates colonic motility via transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 in dogs. *Tohoku. J. Exp. Med.*, **230**, 197-204 (2013).
10. ツムラ 2020 年第 3 四半期決算カンファレンスコール。  
<https://www.tsumura.co.jp/ir/library/movie/item/0207conference.pdf>

11. Bandell M., Story GM., Hwang SW., Viswanath V., Eid SR., Petrus MJ., Early TJ, Patapoutian A., Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, **41**, 849-857 (2004).
12. Sugai E., Morimitsu Y., Iwasaki Y., Morita A., Watanabe T., Kubota K., Pungent Qualities of Sanshool-Related Compounds Evaluated by a Sensory Test and Activation of Rat TRPV1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1951-1957 (2005).
13. Koo JY., Jang Y., Cho H., Lee CH., Jang KH., Chang YH., Shin J., Oh U., Hydroxy- $\alpha$ -sanshool activates TRPV1 and TRPA1 in sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 1139-1147 (2007).
14. Sato Y., Katagiri F., Inoue S., Itoh H., Takeyama M., Dai-kenchu-to Raises Levels of Calcitonin Gene-Related Peptide and Substance P in Human Plasma. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1875-1877 (2004).
15. Kono T., Omiya Y., Hira Y., Kaneko A., Chiba S., Suzuki T., Noguchi M., Watanabe T., Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J. Gastroenterol.*, **46**, 1187-1196 (2011).

16. Kono T., Kaneko A., Omiya Y., Ohbuchi K., Ohno N., Yamamoto M.,  
Epithelial Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-  
dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small  
intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **304**, G428-  
G436 (2013).
17. Kono T., Koseki T., Chiba S, Ebisawa Y., Chisato N., Iwamoto J.,  
Kasai S., Colonic vascular conductance increased by daikenchuto via  
calcitonin gene-related peptide and receptor-activity modifying  
protein 1. *J. Surg. Res.*, **150**, 78-84 (2008).
18. Satoh K., Kase Y., Hayakawa T., Murata P., Ishige A., Sasaki H.,  
Dai-kenchu-to enhances accelerated small intestinal movement. *Biol.*  
*Pharm. Bull.*, **24**, 1122-1126 (2001).
19. Kono T., Kaneko A., Hira Y., Suzuki T., Chisato N., Ohtake N.,  
Miura N., Watanabe T., Anti-colitis and -adhesion effects of  
daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in  
Crohn's disease mouse model. *J. Crohns Colitis.*, **4**,161-70 (2010).



20. Hayakawa T., Kase Y., Saito K., Hashimoto K., Ishige A., Komatsu Y., Sasaki H., Effects of Dai-kenchu-to on intestinal obstruction following laparotomy. *J. Smooth Muscle Res.*, **35**, 47-54 (1999).
21. 日本漢方生薬製剤協会「薬事工業生産動態統計年報」, (2021).  
<https://www.nikkankyo.org/serv/movement/R01/all.pdf>
22. Kono T., Shimada M., Yamamoto M., Kaneko A., Oomiya Y., Kubota K., Kase Y., Uezono Y., Complementary and synergistic therapeutic effects of compounds found in Kampo medicine: analysis of daikenchuto. *Front. Pharmacol.*, **6**, 159 (2015).
23. Horie S., Michael GJ., Priestley JV., Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach. *Inflammopharmacology*, **13**, 127-137 (2005).
24. 富永真琴, 消化管における TRPV1 の発現と機能 *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* , **128**, 78-81 (2006).
25. 堀江俊治, 田嶋公人, 松本健次郎, 消化管スパイスセンサーとその機能 辛味は胃腸でも味わう *YAKUGAKU ZASSHI*, **138**, 1003-1009 (2018).

26. Kondo T., Obata K., Miyoshi K., Sakurai J., Tanaka J., Miwa H.,  
Noguchi K., Transient receptor potential A1 mediates gastric  
distention-induced visceral pain in rats. *Gut*, **58**, 1342-1352 (2009).
27. Manabe N., Camilleri M., Rao A., Rao Archana., Wong B., Burton  
D., Busciglio L., Zinsmaeister A., Haruma K., Effect of daikenchuto  
(TU-100) on gastrointestinal and colonic transit in humans. *Am. J.*  
*Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **298**, G970-G975 (2010).
28. 日本東洋医学会 EBM 委員会ホームページ KCPG Appendix 2018  
<http://www.jsom.or.jp/medical/ebm/cpg/pdf/KCPG2018.pdf>
29. 日本消化器病学会関連研究会, 慢性便秘の診断・治療研究会: 慢性便秘  
症診療ガイドライン 2017, 南江堂, 第1版 77-78 (2017).
30. 高山宏世編著, 金匱要略も読もう, 東洋学術出版社, 第1版 209-212  
(2016).
31. 中永士師明, 救急外来において大建中湯が奏功した三症例 *日本東洋医学  
雑誌*, **59**, 77-81 (2008).
32. Furukawa Y., Shiga Y., Hanyu N., Hashimoto Y., Mukai H.,  
Nishikawa K., Aoki T., Effect of chinese herbal medicine on

- gastrointestinal motility and bowel obstruction. *Jpn. J. Gastroenterol Surg.*, **28**, 956-960 (1995).
33. Yonei Y., Holzer P., Guth PH., Laparotomy-induced gastric protection against ethanol injury is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gastroenterology*, **99**, 3-9 (1990).
34. Kaji I., Yasuoka Y., Karaki S., Kuwahara A., Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**, G690-G701 (2012).
35. 大重茉里奈, 吉久保匡甫, 田嶋公人, 堀江俊治, 実験動物における大建中湯の胃粘膜血流増大作用の機序 – 温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャネルの関与と 温服による作用発現の変化 – *潰瘍*, **47**, 100-102 (2020).
36. Matsumoto J., Takeuchi K., Ueshima K., Okabe S., Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in mucosal blood flow response of rat stomach induced by mild irritants. *Dig. Dis. Sci.*, **37**, 1336-1344 (1992).

37. Wang S., Dai Y., Kogure Y., Yamamoto S., Zhang W., Noguchi K.,  
Etodolac activates and desensitizes transient receptor potential  
ankyrin 1. *J. Neurosci. Res.*, **91**, 1591-1598 (2013).
38. 田嶋公人, 松本健次郎, 堀江俊治, 麻酔科ラットにおける Transient  
receptor potential A1 チャネル活性化薬アリルイソチオシアネートによ  
る胃粘膜血流増大反応 *潰瘍*, **38**, 187-190 (2011).
39. Yoshikubo M., Tashima K, Raimura M., Watanabe Y., Noma Y.,  
Horie S., Daikenchuto, a Traditional Kampo Medicine, Facilitates  
Mucosal Hyperemic Responses through Activation of TRPA1- and  
TRPV1-Expressing Sensory Nerves in Rat Stomach. *Planta Med. Int.*  
*Open*, **9**, e72-e79 (2022).
40. Kubota K., Ohtake N., Ohbuchi K., Mase A., Imamura S., Sudo Y.,  
Miyano K., Yamamoto M., Kono T., Uezono Y., Hydroxy- $\alpha$  sanshool  
induces colonic motor activity in rat proximal colon: a possible  
involvement of KCNK9. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver*  
*Physiol.*, **308**, G579-G590 (2015).

41. Dedov V N., Tran V H., Duke C C., Connor M., Christie M J., Mandadi S., Roufogalis B D., Gingerols: a novel class of vanilloid receptor (VR1) agonists. *Br. J. Pharmacol.*, **137**, 793-798 (2002).
42. Yin Y., Dong Y., Vu S., Yang F., Yarovoy VY., Tian Y., Zheng J., Structural mechanisms underlying activation of TRPV1 channels by pungent compounds in gingers. *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 3364-3377 (2019).
43. Raimura M., Tashima K., Matsumoto K., Tobe S., Chino A., Namiki T., Terasawa K., Horie S., Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide is involved in gastric mucosal hyperemic response to capsaicin in rats. *Pharmacology*, **92**, 60-70 (2013).
44. Horie S., Raimura M., Matsumoto K., Namiki T., Terasawa K., Priestley JV., Tashima K., Cooperative effects of neuronal nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase on gastric hyperemic response to intragastric capsaicin. In: Gyula Mozsik (ed.) *Capsaicin-sensitive neural afferentation and the gastrointestinal tract: from bench to bedside*, First Edition, Intech; 103-124 (2014).
45. 森由雄著, 入門金匱要略, 南山堂, 第1版 74 (2010).

46. 脇坂しおり, 松本雄大, 永井元, 村絵美, 森谷敏夫, 永井成美, 摂取する水の温度と量がヒトの胃運動に及ぼす影響 *日本栄養-食糧学会誌*, **64**, 19-25 (2011).
47. 日笠穰, 山本巖, 成川一郎, 温冷水および温食物の摂取による深部体温の変化 *日本東洋医学雑誌*, **44**, 583-587 (1994).
48. 新島旭, 橋本和則, 榊原巖, 雨谷栄, 油田正樹, 麻酔ラットにおける生姜の匂い刺激および味覚刺激の迷走神経及び交感神経遠心性活動に及ぼす効果 *日本味と匂学会誌*, **10**, 99-104 (2003).

## 謝辞

本研究の実施に当たり、終始有益なる御助言とご指導を賜りました城西国際大学薬理学研究室 堀江俊治 教授に深甚なる謝意を表します。また、城西国際大学薬学部薬理学研究室の 田嶋公人 教授に私の研究指導、論文指導、長期的に連日連夜議論を重ねその都度細部にわたり支援してくださり、継続的な励ましを賜り、深く感謝を申し上げます。誠にありがとうございました。

本研究に協力してくださった城西国際大学薬学部薬理学研究室の 渡邊裕斗 氏、野間裕記子 氏、河邊伊万里 氏、内木蓮 氏、大重茉里奈 氏、本当にありがとうございました。また研究の基礎から構成に至るまで終始有益なご助言とご指導を賜りましたらいむらクリニック 來村昌紀 先生に心より御礼申し上げます。そして本研究を遂行するにあたり、漢方方剤の研究試薬や成分評価測定においてご協力いただきました株式会社ツムラ様に深く感謝いたします。

さらに、学位論文の査読をしていただいた城西国際大学薬学部薬物動態学研究室 秋元雅之 教授に喪心より深甚たる謝意を表します。また、副査を務めてくださいました城西国際大学薬学部分子細胞生物学研究室 西口慶一 准教授な

らびに 城西国際大学薬学部衛生化学研究室 山崎研 准教授に深甚たる謝意を表  
します。

最後に、研究に専心できる環境を与えてくださった、父 昌弘、母 京子 に  
深く感謝いたします。また、終始健康を気遣い、心から支えてくれた妻 香  
織、長男 旭良、次男 亘良に心から熱く感謝いたします。



## 論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Daikenchuto, a traditional Kampo medicine, facilitates mucosal hyperemic responses through activation of TRPA1- and TRPV1-expressing sensory nerves in rat stomach

Masatoshi Yoshikubo, Kimihito Tashima, Masaki Raimura, Yuto Watanabe, Yukiko Noma, Syunji Horie  
Planta Medica International Open 2021 (In press), DOI 10.1055/a-1712-8391

2. 実験動物における大建中湯の胃粘膜血流増大作用の機序 – 温度感受性 TRPV1 および TRPA1 チャンネルの関与と 温服による作用発現の変化 –

大重茉里奈、吉久保匡甫、田嶋公人、堀江俊治  
潰瘍 47 巻 100-102, 2020

3. 麻酔下ラットにおけるワサビ辛味成分アリルイソチオシアネートによる胃粘膜炎症：胃運動減弱を導く神経原性炎症の発生機序解析

田嶋公人、吉久保匡甫、大重茉里奈、堀江俊治  
潰瘍 48 巻 43-47, 2021

## 主査、副査名

本学位論文は城西国際大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 城西国際大学薬学部 教授 秋元 雅之

副査 城西国際大学薬学部 准教授 山崎 研

副査 城西国際大学薬学部 准教授 西口 慶一