

# 学位請求論文要旨

## 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

## 研究背景

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の効能の効果だけでは、漢方薬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からも薬剤師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>。

現在最も使われている漢方薬大建中湯(DKT)について考えてみると<sup>2)</sup>、その添付文書の効能と効果には「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、消化管のどのような症状や部位に作用して改善効果が現れるかについて記述はない。一方、東洋医学の古典「金匱要略(きんぎょうりゃく)」、「勿誤薬室方函口訣(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」の中はお腹を立て直し、「湯」は温める。”という意味が含まれている。大建中湯は現在臨床では術後イレウスなどの下部消化管疾患に用いられるが<sup>3)</sup>、古典から考えれば口から肛門までの消化管を1本の管として捉え、消化管全体を温めて立て直す漢方薬であると考えた。

DKTが下部消化管だけでなく消化管全体に作用して効果を現わすことを薬理的な科学的根拠に基づき現代解釈すると、「DKTが腹部の冷えを改善するのは、消化管に発現する温度感受性TRPV1<sup>4,5)</sup>およびTRPA1チャンネル<sup>6)</sup>へ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、「湯」の意味するようにエキス製剤を温服する効果は検証されていない。そこで私は、DKTの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。

## 目的

DKTが腹部の冷えを改善するのは、消化管に発現する温度感受性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ことが関与しているかどうかについて動物実験で検討した。また、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関しても検討を行った。これらの検討より金匱要略の記載について科学的な解釈を試みた。

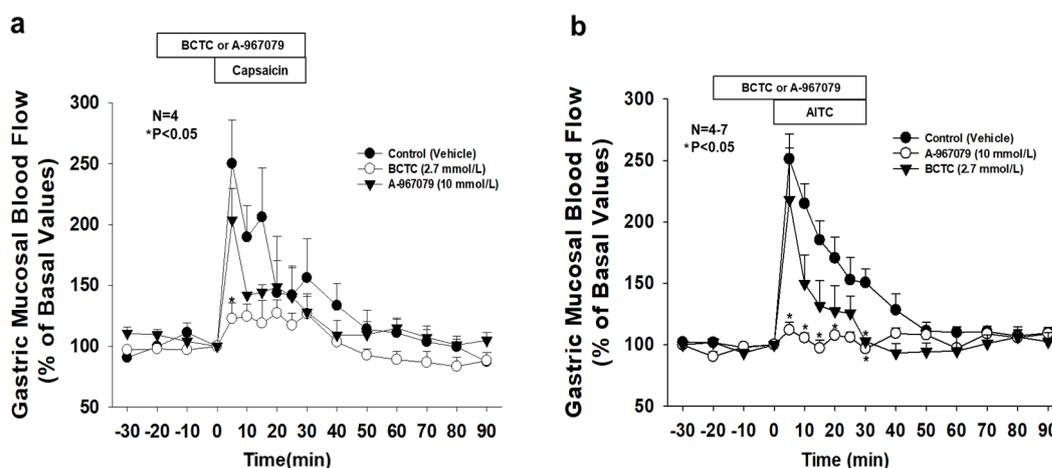
## 方法

実験動物はSD系雄性ラットを18時間絶食後に使用した。胃粘膜血流変化は麻酔下ラット胃にex-vivoチェンバーに装置して接触型レーザードップラー血流計で測定した。TRPV1活性化薬カプサイシン(10 mmol/L)、TRPA1活性化薬アリルイソチオシアネート(AITC)(10 mmol/L)、DKT(320~1440 mg

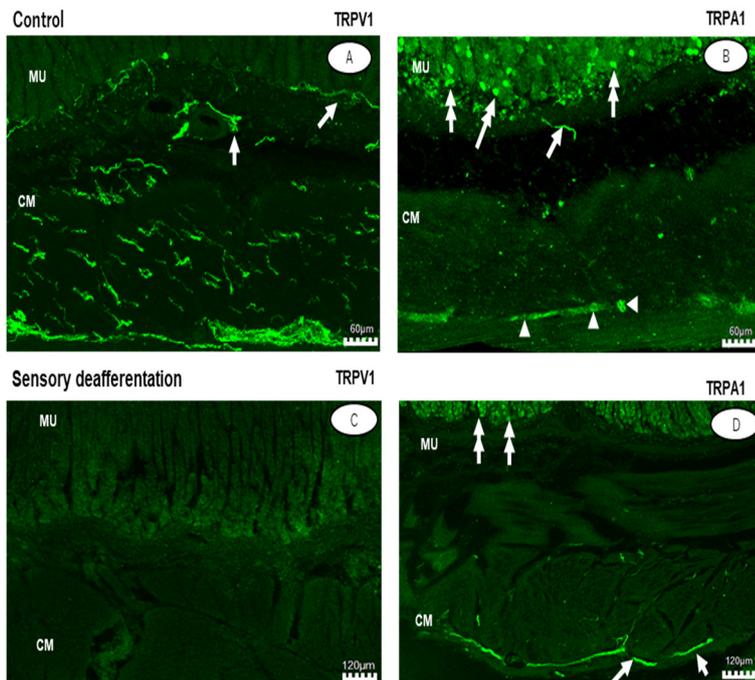
/mL) は胃内に直接適用した。拮抗薬として TRPA1 ブロッカー A-967079 (10 mM) と TRPV1 ブロッカー BCTC (2.7 mM) をカプサイシン、AITC または DKT 適用 20 分前から胃内適用した。また、実験動物の一部には神経毒性用量カプサイシン処置 (計 100 mg/kg) を施し、カプサイシン感受性発現神経の退行変性を誘起した。そのほかに非選択的一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害薬 L-NAME (10 mg/kg) を、DKT (1440 mg/ml) 適用 20 分前に静脈内投与した。

## 第 1 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調節の検討

麻酔下ラットにおいて胃粘膜の TRPV1、TRPA1 チャンネルの活性化により血流増大を誘起されるのかについて検討を行った。カプサイシンを胃内適用したところ、濃度依存的に一過性の胃粘膜血流増大を惹起した。その血流増大は TRPV1 ブロッカー BCTC の前処置によりほぼ完全に抑制された。AITC の胃内適用も同様の一過性の血流増大を引き起こし、これは TRPA1 ブロッカー A-967079 の前処置により顕著に抑制された (Fig.1)。ラット胃体部組織を免疫組織化学的に検討したところ、粘膜下層において TRPV1 あるいは TRPA1 を発現した神経線維が血管周囲を取り込むように発現・分布していた (Fig.2)。したがって、TRPV1 および TRPA1 を発現した神経を刺激すると胃粘膜血流増大を引き起こすが明らかとなった。



**Fig. 1** (a) Effects of TRPV1 blocker BCTC and TRPA1 blocker A-967079 on GMBF induced by the mucosal application of capsaicin in rat stomachs. Time course of GMBF response to capsaicin (10 mmol/L) in rat stomachs is shown. BCTC (2.7 mmol/L) or A-967079 (10 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) 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. Time course of GMBF response to AITC (10 mmol/L) in rat stomachs is shown. A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 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 they represent mean  $\pm$  S.E. of values every 5 or 10 min for 4–7 rats. \* $P < 0.05$  was considered statistically significant using Student's t-test.



**Fig. 2** Alteration in the distribution of immunoreactivities of TRPV1 and TRPA1 in the cross-section of rat stomach in between control and capsaicin-pretreatment. 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 (2-headed arrow). The scale bar is 60  $\mu$ m (A, B). No TRPV1-expressing fiber is found in the capsaicin-pretreated rat stomach (C). Notice 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 mucous cells in the bottom of gastric glands after capsaicin pretreatment (2-headed arrow). MU, mucous membrane; CM, circular muscle. The scale bar corresponds to 120  $\mu$ m (C, D). Two transverse sections of tissues obtained from 5 normal and capsaicin-pretreated rats are stained by immunohistochemical methods. The typical photos are shown in this figure.

## 第2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

DKT が腹部の冷えを改善する機序を明らかにするために、麻酔下ラットにおいて 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。DKT を胃内適用したところ濃度依存的に胃粘膜血流を増大した。その血流増大のパターンは、投与直後に一過性の増加がみられ、その後減少に転じたが、DKT 除去後も持続性の血流増大がみられた (Fig. 3)。

A-967079 前処置により DKT の血流増大作用は中等度に抑制されたが、BCTC 前処置では DKT 適用直後の一過性血流増大は抑制されず、持続性の血流増大が抑制された (Fig. 4)。一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害薬である L-NAME の前処置は DKT による胃粘膜血流の増大作用を顕著に抑制したが、それは NOS の基質である L-Arg の前処置により回復した (Fig. 5)。

カプサイシン感受性知覚神経退行変性処置したラットでは、DKT の適用後一過性の血流増大がみられたが、その後は血流増大が持続せずベースレベルまで低下した。この処置ラットの胃体部組織を免疫組織化学的に検討したところ、粘膜下層にある血管周囲を取り込むように発現分布していた TRPV1 あるいは TRPA1 発現神経が完全に消失していた (Fig. 6)。

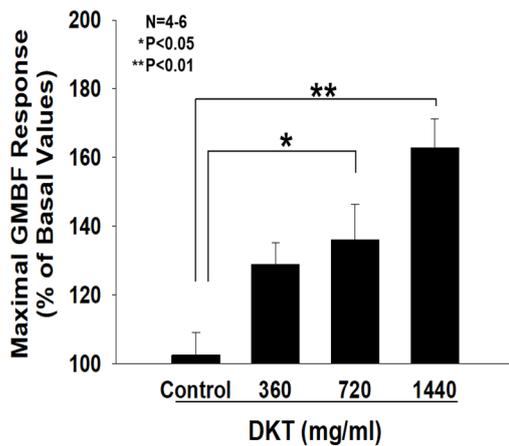


Fig. 3 Maximum response of GMBF induced by the mucosal application of DKT (360, 720, and 1440 mg/mL). The data are expressed as % increase in baseline value, and represented as mean  $\pm$  SE for 4-6 rats. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , considered statistically significant when they compared to control group using ANOVA with Dunnett's test.

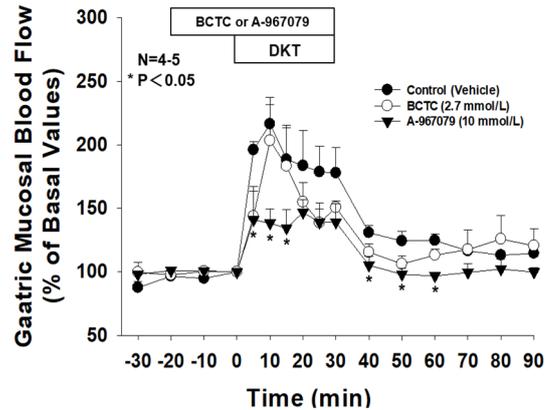


Fig. 4 Effect of TRPV1 blocker BCTC and TRPA1 blocker A-967079 on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. Time course for analysis of GMBF response to DKT (1440 mg/mL) in rat stomachs treated with either A-967079 (10 mmol/L) or BCTC (2.7 mmol/L). The data are expressed as % increase in baseline values, and they represent the mean  $\pm$  SE values obtained every 5 or 10 min for 4-5 rats. \* $P < 0.05$ , compared with the vehicle using Student's t-test.

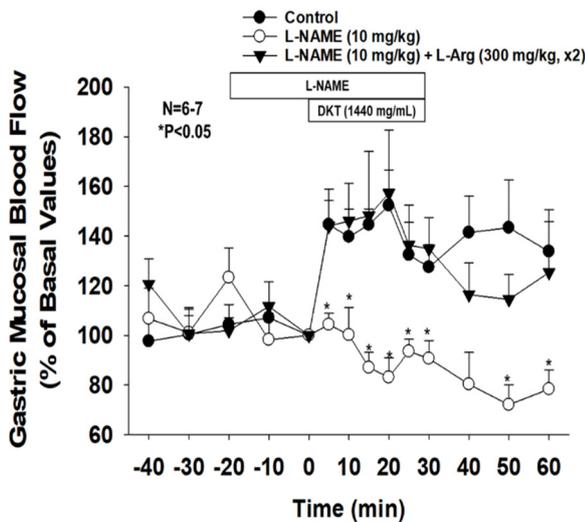


Fig. 5 Effect of a non-selective NOS inhibitor N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) with or without L-Arg (300 mg/kg, x2) on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. L-NAME (10 mg/kg, iv) was administered 20 min prior to the mucosal application of DKT (1440 mg/mL) in rat stomachs, and L-Arg (300 mg/kg, x 2) was administered intravenously 40 and 60 min prior to DKT application, respectively. 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, x 2). 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. \* $P < 0.05$ , compared with the vehicle using Student's t-test.

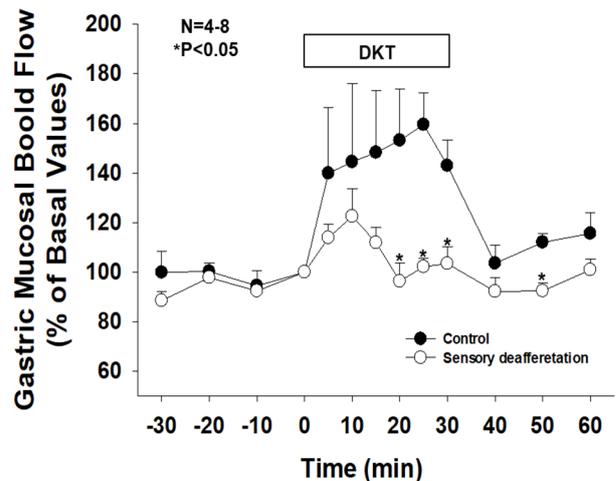


Fig. 6 Effect of deafferentation of capsaicin-sensitive sensory nerves on GMBF induced by the mucosal application of DKT in rat stomachs. DKT (1440 mg/mL) was applied topically to the mucosa for 30 min, and the stomach was perfused with saline before and after application. Time course for analysis of 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. \* $P < 0.05$ , considered statistically significant when they compared to control group using Student's t-test.

### 第3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

DKTの溶液温度を変えると胃粘膜血流の増大反応にどのような作用の変化があるかについて検討した。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。DKT溶液温度を0、22および40にそれぞれ調整したものを胃内適用したところ、いずれも血流増大を誘起した(Fig. 7)。40のDKT溶液による血流増大作用が一番強かったことから、DKTの血流を増大させる薬理作用を引き出すためには温服が有効であることが考えられた。DKT溶液の溶媒である精製水を40にして胃内適用した場合も同程度に血流を増大させた。温湯のみでも顕著な血流増大効果が認められ、残念ながら古典の記載より期待されたDKTと温湯の熱感との協力作用は観察されなかった。

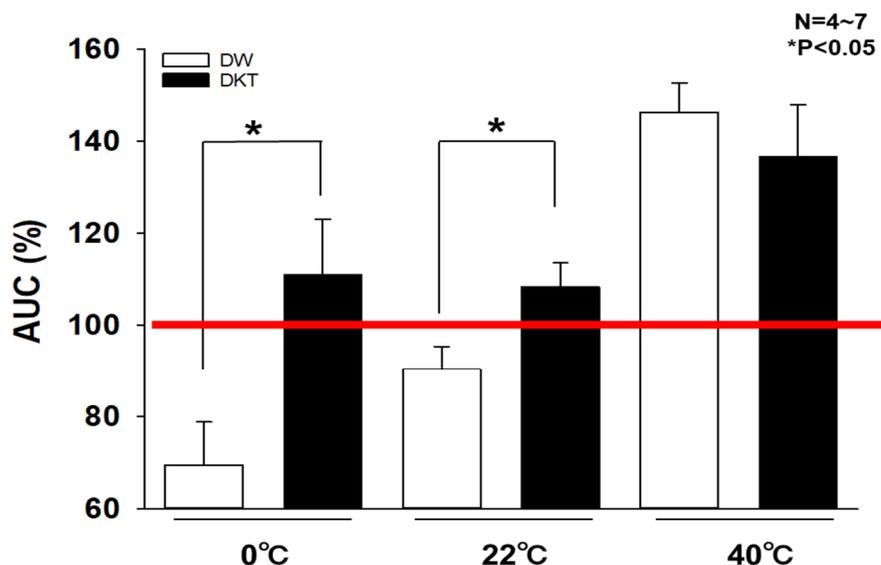


Fig. 7 AUC responses of GMBF at 0°C, 22°C, 40°C distilled water (DW) or DKT 0°C, 22°C and 40°C of GMBF induced by mucosal application for 30 minutes of DKT (1440 mg/mL). The data are expressed as a % increase in base value, and they represent mean  $\pm$  S.E. of values for 4-7 rats.  
\*P<0.05, considered statistically significant when compared to the control group using Student's t-test.

## 考察

DKT の胃内適用はラット胃粘膜血流の増大反応を引き起こした。これが腹部の冷えに対する DKT の効果に寄与していると考えられる。この胃粘膜血流増大の機序は、胃粘膜上皮細胞の TRPA1 活性化に続いて、TRPA1 および TRPV1 が発現した神経の活性化によることが推察された。このように金匱要略に記載された DKT の上部消化管における作用の機序を一部明らかにした。また、DKT は温服、冷服共に血流増大の作用発現がみられた。40 の DKT 溶液による血流増大作用が一番強かったことから、DKT の薬理作用を引き出すためには温服が有効であることが考えられた。一方、DKT 温服による冷えの改善には DKT と温服の相互作用に関して疑問が残り、今後、DKT の抗炎症作用の検討も含めさらなる検討が必要である。

## 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上部消化管にも作用して効果を現わすことを見出した。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 による小腸の粘膜血流改善に加え<sup>6)</sup>、胃の粘膜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<sup>7)</sup>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のがよいと考えられた。

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、漢方薬は経験的になんとなく効いていると考えている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<sup>8)</sup>。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. Pharm. Health Care Sci.*, 35, 351-359 (2009)
2. ツムラ 2021 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/index.html>
3. Kono T., Shimada M., Nishi M., Morine Y., Yoshikawa K., Katsuno H., Maeda K., Koeda K., Morita S., Watanabe M., Kusano M., Sakamoto J., Saji S., Sokuoka H., Sato Y., Maehara Y., Kanematsu T., Kitajima M., Daikenchuto accelerates the recovery from prolonged postoperative ileus after open abdominal surgery: a subgroup analysis of three randomized controlled trials. *Surg Today*, 49, 704-711(2019)
4. 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)
5. 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)
6. 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.*, 304, G428-G436 (2013)
7. 山宏世編著、金匱要略も読もう, 1 edition, 洋学術出版社, 209-212 (2016)
8. Kono T., Shimada M., Yamamoto M., Kaneko A., Omiya 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)