

漢方・和漢薬の考え方に基づく漢方医学・和漢薬作用の統合的解析：
補中益気湯をはじめとした各種補気漢方処方の作用機序に対する「全身的視点からの検討、
ならびに構成生薬類に関する和漢薬理論を基盤とした統合的視点による解析」

統括者 東田 道久 複合薬物薬理学分野

准教授

申請代表者 安東 嗣修 富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）

准教授

【報告セミナー要旨】

和漢薬理論を基盤としたうつ病の細分化と作用和漢薬に関する研究の中で、補中益気湯が抗うつ効果を有し、その感受性は消化器系への作用強度と関係、脳作用を受け持つ生薬群と消化器系に作用する生薬群に分けられ、後者には升麻のセロトニン (5-HT) 受容体刺激効果があることなどを示してきた。今回、その升麻の 5-HT 受容体への作用をさらに検討するため、5-HT 受容体の機能的寄与率の高いモルモット腸管を用いたマグヌス実験を行った。

Hartley 雄性モルモット 5 週齢を麻酔下で断頭致死させ、腸管を取り出し、栄養液 buffer 中で空気を与え保持した。腸管（十二指腸周辺部または回腸部）を適切な長さに切断し、マグヌス装置に装着、薬物による収縮をトランスデューサーを介してコンピューター上に A/D 変換し記録した。薬物は 50 倍濃度に調製し、容量 5 ml の恒温に保った槽中に添加した。

5-HT (0.3 μ M) およびアセチルコリン (Ach, 0.1 μ M) は、十二指腸周辺部および回腸部双方の腸管において収縮を引き起こした。各々の収縮は 1 μ M GR113808 (GR, 選択的 5-HT₄ 受容体 antagonist) および 0.1 μ M atropine によりそれぞれ抑制された。十二指腸周辺部の腸管を用いた実験において、5-HT による収縮が atropine により抑制されたことから、5-HT₄ 刺激は Ach 遊離を介して腸管収縮を引き起こしていることが示唆された。低濃度の升麻 (30 μ g/ml) は、5-HT 収縮を抑制したが、Ach 収縮には影響しなかった。高濃度の升麻 (3 mg/ml) は、一過性の弛緩を引き起こした後のゆらぎを伴った漸次的収縮が認められ、その作用は GR および atropine により抑制された。これらのことから、升麻には 5-HT 受容体に抑制的に作用する成分が含まれると共に、5-HT 遊離促進を介して 5-HT₄ 受容体刺激、その後の Ach 受容体刺激を惹起する成分も含まれることが推定された。一方、回腸部腸管を用いた実験では、3 mg/ml 升麻が腸管のゆらぎ運動を引き起こし、その作用は atropine で消失するものの、GR では影響を受けなかったことから、Ach 受容体に直接的に作用する成分が含まれる可能性も考えられた。升麻を含む補中益気湯特有生薬群 5 種のエキスでも類似の作用が見られた。一方、補中益気湯十全大補湯共通生薬群 5 種のエキスは、十二指腸周辺部腸管で強い弛緩作用と 5-HT 応答抑制作用を示したが、イミプラミン等で見られる強い抗コリン様作用は全く観察されなかった。

以前の電気生理学的研究において、升麻中に 5-HT_{2C} 受容体刺激作用を有する成分が存在することを示したが、今回の知見は加えて 5-HT₄ 受容体抑制成分や 5-HT 遊離促進、Ach 受容体系作用成分等が含まれる可能性も明らかにした。これらの作用の違いはおそらく、トリプタミン骨格が有する強い生理作用と側鎖の違いによる作用様式の差異に起因するものと推定される。今後、他の生薬をどのようにあわせることにより、どの効果が表出されるのかを検討することも漢方薬的視点から興味を持

たれる。また今回の知見は、腸管でも十二指腸側と回腸側とで受容体分布の違いが作用の差を生み出すことや、補中益気湯には抗うつ薬に多い抗コリン作用がないことなども確認でき、漢方と漢薬理の可能性を示し得たと考える。

■背景・目的

漢方・和漢薬には、現代医薬学を包括しかつ個別医療にも対応し得る巨大かつ繊細な独自の理論的体系が存在する。漢方臨床の現場ではその理論体系が生かされてはいるものの、その考え方に立脚した生物学的基礎研究は必ずしも多いとはいえない。本研究では、その漢方・和漢薬独自の考え方を生かし、そこから手掛りを得た研究を進めることにより、従来にはない新たな視点での薬物作用機序・治療法の解明・開発を目指す。

本研究総括者・東田は、全体的・統合的視点を有している和漢薬概念「五行論」(肝心脾肺腎)を基盤にして、うつ病の細分化と和漢薬を含めた薬物選択の適正化、新規うつ病治療薬の開発を目指した研究を志向している。本研究費による研究開始前までに、補中益気湯がヒトにおいて薬物感受性の違いにより脳でのMRI シグナルが異なること、その作用がモデル動物でも再現できる可能性があること、その差は消化器系での作用の違いに基づく可能性があること、などを見出してきた。本研究ではこれらの可能性についてさらに検討する目的で、研究代表者・安東の協力を得て、1) モルモット摘出腸管収縮に対する補中益気湯、同構成生薬群、各生薬の作用を薬理的に検討する。また、2) 補中益気湯などの消化器系を介した自律神経系への作用を解明するため、胃内投与による血圧、心電図、呼吸数、体温に与える影響を検討する。加えて学外協力者との共同研究により、3) 7T MRI装置を用いた小動物 fMRI 解析と脳内関連性解析を行って、その知見に基づく脳波ならびに脳局所刺激による電気生理学的解析を行うための基礎検討を目指す。

漢方の臨床においては「八綱弁証」(表裏、虚実、寒熱、陰陽)に基づく証診断がなされる。また薬物治療に関しては、病気に基づく基本処方に「薬性(五性)理論」(温寒、補瀉、潤乾、収散、升降)に基づいた生薬を加えることで、個別の病態に対応する処方が形作られている。また、その際には「対薬」と称する漢方独自の薬理に基づく生薬選択がなされる。この漢方薬理・対薬の理論に関するエビデンスは多くない。例えば、麻黄に桂枝を合わせた場合には発汗作用を生ずるが、石膏を合わせた場合には全く逆の止汗作用となるが、そこで本研究ではその麻黄を例にして、4) 対薬に基づく二面性作用を説明する知見の提供を目指す。(なお、図表に関しては今後の論文等の関係から、掲載は差し控える。)

■結果・考察

1) モルモット摘出腸管収縮に対する補中益気湯、構成生薬群、各生薬作用の薬理的検討

補中益気湯は10種の生薬により構成されるが、そのうち5種は十全大補湯や帰脾湯と構成を共有する「益気」担当生薬群であり、一方の5種は補中益気湯に特有の「補中」生薬群であると考えている。マウス摘出小腸を用いたこれまでの初期的研究から、補中益気湯および構成生薬の1つ升麻が腸管収縮を生ずることを見出しているが、構成生薬やその詳細に関するその後の系統立てた詳細な研究は行っていない。そこで今回、5-HT受容体の機能的寄与率の高いモルモット腸管を用いたマグ

クス実験を行った。5-HT (0.3 μ M) およびアセチルコリン (Ach, 0.1 μ M) は、十二指腸周辺部 (胃に近い側) および回腸部 (肛門に近い側) 双方の腸管において収縮を引き起こした。各々の収縮は 1 μ M GR113808 (GR, 選択的 5-HT₄ 受容体 antagonist) および 0.1 μ M atropine によりそれぞれ抑制された。十二指腸周辺部の腸管を用いた実験において、5-HT による収縮が atropine により抑制されたことから、5-HT₄ 刺激は Ach 遊離を介して腸管収縮を引き起こしていることが示唆された。低濃度の升麻 (30 μ g/ml) は、5-HT 収縮を抑制したが、Ach 収縮には影響しなかった。高濃度の升麻 (3 mg/ml) は、一過性の弛緩を引き起こした後のゆらぎを伴った漸次的収縮が認められ、その作用は GR および atropine により抑制された。これらのことから、升麻には 5-HT 受容体に抑制的に作用する成分が含まれると共に、5-HT 遊離促進を介して 5-HT₄ 受容体刺激、その後の Ach 受容体刺激を惹起する成分も含まれることが推定された。一方、回腸部腸管を用いた実験では、3 mg/ml 升麻が腸管のゆらぎ運動を引き起こし、その作用は atropine で消失するものの、GR では影響を受けなかったことから、Ach 受容体に直接的に作用する成分が含まれる可能性も考えられた。升麻を含む補中益気湯特有生薬群 5 種のエキスでも類似の作用が見られた。一方、補中益気湯十全大補湯共通生薬群 5 種のエキスは、十二指腸周辺部腸管で強い弛緩作用と 5-HT 応答抑制作用を示したが、イミプラミン等で見られる強い抗コリン様作用は全く観察されなかった。以前の電気生理学的研究において、升麻中に 5-HT_{2C} 受容体刺激作用を有する成分が存在することを示したが、今回の知見は加えて 5-HT₄ 受容体抑制成分や 5-HT 遊離促進、Ach 受容体系作用成分等が含まれる可能性も明らかにした。これらの作用の違いはおそらく、トリプタミン骨格が有する強い生理作用と側鎖の違いによる作用様式の差異に起因するものと推定される。

2) 薬物の胃内投与による自律神経系機能への影響に関する検討

MRI 実験におけるこれまでの結果や、その際の呼吸等に関するモニター結果などから、補中益気湯の消化器系の作用が、視床下部等を介して中枢作用をもたらしていることが想定された。そこで、補中益気湯他を胃内にカニューレをもちいて投与した際の、自律神経系の変化を検討することとした。合わせて上行する神経を結紮した際の変化等についても検討することとし、そのシステムの構築を進めている。現在、呼吸、血圧、心電図の測定装置の設置と体温維持装置の設定を終えている (脳波と脳内微小電流の検出装置に関しても導入を進めている)。

3) 7T MRI 装置を用いた小動物 fMRI 解析と脳内連関性解析

補中益気湯感受性と非感受性のヒトでは、補中益気湯に対して異なる MRI 画像示すことを以前に見出している (その知見は、本研究課題開始前の科研費の補助により実施した成果であり、BioView 社の倫理管理の下で実施した)。類似の作用はラットを用いた低磁場の MRI 装置による実験でも観察されたため、動物で脳内連関性に関するより詳細な解析を進めることを目的として、7T MRI 装置を用いた補中益気湯の効果についての作像を実施した (14年12月8日)。実験は放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター (千葉市) で行った。今回の実験は、共同研究先の手法に準じて実施し、マウスを用い、補中益気湯を 3 mg/kg 静脈内投与することにより行った。なお、補中益気湯は 10 mg/kg i.v. において頻呼吸を観察したが、一過性で生命には影響はなかった。データは視床下部を起始核とした連関性解析を行い、その知見にもとづいて更なる MRI 解析および脳波、脳内微小電流による解析を検討する予定である。

4) 対薬に基づく麻黄の二面性作用に関し分子的文憑を与えるための実験

麻黄に桂枝を合わせた場合と石膏を合わせた場合との発汗作用に対する方向性の違いを説明するこ

とを目的として、麻黄+桂枝、麻黄+石膏ならびに麻黄単独の生薬熱水抽出エキスを作製し、以下の実験を行った。各生薬は、以下の量を量り、沸騰蒸留水450 mlで60分間抽出した。麻黄+桂枝(桂麻)の場合は、葛根湯中の比率に基づき：麻黄15 g + 桂枝10 g、麻黄+石膏(石麻)の場合は、麻杏甘石湯中の比率に基づき：麻黄15 g + 石膏31.5 g、麻黄単独の場合は25 gを用いた。回収率はそれぞれ、桂麻11.3%、石麻4.0%、麻黄13.5%であった。石麻の場合、石膏自体の重量が重く、単独での抽出率も悪い(0.50%)ため、計算上の分母が大きくなることにより回収率が低く見積もられる。そこで実験ではそれらの点を補正し、濃度は麻黄のみの推定される生薬換算量に基づいて設定し、表記した。それぞれの抽出エキス0.2 g/ml(麻黄生薬換算量：以下の濃度表記は全て同様)の3D-HPLC解析の結果より、エフェドリン含量は麻黄単独の場合と比較して、桂枝を加えた場合は増加し、一方、石膏を加えた場合は減少あるいは消失した。その他の麻黄由来成分と思われる物質の抽出割合も、石膏または桂枝の添加により様々に変化した。

桂麻、石麻および麻黄エキスが培養細胞のcAMP生成活性に及ぼす影響を検討した。細胞は、C6グリオーマ細胞とNG108-15細胞(およびN18-TG2細胞)を常法に基づき培養して用いた。各細胞よりRNAを抽出して、ノルアドレナリン系の各種受容体のmRNA量をRT/PCR法により比較定量した。NG108-15細胞中には、 α_2C mRNAが豊富に存在したが、 β のRNAは非常に少なかった。一方C6細胞では α_2A および α_2C のmRNAが存在するものの、 β のRNAの発現量が群を抜いて多いことが明らかとなった。薬物刺激10分間による細胞内cAMP含量の変化をEIA法で定量したところ、C6細胞では、isoproterenol刺激によりcAMP産生量が濃度に依存して劇的に激しく増大したが、NG-108-15細胞はisoproterenol刺激に反応しなかった。一方、 α_2 受容体刺激に関しては、NG-108-15細胞ではmedetomidineが10 μ M prostaglandin E1 (PGE1)によるcAMP産生増大作用を濃度依存的に抑制したが、C6細胞ではこの作用は観察されなかった。ただし、C6細胞はPGE1に反応していない可能性もある。以上の結果より、ノルアドレナリン系によるcAMP産生促進作用の薬理的検出にはC6細胞が適しており、一方、抑制性作用検出にはNG108-15細胞の使用が適しているものと考えられた(今後の実験結果により見解が異なる可能性もある)。C6細胞を用いて、桂麻、石麻および麻黄エキスのcAMP生成活性を検討した。10 nM isoproterenolによりcAMP産生量が無処置の際の 0.1553 ± 0.0144 pmol/35 mm dish (10^6 cells)から 77.46 ± 15.58 pmol/dishに増大する状態下の細胞において、10 mg/ml麻黄はcAMP産生量を 0.5215 ± 0.0205 pmol/dishに約3.3倍増大させた。そこに桂枝が存在することによってその産生量は 0.7140 ± 0.1090 pmol/dishとなり、麻黄の効果は約50%増強された。一方、石膏が存在することにより産生量は 0.3790 ± 0.0455 pmol/dishとなり、逆に約40%減弱した。同様の効果を、10 μ M yohimbin存在下で検討したところ、桂枝による増強効果は(統計的有意ではないものの)同様に観察されたが、石膏による減弱効果は消失した。

麻黄に桂枝を合わせた場合には発汗作用を、石膏を合わせた場合に逆の止汗作用を示すことが漢方理論の「対薬」効果として知られている。その作用機序の仮説として、A)麻黄の多面的な作用の一部を桂枝あるいは石膏が薬理的に遮断することによる作用の単離化と、B)麻黄とともに抽出操作を行うことにより成分組成に変化を生ずることによる作用、とが考えられる。今回の結果からは後者の可能性が高いことが想定された。3D-HPLCによる麻黄の代表的成分エフェドリン他の抽出成分組成の検討から、合わせて抽出することは、成分組成に種々の変化をもたらすことが明確になった。また、活性の検討において、yohimbinが石膏によってもたらされている抑制作用を遮断したが、石膏単独にはcAMP産生抑制活性化作用がないことから、この石膏による抑制効果は、石膏添加により α_2 活

性化作用のある成分の麻黄からの抽出量が増大したかあるいは新たに合成されたことによるものと推定される。3D-HPLCチャートの詳細解析などに基づくその成分の同定などは今後の課題である。なお、エフェドリン単独ではC6細胞においては1～10,000 nMの濃度範囲において、cAMP産生にゆるぎ的变化をもたらすものの、方向性をもった明確な作用は観察できなかった。従って、今回の結果をエフェドリンの含有量の差で直接的に説明することはできない。

■結論

漢方・和漢薬の理論それ自体が、高度に統合されたビッグデータを形成している。それを利用することで、まだまだ新しい概念が生まれることが期待される。末梢組織からのシグナルによってもたらされる機能性精神疾患の新規治療法と治療薬、和漢薬理によってもたらされる和漢薬作用の新展開、を目指した本研究課題の遂行・発展により、それがきっかけとなって漢方・和漢薬理論に立脚した研究が様々な新知見を生み出してゆくことになるものと考えられる。