

学位論文

「ニコチン性アセチルコリン受容体活性化による
抗炎症作用を介した大建中湯の術後腸管麻痺改善効果」

指導教授名 花輪 壽彦

申請者氏名 遠藤 真理

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

【目的】

大建中湯は手足の冷え、冷えによる腹痛、腹部膨満感に用いられるほか、開腹手術後の癒着性腸閉塞や腸管麻痺 (POI) に対する消化管運動促進薬としても頻用されている。その主な作用機序は、コリン作動性神経とセロトニン3および4受容体 (5-HT₃R、5-HT₄R) の活性化やモチリン分泌亢進などを介した消化管運動促進であると考えられている。一方で、大建中湯には炎症性マーカーである C 反応性タンパク (CRP) 減少作用や、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を介した抗炎症作用を有する可能性も示唆されているが、POI の炎症に対して有効性を示すのか否かについては明らかではない。近年、POI の原因として、手術局所の消化管壁の炎症応答が重要であることが分かり、特に、消化管筋層部における常在型マクロファージや血流を介して浸潤する単球や好中球の炎症応答がその中心的役割を担っていることが明らかにされた。そこで、本研究では大建中湯の POI 治療効果の作用機序として、従来の消化管運動改善に加えて抗炎症作用が関与するのではないかと考え、POI モデルマウスを用いて大建中湯の POI 抑制作用の機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】

Balb/c マウスの回腸に外科的刺激 (IM) を施行し POI モデルマウスを作製した。大建中湯 (95 mg/kg) を IM の 3、2、1 日前と 6 時間後に経口投与した。アルファ7ニコチン性アセチルコリン受容体 ($\alpha 7nAChR$) 阻害剤のメチルリカコニクエン酸塩 (MLA) (0.0125 mg/kg) を各大建中湯投与 30 分前に皮下投与した。IM24 時間後に回腸平滑筋層からホルマウント標本作製し、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) とマクロファージの染色を行った。IM 3 時間後に炎症誘発性サイトカイン・ケモカインメッセンジャーRNA (mRNA) 発現変化を検討した。腸管輸送能は色素法で測定した。また、一部の実験では $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスを用いて検討した。

【結果】

大建中湯は IM による腸管運動能の遅延を有意に改善させた。IM を施行した回腸筋層部では CD68 陽性細胞と MPO 陽性細胞の細胞数が増加し、マクロファージと好中球の浸潤が示唆された。MPO 活性も IM 後に増加した。大建中湯はマクロファージと好中球浸潤を有意に抑制し、MPO 活性を減少させた。IM 3 時間後において TNF- α 、MCP-1 の mRNA 発現は上昇したが、大建中湯により TNF- α 、MCP-1 の mRNA 発現は抑制された。MLA の投与は大建中湯の抗炎症作用を有意に抑制した。Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおいて、大建中湯のマクロファージ浸潤抑制効果が有意に減弱した。

【考察】

色素法を用いて POI モデルマウスで大建中湯が消化管運動遅延と胃排出遅延を改善する

ことを確認した。しかし、¹³C 酢酸呼気試験を用いた胃排出能においては有意な回復効果は示さなかった。このことから、色素法による大建中湯の胃排出遅延の回復は大建中湯の下部消化管に対する運動能改善に伴う見かけ上の結果である可能性が考えられた。

これまでに、大建中湯の POI に対する大建中湯の効果は主に消化管運動の改善と血流増加であるとされてきた。一方で、大建中湯の炎症性疾患や結腸直腸がんの手術後の炎症に対する抗炎症作用が報告されているが、大建中湯の POI 改善作用が抗炎症作用を介した作用機序によるものか否かについての直接的な根拠は明らかではなかった。本研究で、大建中湯が IM により消化管炎症筋層部に浸潤した炎症性細胞浸潤を有意に抑制したことから POI における大建中湯の強い抗炎症作用を初めて明らかとした。本研究結果は、臨床で大建中湯が消化管運動と炎症の両者を改善することにより POI を改善していることを示した。

消化管筋層部局所の炎症は消化管運動障害と関係があり、消化管筋層の炎症改善で運動障害が改善する。本研究で正常マウスでも大建中湯は消化管運動を亢進させたが、POI モデルマウスの消化管運動輸送能遅延の改善はさらに効果的であったことから、大建中湯の POI における消化管運動回復作用に消化管運動促進作用と抗炎症作用が関係することを示唆した。

大建中湯の IM により増加する炎症性メディエーターの mRNA 発現に対する影響を検討した結果、TNF- α と MCP-1 の抑制、IL-6 と iNOS の減少傾向を示したことから、大建中湯に IM による炎症性メディエーター遺伝子発現の抑制作用があることが示唆された。

大建中湯の消化管運動活性化機序の一つに迷走神経の 5-HT₃R と、または 5-HT₄R の活性化による筋層間神経叢のコリン作動性伝達刺激が知られている。クエン酸モサプリド (5-HT₄R 作動薬) が筋層間神経叢のコリン作動性神経からの ACh の分泌を介して筋層活性マクロファージの α 7nACh R を活性化し、マクロファージからの炎症性サイトカインを抑制して POI を回復させることが報告されている。今回、POI モデルマウスで大建中湯の抗炎症作用が α 7nACh R 阻害剤 MLA で有意に解除されたことから、大建中湯の POI における抗炎症作用に α 7nACh R 活性化が関係していることが示唆された。この結論をさらに α 7nACh R ノックアウトマウスを用いて確認したところ、大建中湯によるマクロファージ浸潤抑制効果が減少しており部分的にはあるが α 7nACh R を介した作用があることが考えられた。

【結論】

大建中湯は、臨床において消化管運動亢進作用に加えて抗炎症作用の特徴を持った POI をはじめとする消化運動遅延の病態と消化管の炎症疾患に対してこれまでにない治療薬、また、予防薬となることが示唆された。大建中湯の POI における抗炎症効果は、消化管筋層間神経叢からの ACh を介した nACh R の活性化により発揮されることを明らかとし、その作用機序の一つとして α 7nACh R が関係している可能性が考えられた。

目次	頁
1. 序論 -----	1
2. 実験材料及び方法	
2-1. 動物 -----	8
2-2. 漢方薬の調整・品質確認 -----	8
2-2-1. 大建中湯の調整方法 -----	8
2-2-2. 3次元高速液体クロマトグラフ (3D-HPLC) -----	9
2-3. 術後腸管麻痺モデルマウス作製の為の腸管手術 -----	9
2-4. 消化管色素輸送能の解析 -----	10
2-5. ¹³ C 酢酸呼気試験を用いた呼気試験による胃排出能の解析 -----	12
2-6. 腸管筋層伸展標本の作製 -----	13
2-7. 組織化学的染色によるミエロパーオキシダーゼ陽性細胞数の測定 -----	14
2-8. ミエロペルオキシダーゼ活性の評価 -----	15
2-9. 免疫組織化学的染色による CD68 陽性細胞数の測定 -----	15
2-10. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応による サイトカイン・ケモカイン発現量の測定 -----	16
2-11. 実験スケジュール -----	19
2-12. 統計 -----	21
3. 結果	
3-1. 3次元高速液体クロマトグラフによる大建中湯の分析結果 -----	21
3-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の消化管運動遅延の回復 -----	21
3-3. POI モデルマウスにおける大建中湯の胃排出能に対する影響 -----	23
3-4. 大建中湯の IM 処置による消化管筋層部の炎症の改善 -----	24
3-4-1. 大建中湯の IM 処置による好中球浸潤の抑制 -----	24
3-4-2. 大建中湯の IM 処置によるマクロファージ増加の抑制 -----	25
3-5. 大建中湯サイトカイン・ケモカイン mRNA 発現に対する影響 -----	26
3-6. MLA による大建中湯の抗炎症作用の解除 -----	27
3-6-1. MLA による大建中湯の好中球浸潤抑制の解除 -----	27
3-6-2. MLA による大建中湯のマクロファージ浸潤抑制の解除 -----	28
3-7. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける大建中湯の抗炎症活性の減少 -	28
3-7-1. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける 大建中湯の好中球浸潤抑制の維持 -----	28
3-7-2. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける 大建中湯のマクロファージ浸潤抑制の減少 -----	29

4. 考察	
4-1. 大建中湯の消化管運動機能亢進作用	30
4-1-1. これまで明らかにされている大建中湯の消化管運送促進作用	30
4-1-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の消化管運動促進作用	30
4-2. 大建中湯の抗炎症作用の機序	33
4-2-1. これまで明らかにされている大建中湯の抗炎症作用	33
4-2-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の抗炎症作用の機序	35
4-3. 大建中湯の POI 改善薬としての臨床的意義	39
4-3-1. 大建中湯の POI 治療薬、予防薬としての有用性	39
4-3-2. 大建中湯の西洋薬に対する優位性	40
4-3-3. 今後の発展性	42
5. 総括	44
6. 今後の課題	45
7. 謝辞	46
8. 引用文献	47
9. 業績目録	55
10. 図表	63

1. 序論

イレウスは、機械的な閉塞のあるなしに関わらず腸管内容物の肛門側への移動が障害される病態全体と定義されている。発症原因により機械性イレウスと機能性イレウスに分類され、90% は機械性イレウスが占める (図 1)¹⁾。イレウスの約 60% は癒着性であり、これに対して麻痺性はイレウス全体における発症率は 6.1%と少ないものの¹⁾、胃切除手術や消化管手術など腹腔開腹外科手術を施した患者では、外科的侵襲の程度や病態にも左右されるが、その殆どで術後数日間、消化管運動が停止し、イレウスが起こる^{2,3)}。腸管の運動が消失すなわち麻痺することで、腹部膨満感や悪心、嘔吐、腹痛、排便・排ガスの途絶などの症状が現れる。この様に、術後腸管麻痺性イレウス (post operative ileus; POI) は消化管外科領域で最も多いイレウスとなっている。

消化管壁を覆う筋層は内輪、外縦の 2 つの平滑筋層に分かれている。粘膜と内輪走筋の間には粘膜下神経叢 (submucosal plexus = マイスナー神経叢; Meissner's plexus) が分布しており、主に粘膜での分泌を制御している。これに対して、これら内輪走筋層と外縦走筋層の間には筋層間神経叢 (myenteric plexus = アウエルバッハ神経叢; Auerbach's plexus) が網目状に張り巡らされ⁴⁾、自律神経系と消化管ホルモンによる制御を受けながら消化管運動を調節している (図 2)。また、消化管の筋層間神経叢には、神経遮断によっても活動を停止せずペースメーカーとして働いているカハールの介在細胞 (Interstitial Cell of Cajal; ICC) が同一平面

上に存在している。消化管は、摂取された食物塊の混和や、肛門側への移動の為に運動を行っているが、この蠕動運動は、壁内神経叢（腸壁内神経系; intramural nervous system）—ICC—消化管平滑筋細胞の相互作用により制御されている（図3）^{5,6)}。

POI は、主に神経性、炎症性、薬理学的な3つの機序により発症すると考えられている（図4）⁷⁻⁹⁾。最も大きな原因の一つである神経性の機序としては、副腎皮質刺激ホルモン（corticotropin-releasing hormone; CRH）やノルエピネフリン、一酸化窒素（nitric oxide; NO）をはじめとした内因性の物質が消化管における神経筋の活動を阻害することが知られている。術後すぐの急性期には、腸管露出、乾燥、機械的圧迫などの手術操作の影響や、痛みなどが原因で、交感神経の過剰な刺激反射が起こり、消化管運動は抑制される³⁾。また、麻酔薬による神経系の抑制も消化管運動抑制を引き起こす。近年、慢性的に続く術後の消化管運動障害の原因として、手術局所の消化管壁の炎症応答が重要であることが分かってきた^{7,10)}。クローン病や潰瘍性大腸炎、腸閉塞、感染症、食中毒などが消化管粘膜を発端とする消化管腔内側からの炎症刺激であるのに対して、腹膜炎、POIなどの消化器疾患は消化管腔外側からの炎症刺激を発端とする。POIにおいては、消化管の手術による把持、牽引、擦過などの組織への刺激が、筋層部や腸管膜直下に常在するマクロファージや肥満細胞（mast cell）を活性化させ、最初の炎症カスケードであるアラキドン酸経路へと導き、単球や好中球などの炎症細胞の腸管壁への浸潤を生じる。一方、クローン病などの腸炎疾患では粘膜上皮の破たんから粘膜に炎症が生じた後、炎症が筋層へも波及していく。いずれの疾患においても、最終的

には筋層部において、壁内神経叢－ICC－消化管平滑筋細胞の相互作用に異常が起こり、消化管の蠕動運動は抑制されて消化管運動機能不全の状態となる。このように、POI において最初の侵襲は腸管外側で生じることから、筋層間神経叢や漿膜下層に多数常在しているマクロファージが病態発症に重要な役割を担っており、常在マクロファージの活性化が血流を介して浸潤する単球由来の滲出性マクロファージや好中球の炎症応答を引き起こし、これらの筋層部での炎症応答が POI の長期化の原因を担っている。これらの炎症性細胞は誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase; iNOS) を発現し、産生される NO により長期に渡る消化管運動障害を生じる (図 5)^{11,12)}。また、炎症が体液移動を起こし、それによる電解質の異常が腸壁浮腫を引き起こすが、これも消化管神経筋機能の変化と関係している¹³⁾。さらに、一般的に術後の消化管鎮痛薬として麻薬系鎮痛薬 (外因性オピオイド) が用いられているが³⁾、神経筋伝達系が影響を受けることにより神経伝達物質の遊離や神経細胞体の興奮性の低下が起こり POI を悪化させることが報告されており^{7, 14, 15)}、鎮痛効果を示す適切な濃度 25%でも十分に消化管の蠕動運動が遅延してしまう^{3,16)}。POI の長期化は鎮痛剤を適用する機会が多いことから、鎮痛剤の適用によりさらに POI が長期化する悪循環を引き起こす可能性が考えられ、処方管理が難しい。

これまで、POI の治療法として、前述の鎮痛薬の他に、メトクロプラミド¹⁷⁾、シサプリド¹⁸⁾、クエン酸モサプリド^{19,20)}などの消化管運動促進薬が使用されてきた (表 1)。これらの薬は、いずれも神経終末からの神経伝達物質の一つであるアセチルコリン (ACh) の遊離

を促進することで消化管運動を促進すると考えられている。しかし、5-ヒドロキシトリプタミン (セロトニン) 受容体 (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor; 5-HT R) 刺激作用に加えてドーパミン受容体 (D₂ R) 拮抗作用を併せ持つメトクロプラミドは、時に腸管のみならず、大脳基底核線状体ニューロンに存在する D₂ R にも作用し D₂ R を遮断することで手のふるえ、筋硬直による歩行困難を含む中枢性の錐体外路障害や高プロラクチン血症による乳汁分泌や月経異常などの副作用を起こす欠点を持つ。シサプリドはメトクロプラミドの作用を鈍化させ誘導された薬剤で、5-HT₁ R あるいは 5-HT₃ R の拮抗作用または、5-HT₄ R の作動薬として作用し、上記の D₂ R 遮断薬が上部消化管に使用が限定されるのに比べ食道から大腸までの全域で効果を発揮する点や副作用が低減する点では優れているが、心筋におけるカリウムチャンネルの阻害によって QT (Quick Time; 心電図の心室筋の活動電位持続時間の平均的な長さ) の延長による心室性不整脈などの循環系への重篤で致命的な副作用があることなどから現在は販売されておらず使用できない。その為、D₂ R 拮抗作用を持たない消化管運動促進薬として 5-HT₄ R の選択的作動薬であるクエン酸モサプリドが開発されたが、比較的副作用が少ないものの²¹⁾、これらの西洋薬による治療だけでは限界があり十分な治療効果を得られていない。また、消化管には 4 種類の 5-HT R が存在しているが、これらの受容体は消化管以外の臓器にも存在することから、幅広く 5-HT R に作用する薬剤は他の臓器への影響も懸念される。このことから、開腹手術後の POI において QOL (Quality of Life) の低下や治癒の延期、合併症の併発とそれに伴う入院延長や非経口栄養などによる費用の負担増加を引き起こすことが

重大な問題となっている^{8,22-24)}。腸管麻痺は、敗血症や多臓器不全の引き金となることから術後の生体反応の中でも重要視されており^{3,22,25)}、POIの発症機序の解明、治療や予防における新しい選択肢の確立、侵襲性の低い新たな手術法の開発が求められている^{7,9)}。

大建中湯は人参、乾姜、山椒の3つの生薬と膠飴から構成される漢方薬(表2)で、体力が低下した人で、手足、腹部が冷えて、激しい腹痛があり、腹部膨満感のある者が適応症とされている(図6)。臨床では、慢性腸炎、クローン病や放射線腸炎などの炎症性腸疾患にも広く処方されるほか、胃全摘によるパウチ再建後の停滞²⁶⁾、モルヒネによる蠕動低下、便秘やPOIに対する消化管運動促進薬²⁷⁾としても頻用されているだけでなく、下痢などの腸管運動の亢進に対しても用いられている。大建中湯の服用による健常人への消化管運動促進効果²⁸⁾、腹部開腹手術や放射線治療による消化器症状の改善^{26,29,30)}、再手術の移行率低下²⁷⁾、治療期間短縮³¹⁾や入院日数短縮³²⁾、イレウス改善後1か月以内の有意な再発低下³³⁾などの臨床試験や症例報告が、POIをはじめとした消化管障害の諸症状に対する大建中湯の臨床的有効性を実証している。また、実験的研究においては、POIモデルラットを用いた大建中湯の消化管運動促進によるPOI改善効果が報告されている^{27,34,35)}。

大建中湯のPOIに対する有効性は、消化管運動性の活性化による消化管輸送遅延の改善作用に基づくと考えられている。その主な作用機序は、これまでにいくつか推定されている。① コリン作動性神経の直接刺激、もしくは、5-HT₃R、5-HT₄Rを刺激することによ

る間接的なコリン作動性神経経路の活性化により、壁内神経叢からの ACh 遊離を促進すると考えられている (図 7)³⁴⁻³⁶。放出された ACh はムスカリン 2 または 3 受容体 (muscarinic 2, 3 receptor; M₂ R, M₃ R) を刺激することで消化管平滑筋収縮性作用を亢進し、胃排出遅延の回復やラット POI による消化管運動遅延の改善が起こるとことが報告されている³⁴⁻³⁶。② また、消化管ポリペプチドホルモンであるモチリンの分泌を促進させ血漿中濃度が上昇することにより消化管が収縮し、がん患者における疼痛治療薬モルヒネの副作用で誘発される便秘や覚醒イヌにおける消化管運動障害を改善させることが報告されている (図 7)^{37,38}。③ さらに、消化管粘膜層の粘膜感覚神経末端にあるバニロイド受容体に直接働きかけることで第一知覚神経からのサブスタンス P (tachykinins; substance P) の遊離が促進されて、平滑筋を収縮させることが報告されている (図 7)^{39,40}。臨床的に経験する大建中湯の投与後ごく数時間での有効性は、バニロイド受容体への直接作用による消化管運動促進作用機序によるものではないかと推測されている。

近年、クエン酸モサプリドが、消化管運動促進作用に加えてラット POI に対して抗炎症活性を示すことが報告され、その作用機序として筋層間神経叢からの ACh 分泌を介し、筋層部マクロファージの細胞膜上に発現しているアルファ 7-ニコチン性アセチルコリン受容体 (alpha7-nicotinic acetylcholine receptor; $\alpha 7$ nACh R) が活性化することで抗炎症作用が発揮されるのではないかと考えられている (図 8)²⁰。また、非ステロイド性抗炎症薬の一つであるインドメタシンが POI モデルラットに対して消化管運動遅延の改善を示すことが報告されて

いる⁴¹⁾。一方で、大建中湯にも腹腔鏡結腸直腸切除術により誘導される炎症性マーカーである血清C反応性タンパク (C-reactive protein; CRP) の減少作用⁴²⁾が報告されている。加えて、TNBS誘発大腸炎モデルラットに対して大腸の虚血部位において腸管上皮細胞などの非神経細胞から産生される多機能性ペプチドであるアドレノメジュリン (adrenomedullin; ADM) や、腸管粘膜に存在する感覚神経末端に合成蓄積され強力な血管拡張作用を有する神経ペプチドの一種であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) の増加作用を介した血流改善による抗炎症作用が報告されている^{43, 44)}。大建中湯もクエン酸モサプリド同様に5-HT₄ R作動性を持つことから、大建中湯のPOIに対する治療や予防における有効性は、従来の消化管運動機能改善作用に加え、 α 7nACh R活性や他の経路を介した抗炎症作用が関与するのではないかという仮説が考えられる(図8)。しかし、大建中湯のPOI改善作用が抗炎症作用を介した作用機序によるものか否かについての直接的な証拠はこれまでに明らかとされていない。

そこで、本研究では大建中湯のPOIモデルマウスに対する運動遅延改善作用のみならず、抗炎症作用を含めた有効性の有無を検討し、その有効性の作用機序を明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料及び方法

2-1. 動物

6-7 週齢 (21-25 g 体重) の雄性 Balb/c マウス、または雌性 C57BL/6J マウス (日本 SLC, 静岡, 日本) を 1 週間の馴化飼育後に実験に供した。マウスは木片製の床敷きの入ったプラスチックケージの中に 4 匹ずつ分け、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12 時間サイクルで照明と暗闇が入れ替わる環境下で自由飲水、自由食餌で飼育した。飼育飼料には実験用ラットマウス固形ペレット (CE-2, 日本 CLEA, 東京, 日本) を用いた。以下の動物実験は、「北里大学における動物実験等に関する規程」に基づき、北里大学動物実験委員会の承認を得て行った。

6-7 週齢 (21-23 g 体重) の雄性、雌性 $\alpha 7\text{nACh}$ 受容体ノックアウトマウス (Jakson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) は野生型 C57BL/6J マウスと戻し交雑して得た。実験は、「東京大学動物実験実施規則」に基づき、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室にて行った。

2-2. 漢方薬の調整・品質確認

2-2-1. 大建中湯の調整方法

大建中湯 (DKT) のヒト 1 日用量の構成生薬である人参 (*Ginseng Radix*) 3.0 g、乾姜 (*Zingiberis Siccatum Rhizoma*) 3.0 g、山椒 (*Zanthoxylum Fructus*) 2.0 g、膠飴 (*Saccharum Gramorumb* = 麦芽糖; maltose・水飴) 2 粒・20.0 g の 4 品目の混合生薬 計 28 g (北里大学・東洋医学総合研究所・漢方薬局にて調合) (表 2) に 600 ml のイオン交換水を加え、電子煎じ器

(煎治[®],ウチダ和漢薬, 東京, 日本) で重量による計測で 300 g の減少、すなわち 300 ml になるまで煎じた。煎じ液を回転数 3000 rpm、遠心力 1500 ×g で 15 分間遠心した上清を凍結乾燥し (Freeze dry system[®], Labconco co, Kansas city, MO, USA)、9.5 g の大建中湯凍結乾燥エキスを得た。得られた凍結乾燥エキスはヒト体重 50 kg 当たりの 1 日用量とし、実験に供する直前にマウスの体重に換算してイオン交換水で溶解して用いた (図 9)。

また、株式会社ツムラより提供された人参 3.0 g、乾姜 5.0 g、山椒 2.0 g の 3 品目、計 10 g の混合生薬から得られた凍結乾燥エキス原末 1.25 g と膠飴パウダーを 1 : 8 の割合で混合したメーカー製の 大建中湯 (manufactured DKT; m-DKT) を、ヒト体重 50 kg 当たりの 1 日用量とし、自家製大建中湯と同様に調整し実験に用いた。

2-2-2. 3 次元高速液体クロマトグラフ (3-three-dimensional high performance liquid chromatography; 3D-HPLC)

大建中湯をイオン交換水に、標準品はそれぞれメタノールに溶解してフィルターにかけた。各サンプル 10 µl を以下の条件下で 3 次元高速液体クロマトグラフ (ACQUITY UPLC; Nihon Waters K.K, 東京, 日本) にアプライし解析した。カラム; COSMOSIL C18-MS-II column (3.0×50 mm; nacalai tesuque Co., Inc., 京都, 日本)、移動相; 水 (H₂O): アセトニトリル (CH₃Hn) (linear gradient, 9:1 10 分 → 1:1, 85 分)、流量 ; 1.0 ml/min、温度; 30°C。HPLC パターンは 200-340 nm の吸光度で分析した。

2-3. 術後腸管麻痺モデルマウス作製の為の腸管手術

イソフルラン (エスカイン[®] 吸入麻酔液; マイラン製薬, 東京, 日本) 吸入 (inhalation; i.h.) 麻酔、または、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル[®] 注射剤; 共立製薬, 東京, 日本) (25 mg/kg) 腹腔内投与 (intraperitoneal; i.p.) による麻酔下で、腹部の剃毛を行い、正中線上に皮膚を切開し、皮膚と腹壁の間を剥離後、さらに腹壁を切開した。盲腸を同定し、腹腔外へ引き出して、回盲弁から口側へ向かい約 10 cm の小腸遠位部回腸の表層を裏表均一に 20 回に分けて、滅菌した生理的食塩水で湿らせた滅菌済みの綿棒を用いて、腸間膜から物理的刺激で出血しないように注意を払いながらやさしく 1 か所につき 5 秒間で 7 往復ずつ、鉛筆で一般的な濃さの文字を書く程度の強さで圧迫しながら擦る外科的な摩擦刺激術 (intestinal manipulation; IM) を施行した。IM 処置施行後直ちに、腸管を腹腔内に還納し、腹壁と皮膚をそれぞれ 3-0 絹糸で 3 針ずつ縫合した^{10-12, 20, 45, 46}。

2-4. 消化管色素輸送能の解析

マウスを、網状床を設置したケージ内で自由飲水下に IM 後 23 時間絶食させ、フェノールレッドを PBS で 0.25% (w/v) になるように溶解し、80 μ l を各マウスに経口投与 (p.o.; per os) した。投与 1 時間後、すなわち IM 後 24 時間後に解剖し胃から肛門までを引き出して定規で全長を測定し、胃 (Sto)、小腸を 10 等分 (SI1-SI10)、盲腸 (Cec)、大腸を 3 等分 (Co1-Co3) になるよう、3-0 絹糸で結紮して 15 パーツに分離した。腸管及び各内容物に 0.1 N の水酸化ナトリウム溶液 5 ml を加えて攪拌した。破砕液 1 ml に 20% (w/v) のトリクロロ酢酸 200 μ l を加えて回転数 4600 rpm、遠心力 1600 \times g で 20 分間遠心分離し、タンパ

クを沈殿させた。上清のうち 600 μ l を 0.5N 水酸化ナトリウム溶液 800 μ l に移した。出来上がったサンプル溶液の波長 570 nm の吸光度を吸光度計 (Model 680 Micro plate reader, Japan Bio RAD laboratories Inc, 東京, 日本) にて測定し、検量線から各部位のフェノールレッド量を算出した。測定値は、15 パーツ中の各 1 パーツ当たりの吸光度の比率 (%) として示した。また、15 パーツのフェノールレッド分布の幾何学的中心位置を示すジオメトリックセンター (Geometric Centre; GC) と胃排出能 (Gastric Emptying Rate; GER) を以下の公式を用いて計算した^{12,46)}。

$$GC = \Sigma \{ (\text{区域別のフルオレスセインシグナル中の\%}) \times (\text{区域番号}) \} \div 100$$

$$GER = (\text{S11 ~ Co3 の全フェノールレッド含有量})$$

$$\div (\text{Sto ~ Co3 のフェノールレッドの総含有量}) \times 100 (\%)$$

[測定原理-1; 消化管色素輸送能解析法による消化管運動能評価]

図 6 の模式図に示した様に、フェノールレッドは赤色の化学物質で、人体においては酸化分解されないが、腸管から吸収されてそのほぼ全てが腎臓から尿中に排出される。このことから、臨床では腎機能検査にもマーカーとして用いられる試薬である。以上の原理により、経口投与後の各パーツにおける腸管内フェノールレッドの濃度が高ければ、その場所まで色素が移動している、すなわち、各パーツの色素の量を測定することで消化管運動能の評価が可能である。

[測定原理-2; フェノールレッド量測定の原理]

強いアルカリである水酸化ナトリウムはペプチド結合を加水分解し、タンパク質をアミノ酸、ペプチドまで分解する。さらにトリクロロ酢酸は、酢酸のメチル基部分の炭素 1 原子に水素ではなく塩素が 3 原子結合している。この塩素原子を含む頭部が、タンパク質のペプチド結合にくっついて、結合水をはじき出し、タンパク質 (ペプチド) を変性させ沈殿させる。上清溶液に光をあて、その光が試料を通過する際の、フェノールレッドによる光の吸収の程度、すなわち吸光度を測定することにより、フェノールレッドの濃度を定量的に測定した (図 10)。人が白色光の下において光源でない物質の色を見るとき、その物質の色は、その物質が吸収した光の波長の色の補色である。フェノールレッドのような赤い色素を見る場合、実際はその物体は赤色の補色である青緑色を吸収している。測定に用いた 570 nm の波長は青緑色の光でこの波長の下では、フェノールレッドの光が全て吸収されることから測定に用いた。

2-5. ^{13}C 酢酸を用いた呼気試験による胃排出能の解析

マウスを、網状床を設置したケージ内で自由飲水下に IM 後 23 時間絶食させ、安定同位体化合物である炭素 13 ($[1-^{13}\text{C}]$) で標識した酢酸ナトリウム (Cambridge Isotope Laboratories, Woburn, MA, USA) 110 μg を添加した固形試験食 (Bioserv Inc., Frenchtown NJ, USA) 40mg をチャンバー内に設置した⁴⁷⁾。マウスはあらかじめチャンバー内に設置した固形試験食を 1 分以内に食べるように 2 週間前からトレーニングを行った。チャンバー (デシケーター; 1,850 ml) ・ポンプ (Masterflex L/S, Cole-palmer Inst, Co., Vernon Hills, IL, USA) ・

呼吸回収バック (大塚製薬株式会社, 東京, 日本) から構成される非侵襲的呼吸試験系 (図 11)⁴⁸⁾ を用いて、試験食摂取後のチャンバー内の排出呼吸を 70 ml/min の吸引量で、試験食摂取後 30 分までは 5 分ごとに、以下 60 分までは 10 分ごとにそれぞれ 5 分間回収した。回収した呼吸中の[1-¹³C] 標識された二酸化炭素 (¹³CO₂) 量を赤外分光光度計・POC one (大塚電子株式会社, 東京, 日本) で測定し、試験食投与前にあらかじめ採取しておいた呼吸中の ¹³CO₂ 量との変化率 ($\Delta^{13}\text{CO}_2$ (%)) として表した⁴⁷⁾。

[測定原理; ¹³C 酢酸を用いた呼吸試験の胃排出能評価]

酢酸は胃からは吸収されず、十二指腸以下の小腸粘膜で急激に吸収される。その多く (55%) は、門脈を經由して肝臓に移行し代謝される⁴⁹⁾。酢酸はアセチル-CoA シンターゼによりアセチル-CoA に変換されたのち、トリカルボン酸サイクルを通じて、二酸化炭素と水に分解される (図 12)。以上のような原理により、呼吸中に排出された ¹³C 酢酸を測定することで間接的に胃排出能を評価することが可能である。

2-6. 腸管筋層伸展標本の作製

頸椎脱臼で犠死後開腹して、IM した回腸約 10 cm の内、回盲部より 5 cm 部分を摘出し、氷冷したリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffer saline; PBS) を満たした遠心管に入れた。注射筒注入した PBS を回腸内に押し出して便塊を出来るだけ排出した。実体顕微鏡下で開いた回腸を筋層が上を向くように PBS で満たしたシリコン底シャーレにピンを用いて伸展し、筋層を粘膜層からピンセットで剥離した。シリコン板に筋層を静止長の 110%まで

伸展させた状態で、PBS に溶解した 4% パラフォルムアルデヒド溶液で 4°C、30 分間固定した^{50,51)}。固定後に 0.5 cm×0.5 cm の角状片に切りぬき、PBS に浸漬させて 4°C で洗浄した。出来上がった標本は 1 週間以内の実験に用いた。

2-7. 組織化学的染色によるミエロペルオキシダーゼ陽性細胞数の測定

筋層伸展標本はミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性好中球を検出する為に、PBS でハンカーイエー (Hanker-Yates ; HY) (Polysciences, Warrington, PA, USA) 試薬を 0.1% (w/v) に、過酸化水素 (Wako Pure Chemical Industries Ltd, 大阪, 日本) を 0.03% (v/v) になるように溶解した溶液で 10 分間インキュベートした⁵²⁾。氷上にて PBS で 10 分間洗浄後、標本をスライドグラスに伸展させて封入した。標本を実体顕微鏡 (BX41, Olympus Corporation, 東京, 日本) で観察し、各標本中の明らかに染色数の多い部位 0.0825 mm² の 3 か所をランダムに選択し MPO 陽性細胞 (好中球) 数を数えた。

[測定原理; MPO 染色]

HY 試薬は、p-フェニレンジアミンとピロカテコールの混合物でペルオキシダーゼの基質である。ペルオキシダーゼは過酸化水素を水と酸素に分解すると同時に、この酸素で様々な有機物を酸化する酵素である。HY が MPO の酵素作用により酸化されると無色から茶色に変色する。ペルオキシダーゼの存在は、過酸化水素と HY を加え、茶に変色する部位を観察することで検討することが可能である (図 13)。

2-8. ミエロペルオキシダーゼ活性の評価

回腸部位における MPO 活性の評価は、ホモジナイズした組織液にテトラメチルベンジジン (TMB) と過酸化水素の混合溶液 (BO Opt EIA™ Substrate Reagent A and B, 日本 BO バイオサイエンス, 東京, 日本) を用いて分光光度的に行った。まず回腸部位の組織 50 mg の湿重量に対して 1 ml の 0.5% (w/v) 臭化ヘキサデシルトリメリルアンモニウム (HTAB) 溶液を添加し、細かく刻んでホモジナイズ溶液にした。凍結溶解を 3 回繰り返す、4°C、12000 g で 2 分間遠心した。上清 20 µl に TMB 溶液を 150 µl 添加後、1 N 硫酸で反応を停止させた。波長 460 nm の吸光度を吸光度計 (Model 680, Bio Rad, Hercules, CA, USA) で測定し、検量線から組織中の MPO 量を算出した⁵³⁾。

[測定原理; MPO 量の測定]

TMB 試薬は HY 同様に、ペルオキシダーゼの基質である。TMB は MPO 酵素作用により酸化されると無色から青色に変色し、さらに硫酸により青色から黄色へと変化する。ペルオキシダーゼの量は、過酸化水素と TMB、さらに硫酸を加え、黄の変色を吸光度により測定することで検討が可能である (図 13)。

2-9. 免疫組織化学的染色による CD68 陽性細胞数の測定

単球・マクロファージに特異的に発現するリソソーム関連膜タンパク (LAMP) ファミリーの糖タンパク質である分化抗原群 (cluster of differentiation; CD) 68 抗体と神経細胞に特異的に発現するユビキチン C 末端加水分解酵素であるタンパク質遺伝子産物 (Protein

Gene Product 9.5; PGP 9.5) 抗体を用いて筋層伸展標本の免疫組織化学的染色を行った。各ホールマウント標本はまず PBS で 0.2%になるように調整したトライトン X - 100 溶液にて室温で 2 時間インキュベートして脱膜化を行った。次に PBS で 2%になるように調整したウシ血清アルブミン (BSA) 溶液にて室温で 1 時間インキュベートしてブロッキングを行った後、1 次抗体としてブロッキング溶液にて 1:1000 に希釈したラット抗マウス CD68 抗体 (Serotec, Düsseldorf, Germany) とブロッキング溶液にて 1 : 1000 に希釈したウサギ抗ヒト (マウス) ポリクローナル PGP 9.5 抗体 (Cosmo Bio Co., Ltd, 東京, 日本) にて 4°C で一晩インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、ブロッキングバッファーで健常ロバ及びヤギ血清を各 5%に調整した溶液 (ロバ混ヤギ IgG 溶液) で 15 分間インキュベートした。2 次抗体として前述のロバ混ヤギ IgG 溶液で 1 : 500 に希釈した蛍光色素アレクサ (Alexa Fluor[®]) 488 で標識したロバ抗ラット IgG 抗体 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) とロバ混ヤギ IgG 溶液で 1 : 500 に希釈した Alexa Fluor[®] 568 で標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で室温にて 1 時間 30 分インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、筋層伸展標本をスライドガラスに伸展させて封入した。標本を共焦点顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon, 東京, 日本) で観察し、各標本中の明らかに染色数が強い部位 0.1024 mm² の 3 か所をランダムに選択し CD68 陽性細胞数を数えた。

2-10. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応によるサイトカイン・ケモカイン発現量の測定

総リボ核酸 (ribonucleic acid; RNA) は、回腸筋層部組織から以下の様に抽出した。まず、

組織 10 mg から 30 mg に対して ToRzol[®] 試薬 (酸性フェノール、タンパク質変性剤) 700 μ l を加え、ホモジナイザーで乳剤とした。クロロホルム 200 μ l 添加後、4 $^{\circ}$ C で遠心速度 12000 rpm、遠心力 13000 \times g で 15 分遠心し、溶液を水相とフェノール-クロロホルム相に分離した (水相; RNA 含有、中間相; DNA 含有、フェノール-クロロホルム相; タンパク質含有)。

上層の水相に析出してきた RNA をイソプロパノール 700 μ l で沈殿させた (4 $^{\circ}$ C、12000 rpm、13000 \times g、10 分遠心)。さらに、イソプロパノールを除く為に 70% エタノールを 700 μ l 加え揮発風乾して沈殿を採取し、RNA 分解酵素リボヌクレアーゼ (RNase) の含まれない蒸留水で 0.5 μ g/ μ l の濃度に調整した。得られた RNA と合成酵素 ReverTra Ace[®] (Takara Bio, 滋賀, 日本) を用いて 30 $^{\circ}$ C \cdot 10 分間、42 $^{\circ}$ C \cdot 60 分間、90 $^{\circ}$ C \cdot 5 分間、逆転写反応 (Reverse Transcription; RT) を行い、完全長の一本鎖ファーストストランド相補的デオキシリボ核酸 (complement deoxyribonucleic acid; c DNA) を合成した。RT 産物として得られた c DNA をテンプレートとして、サイトカイン、ケモカイン量を以下の要領でポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase Chain Reaction; PCR) を用いて半定量的に検討した。DNA の増幅には TaKaRa Ex Taq ポリメラーゼ (Takara Bio, 滋賀, 日本) を用いた。内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) (Ref Seq ID; NM 008084)、各標的遺伝子として単球走化性タンパク質 (monocyte chemotactic protein-1; MCP-1) (NM 011333)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF- α) (NM 013693)、インターロイキン 6 (interleukin-6; IL-6) (NM 031168)、インターロイキン 1 ベータ (interleukin-1 β ;

IL-1 β) (NM 008361) 、iNOS (BC 062378) のオリゴヌクレオチドプライマーは NCBI (national center for biotechnology information) が提供している reference sequence (Ref Seq) cDNA 配列データベースを元に設計し、各フォワードプライマー・リバースプライマーの塩基配列、予測増幅サイズ、融解温度 (melting temperature; T_m) を表 3 に示した。増幅は PCR サーマルサイクラー (Takara PCR Thermal Cycler MP, Takara Bio, 滋賀, 日本) を用いて MCP-1、TNF- α 、IL-6 は 94°C・40 秒、58°C・60 秒、72°C・90 秒を 32 サイクルで、IL-1 β 、iNOS は 37 サイクルで行った。PCR 産物を 0.1% エチジウムブロマイドを含んだ 2%アガロースゲルで電気泳動し、UV トランスイルミネーター (High Performance UV transilluminator, UVP, Upland, CA, USA) で UV 照射にてバンドを確認した。バンドの濃度を NIH イメージソフトウェア (Image J, Ver. 1.46r) で分析し、各炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA 発現量をハウスキーピング遺伝子 (細胞の生存・維持に関わり、どの細胞でも常に一定量発現している遺伝子) の一つである GAPDH を内部標準としてその割合で半定量的に示した⁵¹⁾。

IM 後、3 時間後の時間帯は開腹という処置だけの外科的侵襲だけでもサイトカインが動員されてしまう可能性も考えられたが、Wehner らは、POI モデルマウスでは IM 後 12 時間ではサイトカインの上昇が自然に静止レベルにまで低下し、産生のピークは IM 3 時間後から 6 時間後で、その粘膜形態は正常であることを報告している¹²⁾。今回の実験では、サイトカインの測定の為に IM 後、3 時間後に採取した標本を用いた。IL-1 β 及び iNOS については予備検討にて IM 3 時間後の mRNA の発現が増加しなかった為 (資料未記載)、

6 時間後の mRNA を検討した。

2-11. 実験スケジュール

動物をランダムに以下のように群分けした。1) Normal (正常群) ; IM の施行なし、2) Control (IM + vehicle) ; IM を施行 + 水を IM の 3、2、1 日前と 6 時間後の計 4 回ゾンデで経口投与 (p.o; per os) 、3) IM + DKT; IM を施行 + 自家製大建中湯 (19 mg/kg; ヒト 1 日用量の 0.1 倍量、95 mg/kg; ヒト 1 日用量の 0.5 倍量すなわち 2.375 mg/ml、11.875 mg/ml の各濃度の溶液をマウス体重 10 g につき 80 μ l で IM の 3、2、1 日前と 6 時間後の計 4 回ゾンデで経口投与) 、4) IM + m-DKT; IM を施行 + メーカー製の大建中湯 (人参・乾姜・山椒 12.5 mg/kg + 膠飴 100 mg/kg; ヒト 1 日用量の 0.5 倍量) を IM の 3、2、1 日前と 6 時間後の計 4 回ゾンデで経口投与した。

大建中湯の単独投与における作用を検討する為に、IM 群とは別に以下の 2 群に群分けした。1) Normal (正常群)、2) Normal + DKT ; 正常群 + DKT を上記スケジュールで 4 回投与

今回の検討では、臨床試験の二重盲検試験の様に IM の為の手術を術者に群分けの情報のブラインドで行うことはしなかった。

すべての実験は、IM 施行後絶食の条件下で検討した。IM 施行後 23 から 24 時間の 1 時間での消化管運動能と胃排出能を色素法による腸管内容物輸送 (図 14-A) と ^{13}C 標識酢酸呼吸試験 (図 11) で検討した。また、回腸平滑筋層から全層伸展標本を作製し、ミエロパーオキシダーゼ (MPO) 組織化学的染色とマクロファージ免疫組織化学的染色を行った。回腸組

織を用いて MPO 活性についても検討した (図 14-B)。炎症誘発性サイトカイン・ケモカインメッセンジャーRNA (m-RNA) 発現変化は、IM 3 時間後 (MCP-1、TNF α 、IL-6 mRNA) または、6 時間後 (IL-1 β 、iNOS mRNA) の回腸平滑筋層を用いて検討した (図 14-C)。IL-1 β 、iNOS mRNA については、予備検討にて IM 3 時間後に発現が見られなかった (資料未記載) ことから IM 6 時間後の組織を用いた。

Alpha7nACh 受容体阻害剤のメチルリカコニチンクエン酸塩 (methyllycaconitine citrate; MLA) (0.0125 mg/kg) は、各大建中湯投与 30 分前に皮下投与 (subcutaneous; s.c.) した (図 14-D)。

本研究で用いた IM による POI モデルマウスは急性の炎症モデルで、炎症活性や消化管運動障害はすべてのマウスで 3 日以内に回復した (資料未記載)。さらに、IM による POI モデルマウスではサイトカイン産生は IM 3 時間から 6 時間後にピークを示し、12 時間後には自然に静止レベルにまで下がってしまうことも報告されている¹²⁾。臨床では通常、大建中湯は術後に用いられることが多いことから、POI モデルマウスにおいてもその治療効果を検討する為には IM 後の投与が望ましかったが、本モデルマウスの上記に示した特徴から、大建中湯の投与を IM 前から行い、また、IM 24 時間後の効果を評価した。臨床での多くの外科手術は、緊急性の高いものを除いては、通常、計画的にスケジュールが組まれる。このことから、術前からの投薬も計画しやすい。今回の検討で用いた IM 前より予防的に大建中湯を投与して POI モデルマウスに対する有効性を検討するスケジュールは、臨床的にも十分

意義があると考えられる。

2-12. 統計

結果は、平均 (means) ± 標本平均についての標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で示した。2 群間の比較を対応のないスチューデント T 検定により評価した。また、一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて、多重比較のダネット検定 (Dunnet's test) を用いて評価した。P 値が 0.05 以下の場合を統計的有意とした。

3. 結果

3-1. 3次元高速液体クロマトグラフによる大建中湯の分析結果

3D-HPLC 分析による結果を図 15 に示した。本実験で調整した自家製大建中湯凍結乾燥エキスにはジンセノサイド Rg₁ (ginsenoside-Rg₁)、6-ジンゲロール ([6]-gingerol)、ジンセノサイド Rb₁ (ginsenoside-Rb₁)、6-ショウガオール (6-shogaol) を含むことが明らかとなった。リテンションタイム 76 分の主要構成成分のピークは、これまでの報告よりヒドロキシ α サンシヨール (hydroxyl-α-sanshool) とヒドロキシ β サンシヨール (hydroxyl-β-sanshool) であると考えられるが^{30,54)}、市販標準品が無いことから、同定は行っていない。

3-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の消化管運動遅延の回復

POI モデルマウスにおいて大建中湯 (95 mg/kg) の投与により消化管運動改善作用が認

められるか否かを確認する為に、消化管輸送能を測定した。

図 16-A のカラムに各パーツ内の色素の分布を示した。正常群では経口投与した色素の約 6%が胃に残っており、一方で 94% が回腸の遠位末端にまで移動し、ピークは SI-8 であった。正常群の 15 パーツの平均ジオメトリックセンター値と胃排出率はそれぞれ 7.16 ± 0.22 と $94.42 \pm 0.85\%$ であった (図 16-B, C)。一方 IM + vehicle 群では、約 44% の色素が胃に残っており、56% が SI-1 と SI-2 のパーツに移動してきている (図 16-A)。IM + vehicle 群では、正常群に比べてジオメトリックセンター値が 2.04 ± 0.07 ($P < 0.0001$)、胃排出率が $55.56 \pm 4.13\%$ ($P = 0.0007$) でそれぞれ有意に遅延している (図 16-B, C)。IM + DKT (95 mg/kg) 群では約 22% の色素が胃に残っているものの 78% が SI-1 と SI-3 の間にまで移動しており、ピークは SI-3 で IM による消化管運動遅延が有意に回復していた (図 16-A)。また、ジオメトリックセンター値と胃排出率はそれぞれ 4.11 ± 0.37 ($P = 0.015$) と $84.13 \pm 2.60\%$ ($P = 0.005$) で IM + vehicle 群に比べて有意に増加していた。以上のことから、POI モデルマウスにおいて大建中湯の投与により消化管運動改善作用が認められた。

正常マウスにおいて、大建中湯はジオメトリックセンター値 (正常群; 7.15 ± 0.15 、+ DKT 群; 9.53 ± 0.22) ($P = 0.038$) と胃排出率 (正常群; $94.96 \pm 0.63\%$ 、+ DKT 群; $99.69 \pm 0.21\%$) ($P = 0.031$) をわずかではあるが有意に増加させた (図 17) ことから、本研究による投与方法ならびに消化管輸送能試験の実験条件下においても、大建中湯は正常マウスに対して消化管輸送能促進作用を有することが確認された。

3-3. POI モデルマウスにおける大建中湯の胃排出能に対する影響

前述の消化管色素輸送能解析法を用いた大建中湯の胃排出率改善効果は、試算による胃内から小腸以下へ移動してきた総色素含有量の比率増加により算出した結果であり、小腸の運動性が向上した為に見かけ上、胃排出率が改善した可能性も考えられた。そこで、¹³C 酢酸呼気試験を用いて大建中湯が胃排出能の遅延を回復させるのか否かを検討した。

2濃度の 大建中湯を投与した場合の ¹³CO₂ 排出の経時変化を図 18 に示した。IM + vehicle 群の ¹³CO₂ 排出曲線 (A)、¹³CO₂ 累積排出曲線 (B) はいずれも ANOVA による解析で正常群に比べて有意に低下しており (P < 0.01)、15 分から 40 分の各時間における ¹³CO₂ の排出量もそれぞれ正常群に比べて有意に低下していた (それぞれ P < 0.01)。また、15 分から 60 分の各時間での ¹³CO₂ の累積排出量が IM + vehicle 群で正常群に比べて有意に低下していた (それぞれ P < 0.01)。最大濃度 (maximum concentration; C max) (Δ‰) は、正常群; 55.24 ± 5.22、IM + vehicle 群; 21.23 ± 1.41 (P < 0.05)、曲線下面積 (area under the curve; AUC) (Δ‰/min) は、正常群; 1385.33 ± 221.31、IM + vehicle 群; 180.75 ± 18.71 (P < 0.01) で、IM によりそれぞれ有意に低下していた。最大濃度到達時間 (time to reach the maximum concentration; T max) (min) は、正常群; 19.00 ± 0.94、IM + vehicle 群; 28.57 ± 1.71 (P < 0.01) で IM により有意に増加していた。

IM + DKT (95 mg/kg) 群の ¹³CO₂ 排出曲線は、ANOVA による解析では IM + vehicle 群での減少を有意に増加させたが (P < 0.01)、0 分から 60 分の各時間での排出量に有意差は

認められなかった。また、C max は、IM + DKT 19 mg/kg 群; 28.97 ± 2.24 、95 mg/kg 群; 32.02 ± 3.29 、AUC は、IM + DKT 19 mg/kg 群; 317.01 ± 38.59 、95 mg/kg 群; 441.35 ± 95.53 、T max は、IM + DKT 19 mg/kg 群; 25.00 ± 1.15 、95 mg/kg 群; 32.02 ± 1.70 で、それぞれ IM + vehicle 群と比べて大建中湯の有効性は示さなかった。 $^{13}\text{CO}_2$ 累計排出曲線は、IM + DKT 19 mg/kg 群、95 mg/kg 群ともに ANOVA による解析では IM + vehicle 群での減少を有意に増加させた (P < 0.01)、0 分から 60 分の各時間での $^{13}\text{CO}_2$ 累計排出量に有意差は認められなかった。以上を総合的に考えると、 ^{13}C 酢酸呼気試験を用いた胃排出能に対しては大建中湯の投与で微弱な促進作用しか示さなかった。

3-4. 大建中湯の IM 処置による消化管筋層部の炎症の改善

POI における大建中湯の抗炎症作用の有無を、POI モデルマウスの消化管筋層部での好中球浸潤とマクロファージ浸潤に対する作用を指標に検討した。

3-4-1. 大建中湯の IM 処置による好中球浸潤の抑制

組織化学的染色による MPO 陽性好中球浸潤の大建中湯投与による変化の様子を図 19 に典型的な画像例と陽性細胞数のグラフで示した。

IM 処置を行わない正常マウスでは大建中湯を投与しても筋層回腸組織における MPO 陽性浸潤性好中球 (正常群; $3.26 \pm 1.46 /\text{mm}^2$ 、+DKT 群; $4.88 \pm 1.49 /\text{mm}^2$) は検出されず、炎症が起こらない状態では影響を示さなかった (図 21-A, C)。

IM + vehicle 群では IM 処置による炎症で、正常マウスに比べて MPO 染色好中球の浸

潤が増加した ($P = 0.0001$)。IM による MPO 染色陽性好中球の浸潤は、大建中湯 95 mg/kg の投与 (IM + DKT 群) ($P = 0.011$) で改善され抗炎症作用が認められた (図 19)。検討した他の濃度 19 mg/kg と 190 mg/kg の大建中湯の投与では好中球数の増加に有意な変化を示さなかった (資料未記載)。

メーカー製の大建中湯投与群では、自家製大建中湯投与群と同じく、IM による MPO 陽性細胞数の増加が抑制した (正常群; 1.1 ± 0.4 cells/mm², IM 群 1653.7 ± 121.2 cells/mm², IM + DKT 群 1047.47 ± 92.27 cells/mm², $P = 0.041$, IM + m-DKT 群 603.00 ± 90.70 cells/mm², $P = 0.001$ n = 4)。

3-4-2. 大建中湯の IM 処置によるマクロファージ増加の抑制

免疫組織化学的染色による CD68 陽性常在及び単球由来滲出性マクロファージ数の大建中湯投与による変化の様子を図 20 に典型的な画像例と陽性細胞数のグラフで示した。

IM 処置を行わない正常マウスでは、大建中湯を投与すると筋層回腸組織においてこれまでの報告で知られているように樹状形をした⁵⁵⁾ CD68 陽性常在マクロファージ^{51, 56)} が観察された。すなわち、大建中湯は CD68 陽性マクロファージ (正常群; 646.16 ± 16.59 /mm², + DKT 群; 626.63 ± 29.52 /mm²) に対して、炎症が起こらない状態では影響を示さなかった (図 21-B, D)。

IM 24 時間後には、円形⁵⁵⁾ の単球由来マクロファージの浸潤と活性化された常在マクロファージが観察されることが報告されている²⁰⁾。写真に観察されるように、円形の CD68

陽性マクロファージ数は POI モデルマウス (IM + vehicle 群) で正常マウスの 6 倍にまで増加した (P = 0.001)。この IM + vehicle 群での CD68 陽性マクロファージ数の増加は大建中湯 95 mg/kg の投与で有意に抑制され抗炎症作用が認められた (P = 0.027)。検討した他の濃度 19 mg/kg と 190 mg/kg の大建中湯では CD68 陽性マクロファージ数に変化を示さなかった (資料未記載)。

メーカー製の 大建中湯投与群では、自家製大建中湯投与群と同じく、IM による MPO 陽性細胞数の増加が抑制した (正常群 186.7 ± 13.1 cells/mm², IM 群 2096.0 ± 144.0 cells/mm², IM + DKT 群 1484.5 ± 70.1 cells/mm², P = 0.033, IM + m-DKT 群 1515.1 ± 71.5 cells/mm², P = 0.035, n = 4)。

3-5. 大建中湯のサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現に対する影響

大建中湯による上記の消化管運動亢進作用や抗炎症作用が炎症性サイトカイン・ケモカインと関与しているのか否かを検討した。

これまでに、MCP-1、TNF- α 、IL-6 は POI モデルマウスの炎症に対する最も重要なサイトカイン/ケモカインであることが報告されている^{12, 57)}。そこで、小腸炎症筋層部における IM 3 時間後の MCP-1、TNF- α 、IL-6 の mRNA の発現量を測定した。また、POI モデルマウスの炎症部位では IL-1 β が上昇することが報告されている^{12, 20)}。予備検討で IM 3 時間後の IL-1 β mRNA 発現を示さないことを確認したことから (資料未記載)、IM 6 時間後の mRNA 発現を検討した。加えて、IM による消化管運動遅延は平滑筋細胞において誘発

された iNOS を介した NO により起こることが知られている^{12, 57)}。Inducible NOS mRNA 発現においても IM 3 時間後には検出が認められなかったことから (資料未記載)、IM 6 時間後の iNOS mRNA 発現を検討した。

図 22 に示すように、MCP-1 と TNF α の mRNA 発現は IM + vehicle 群で有意に上昇していた。IL-6 と iNOS 遺伝子もまた、IM で上昇傾向にあった (Dunnet 検定値: IL-6; P = 0.060、iNOS; P = 0.439)。IL-1 β の mRNA 発現は本実験の POI モデルマウスでは IM 有意な上昇は示さなかった。TNF- α と MCP-1 は IM + DKT 群で IM + vehicle 群に比べて有意に抑制していた。IM による IL-6 と iNOS mRNA 発現の上昇も大建中湯の投与で下降傾向にあった (IL-6; P = 0.252、iNOS; P = 0.295)。以上のように、大建中湯は IM による炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子発現の増加を抑制した。

3-6. MLA による大建中湯の抗炎症作用の解除

Alpha7nACh R 阻害剤であるメチルリカコニチン (MLA) を大建中湯投与のそれぞれ 30 分前に投与し、大建中湯の抗炎症作用に対する影響を POI モデルマウスの消化管筋層部での好中球浸潤とマクロファージ浸潤に対する作用を評価指標に用いて検討した。

3-6-1. MLA による大建中湯の好中球浸潤抑制の解除

図 23 に示す様に、MLA の投与により大建中湯の IM による MPO 陽性細胞数上昇抑制の効果が有意に解除された。また、回腸組織を用いた MPO 活性の測定による方法でも同じく MLA の投与により有意に大建中湯の MPO 上昇抑制作用が減少した。

MLA 単独で、正常マウスに投与した場合には MPO 活性、組織化学的好中球の浸潤に影響しなかった (図 25) (MPO 活性:正常群; 10.01 ± 0.97 U g /wet tissue、+ MLA 群; 36.80 ± 4.26 U g wet /tissue) (MPO 陽性細胞: 正常群; 15.47 ± 1.53 cells /mm²、+ MLA 群; 15.19 ± 1.49 cells /mm²)。

加えて、本実験で用いた濃度の MLA は MPO 活性ならびに MPO 陽性好中球を指標とした炎症反応評価において、IM による炎症を増加させることはなかった (図 26)。

3-6-2. MLA による大建中湯のマクロファージ浸潤抑制の解除

CD68 陽性マクロファージにおいても同じ結果が得られた。図 24 に示すように、MLA の投与により大建中湯の IM によるマクロファージ浸潤抑制効果が解除された ($p = 0.06$)。

MLA 単独で、正常マウスに投与した場合には CD-68 マクロファージ数に影響しなかった (図 25) (正常群; 429.67 ± 45.95 cells /mm²、+MLA 群; 261.50 ± 9.76 cells /mm²)。

加えて、本実験で用いた濃度の MLA は、CD-68 陽性マクロファージを指標とした炎症反応評価において、IM による炎症を増加させることはなかった ($P = 0.06, n = 5$) (図 26)。

3-7. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける大建中湯の抗炎症活性の減少

図 27 に、 $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスにおける大建中湯の抗炎症作用について、野生型マウス (C57BL/6J)での作用 と比較して示した。

3-7-1. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける大建中湯の好中球浸潤抑制の維持

本実験項目で用いた野生型マウス (C57BL/6J) では、これまでの実験で使用した野生

型マウス (BALB/c) での成績 (図 19 参照) 同様に IM 刺激により同程度の好中球浸潤が認められた。また、大建中湯の好中球浸潤に対する抑制作用も両野生型マウス間で差は認められなかった (図 19 参照)。Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける IM による好中球浸潤は野生型マウス (C57BL/6J) で浸潤の程度と有意な差は認められなかった。IM による好中球浸潤において、大建中湯は $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスと野生型マウス (C57BL/6J) のいずれにおいても同等の浸潤抑制作用を示した (図 27-A)。

大建中湯は野生型マウス (C57BL/6J) の平滑筋層における好中球の細胞数に影響を示さなかった (正常群; 7.63 ± 1.23 、+DKT; 6.63 ± 0.90 cells/mm²) (資料未記載)。

3-7-2. Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける大建中湯のマクロファージ浸潤抑制の減少

一方で、マクロファージの浸潤に関しても、野生型マウス (C57BL/6J) では、これまでの実験で使用した野生型マウス (BALB/c) での成績 (図 20 参照) 同様に IM 刺激により同程度のマクロファージ浸潤が認められた。また、大建中湯のマクロファージ浸潤に対する抑制作用も両野生型マウス間で差は認められなかった (図 20 参照)。Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおける IM によるマクロファージ浸潤は、野生型マウス (BALB/c) での浸潤の程度と有意な差は認められなかった。Alpha7nACh R ノックアウトマウスにおいて、大建中湯によるマクロファージ浸潤抑制作用は、野生型マウス (C57BL/6J) と比較し、有意に減弱していた (図 27-B)。以上のことから、IM による CD68 陽性マクロファージ浸潤

に対する大建中湯の改善効果は、一部 $\alpha 7nAChR$ の活性化が関与する可能性が考えられた。

大建中湯は野生型マウス (C57BL/6J) の平滑筋層におけるマクロファージの細胞数に影響を示さなかった (正常群; 692.68 ± 51.93 、+DKT; 706.75 ± 68.17 cells /mm²) (資料未記載)。

4. 考察

4-1. 大建中湯の消化管運動機能促進作用

4-1-1. これまで明らかにされている大建中湯の消化管運動促進作用

本研究で正常マウスに大建中湯を投与したところ消化管輸送能を促進させ、消化管運動促進作用があることを確認した。このことは、大建中湯が正常ヒトボランティアによるランダム二重盲検試験においてプラセボに比べて小腸と上行結腸で腸管運動を有意に促進させる報告²⁸⁾と一致していた。これまでに、大建中湯の消化管運動促進作用の主な作用機序は、5-HT₃R と 5-HT₄R の活性化を介したコリン作動性神経からの ACh 分泌促進³⁴⁻³⁶⁾、モチリンの血漿中濃度上昇^{37, 38)}、バニロイド受容体 (transient receptor potential vanilloid type1; TRPV1) を介したサブスタンス P による平滑筋収縮促進作用が報告されている (図 7)^{39, 40, 58)}。

4-1-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の消化管運動促進作用

本研究で POI モデルマウスにおいて大建中湯が IM による消化管運動能遅延改善と胃

排出遅延改善効果を示すのか否かを検討した。その結果、POI モデルマウスにおいて大建中湯の投与で消化管運動遅延が有意に回復し (図 16-A、B)、試算による胃排出率 (図 16-C) も回復した。すなわち、大建中湯は消化管運送促進作用と胃排出能促進作用を持つと解釈できる。これらマウスでの結果は、術後腸管麻痺モデルラットに対して大建中湯が腸管運動の遅延を回復させる報告とも一致しており^{34, 35)}、臨床で大建中湯が POI に対する消化管運動促進薬として頻用されていることの根拠を示している。

これまで、大建中湯による POI による消化管運動不全の改善効果の機序として大建中湯が本来持ち合わせている消化管運動機能亢進作用に因ると考えられてきた。その分子機構についてはすでに 4-1-1 で述べた通りである。しかし近年、消化管筋層部における局所の炎症で浸潤してきた炎症細胞であるマクロファージと好中球が iNOS を発現し、NO を産生することで消化管運動障害を引き起こされることが分かり^{11, 12, 18, 48, 59)}、POI の発症においても消化管筋層部におけるマクロファージと好中球の動員を中心とした炎症応答が重要な役割をしていることが報告されている^{7, 10)}。事実、消化管筋層部における炎症の改善は、消化管運動障害を回復させることが実証されている^{12, 20, 55)}。本研究で正常マウスにおいても大建中湯は消化管輸送能を亢進させてはいたが、POI モデルマウスにおける大建中湯の消化管輸送能遅延に対してはさらに効果的に輸送能を回復させた。上記の知見を合わせて考えると、今回の結果から大建中湯の POI モデルマウスの消化管輸送能遅延回復作用は、消化管運動促進作用に加えて、IM に対する抗炎症作用による消化管運動促進作用が加わっ

ていることが示唆された。

本研究において胃排出能はフェノールレッド強制投与による消化管色素輸送能解析法(色素法)からの算出と、 ^{13}C 酢酸呼気試験による解析法の両者について検討した。その結果、色素法では、IMは顕著に胃排出能を低下させ大建中湯はこれを顕著に回復させた。すなわち、大建中湯は胃排出能亢進作用を持つと解釈できる。一方、 ^{13}C 酢酸呼気試験の経時変化全体の比較を示すANOVA検定においては、大建中湯が色素法同様にIMによる胃排出能低下を有意に回復させていた。しかし同時に、 C_{max} 、 T_{max} 、AUCや各経時時間での有意な回復を示さなかったことから総合的に判断し、大建中湯はIMによる胃排出能低下に対して微弱な回復効果しか示さなかったと考えた(図18)。色素法は元来、胃から肛門までの消化管全体の総体的な運動能を定量的に測定する方法であり、この方法による胃排出能は単に胃内から小腸以下へ移動してきた総色素含有量の比率を算出した結果である。一方、 ^{13}C 酢酸呼気試験は胃内からの排出、小腸での ^{13}C 吸収、肝臓での代謝、 CO_2 排泄を総合した間接法ではあるが、胃排出能の動態を経時的に評価出来、臨床的にも専ら上部消化管機能研究に応用されている⁶⁰⁾。また私はこれまでに、 ^{13}C 酢酸呼気試験が正常マウスへのメトクロプラミドまたはアトロピンの投与で起こる胃排出能の亢進または遅延の変化を評価出来ることを確認し、本方法によるマウスでの胃排出機能測定が可能であることを実証している⁴⁷⁾。さらに、 ^{13}C 酢酸呼気試験で大建中湯の胃排出能低下に対する回復が微弱であったことから、色素法で算出された大建中湯の胃排出能低下の顕著な回復結果は、小腸以下の

運動能改善に伴う見かけ上の結果であり過大評価と推測した。以上をまとめると、大建中湯は IM による小腸輸送能低下に対しては回復作用を示すが、IM による胃排出能低下に対しては直接的な回復作用を持っても極めて弱いと考えられた。これらの解釈は、臨床で大建中湯が直腸や大腸など下部消化管の働きを良くするが、胃など上部消化管の運動はむしろ抑制し主に下部消化管の症状に対して用いられてきたこと、健常人で大建中湯が下部消化管運動能を亢進させるが胃排出能には効果がないという報告²⁸⁾、さらには覚醒犬において大建中湯が噴門部や十二指腸、回腸で一過性収縮を引き起こすものの胃体部では起こらないという報告を支持する成績といえる³⁶⁾。

本研究では、大建中湯の 19 mg/kg の低濃度や 190 mg/kg の濃度 (資料未記載) では消化管運動能遅延を有意に回復させなかった。有効性を示した 95 mg/kg の大建中湯は、臨床でのヒト 1 日用量の 0.5 倍量に相当する。今回の結果が動物種の違いなどによるものか、今後詳細な検討が必要と考える。しかし興味深いことに、以上のような濃度依存的な有効性を示さないという結果は、健常人にメーカー製の大建中湯の医療用製剤をヒト 1 日用量の 0.5 倍量である 7.5 g/body の反復投与で消化管運動を亢進させたが、1 日用量 15 g/body では有効性が見られなかったという報告と一致している²⁸⁾。

4-2. 大建中湯の抗炎症作用の機序

4-2-1. これまでに明らかにされている大建中湯の抗炎症作用

大建中湯は、炎症性疾患にも有効であり、心筋梗塞や心不全などの循環器疾患に関連のある中枢神経、心臓や血管など末梢の一次知覚神経の終末から分泌される CGRP やサブスタンス P 量を血漿中に増加させる³⁹⁾ ことにより腸管の血流を改善することで (図 28)、消化管内での腸内細菌の増殖や炎症性サイトカイン、シクロオキシゲナーゼ 2 (cyclooxygenase-2; COX-2) 産生をコントロールすることが報告されている⁶¹⁾。近年の研究で、 α -CGRP 阻害剤や拮抗薬が POI による胃排出能遅延を回復させるという報告や^{62,63)}、CGRP 類似の生体内生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン (adrenomedulin; ADM) が胃排出を亢進させるよりはむしろ遅延させるという報告も知られてはいるが⁶⁴⁾、一方で炎症に対しては、これら ADM や CGRP が増加調節されることで起こる血管拡張性活性が、クローン病の消化管炎症の治療と予防にも有効であると考えられている⁶⁵⁾。大建中湯にも、ADM と CGRP 値を上昇させることでクローン病を改善する可能性があることが報告されている^{43,44)}。また、ナイーブ CD4+T 細胞を移入した大腸炎モデルマウスで大建中湯の治療効果が認められ、消化運動改善作用だけでなく、抗炎症にも作用することが報告されている⁶⁶⁾。加えて、術後の大建中湯の投与は、炎症や組織破壊が起こると血清中に増加するタンパク質である CRP と結腸直腸がんの手術後の炎症を有意に抑制させる⁴²⁾。消化管運動に関しては下部消化管に主に用いられている大建中湯であるが、炎症に関しては、胃アトニーや胃下垂など基質病変が認められない慢性胃炎に対しても、奏効することが知られている。しかしながら、大建中湯が POI の炎症に対して有効性を示すのか、そして抗

炎症作用を持つ場合にはその作用機構についての詳細はこれまで全く解明されていなかった。

4-2-2. POI モデルマウスにおける大建中湯の抗炎症作用の機序

本研究で大建中湯の消化管筋層部の炎症性細胞に対する影響について検討した。大建中湯が炎症を生じたマウス回腸筋層部での IM による好中球浸潤とマクロファージ浸潤を強く抑制したことから、POI モデルマウスに対する強力な抗炎症作用を持つことを初めて明らかとした。これらの発見は、大建中湯の臨床での POI 改善が消化管運動と炎症の両方の改善に関連していることを示唆する。それ故に、本研究結果は POI 治療における大建中湯の使用についての新たな知見となると考えられる。

POI モデルマウスにおける消化管炎症は IM で誘導される炎症性伝達物質 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、顆粒球単球コロニー刺激因子 (granulocyte macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) CSF2 などのサイトカインやケモカインの m-RNA 発現の増加により起こることが特徴づけられるが⁵⁷⁾、中でも MCP1、TNF- α 、IL-6、IL-1 β は齧歯類 POI モデルの炎症に対して最も重要であることが報告されている^{12, 57)}。加えて、IM により iNOS 遺伝子が誘導され、産生された NO が POI の消化管運動遅延を引き起こす^{12, 20, 67)}。そこで、大建中湯の POI モデルマウスにおけるマクロファージ浸潤抑制が、IM によるこれらの炎症性メディエーターの mRNA 発現増加に対する調節作用なのか否かを検討した。本研究の POI モデルマウスにおける大建中湯の TNF- α と MCP-1 mRNA 抑制効果は、クローン病治療において

大建中湯が ADM を介して血管拡張による血流を増加するだけでなく、ラットやマウスクローン病モデルにおける TNF- α の抑制を介した大建中湯の抗炎症作用の報告と一致していた^{54, 68, 69)}。さらに、本研究では IM による IL-6 と iNOS mRNA 発現の増加は大建中湯の投与で減少する傾向を示した。以上を合わせて考えると、大建中湯に IM による炎症性メディエーター遺伝子発現の抑制作用があることが考えられる。

大建中湯の消化管運動促進作用は、迷走求心性神経の 5-HT₃R と、または 5-HT₄R の活性により、筋層間神経叢のコリン作動性伝達が刺激されることによって発揮される³⁴⁾が、5-HT₄R 作動薬であるクエン酸モサプリドが筋層間神経叢のコリン作動性神経からの ACh の分泌を介した筋層の活性マクロファージの α 7nACh R を活性化し、消化管運動促進作用だけでなく抗炎症作用を示すことが報告されている²⁰⁾。近年、「コリン作動性抗炎症経路」と名付けられた副交感神経刺激によるマクロファージの不活性機構が生理的に存在することが明らかとなり注目されている^{70, 71)}。消化管筋層部の常在マクロファージは、筋層間にまで分枝を伸ばすコリン作用性遠心性神経終末と近接しており、迷走神経刺激によってこの常在マクロファージの細胞膜上に存在する α 7nACh R が活性化される。その結果 IM によるマクロファージからの IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-18 などの炎症性サイトカイン産生が強く抑制されて POI が回復することが明らかとなってきた^{71, 72)}。副交感神経刺激を介したマクロファージの不活性化にはトリプシンキナーゼ (Janus kinase 2; Jak2) の活性化とそれによる炎症反応の負の調節制御を行う転写因子シグナル伝達転写活性化因子 3 (Signal Transducer

and Activator of Transcription 3; STAT3) のリン酸化が関与しており、それに続く Src 相同性領域 (Src homology 2; SH2) ドメインタンパク SOCS3 の発現増強はあまり関与していないことから、リン酸化した STAT3 が直接、核内因子 κ B (nuclear factor-kappa B; NF κ -B) p65 (RelA) と結合することにより抗炎症作用を発揮すると考えられている^{72, 73)}。本研究で、POI モデルマウスにおいて大建中湯が炎症性サイトカインの産生を抑制し、抗炎症作用を示したことから、大建中湯の抗炎症作用に α 7nACh R が関係する可能性が考えられた。そこで、 α 7nACh R 阻害剤 MLA を用いて POI モデルマウスにおける大建中湯の抗炎症作用に対する影響を検討した。結果は、MLA が有意に大建中湯の好中球とマクロファージの浸潤を指標とした抗炎症効果を解除させた。これらの結果から、大建中湯の POI における抗炎症活性にマクロファージの α 7nACh R 活性が関係していることが示唆された。この見解は、選択的 α 7nACh R 作動薬である AR-R17779 が POI の炎症を阻害する報告からも裏付けられる⁷³⁾。近年、POI においては消化管筋層間神経叢で遊離した ACh が迷走神経反射を介さずに、直接消化管局所の α 7nAChR を刺激して抗炎症作用を示すことが報告された⁷⁴⁾。以上のことから、大建中湯の POI における抗炎症活性は消化管運動遅延抑制作用機序と同様なコリン作動性神経の直接刺激に対するよりはむしろ、5-HT₃R や 5-HT₄R の刺激による壁内神経叢からの間接的な ACh 放出の促進と、これによるマクロファージの α 7nACh R 活性が関係している可能性が明らかとなった。ラット POI モデルにおいて、浸潤マクロファージと活性化常在マクロファージは哺乳類の α 1、 α 7、 α 10 nACh R の選択的放射性リガンドで

ある α ブンガロトキシン (α -bungarotoxin; α -BTX) に対して親和性があるが、浸潤好中球には親和性がないことが知られている²⁰⁾。このことから、これらの α -BTX 結合マクロファージが大建中湯の抗炎症活性における効果細胞である可能性が推測される。

大建中湯の POI モデルマウスにおける抗炎症作用が、本当に $\alpha 7nACh R$ を介した作用であるのか否かを確認するために、 $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスを用いて検討した。興味深いことに、大建中湯の抗炎症活性は $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスでは部分的にしか解除されなかった。すなわち、IM によるマクロファージ浸潤に関しては、 $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスでは大建中湯による浸潤抑制効果を部分的にではあったが、依然有意に維持していた。この結果は、少なくとも部分的に大建中湯によるマクロファージ浸潤抑制効果は $\alpha 7nACh R$ を介した作用であることを示している。対照的に、好中球浸潤においては、大建中湯による浸潤抑制効果は $\alpha 7nACh R$ ノックアウトマウスでも影響されず維持していた。このことから、 $\alpha 7nACh R$ は大建中湯の好中球浸潤抑制作用には関与しないと考えられた。総合すると、これらの結果は $\alpha 7nACh R$ と他の $nACh R$ のサブタイプが大建中湯の抗炎症作用に関与する可能性を示した。 $nACh R$ は、カルシウムチャンネルを保有したイオンチャンネル一体型リガンド作動性受容体で 5 量体を形成している (図 29)。神経筋接合部や自律神経節に存在し、神経伝達物質 ACh の神経伝達を行っている。さらに、上述の様に血液細胞であるマクロファージなどの免疫細胞にも神経性 $nACh R$ が存在することが明らかとなり⁷⁵⁾、迷走神経性の抗炎症作用の機序の一つとして注目されてきた^{71, 72)}。5 量体の組

み合わせにより多数のサブタイプが存在するが、ヒトにおいては、9種類の α サブユニット ($\alpha 1-7$ 、 $\alpha 9-10$)、4種類の β サブユニット ($\beta 1-4$)、デルタ (δ)、イプシロン (ϵ)、ガンマ (γ) の16種類のサブタイプが報告されている。神経系のnACh Rは、 α が2個と、 β が3個からなるサブユニットのヘテロ5量体 (ペンタマー; pentamer)、あるいは5個の同一のサブユニットからなるホモ5量体を形成して、その組み合わせによりそれぞれの構造に特異的な薬理学的特性を示すことが知られている。これらサブユニットには9種類の α サブユニット ($\alpha 2-\alpha 10$) と、3種類の β サブユニット ($\beta 2-\beta 4$) が見出されている。自律神経節のnACh Rは主に $\alpha 3\beta 4$ を含むヘテロ5量体、中枢神経系の主要なnACh Rサブタイプは $\alpha 4\beta 2$ からなるヘテロ5量体と $\alpha 7$ からなるホモ5量体である。近年の研究で、マクロファージ活性のニコチン障害が $\alpha 7$ nACh Rに加えて他の受容体と関係していることが裏付けられている⁷³⁾。そこで、大建中湯の抗炎症作用に関与するnACh Rの一つに考えられる候補として $\alpha 4\beta 2$ ヘテロ5量体nACh Rが挙げられる⁷⁶⁾。このnACh Rサブタイプの活性は転写因子NF- κ -B p65の転写促進活性もまた抑制することが報告されている。しかし、MLAは $\alpha 7$ のみならず、 $\alpha 6$ nACh Rや $\alpha 7$ nACh Rのイソ型 (isoform) に対しても親和結合性があることが報告されており⁷⁷⁾ これらのnACh Rの関与も考えられる。

4-3. 大建中湯のPOI改善薬としての臨床的意義

4-3-1. 大建中湯のPOI治療薬、予防薬としての有用性

手術直後の大建中湯の投与で術後腸管運動機能の低下が特に4日目以降に、投与をう

けない場合に比べて改善が早まったという報告がある⁷⁸⁾。臨床における開腹手術後のイレウスから回復にかかる時間は、胃では24時間から48時間、大腸では48時間から72時間と言われているが³⁾、小腸では比較的早く術後4時間から24時間である⁷⁹⁾。ラットPOIモデルでは術後24時間後に顕著な消化管運動不全が認められ、48-72時間後には自然回復することが報告されている²⁰⁾。今回の実験に用いたPOIモデルマウスは小腸部位にIMを施行した急性炎症モデルであり、本モデルで大建中湯の効果を評価するためには自然治癒の影響を避ける為に24時間以内に検討する必要がある。上記の臨床症例の様にIM後の単回投与すぐの時間から大建中湯が有効性を示す可能性も十分に考えられたが、本研究の実験スケジュールでは、よりはっきりとした有効性を示す為にIM3日前から大建中湯を投与した。得られた結果は治療効果というよりは、予防効果を示している可能性が考えられる。開腹術は緊急性を伴うものを除いて通常予定した日程で計画的に施行されることから、大建中湯の予防的な投与は計画しやすい。今回の結果から、開腹術後に腸を早く動かして閉塞を予防する目的で大建中湯の術前投与を行うことは、これまでのPOI治療で生じていた症状改善の遅延や合併症の併発と、それに伴う入院延長や非経口栄養などによる費用の負担増加を解消し、POI改善効果の向上、入院日数の短縮に寄与しうる点で臨床的意義が高いと推測された。

4-3-2. 大建中湯の西洋薬に対する優位性

大建中湯がクエン酸モサプリドと同様に筋層間神経叢からのACh分泌を介したマクロ

ファージの $\alpha 7nACh R$ の活性化を介した POI に対する治療薬となることを示唆したが、西洋薬が単一の機序であるのに対して、大建中湯は複数の作用機序により POI に対して有効性を示している点で優れており、特に TRPV₁R を介した直接作用は、西洋薬には見られない特徴であると考えられる。また、大建中湯は胃腸以外の部位での血流増加作用がなく、さらに、例えば酸化マグネシウムなどの塩類下剤では効果が弱い、センナとセンナ実 (*Sennae Folium*; Senna leaf と Senna fruit) などの刺激性下剤では長期連用による耐性や大腸組織の機能障害を起こすなどの西洋薬による治療の限界に対して、POI をはじめとした消化管運動改善、抗炎症薬の補助薬または代替薬となる可能性を持つ点で有用な薬であると思われる。

漢方薬は天然物であることからその有効性の再現性、品質の安定性が問題とされることがある。今回、自家製大建中湯エキスの 3 次元 HPLC 分析を行った結果、いくつかの構成含有物を同定した。生薬にはかならずしも薬効を代表する成分とは限らないがそれぞれ様々な成分が含まれている。漢方薬の有効性はこれら成分の複合作用または相乗作用として現れると考えられる。HPLC 分析は、漢方薬の特定の既知成分の含有物の同定や含有量を検討することが出来るばかりでなく、得られたチャートパターンは様々な成分すべてを示している。異なるロットの生薬、異なる産地の生薬、異なる時期に採取された生薬などの分析結果を比較し、様々な成分が常に一定の範囲内で含有されていることを分析チャートパターンから確認することで、品質が安定していることを保証することが出来る (図

30)。本研究ではさらに、メーカー製の大建中湯 (m-DKT) の投与でも、自家製大建中湯 (DKT) と同様に、IM 処置による好中球浸潤とマクロファージ増加を抑制することを確認した。以上のことより、本研究で用いた自家製大建中湯の薬の品質担保と、結果の再現性を裏付けることが出来たと思われる。

4-3-3. 今後の発展性

ADM の TNF- α 産生抑制効果はクローン病の領域においてはかなり注目されてきており、TNF- α をターゲットとするインフレキシマブによる治療に期待されている。また、TNF- α がラット TNBS 誘発大腸炎モデルにおいて平滑筋を直接刺激し、収縮機序を抑制することが報告されており^{80, 81)}、TNF- α は内因性セリン/スレオニン蛋白フォスファターゼ阻害剤 (C-kinase potentiated Protein phosphatase-1 Inhibitor Mr = 17 kDa; CPI-17) 発現量を減少させることから、ミオシンフォスファターゼ活性の増加と消化管運動減少が起こる。本研究で大建中湯もまた TNF- α mRNA を抑制したことから、POI 以外の炎症性疾患においても抗炎症作用と消化管運動促進効果を発揮する可能性が示唆された。本研究はこれまで大建中湯が処方されることのなかった新たな適応性疾患に応用する根拠となり、多くの患者の福音となる可能性がある。

大脳皮質、海馬において神経終末に存在する神経性 $\alpha 7nACh R$ の活性化は、神経伝達物質遊離を促進し⁸²⁾、アゴニストである GTS-21 (3-2,4- dimethoxybenzylidene-anabaseine) が認知行動、学習機能低下、不安性を改善したことから⁸³⁾、パーキンソン病やアルツハイマーの

治療標的としても $\alpha 7nACh R$ 研究が進められている⁸⁴⁾。また、血管内皮細胞では $\alpha 7nACh R$ の活性化が血管新生を促進させることが報告されている⁸⁵⁾。今回、大建中湯の $\alpha 7nACh R$ の活性化による抗炎症作用を示したが、この機序の解明からアルツハイマー治療薬や悪性腫瘍や関節リウマチ、粥状動脈硬化症などの血管新生異常に対する治療薬へと新たに応用出来る可能性も考えられる。加えて、他のタイプの $nACh R$ の発見により、新規の抗炎症薬、アルツハイマー治療薬の標的分子同定へと応用出来る可能性が考えられる。

大建中湯の消化管運動亢進作用の薬効は、山椒の主要成分である 6-shogaol や α および β 体混合の hydroxyl-sanshool が関与すると考えられているが、抗炎症作用については不明である^{35,58)}。また、膠飴は、水飴の成分で α -グルコース 2 分子からなる二糖類の麦芽糖 (マルトース) であるが、消化管運動抑制作用が報告されていることから大建中湯の消化管運動能に影響するターゲット構成生薬として考えられる⁸⁶⁾。漢方薬は主に経口的に服用されることから、経口投与された生薬成分のあるものは消化管内で腸内細菌により代謝されることが考えられる。また、薬効に関与すると考えられる成分のいくつかは生薬中に配糖体などのプロドラッグ様成分として存在し、これらが腸内細菌による代謝を受け、アグリコンなどの代謝産物が腸管から吸収されて血中に活性成分として現れることが、実験的に認められている。このため、大建中湯の処方中の各生薬単一の作用のみならず、特定の生薬一味抜きにした場合に POI モデルマウスに対して POI 抑制効果を発揮するか否かを検討することで、大建中湯を構成するどの生薬、成分に活性があるのかを同定することができる。これまで漢方薬は古

典を拠り所にした経験的に用いられてきた処方がほとんどであり、薬効作用の解析から新たな漢方処方が生み出されたことはない。本研究を発展させ、POI モデルマウスに対する抗炎症作用の強さと腸管運動促進作用の 2 つの作用を目標に生薬や処方組み合わせを考えていけば、これまでにない新規あるいはより強い効能をもった漢方処方の創製へとつながる可能性がある。加えて、有効と認められた生薬に関しては有効主成分での検討や液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS) と核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) 技術による標的化合物同定を合わせて行うことで POI モデルマウスに対する大建中湯の抗炎症作用の西洋医薬としての有効主成分をも明らかとすることができる。

今後、本研究の成果が新たな作用メカニズムに基づく抗炎症薬の開発や新たな適応疾患の創出へと役立てられると確信している。

5. 総括

私は、大建中湯が消化管運動機能亢進作用に加えて、抗炎症作用を示すことで POI 治療効果を示すことを初めて明らかとした。その作用機序の一部として 5-HT₃R と、または、5-HT₄ R 刺激によりコリン作動性筋層間神経叢からの ACh 分泌が促進し、この ACh が炎症により活性化したマクロファージ細胞膜上の $\alpha 7nACh R$ を活性化することで抗炎症作用を発揮する可能性が考えられ

た。

結論として、大建中湯は消化管運動改善作用に加え、抗炎症作用を持った POI の治療薬であることが示唆された。

本研究は、大建中湯が POI をはじめとした炎症性疾患など新たな適応性疾患に応用する根拠となり、今後多くの患者の福音となることが期待される。

6. 今後の課題

Alpha7nACh R 阻害剤 MLA を用いた検討から、大建中湯の POI における抗炎症作用に $\alpha 7$ nACh R 活性化が関係していることを示唆した。この結論をさらに $\alpha 7$ nACh R ノックアウトマウスを用いて確認したところ、マクロファージについては、大建中湯によるマクロファージ浸潤抑制効果はその一部に $\alpha 7$ nACh R を介した作用があることを示していたのに対し、好中球については、 $\alpha 7$ nACh R が関与しないと考えられた。これらの結果から、大建中湯の抗炎症作用には $\alpha 7$ nACh R と他の nACh R のサブタイプが関与する可能性が示されたが、その特定はされていない。今後、どのタイプの nACh R が関与しているかを明らかにすることが必要である。

大建中湯の消化管運動亢進作用の薬効は、山椒と膠飴がその中心的役割を果たしてい

るとされているが抗炎症作用については不明である。大建中湯の抗炎症作用に関係する構成生薬や有効成分の同定が今後の課題である。既に、私は予備検討として POI モデルマウスにおける大建中湯の構成生薬の一味抜きの抗炎症作用についてマクロファージの浸潤と消化管輸送能を指標に評価を開始している。現在の結果から、大建中湯の POI モデルにおける筋層部マクロファージが関与する炎症の改善と消化管運動遅延改善作用が、乾姜を除いた大建中湯ではそれぞれ消失することを見出している。今後も引き続き検討をすることで、効能強化された新規漢方処方創製されることが望まれる。

7. 謝辞

本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって御懇篤なご指導を賜りました北里大学・東洋医学総合研究所・所長、北里大学大学院・医療系研究科・教授 花輪 壽彦 先生に謹んで感謝申し上げます。また、本研究に際し、終始、御親切なる御指導を頂きました北里大学・東洋医学総合研究所・副所長、臨床研究部・部長 及川 哲郎 先生に深く感謝致します。さらに、貴重なご助言を戴くとともに本論文の細部にわたり御指導を頂きました東京大学大学院・農学生命科学研究科・獣医薬理学教室・教授 尾崎 博 先生、並びに、准教授 堀 正敏 先生に心より感謝致します。3次元 HPLC 分析におきましては、大峰堂薬品工業株式会社 にご協力を頂きました。ここに謝意を表します。最後に、日頃より

有益なご助言を頂きました北里大学・東洋医学総合研究所・臨床研究部の皆様に心よりお礼申し上げます。

8. 引用文献

1. 恩田昌彦, 高崎秀明, 古川清憲, 田中宣威, 森山雄吉. イレウス全国集計 21,899 例の概要. 日本腹部救急医学会雑誌 2000; 20:629-36.
2. Cannon WB, Murphy FT. IV. The Movements of the Stomach and Intestines in Some Surgical Conditions. *Ann Surg* 1906; 43:512-36.
3. Holte K, Kehlet H. Postoperative ileus: a preventable event. *Br J Surg* 2000; 87:1480-93.
4. 片山芳文. 腸神経系を通してみた自立神経系 (ニューロサイエンスの仮説). *脳の科学* 2001; 23:507-12.
5. Fujita A, Okishio Y, Takeuchi T, Hata F. Roles of interstitial cells of Cajal in regulation of motility of the mouse intestine. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2004; 123:170-8.
6. Takeuchi T, Fujinami K, Fujita A, Okishio Y, Takewaki T, Hata F. Essential role of the interstitial cells of Cajal in nitric oxide-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse ileum. *J Pharmacol Sci* 2004; 95:71-80.
7. Bauer AJ, Boeckxstaens GE. Mechanisms of postoperative ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16:54-60.
8. Doorly MG, Senagore AJ. Pathogenesis and clinical and economic consequences of postoperative ileus. *Surg Clin North Am* 2012; 92:259-72.
9. Holte K, Kehlet H. Postoperative ileus: progress towards effective management. *Drugs* 2002; 62:2603-15.
10. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically induced

leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117:378-87.

11. Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. *Gastroenterology* 2000; 118:316-27.

12. Wehner S, Behrendt FF, Lyutenski BN, Lysson M, Bauer AJ, Hirner A, et al. Inhibition of macrophage function prevents intestinal inflammation and postoperative ileus in rodents. *Gut* 2007; 56:176-85.

13. Prasad M, Matthews JB. Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* 1999; 117:489-92.

14. Bauer AJ, Szurszewski JH. Effect of opioid peptides on circular muscle of canine duodenum. *J Physiol* 1991; 434:409-22.

15. Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH. Opioids inhibit neuromuscular transmission in circular muscle of human and baboon jejunum. *Gastroenterology* 1991; 101:970-6.

16. Sternini C, Patierno S, Selmer IS, Kirchgessner A. The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16:3-16.

17. Chan DC, Liu YC, Chen CJ, Yu JC, Chu HC, Chen FC, et al. Preventing prolonged post-operative ileus in gastric cancer patients undergoing gastrectomy and intra-peritoneal chemotherapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4776-81.

18. Shibata Y, Toyoda S. Effects of prostaglandin F₂alpha and cisapride on small intestinal activity during the early postoperative period in humans. *Surg Today* 1998; 28:787-91.

19. Narita K, Tsunoda A, Takenaka K, Watanabe M, Nakao K, Kusano M. Effect of mosapride on recovery of intestinal motility after hand-assisted laparoscopic colectomy for carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:1692-5.

20. Tsuchida Y, Hatao F, Fujisawa M, Murata T, Kaminishi M, Seto Y, et al. Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via alpha₇nACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Gut* 2011; 60:638-47.

21. 巽数富, 及川達也, 島田秀治, 森野直宜, 竹本勇一, 中坂剛志, et al. クエン酸モサプリド (ガスモチン) の使用成績調査. 臨床医薬 2006; 12:1043-53.
22. Livingston EH, Passaro EP, Jr. Postoperative ileus. Dig Dis Sci 1990; 35:121-32.
23. Collins TC, Daley J, Henderson WH, Khuri SF. Risk factors for prolonged length of stay after major elective surgery. Ann Surg 1999; 230:251-9.
24. Chang SS, Baumgartner RG, Wells N, Cookson MS, Smith JA, Jr. Causes of increased hospital stay after radical cystectomy in a clinical pathway setting. J Urol 2002; 167:208-11.
25. Dubois A, Weise VK, Kopin IJ. Postoperative ileus in the rat: physiopathology, etiology and treatment. Ann Surg 1973; 178:781-6.
26. Endo S, Nishida T, Nishikawa K, Nakajima K, Hasegawa J, Kitagawa T, et al. Dai-kenchu-to, a Chinese herbal medicine, improves stasis of patients with total gastrectomy and jejunal pouch interposition. Am J Surg 2006; 192:9-13.
27. Itoh T, Yamakawa J, Mai M, Yamaguchi N, Kanda T. The effect of the herbal medicine dai-kenchu-to on post-operative ileus. J Int Med Res 2002; 30:428-32.
28. Manabe N, Camilleri M, Rao A, Wong BS, Burton D, Busciglio I, et al. Effect of daikenchuto (TU-100) on gastrointestinal and colonic transit in humans. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2010; 298:G970-5.
29. 久保宣博, 内田雄三, 秋吉毅. イレウスに対する大建中湯の効果 多施設による検討. Prog Med 1995; 15:1962-7.
30. Takeda T, Kamiura S, Kimura T. Effectiveness of the herbal medicine daikenchuto for radiation-induced enteritis. J Altern Complement Med 2008; 14:753-5.
31. Yasunaga H, Miyata H, Horiguchi H, Kuwabara K, Hashimoto H, Matsuda S. Effect of the Japanese herbal kampo medicine dai-kenchu-to on postoperative adhesive small bowel obstruction requiring long-tube decompression: a propensity score analysis. Evid Based Complement Alternat Med 2011; doi: 10.1155/2011/264289.

32. 壁島康郎, 高橋洋子, 亀山哲章, 戸泉篤, 田村洋一郎, 影山隆久;. 大腸癌手術症例における大建中湯を用いた術後リハビリテーションの検討. 日本消化器外科学会雑誌 2005; 38:592-7.
33. 植田俊夫. 腸管癒着障害の漢方治療. 臨牀と研究 2000; 73:1069-72.
34. Fukuda H, Chen C, Mantyh C, Ludwig K, Pappas TN, Takahashi T. The herbal medicine, Dai-Kenchu-to, accelerates delayed gastrointestinal transit after the operation in rats. J Surg Res 2006; 131:290-5.
35. Tokita Y, Yuzurihara M, Sakaguchi M, Satoh K, Kase Y. The pharmacological effects of Daikenchuto, a traditional herbal medicine, on delayed gastrointestinal transit in rat postoperative ileus. J Pharmacol Sci 2007; 104:303-10.
36. Shibata C, Sasaki I, Naito H, Ueno T, Matsuno S. The herbal medicine Dai-Kenchu-Tou stimulates upper gut motility through cholinergic and 5-hydroxytryptamine 3 receptors in conscious dogs. Surgery 1999; 126:918-24.
37. Nagano T, Itoh H, Takeyama M. Effect of Dai-kenchu-to on levels of 3 brain-gut peptides (motilin, gastrin and somatostatin) in human plasma. Biol Pharm Bull 1999; 22:1131-3.
38. Jin XL, Shibata C, Naito H, Ueno T, Funayama Y, Fukushima K, et al. Intraduodenal and intrajejunal administration of the herbal medicine, dai-kenchu-tou, stimulates small intestinal motility via cholinergic receptors in conscious dogs. Dig Dis Sci 2001; 46:1171-6.
39. 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 2004; 27:1875-7.
40. Satoh K, Hashimoto K, Hayakawa T, Ishige A, Kaneko M, Ogihara S, et al. Mechanism of atropine-resistant contraction induced by Dai-kenchu-to in guinea pig ileum. Jpn J Pharmacol 2001; 86:32-7.
41. 加瀬義夫, 早川晃正, 斎藤和子, 敦石, 小松靖弘. 大建中湯の消化管機能に対する作用. Prog Med 1997; 17:2512-8.
42. Yoshikawa K, Shimada M, Nishioka M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, et al. The effects of the

Kampo medicine (Japanese herbal medicine) "Daikenchuto" on the surgical inflammatory response following laparoscopic colorectal resection. *Surg Today* 2011; 42:646-51.

43. Kono T, Koseki T, Chiba S, Ebisawa Y, Chisato N, Iwamoto J, et al. Colonic vascular conductance increased by Daikenchuto via calcitonin gene-related peptide and receptor-activity modifying protein 1. *J Surg Res* 2008; 150:78-84.

44. Murata P, Kase Y, Ishige A, Sasaki H, Kurosawa S, Nakamura T. The herbal medicine Dai-kenchu-to and one of its active components [6]-shogaol increase intestinal blood flow in rats. *Life Sci* 2002; 70:2061-70.

45. Schmidt J, Stoffels B, Moore BA, Chanthaphavong RS, Mazie AR, Buchholz BM, et al. Proinflammatory role of leukocyte-derived Egr-1 in the development of murine postoperative ileus. *Gastroenterology* 2008; 135:926-36.

46. Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Engel BM, Watkins SC, Billiar TR, et al. Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 2001; 121:1354-71.

47. Hoshino T, Oikawa T, Endo M, Hanawa T. The utility of noninvasive ¹³C-acetate breath test using a new solid test meal to measure gastric emptying in mice. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44:159-65.

48. Uchida M, Endo N, Shimizu K. Simple and noninvasive breath test using ¹³C-acetic acid to evaluate gastric emptying in conscious rats and its validation by metoclopramide. *J Pharmacol Sci* 2005; 98:388-95.

49. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 216:132-48.

50. Kinoshita K, Horiguchi K, Fujisawa M, Kobirumaki F, Yamato S, Hori M, et al. Possible involvement of muscularis resident macrophages in impairment of interstitial cells of Cajal and myenteric nerve systems in rat models of TNBS-induced colitis. *Histochem Cell Biol* 2007; 127:41-53.

51. Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol*

Gastrointest Liver Physiol 2001; 280:G930-8.

52. Sheibani K, Lucas FV, Tubbs RR, Savage RA, Hoeltge GA. Alternate chromogens as substitutes for benzidine for myeloperoxidase cytochemistry. *Am J Clin Pathol* 1981; 75:367-70.

53. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87:1344-50.

54. Kono T, Omiya Y, Hira Y, Kaneko A, Chiba S, Suzuki T, et al. Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J Gastroenterol* 2011; 46:1187-96.

55. Hori M, Nobe H, Horiguchi K, Ozaki H. MCP-1 targeting inhibits muscularis macrophage recruitment and intestinal smooth muscle dysfunction in colonic inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294:C391-401.

56. Mikkelsen HB, Thuneberg L, Rumessen JJ, Thorball N. Macrophage-like cells in the muscularis externa of mouse small intestine. *Anat Rec* 1985; 213:77-86.

57. Schmidt J, Stoffels B, Chanthaphavong RS, Buchholz BM, Nakao A, Bauer AJ. Differential molecular and cellular immune mechanisms of postoperative and LPS-induced ileus in mice and rats. *Cytokine* 2012; 59:49-58.

58. Tokita Y, Yamamoto M, Satoh K, Nishiyama M, Iizuka S, Imamura S, et al. Possible involvement of the transient receptor potential vanilloid type 1 channel in postoperative adhesive obstruction and its prevention by a kampo (traditional Japanese) medicine, daikenchuto. *J Pharmacol Sci* 2010; 115:75-83.

59. Kiyosue M, Fujisawa M, Kinoshita K, Hori M, Ozaki H. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18:1019-30.

60. 中田浩二, 川崎成郎, 梁井真一郎, 高橋朋子, 羽生信義, 矢永勝彦. 消化管機能検査における ^{13}C 呼気ガス診断の適応と限界. *消化器科* 2004; 39:119-27.

61. Hayakawa T, Kase Y, Saito K, Hashimoto K, Ishige A, Komatsu Y, et al. Effects of Dai-kenchu-to on intestinal obstruction following laparotomy. *J Smooth Muscle Res* 1999; 35:47-54.
62. Freeman ME, Cheng G, Hocking MP. Role of alpha- and beta-calcitonin gene-related peptide in postoperative small bowel ileus. *J Gastrointest Surg* 1999; 3:39-43.
63. Zittel TT, Lloyd KC, Rothenhofer I, Wong H, Walsh JH, Raybould HE. Calcitonin gene-related peptide and spinal afferents partly mediate postoperative colonic ileus in the rat. *Surgery* 1998; 123:518-27.
64. Reidelberger RD, Kelsey L, Heimann D. Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282:R1395-404.
65. Angerson WJ, Allison MC, Baxter JN, Russell RI. Neoterminal ileal blood flow after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Gut* 1993; 34:1531-4.
66. Iwasa T, Ogino H, Nakamura K, Ihara E, Akiho H, Takayanagi R. Feeding Administration of Daikenchuto Suppresses Colitis Induced by Naive CD4(+) T Cell Transfer into SCID Mice. *Dig Dis Sci* 2012; 57:2571-9.
67. Schwarz NT, Kalff JC, Turler A, Speidel N, Grandis JR, Billiar TR, et al. Selective jejunal manipulation causes postoperative pan-enteric inflammation and dysmotility. *Gastroenterology* 2004; 126:159-69.
68. Kono T, Kanematsu T, Kitajima M. Exodus of Kampo, traditional Japanese medicine, from the complementary and alternative medicines: is it time yet?. *Surgery* 2009;146:837-40.
69. Kono T, Kaneko A, Hira Y, Suzuki T, Chisato N, Ohtake N, et al. Anti-colitis and -adhesion effects of daikenchuto via endogenous adrenomedullin enhancement in Crohn's disease mouse model. *J Crohns Colitis* 2010; 4:161-70.
70. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000; 405:458-62.
71. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421:384-8.

72. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005; 6:844-51.
73. The FO, Boeckxstaens GE, Snoek SA, Cash JL, Bennink R, Larosa GJ, et al. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates postoperative ileus in mice. *Gastroenterology* 2007; 133:1219-28.
74. Matteoli G, Gomez-Pinilla PJ, Nemethova A, Di Giovangiulio M, Cailotto C, van Bree SH, et al. A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen. *Gut* 2013; doi: 10.1136/gutjnl-2013-304676.
75. Mishra NC, Rir-sima-ah J, Boyd RT, Singh SP, Gundavarapu S, Langley RJ, et al. Nicotine inhibits Fc epsilon RI-induced cysteinyl leukotrienes and cytokine production without affecting mast cell degranulation through alpha 7/alpha 9/alpha 10-nicotinic receptors. *J Immunol* 2010; 185: 588-96.
76. van der Zanden EP, Snoek SA, Heinsbroek SE, Stanisor OI, Verseijden C, Boeckxstaens GE, et al. Vagus nerve activity augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor alpha4beta2. *Gastroenterology* 2009; 137:1029-39.
77. Whiteaker P, Marks MJ, Christensen S, Dowell C, Collins AC, McIntosh JM. Synthesis and characterization of 125I-alpha-conotoxin ArIB[V11L;V16A], a selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325:910-9.
78. 草川 均, 下野 高, 田中 仁, 平野 弘, 小野田 幸, 新保 秀. 腹部大動脈瘤術後の腸管運動機能低下に対する大建中湯の改善効果. *日本血管外科学会雑誌* 2006; 15:287.
79. Catchpole BN. Smooth muscle and the surgeon. *Aust N Z J Surg* 1989; 59:199-208.
80. Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, Sato K, Ohama T, Momotani E, et al. Role of TNF-alpha in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF-alpha-deficient mice. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18:578-88.
81. Ohama T, Hori M, Momotani E, Iwakura Y, Guo F, Kishi H, et al. Intestinal inflammation downregulates smooth muscle CPI-17 through induction of TNF-alpha and causes motility disorders.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292:G1429-38.

82. McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. Science 1995; 269:1692-6.

83. Kem WR. The brain alpha7 nicotinic receptor may be an important therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease: studies with DMXBBA (GTS-21). Behav Brain Res 2000; 113:169-81.

84. Dzieczapolski G, Glogowski CM, Masliah E, Heinemann SF. Deletion of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor gene improves cognitive deficits and synaptic pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci 2009; 29:8805-15.

85. Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. J Clin Invest 2002; 110:527-36.

86. 赤瀬朋秀、田代眞一. 漢方に強くなる服薬指導 16. 漢方薬学研究 1997; 5:11-3.

9. 業績目録

口頭発表

(I) 学会発表

(1) 遠藤真理、堀 正敏、及川哲郎、尾崎 博、花輪壽彦; 六君子湯の抗炎症作用による術後腸管麻痺改善効果. 第 15 回日本神経消化器病学会: 出雲; 2013. 11 月.

(2) 遠藤真理、堀 正敏、及川哲郎、尾崎 博、花輪壽彦; 六君子湯の抗炎症作用による術後腸管麻痺改善効果. 第 30 回和漢医薬学会学術大会: 金沢; 2013. 8 月.

(3) 及川哲郎、遠藤真理、星野卓之、花輪壽彦; ¹³C 酪酸注腸呼気試験を用いたマウス大腸炎の評価～漢方薬による治療効果を含めて～. 第 99 回日本消化器病学会総会: 鹿児島; 2013. 3 月.

(4) 遠藤真理、堀 正敏、及川哲郎、尾崎 博、花輪壽彦; 大建中湯のアセチルコリン受容体を介した抗炎症作用による術後腸管麻痺改善効果. 第 14 回日本神経消化器病学会: 大阪;

2012. 11 月.

(5) 遠藤真理、星野卓之、及川哲郎、花輪壽彦; ^{13}C 酪酸注腸呼気試験を用いたマウス大腸炎の評価. 第 4 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会: 東京; 2012. 10 月.

(6) 遠藤真理、堀 正敏、及川哲郎、尾崎 博、花輪壽彦; 大建中湯のアセチルコリン受容体を介した抗炎症作用による術後腸管麻痺改善効果. 第 29 回和漢医薬学会学術大会: 東京; 2012. 8 月.

(7) Masatoshi Hori, Mari Endo, Toshihiko Hanawa, Hiroshi Ozaki and Testuro Oikawa; Daikenchuto, a Kampo (Japanese herbal) medicine, ameliorates postoperative ileus by anti-inflammatory action through nACh receptor. Digestive Disease Week: San Diego, USA; 2012. May.

(8) 遠藤真理、星野卓之、及川哲郎、花輪壽彦; ^{13}C 酢酸呼気試験を用いた六君子湯の胃排出能の検討. 第 28 回和漢医薬学会学術大会: 富山; 2011. 8 月.

(9) 遠藤真理、及川哲郎、星野卓之、羽鳥 努、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルにおける ^{13}C 酪酸注腸呼気試験を指標とした漢方薬の有効性の検討. 第 2 回日本安定同位体・生体ガス医学応用学会大会: 東京; 2010. 10 月.

(10) 遠藤真理; 学会奨励賞受賞者講演～マウス大腸炎に有効な漢方薬とその有効生薬の解明～. 第 27 回和漢医薬学会学術大会: 京都; 2010. 8 月.

(11) 遠藤真理、星野卓之、及川哲郎、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルにおける ^{13}C 酪酸注腸呼気試験を指標とした漢方薬の有効性の検討. 第 27 回和漢医薬学会学術大会: 京都; 2010. 8 月.

(12) 及川哲郎、遠藤真理、羽鳥 努、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスに対する柴苓湯の効果. 第 96 回日本消化器病学会総会: 札幌; 2010. 4 月.

(13) 及川哲郎、遠藤真理、伊藤直樹、渡辺浩二、羽鳥 努、齊藤紀彦、花輪壽彦; Paclitaxel 惹起性末梢神経障害モデルマウスに対する漢方薬の効果. 第 26 回和漢医薬学会学術大会: 千葉; 2009. 8 月.

(14) 遠藤真理、及川哲郎、羽鳥 努、松本 司、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する漢方薬の有効性～Balb/c マウスと C57BL/6 マウスの比較検討～. 第 26 回和漢医薬学会学術大会: 千葉; 2009. 8 月.

(15) 渡辺浩二、日向須美子、日向昌司、関口敦子、遠藤真理、津田篤太郎、及川哲郎、山口照英、花輪壽彦; 温経湯の選択的エストロゲン受容体モジュレーター様作用について. 第

25 回和漢医薬学会大会: 大阪; 2008. 8 月.

(16) 遠藤真理、羽鳥 努、及川哲郎、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスに対する漢方薬の効果. 第 25 回和漢医薬学会大会: 大阪; 2008. 8 月.

(17) 及川哲郎、遠藤真理、羽鳥 努、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスに対する漢方薬の効果. 第 94 回日本消化器病学会総会: 福岡; 2008. 5 月.

(18) 遠藤真理、羽鳥 努、及川哲郎、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルに対する黄連解毒湯の効果の検討. 第 24 回和漢医薬学会大会: 富山; 2007. 9 月.

(19) 遠藤真理、蒲生裕司、伊藤直樹、羽鳥 努、及川哲郎、花輪壽彦; 潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いた甘麦大棗湯の薬効評価の検討. 第 23 回和漢医薬学会大会. 岐阜; 2006. 8 月.

(20) 遠藤真理、花輪壽彦; 芍薬甘草湯の芍薬と甘草の効果的な配合比の検討. 第 55 回日本東洋医学会学術総会: 大阪; 2006. 6 月.

(21) Hiroshi Odaguchi, Akino Wakasugi, Hisakazy Shoda, Hidenori Ito, Toshihiko Hanawa, Yukari Gono, Mari Endo, Sung-Joon Kim and Fumihiko Sakai; Efficacy of goshuyuto, the representative Kampo (Japanese herbal) medicine for headache, in chronic headache: a responder-limited, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. XII Congress of the International Headache Society: Kyoto; 2005. Oct.

(22) 早崎知幸、松本 司、遠藤真理、川久保安朗、花輪壽彦、山田陽城; 食物アレルギーモデルマウスの作製と漢方薬の薬効評価への応用. 第 27 回日本小児東洋医学会秋季大会: 神戸; 2005. 9 月.

(23) 早崎知幸、松本 司、遠藤真理、山田陽城、花輪壽彦; 食物アレルギーモデルマウスを使った桂枝加芍薬湯の有効性の検討. 第 22 回和漢医薬学会大会: 東京; 2005. 8 月.

(24) 遠藤真理、花輪壽彦; 芍薬甘草湯の芍薬及び甘草の配合比の検討. 第 22 回和漢医薬学会大会: 東京; 2005. 8 月.

(25) 遠藤真理、花輪壽彦; ワーファリン使用中に漢方治療を併用し、ワーファリンのコントロールに異常をきたした 4 症例. 第 21 回和漢医薬学会大会: 富山; 2004. 8 月.

(26) 遠藤真理、花輪壽彦; 漢方薬の血液凝固系及び血小板凝集能に対する影響. 第 20 回和漢医薬学会大会: 熊本; 2003. 8 月.

- (27) 早崎知幸、遠藤真理、松本 司、花輪壽彦、山田陽城; 抗原の反復投与により発症する食物アレルギーモデルマウスの作製と漢方薬の薬効評価への応用. 第 2 回腸管機能と免疫研究会学術集会. 東京; 2002. 11 月.
- (28) 遠藤真理、早崎知幸、松本 司、花輪壽彦、山田陽城; 抗原の反復投与により発症する食物アレルギーモデルマウスの作製と漢方薬の薬効評価への応用. 第 19 回和漢医薬学会大会: 千葉; 2002. 8 月.
- (29) 遠藤真理、保崎清人、友池仁暢、岡崎三代; ヘパリン静注によるリポ蛋白粒子サイズの変化 -HPLC 法による検討-. 第 48 回日本生理人類学会大会: 東京; 1999. 6 月.
- (30) 鳥海彩子、奈良雅之、岡崎三代、臼井真一、井橋幸恵、遠藤真理、保崎清人、福井昭男、友池仁暢; ガウス近似法(HPLC)による LDL および HDL サブクラスの解析とその臨床的意義(第 2 報). 第 30 回動脈硬化学会総会. 東京; 1998. 12 月.
- (31) Tomoko Sagai, Tsuyoshi Koide, Mari Endo, Kenjiro Tanoue, Yoshiaki Kikkawa, Hiromichi Yonekawa, Serichi Ishiguro, Makoto Tamai, Yoichi Matsuda, Shigehora Wakana, Toshihiko Shiroishi.; Rim2 (Recombination induced mutation 2) is a new allele of pearl and a mouse model of human Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS) :genetic and physical mapping. 11th International Mouse Genome Conference: Florida, USA ; 1998. Oct.
- (32) 坂下千端、秋山秀樹、市川幹、中根 実、中村典彦、大橋一輝、谷川 宗、坂巻 壽、遠藤真理、田上憲次郎; 同種骨髄移植患者の血管内皮傷害と ATP storage pool の検討. 第 60 回日本血液学会総会: 大阪; 1998. 3 月.
- (33) Kenjiro Tanoue, Mari Endoh, Hideki Akiyama, Kazumasa Aoki, Shu Tanikawa, Hisashi Sakamaki.; Acquired storage pool diswases of platelets in bone marrow transplanted patients. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XII th. Congress: Florence, Italy; 1997. Jly.
- (34) Kazumasa Aoki, Mari Endoh, Tomoko Sagai, Toshihiko Shiroishi, Kenjiro Tanoue.; rim2 mouse, a new animal model of Hermansky-Pudlak syndorome, especially Empty Sack syndorome. The International Society on Thrombosis and Haemostasis XII th. Congress: Florence, Italy; 1997. Jly.
- (35) 遠藤真理、青木一正、田上憲次郎、秋山秀樹、谷川 宗、坂巻 壽、小野沢康輔 ; 骨髄移植患者における血小板の後天性ストレージ・プール病. 第 59 回日本血液学会総会: 京都; 1997. 3 月.
- (36) 遠藤真理、鈴木英紀、山口敦美、山本正雅、山崎博男、嵯峨井知子、森脇和郎、城石

俊彦、田上憲次郎; Empty sack 症候群を呈する血小板 Storage pool のモデル動物 rim2 マウス. 第 58 回日本血液学会総会: 宇都宮; 1996. 4 月.

(37) 嵯峨井知子, 小出 剛, 若菜茂晴, 吉川欣亮, 米川博通, 遠藤真理, 田上憲次郎, 石黒誠一, 玉井 信, 松田洋一, 森脇和郎, 城石俊彦 ; MHC 領域内組換え体に由来する rim2 突然変異の分子遺伝学的解析. 第 18 回日本分子生物学会年会: 名古屋; 1995. 12 月.

(38) 遠藤真理、山口敦美、赤松紀子、鈴木英紀、山本正雅、山崎博男、田上憲次郎、嵯峨井知子、森脇和郎、城石俊彦 ; Storage pool 病の新しいモデル動物 rim2 マウス. 第 18 回日本血栓止血学会学術集会: 博多; 1995. 12 月.

(II) その他の発表

(1) 遠藤真理; 漢方医学の臨床 (その 2) 臨床の為の基礎研究の実際 漢方薬の薬効の科学的解明 ~その研究方法について~. 北里大学薬学部 東洋医学精説 講義: 東京; 2013. 5 月.

(2) 遠藤真理、及川哲郎、星野卓之、羽鳥 務、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスにおける ^{13}C 酪酸注腸呼吸試験を指標とした漢方薬の有効性の検討. 第 6 回北里研究所病院研究発表会: 東京; 2010. 11 月.

(3) 遠藤真理、及川哲郎、羽鳥 努、松本 司、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスに対する漢方薬の効果の検討~特に柴苓湯の有効性に関して~. 第 5 回北里研究所病院研究発表会: 東京; 2009. 11 月.

(4) 遠藤真理、羽鳥努、及川哲郎、花輪壽彦; デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎モデルマウスに対する漢方薬の有効性の検討. 第 180 回北里研究会: 東京; 2008. 9 月.

論文

(I) 原著

(1) Mari Endo, Masatoshi Hori, Hiroshi Ozaki, Tetsuro Oikawa, Toshihiko Hanawa; Rikkunshito, a Kampo medicine, ameliorates post-operative illues by anti-inflammatory action. J Pharmacol Sci 2014; doi: 10.1254/jphs.13182FP.

(2) Mari Endo, Tetsuro Oikawa, Takayuki Hoshino, Tsutomu Hatori, Tsukasa Matsumoto, Toshihiko Hanawa; The ^{13}C -butyrate breath test: A new non-invasive method for assessing colitis in a murine model. J Pharmacol Sci 2013; 123:176-84.

- (3) Mari Endo, Masatoshi Hori, Hiroshi Ozaki, Tetsuro Oikawa, Toshihiko Hanawa; Daikenchuto, a traditional Japanese herbal medicine, ameliorates postoperative ileus by anti-inflammatory action through nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Gastroenterology* 2013; doi; 10.1007/s00535-013-0854-6.
- (4) Mari Endo, Tetsuro Oikawa, Takayuki Hoshino, Tsutomu Hatori, Tsukasa Matsumoto, Toshihiko Hanawa; Suppression of murine colitis by Kampo medicines, with special reference to the efficacy of saireito. *J Trad Med* 2009; 26:110-21.
- (5) Koji Watanabe, Sumiko Hyuga, Masashi Hyuga, Atsuko Sekiguchi, Mari Endo, Tokutaro Tsuda, Tetsuro Oikawa, Teruhide Yamaguchi and Toshihiko Hanawa; Unkeito, a traditional Kampo formula exhibits a selective estrogen receptor modulator-like activity. -Prevention of osteoporosis in ovariectomized mice-: *Journal of Traditional Medicines* 2009; 26:18-24.
- (6) Takayuki Hoshino, Tetsuro Oikawa, Mari Endo, Toshihiko Hanawa; The utility of noninvasive ¹³C-acetate breath test using a new solid test meal to measure gastric emptying in mice. *J Smooth Muscle Res* 2008; 44: 159-65.
- (7) Chizuko Sakashita, Hideki Akiyama, Yoriko Satoh, Takashi Inoue, Kazuteru Ohashi, Shin-ichiro Mori, Hisashi Sakamaki, Kiyoshi Hiruma, Mari Endoh, Noriko Akamatsu, Kenjiro Tanoue; Acquired storage-pool disorders occurring late after allogeneic bone marrow transplantation: partial activation of platelets in asymptomatic patients. *Int J Hematol* 2001; 74: 222-7.
- (8) 田上憲次郎、遠藤真理、赤松紀子、山口敦美、秋山秀樹、坂下千端、坂巻壽; 造血幹細胞移植後の遷延性血小板減少症の原因の研究. *腎臓* 1998; 21:166-8.
- (9) 遠藤真理、田上憲次郎、山崎博男; 血小板 Storage Pool 病の動物モデルの確立. *実践女子大学生生活科学部紀要* 1998; 35: 72-6.
- (10) Tomoko Sagai, Tsuyoshi Koide, Mari Endo, Kenjiro Tanoue, Yoshiaki Kikkawa, Hiromichi Yonekawa, Serichi Ishiguro, Makoto Tamai, Yoichi Matsuda, Shigehora Wakana, Toshihiko Shiroishi; rim2 (recombination-induced mutation 2) is a new allele of pearl and a mouse model of of human Hermansky-Pudlak syndrome (HPS):genetic andphysical mapping. *Mamm Genome* 1998; 9:2-7.
- (11) Hidehiko Akiyama, Harumi Yoshinaga, Mari Endoh, Shu Tanikawa, Hisashi Sakamaki, Kenjiro Tanoue, Y Onozawa.; Microangiopathy without hemolysis in a patient following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:261-3.

(II) 総説

(1) Mari Endo, Tetsuro Oikawa, Tsutomu Hatori, Tsukasa Matsumoto, Toshihiko Hanawa; Current status of basic reserch in Kampo therapy using a murine colitis. J Trad Med 2011; 28:93-105.

(III) 症例・臨床治験・その他

(1) Mari Endo, Tomoyuki Hayasaki, Tetsuro Oikawa, Toru Akahoshi, Toshihiko Hanawa; A cases in which Kampo medicines affected on warfarin control. J Trad Med 2008; 25:122-4.

(2) Mari Endo, Tetsuro Oikawa, Shinyu Nunome, Haruki Yamada, Toshihiko Hanawa; Pharmacological anlysis for the optimal combination ratio of Shakuyakua and Kanzo in Shakuyakukanzoto: J Trad Med 2007; 24:39-42.

(3) Hiroshi Odaguchi, Akino Wakasugi, Hidenori Ito, Hisakazu Shoda, Yukari Gono, Sung-Joon Kim, Mari Endo, Tetsurho Oikawa, Fumihiko Sakai, Toshihiko Hanawa; Statistical Analysis of the Findings in Patients Responded to Goshuyuto. Kampo Med 2007; 58:1099-105.

これまでに受けた研究費

(I) 科学研究費補助金

(1) 基盤研究 (C) 2013; 研究課題名: 腸閉塞モデルマウスにおける大建中湯の有効性とその作用機序, 研究代表者: 及川哲郎, 連携研究員: 堀 正敏, 遠藤真理.

(2) 若手研究 (B) 2011, 2012; 研究課題名: 漢方薬によるマウス大腸炎の治療効果を評価できる ^{13}C 酪酸注腸呼気試験の確立, 研究代表者: 遠藤真理. (J Pharmacol Sci 2013; 123:176-84.)

(3) 若手研究 (B) 2008, 2009; 研究課題名: 潰瘍性大腸炎に対する漢方薬の有効性の評価 研究代表者: 遠藤真理. (J Trad Med 2009; 26:110-21.)

(II) その他の補助金

(1) 平成 24 年度 公益財団法人 上原記念生命科学財団 研究助成金 2013; 研究課題名: 腸閉塞モデルマウスにおける漢方薬の有効性とその作用機序, 研究代表者: 遠藤真理.

(2) 平成 23 年度第 24 期 北里大学学術奨励資金 2011; 研究課題名: 漢方薬によるマウス大腸炎の治療効果を評価できる ^{13}C 酪酸注腸呼気試験の確立, 研究代表者: 遠藤真理. (J Pharmacol Sci 2013; 123:176-84.)

(3) 平成 22 年度第 23 期 北里大学学術奨励資金 2010; 研究課題名: 漢方薬など薬物の治療効果をより正確に評価出来る大腸炎モデルの確立, 研究代表者: 遠藤真理. (J Pharmacol Sci 2013; 123:176-84.)

(4) 平成 19 年度第 17 回 北里研究所研究奨励金 2007; 研究課題名; 各種漢方薬の炎症性腸疾患における有効性の検討: 研究代表者: 遠藤真理. (J Trad Med 2009; 26:110-21.)

(5) 日本漢方生薬製剤協会助成金 2003; 研究課題名: 漢方薬の血液凝固・凝固系に対する作用について～特に西洋薬との相互作用に関して～, 研究代表者: 遠藤真理. (J Trad Med 2008; 25: 122-4.)

受賞歴

(1) 2012 第 14 回日本神経消化器病学会 優秀演題賞

(2) 2010 第 6 回北里研究所病院研究発表会 奨励賞

(3) 2010 2010 年度和漢医薬学会奨励賞

(J Trad Med 2008; 25:122-4., J Trad Med 2009; 26:110-21.)

(4) 2005 第 22 回和漢医薬学会大会 若手研究者優秀賞

(5) 2002 第 19 回和漢医薬学会大会 若手研究者奨励賞

10. 图表

【腸閉塞; intestinal obstruction = イレウス; ileus】

腸管内容物の肛門側への移動が障害される病態

《症状》



腹部膨満感
悪心
嘔吐
排便・排ガスの途絶

《分類》

機械性イレウス; Intestinal obstruction

単純性イレウス

胆石・胃石・異物・腫瘍……腸管内腔の閉塞

癒着性イレウス

先天的な要素

複雑性(絞扼性)イレウス

癒着性イレウス

先天的な要素

ヘルニア嵌頓

腸重積

腸軸捻転

機能性イレウス; ileus

麻痺性イレウス

腸管麻術後痺

急性腹膜炎

薬剤性腸管麻痺

電解質異常

偽性腸閉塞症……Ogilvie症候群、強皮症、糖尿病、アミロイドーシス

《治療》

絶食・輸液

経鼻胃管による逆流した腸内容の吸引

減圧イレウス管による腸閉塞部の拡張

癒着性イレウスでは手術適応

麻痺性イレウスでは蠕動亢進薬

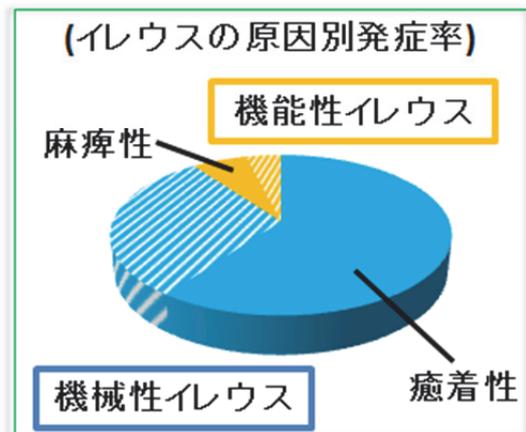


図 1. イレウスの概要

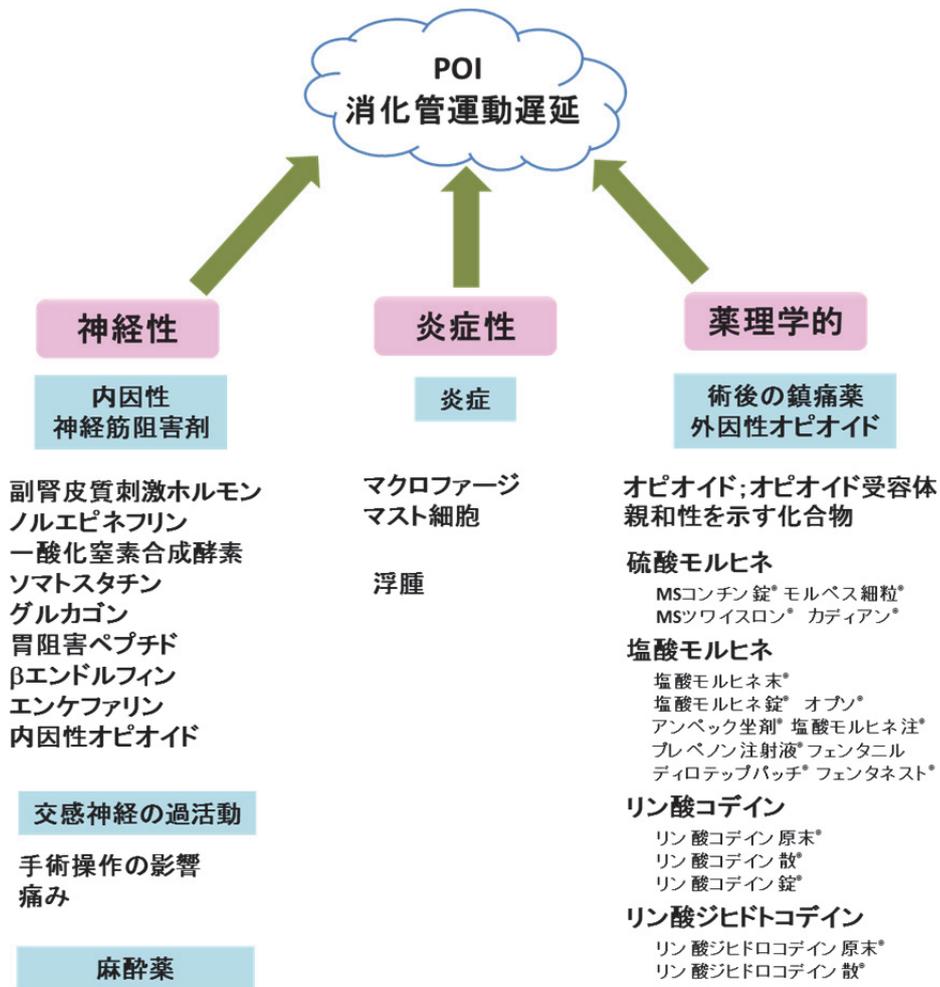


図 4. POI の発症機序

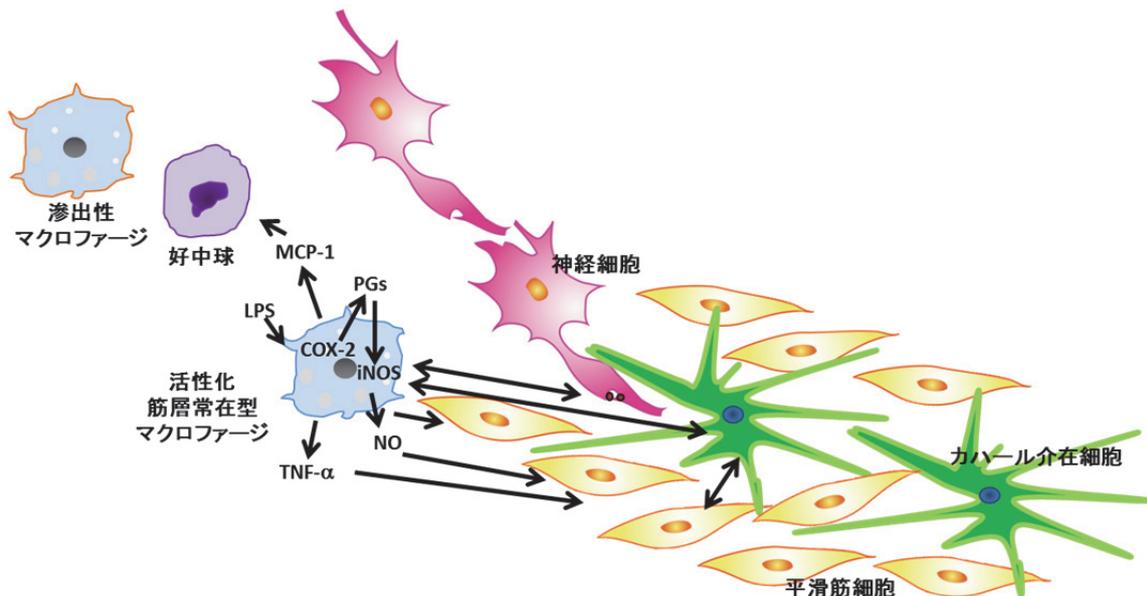


図 5. 消化管炎症による消化管平滑筋収縮抑制機構

POI において消化管筋層部や筋層部に滲出してきたマクロファージが主役となって消化管運動障害を引き起こすことが分かってきた。

表 1. POI 治療に用いられる消化管運動促進薬とその問題点

薬剤名	作用機序	問題点
メクロプラミド (制吐作用・消化管運動促進作用) (プリンペラン®)	D ₂ 受容体遮断 5-HT ₃ 受容体拮抗・5-HT ₄ 受容体活性化	時に、中枢性の錐体外 路障害 (血液脳関門を通過)
シサプリド (メクロプラミドより誘導された。 消化管運動促進作用のみを 有する) (アセナリン® リサモール®)	5-HT ₁₋₃ 受容体拮抗 5-HT ₄ 受容体活性化	心室性不整脈
クエン酸モサプリド (ガスモチン®)	5-HT ₄ 受容体活性化	重大な副作用はなし (肝機能障害) 有効性が不十分

表 2. 大建中湯の構成生薬

大建中湯 ; Daikenchuto (DKT)



人参; Ninjin (*Ginseng Radix*) 3.0g

ウコギ科・オタネ人参の細根を除いた根
 体力や抵抗力を高める補気薬
 胃腸運動や消化吸収機能を高める



乾姜; Kankyo (*Zingiberis Siccatum Rhizoma*) 3.0g

生姜科・生姜の根茎 湯通し又は蒸してからコルク皮を除き煮沸乾燥したもの
 体を温める作用が強い
 身体の機能低下、低体温を回復、冷えによる腹痛や下痢を改善



山椒; Sansyo (*Zanthoxylum fructus*) 2.0g

ミカン科・山椒の熟果皮
 芳香性健胃薬・整腸薬、腹部ガス停滞・腹痛を改善



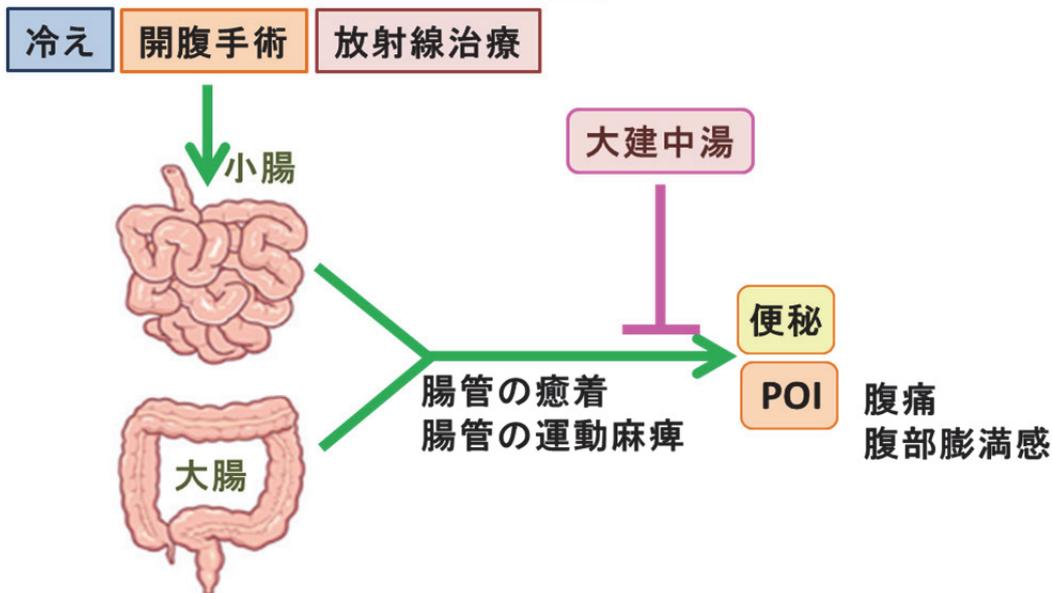
膠飴; Koi (*Saccharum Granorum*) 20g

イネ科・糠米、小麦の種子に麦芽を加えて加工精製により糖化した飴
 麦芽糖(マルトース)やデキストリンが含まれる
 胃腸虚弱、冷えに伴う腹痛を緩和

【適応・効能】

- 体力低下
 - 四肢・腹部に冷え
 - 腹痛、腹部膨満、鼓腸
- 1) 腹壁が薄く軟弱無力で蠕動不安を認める。
 - 2) 冷えにより症状が悪化する。
 - 3) 開腹術後の腸管通過障害に伴う腹痛、腹部膨満感。

がん性疼痛の治療薬(モルヒネ)投与



- ### 【薬効薬理・作用機序】
- 消化管運動促進作用
 - モルヒネによる便秘；モチリン濃度上昇
 - 消化管ホルモンに対する作用
 - イレウス改善作用
 - 消化管機能異常改善作用

- ### 【作用機序】
- 消化管運動促進作用
 - 平滑筋刺激、5-HT₄受容体を介したアセチルコリンの分泌促進
 - 腸に分布する末梢神経を刺激する
 - 消化管運動を促進する消化管ホルモンの分泌を促進する
 - 神経ペプチドカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)を介した腸管の血流増加
 - シクロオキシゲナーゼ(COX)-2 選択的抑制作用

図 6. 大建中湯の適応

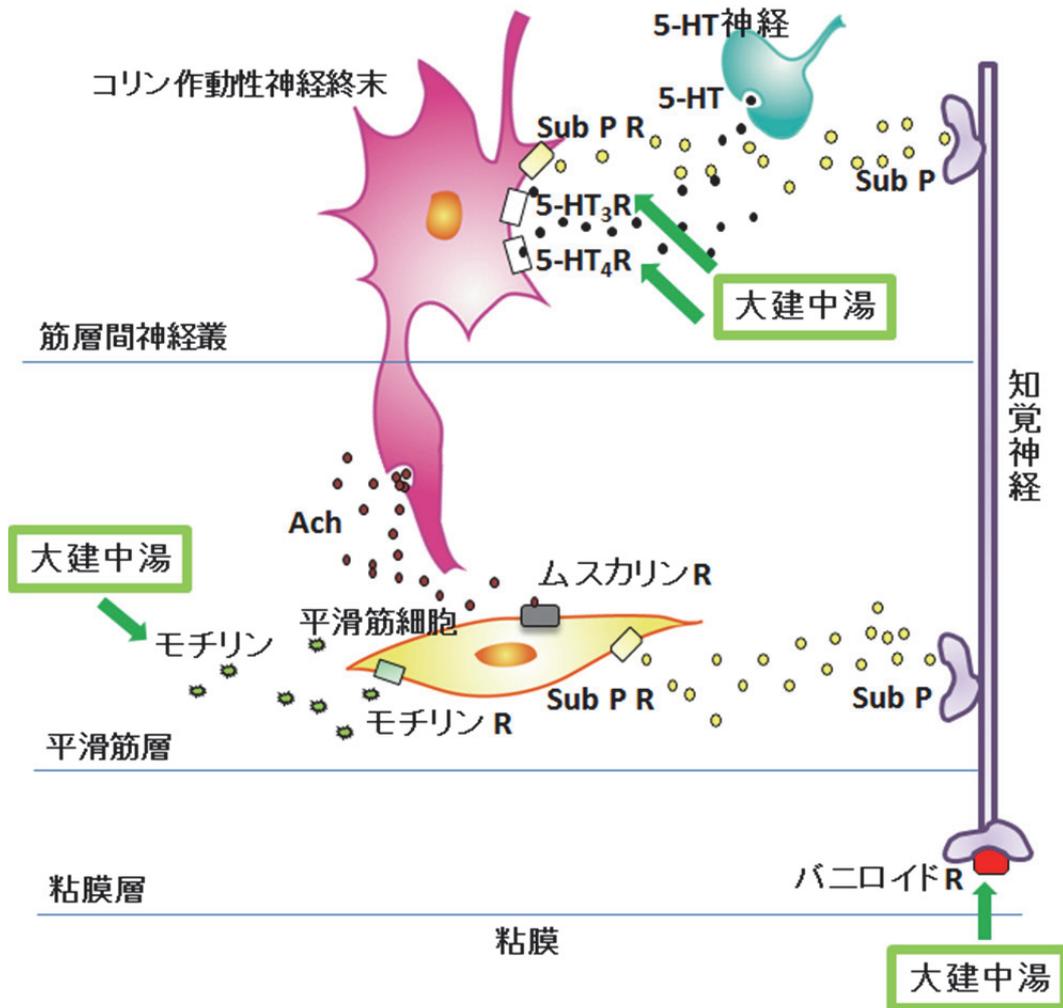
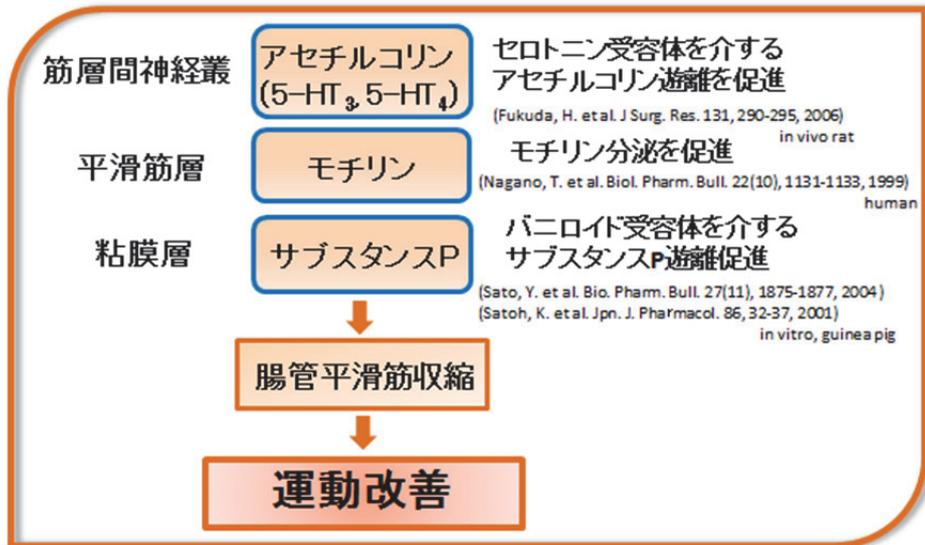
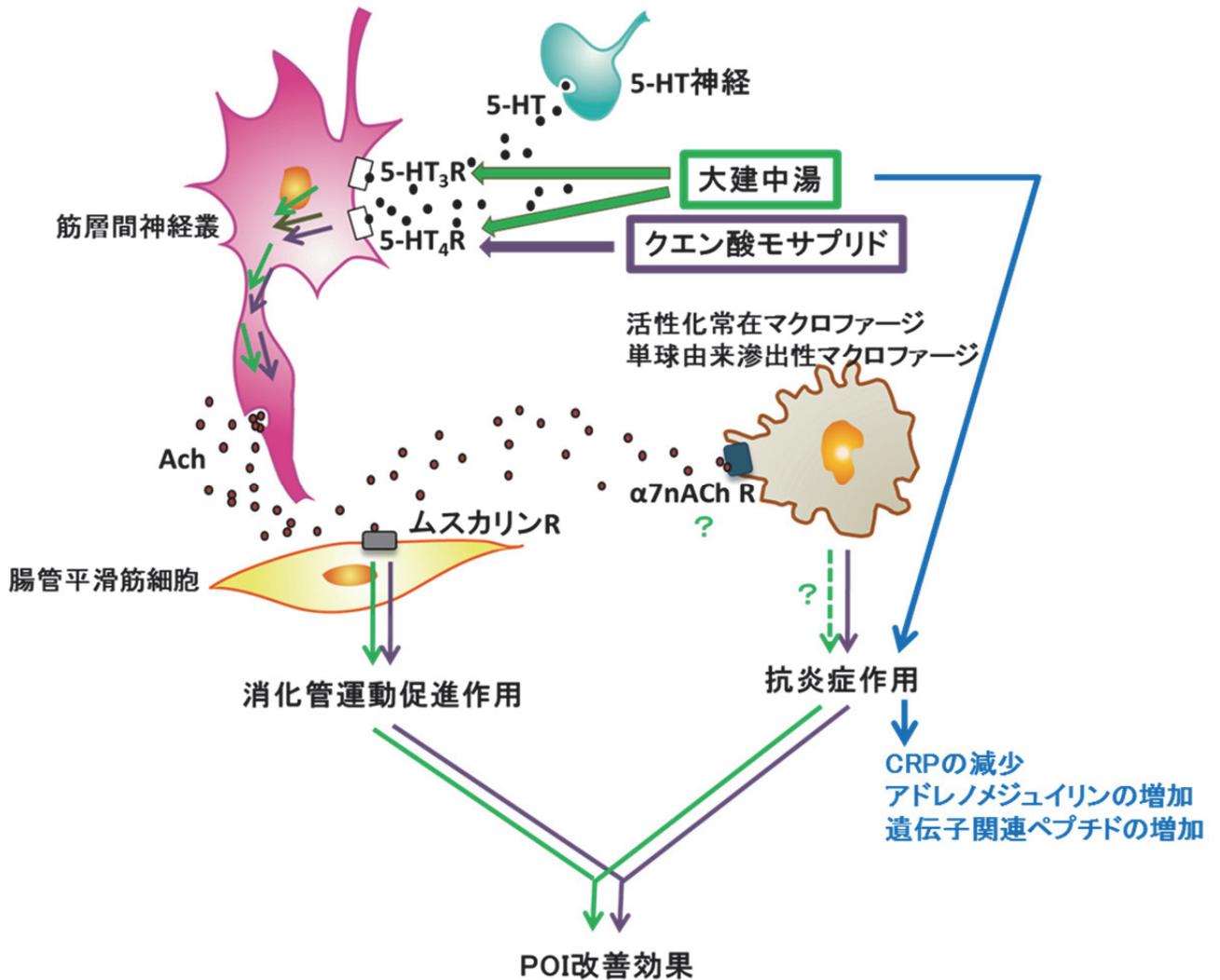


図 7. 大建中湯の運動亢進作用のメカニズム



**図 8. 大建中湯とクエン酸モサプリドの
POI 改善効果の作用機序における共通点**

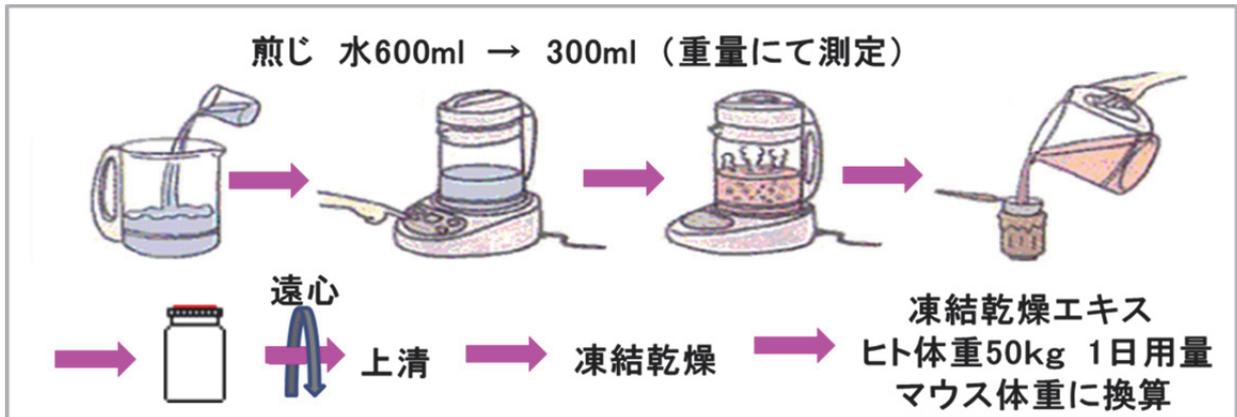


図 9. 自家製大建中湯エキス調整方法

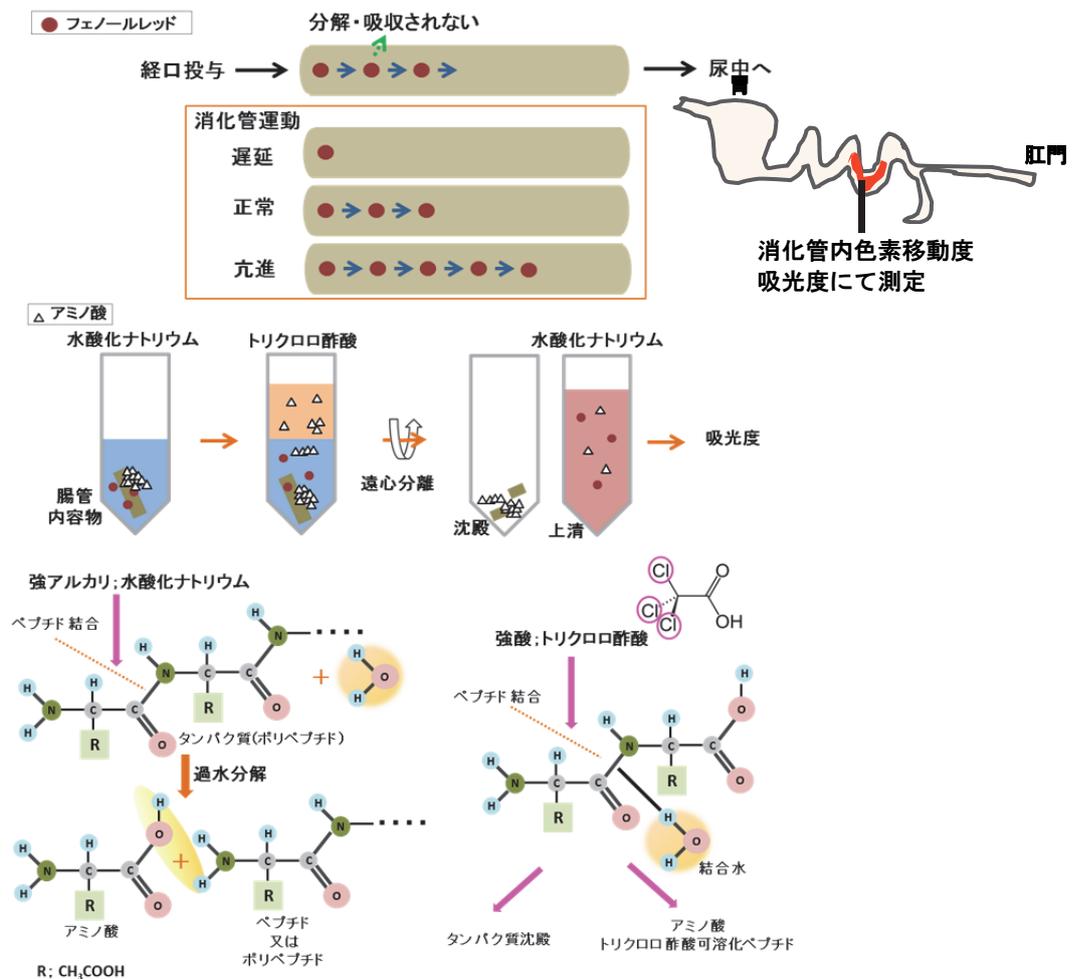
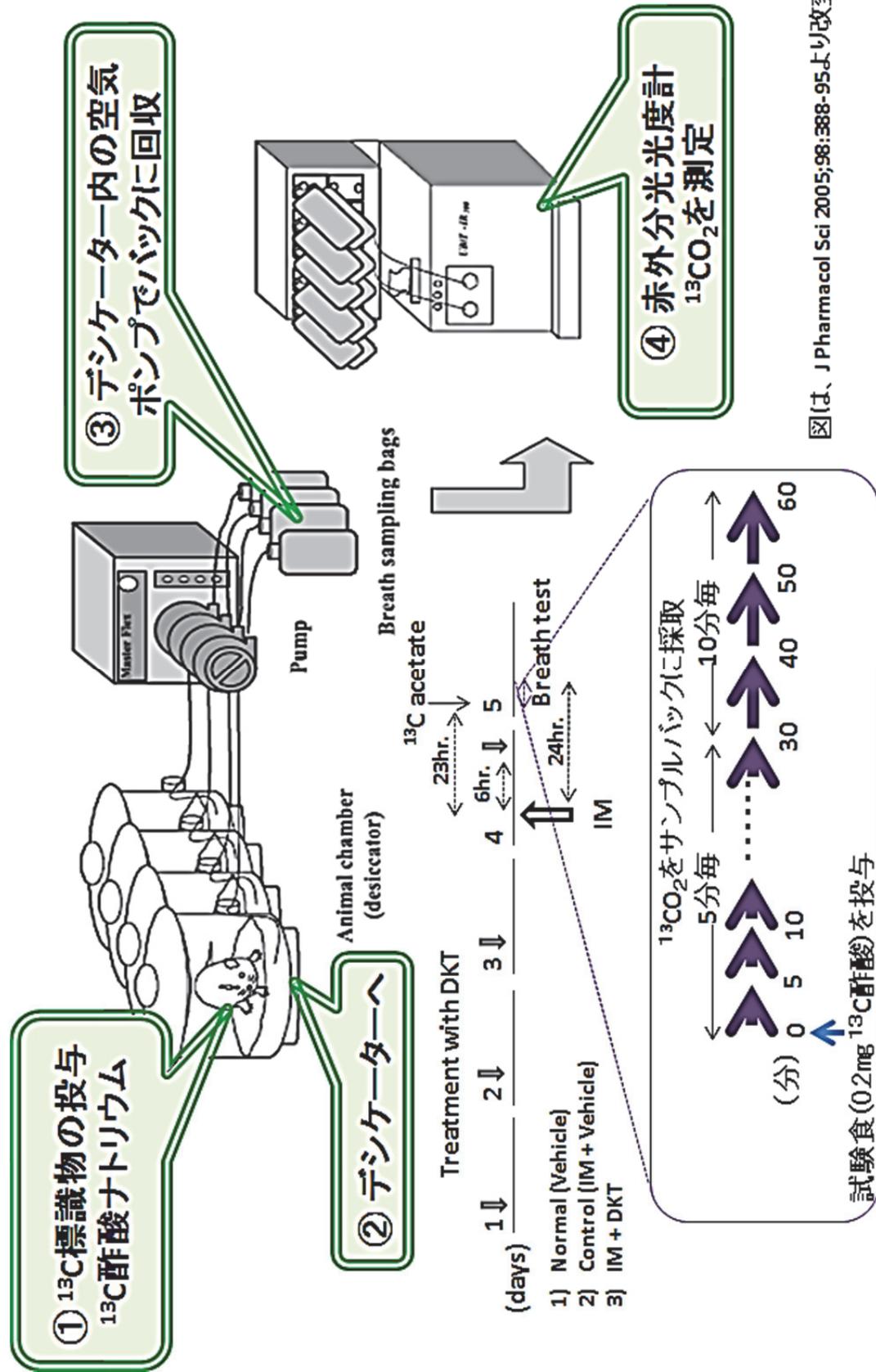


図 10. 腸管内色素輸送能による腸管輸送能の測定原理



図は、J Pharmacol Sci 2005;98:388-95より改変

図 11. ^{13}C 酢酸を用いたマウス非侵襲的呼気試験

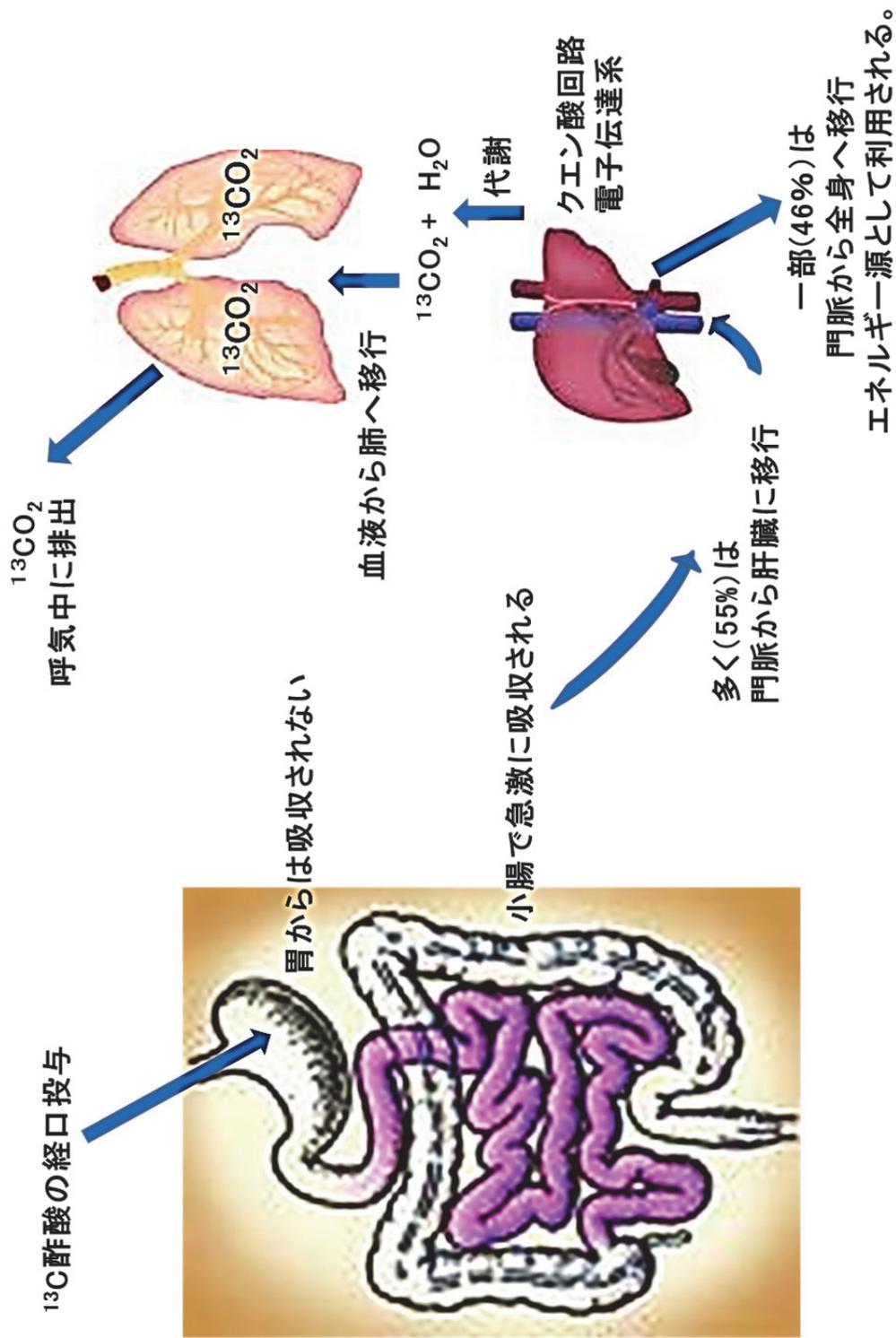
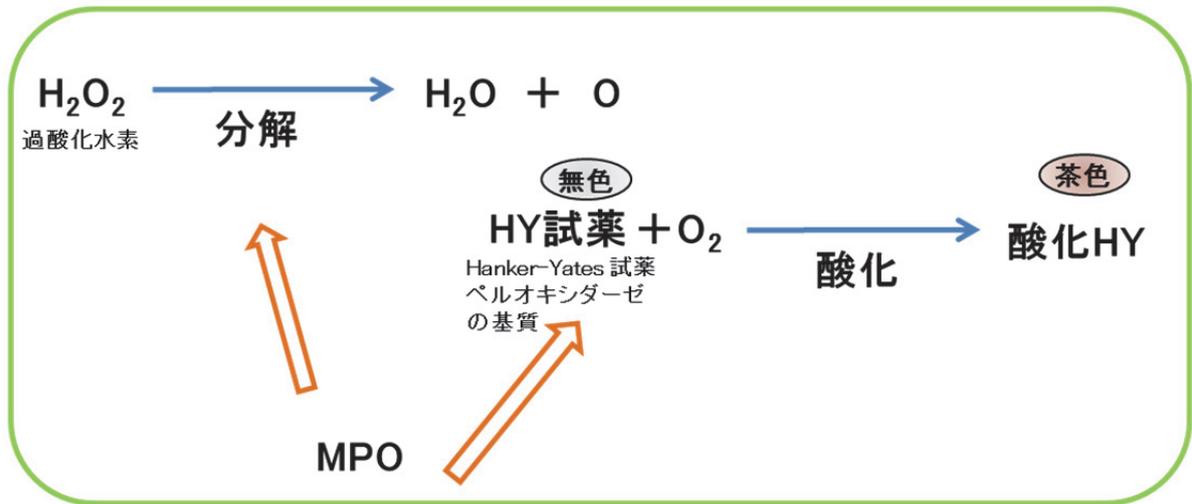


図 12. ^{13}C 酢酸呼気試験の胃排出能評価の原理

MPO染色



MPO活性

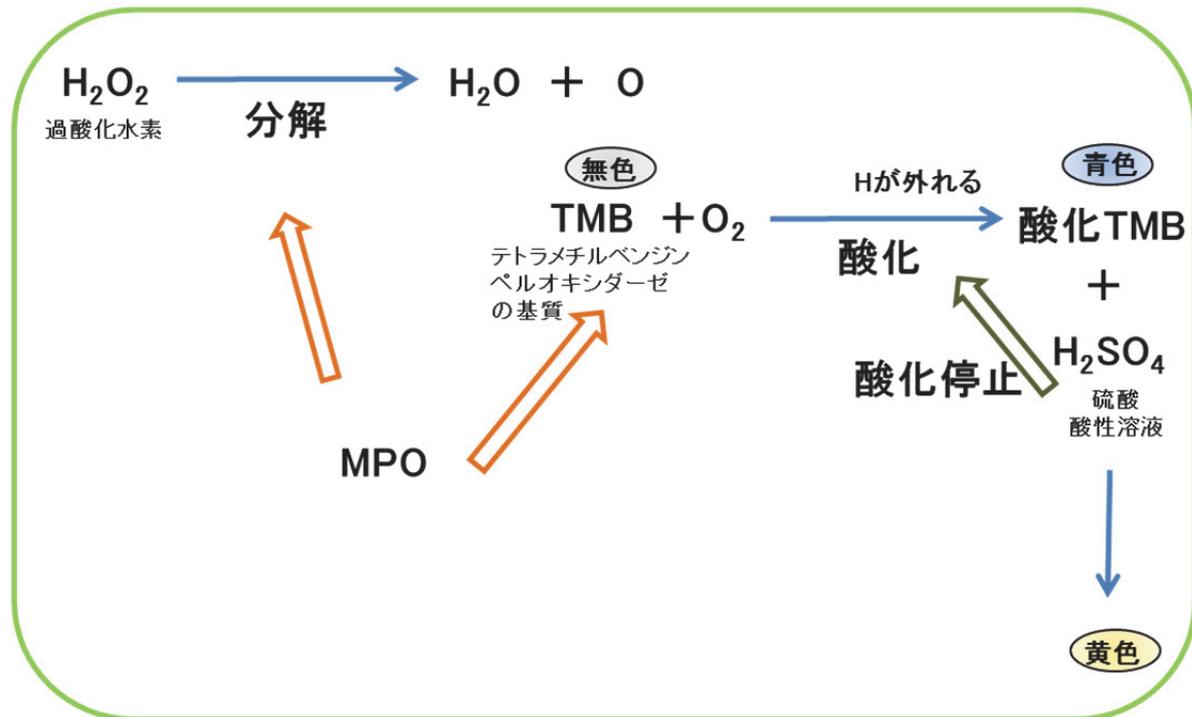


図 13. MPO 測定 の 原理

表 3. PCR プライマーの塩基配列、Tm 値、増幅サイズ

Gene (Locus)	Forward Primers Reverse Primers	Tm (°C)	PCR cycles	Size (bp)
GAPDH (NM 007778.2)	TGTTCCCTACCCCAATGTGT CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	58	32	269
TNF- α (NM 013693)	ACGGCATGGATCTCAAAGAC CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	58	32	324
IL-6 (NM 031168)	TCTCTGGGAAATCGTGGAAA GATGGTCTTGGTCTTAGCC	58	32	397
IL-1 β (NM 008361)	TGACGTTCCATTAGACAGC TGGGGAAGGCATTAGAAACA	58	37	497
MCP-1 (NM 011333)	CCCACTCACCTGCTGCTACT AAGGCATCACAGTCCGAGTC	58	32	381
iNOS (BC 062378.1)	AAGAGAGTGCTGTTCCAGGT CCACCAGCTTCTTCAACGTG	58	37	196

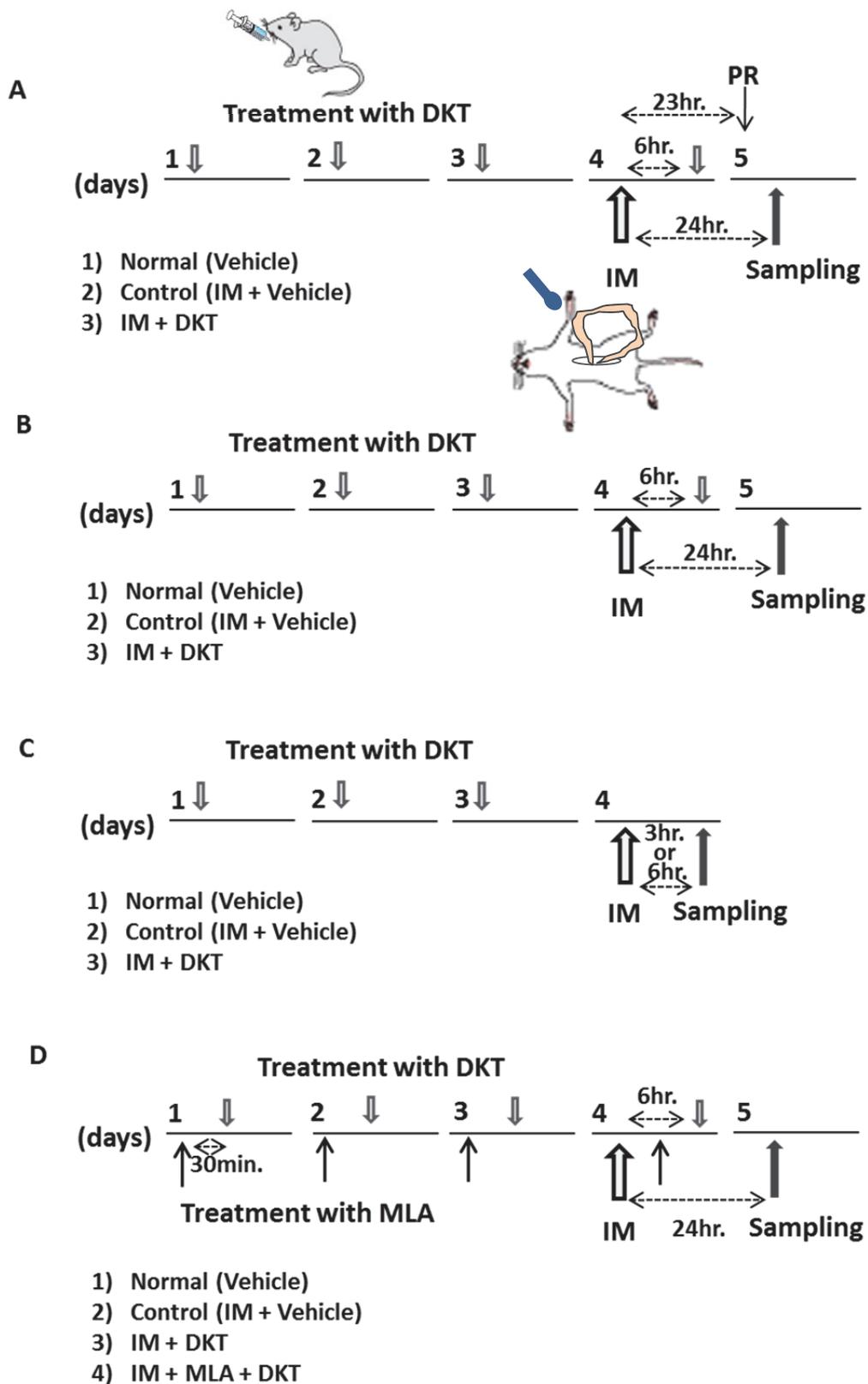


図 14. 実験スケジュール

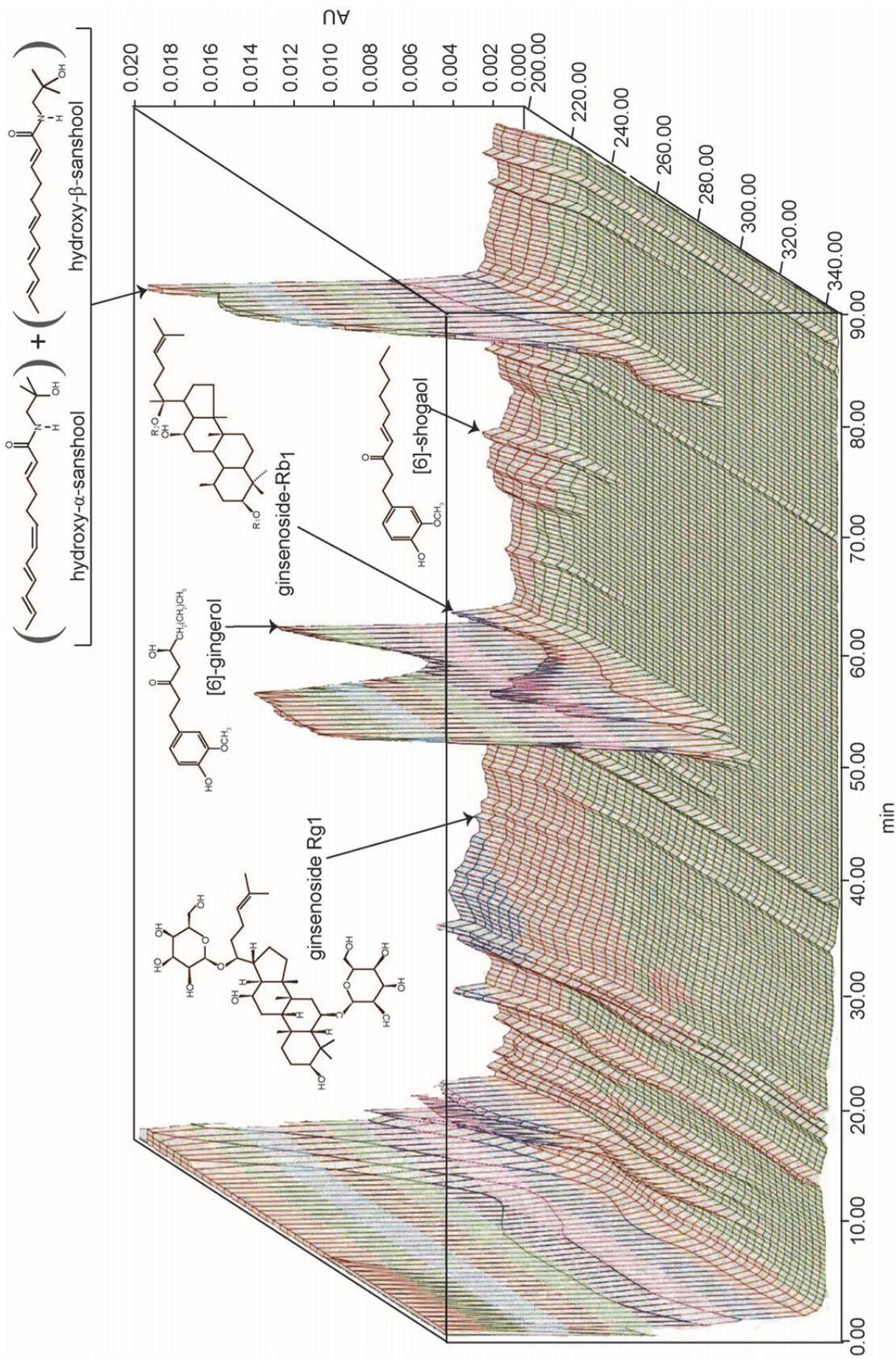


図 15. 大建中湯の HPLC プロファイル

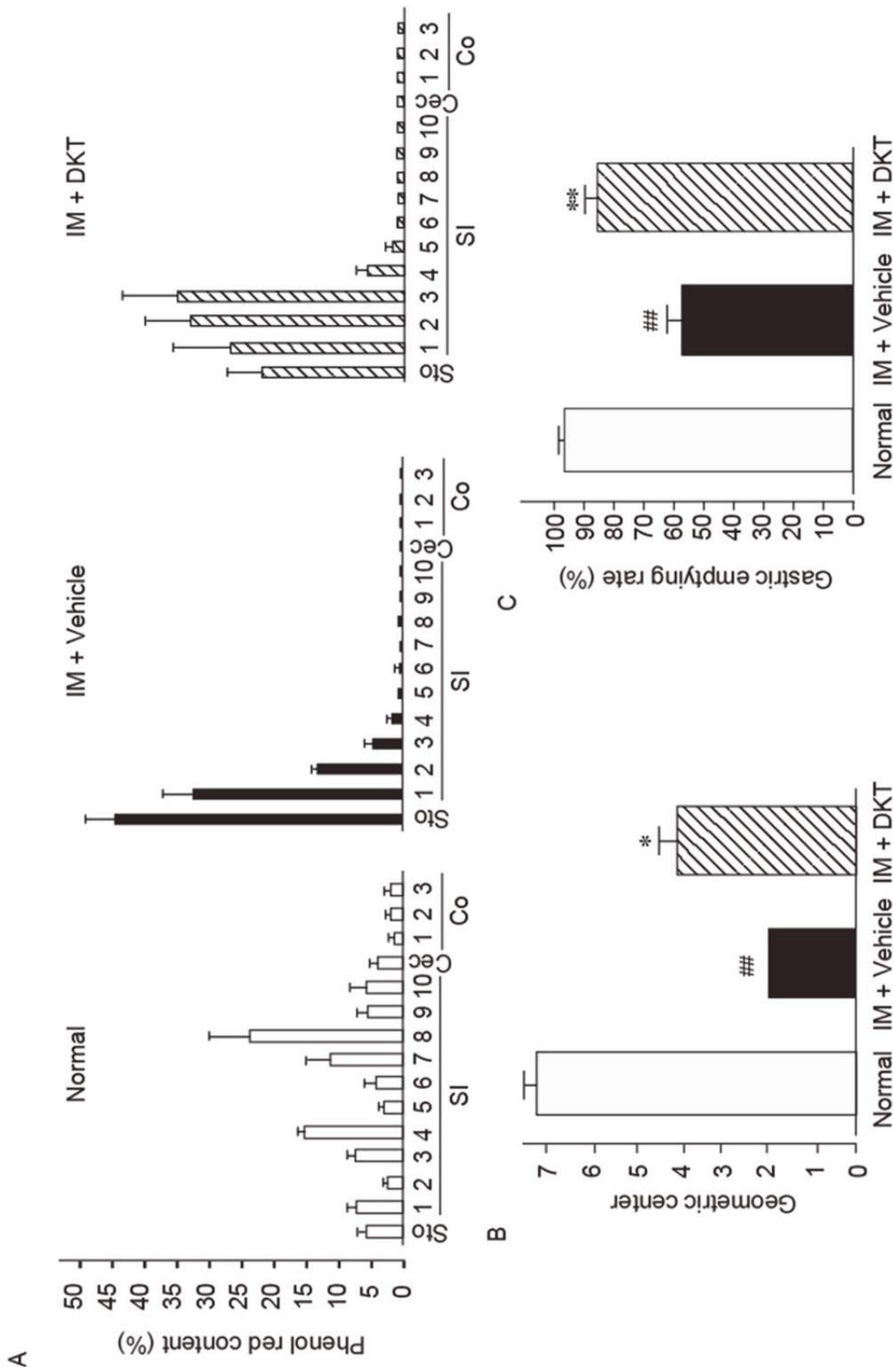
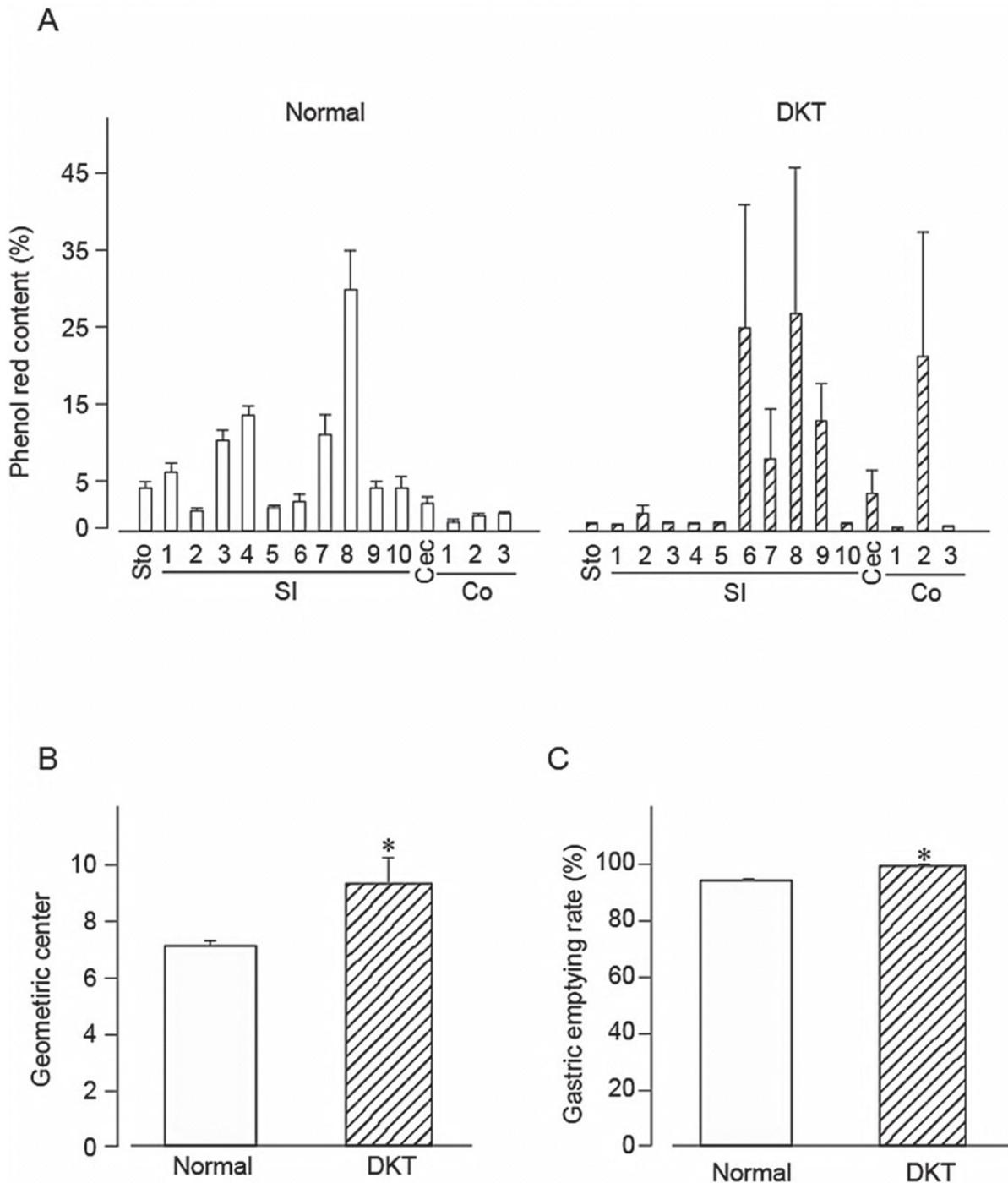


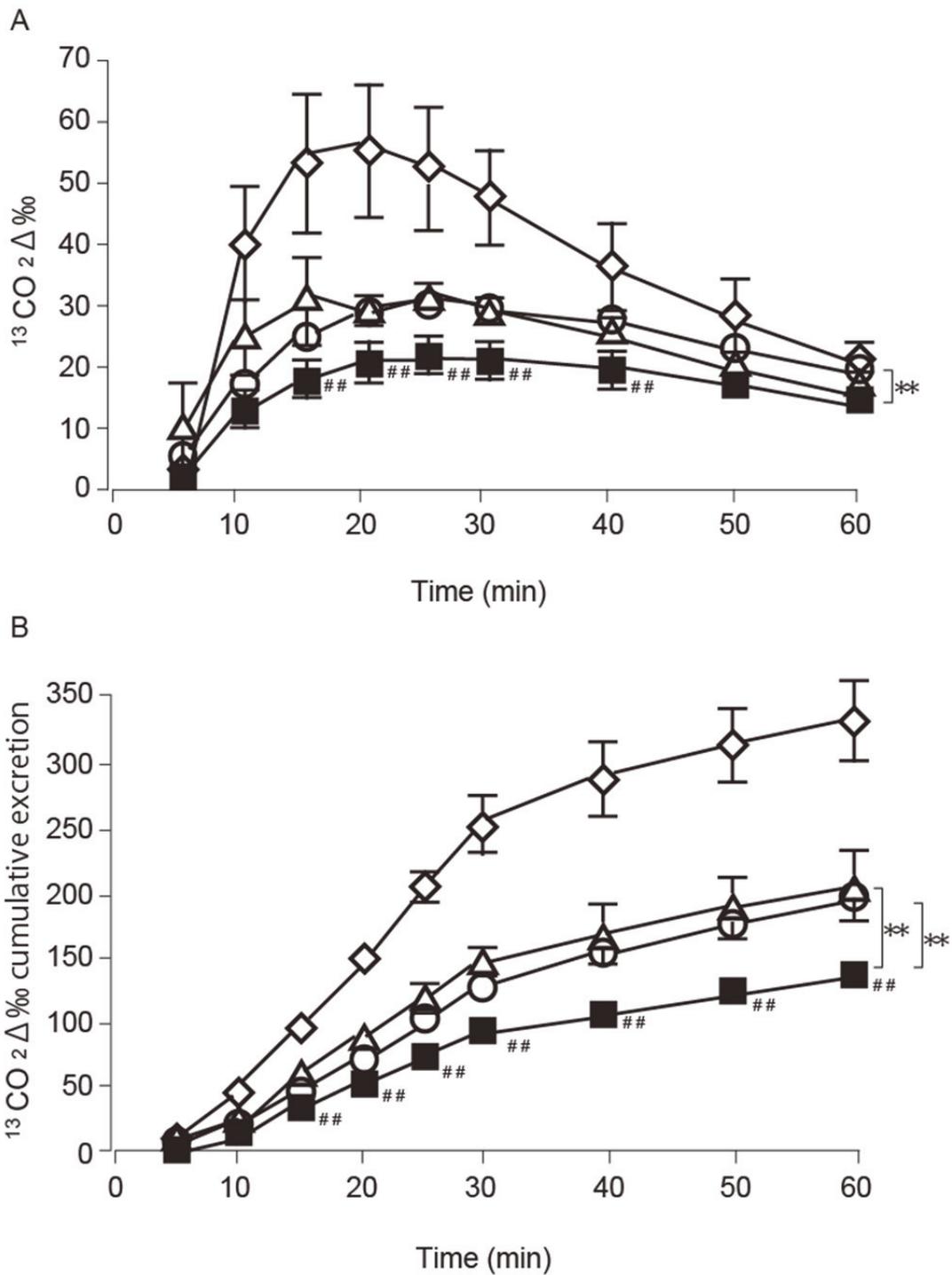
図 16. マウス POI モデルにおける大建中湯の消化管運動遅延の回復

詳細な手順は実験材料及び方法で述べた。Aは、正常群のPRの分布(左のパネル)、IM24時間後の分布(真ん中のパネル)、DKT(95mg/kg)を投与したIM群(右のパネル)を示した。各カラムはn=4/群の平均 ± 標準誤差を示した。BとCは、Aから算出したジオメトリックセンター値と胃排出率を示した。棒グラフは平均 ± 標準誤差を示した。##; 正常群とP<0.01で有意差あり。*、**、それぞれIM群とP<0.05、P<0.01で有意差あり。



**図 17. 正常マウスにおける
大建中湯の消化管運動に対する影響**

A は、正常群の PR の分布(左のパネル)、DKT(95mg/kg)投与群(右のパネル)を示した。各カラムは $n=3-5$ /群の平均 \pm 標準誤差を示した。B と C は、A から算出したジオメトリックセンター値と胃排出率を示した。棒グラフは正常群 $n=5$ 、DKT 群 $N=3$ の平均 \pm 標準誤差を示した。* ; 正常群と $P<0.05$ で有意差あり。

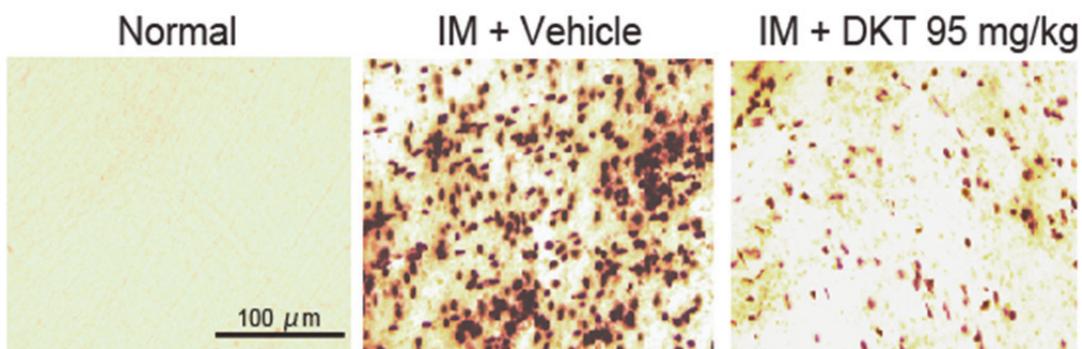


**図 18. ^{13}C 酢酸呼気試験による
大建中湯の $^{13}\text{CO}_2$ 排出量に対する影響**

A または B は、それぞれ $^{13}\text{CO}_2$ 排出曲線、累計排出曲線を示した。詳細な手順は実験材料及び方法で述べた。◇、■、△、○はそれぞれ、正常群、IM24 時間群、IM+DKT19mg/kg 群、IM+DKT95mg/kg を示した。

; 正常群と $P < 0.01$ で有意差あり。各シンボルは、各群 5-7 匹の平均土標準誤差を示した。

A



B

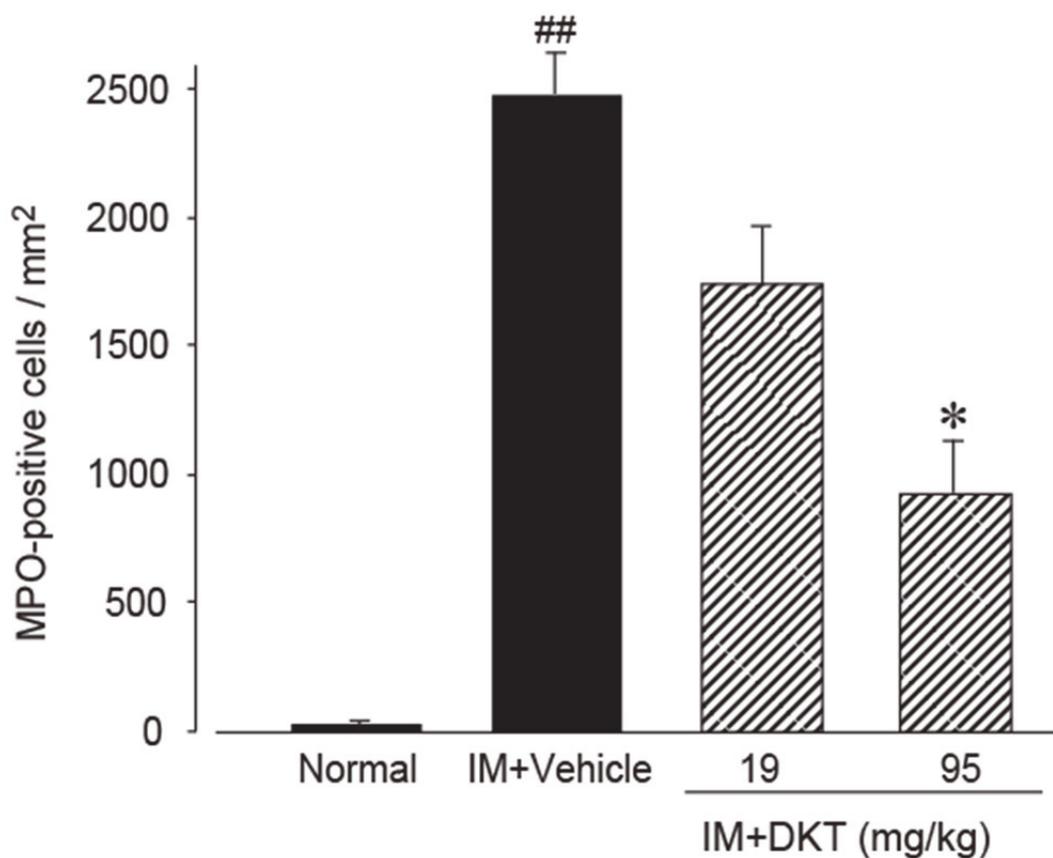


図 19. 大建中湯の IM 処置による好中球浸潤の抑制

A は、ホルマウント組織染色による筋層部の MPO 陽性好中球の検出結果を示した。B は、正常群と IM+DKT(95mg/kg)群は n=5、IM+vehicle 群と IM+DKT(19mg/kg)群では n=7 の好中球細胞の数を示した。各カラムは平均±標準誤差を示した。##、*；それぞれ正常群と IM+vehicle 群と P<0.01、P<0.05 で有意差あり

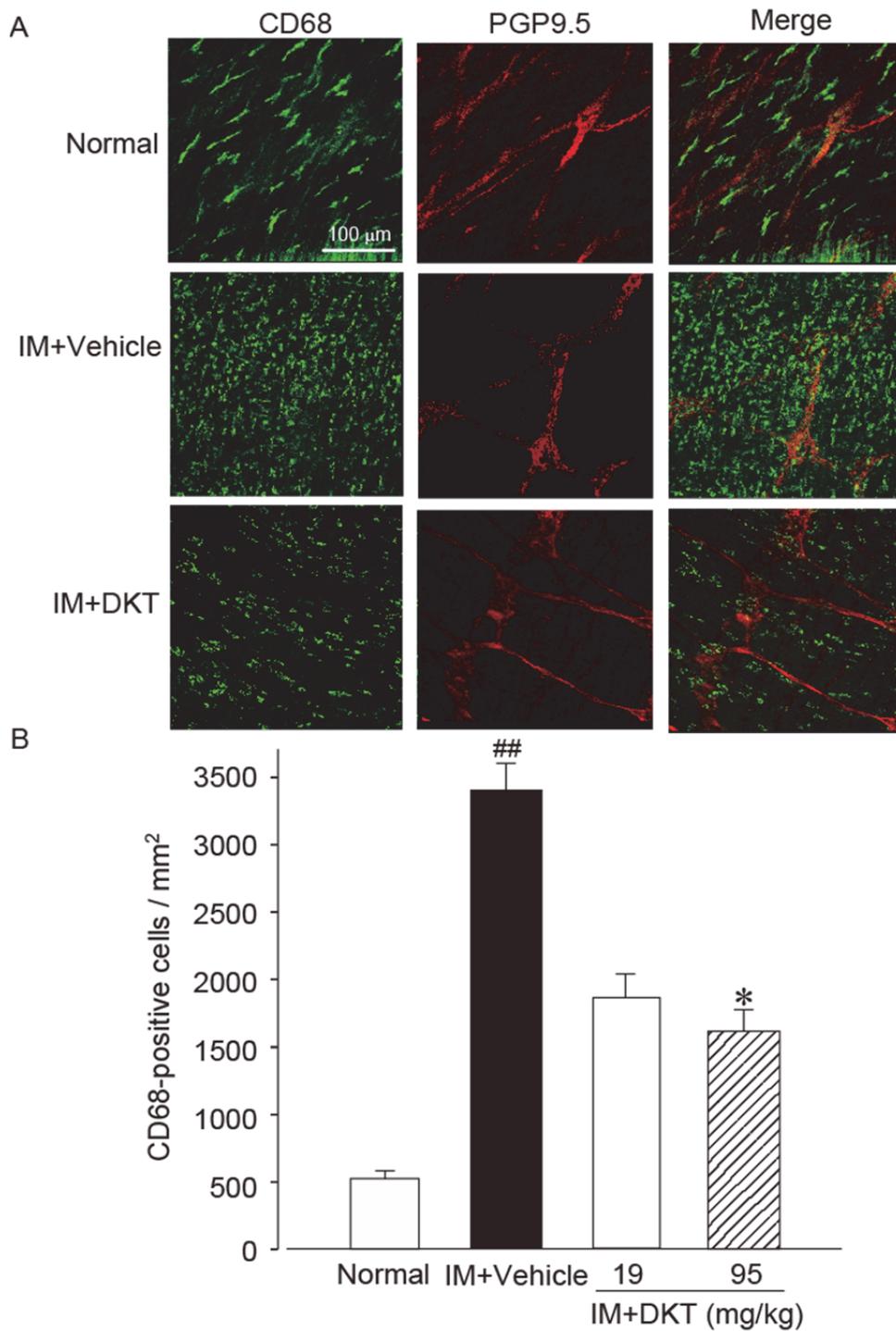
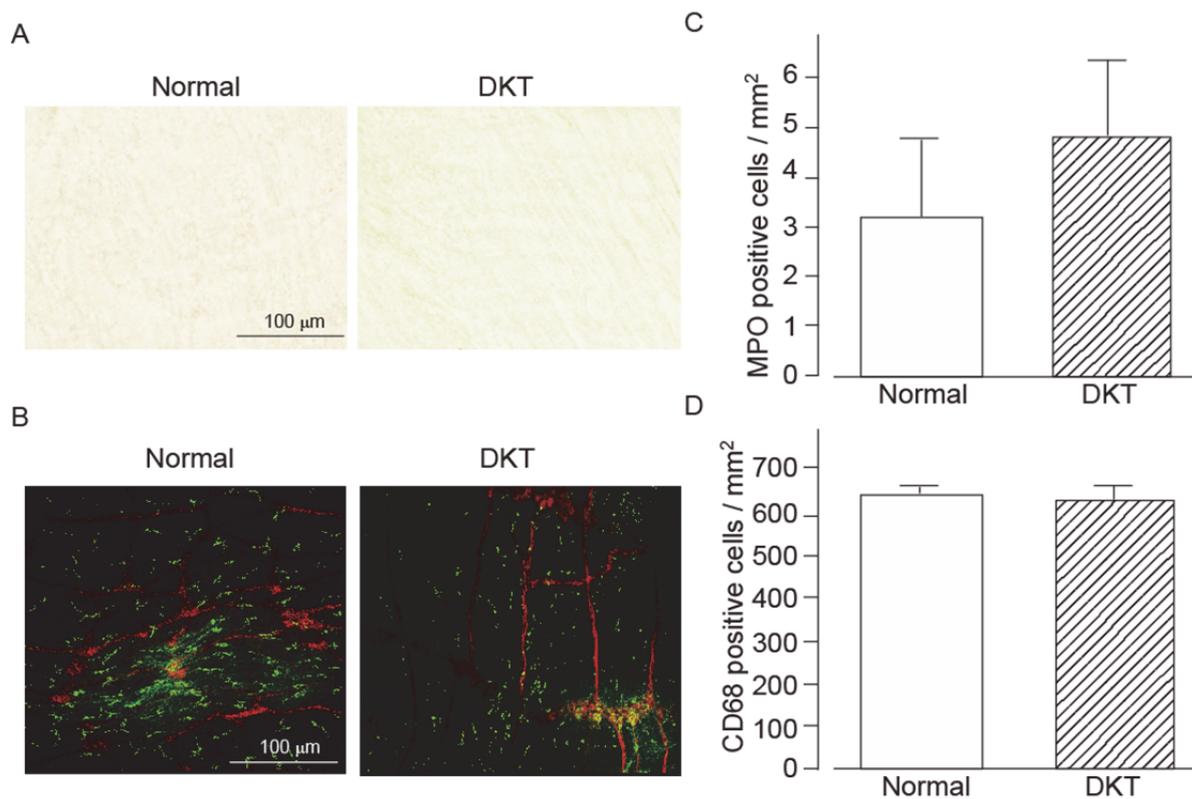


図 20. 大建中湯の IM 処置によるマクロファージ増加の抑制

Aは、ホルマリン免疫染色による筋層部のCD68陽性マクロファージの検出結果を示した。Bは、正常群とIM+DKT(95mg/kg)群はn=5、IM+vehicle群とIM+DKT(19mg/kg)群ではn=7のマクロファージの細胞数を示した。各カラムは平均±標準誤差を示した。##、*、それぞれ正常群とIM+vehicle群とP<0.01、P<0.05で有意差あり。筋層部の神経叢はPGP 9.5染色で示した。赤いシグナル；PGP 9.5陽性筋層神経。緑のシグナル；CD68陽性マクロファージ。



**図 21. 正常マウスにおける
大建中湯の MPO マクロファージに対する影響**

各カラムは n=2/群の平均 ± 標準誤差を示した。A と C は MPO 陽性細胞を、B と D は CD68 陽性マクロファージ示した。棒グラフは平均 ± 標準誤差を示した。

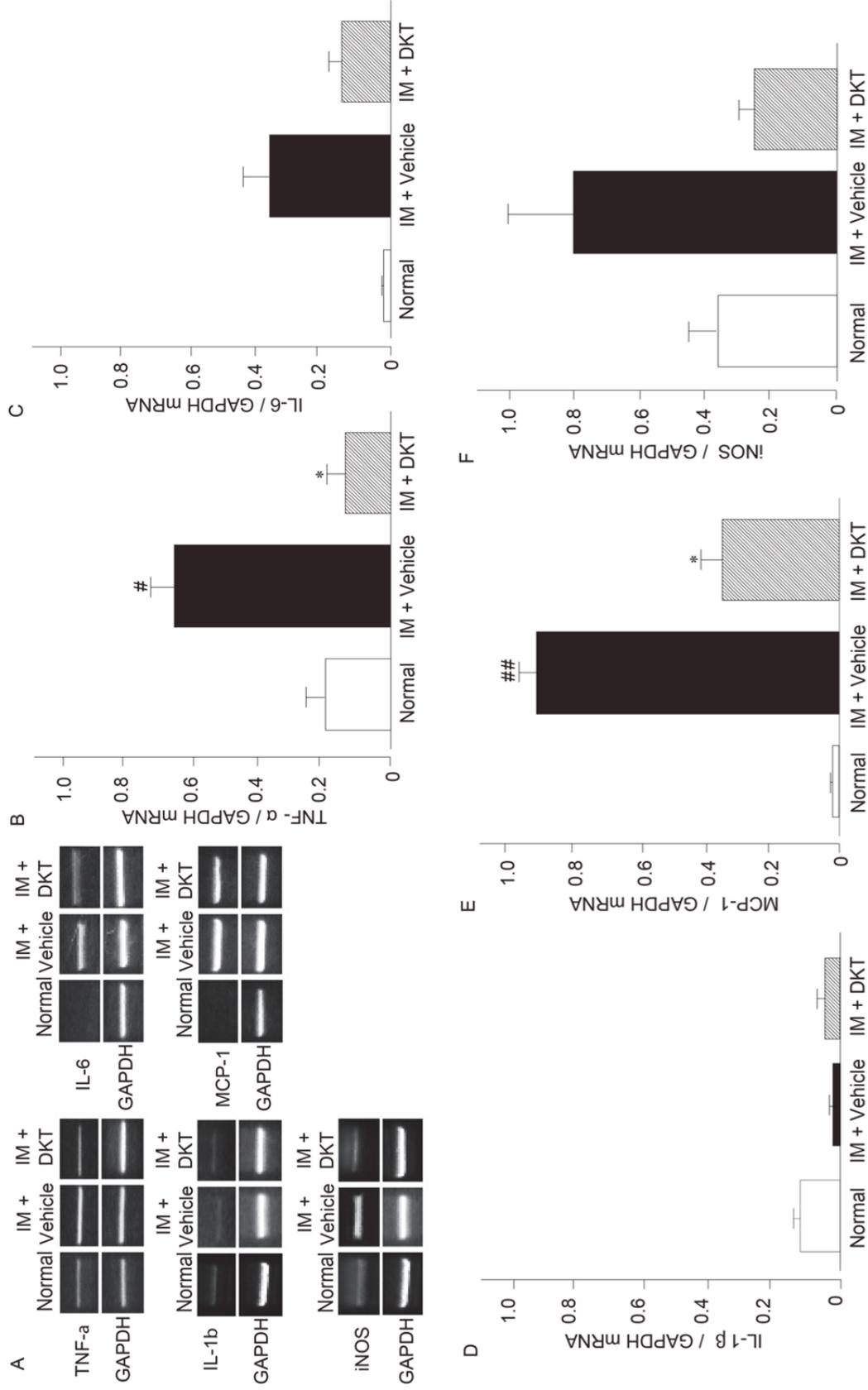


図 22. 大建中湯のサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現に対する影響

A に典型的な RT-PCR の結果を示した。B-F は TNF- α 、IL-6、MCP-1、iNOS の mRNA 発現量を示した。各カラムは n=4/群の平均±標準誤差を示した。#、##；それぞれ正常群と P<0.05、P<0.01 で有意差あり。*；IM+vehicle 群と P<0.05 で有意差あり。

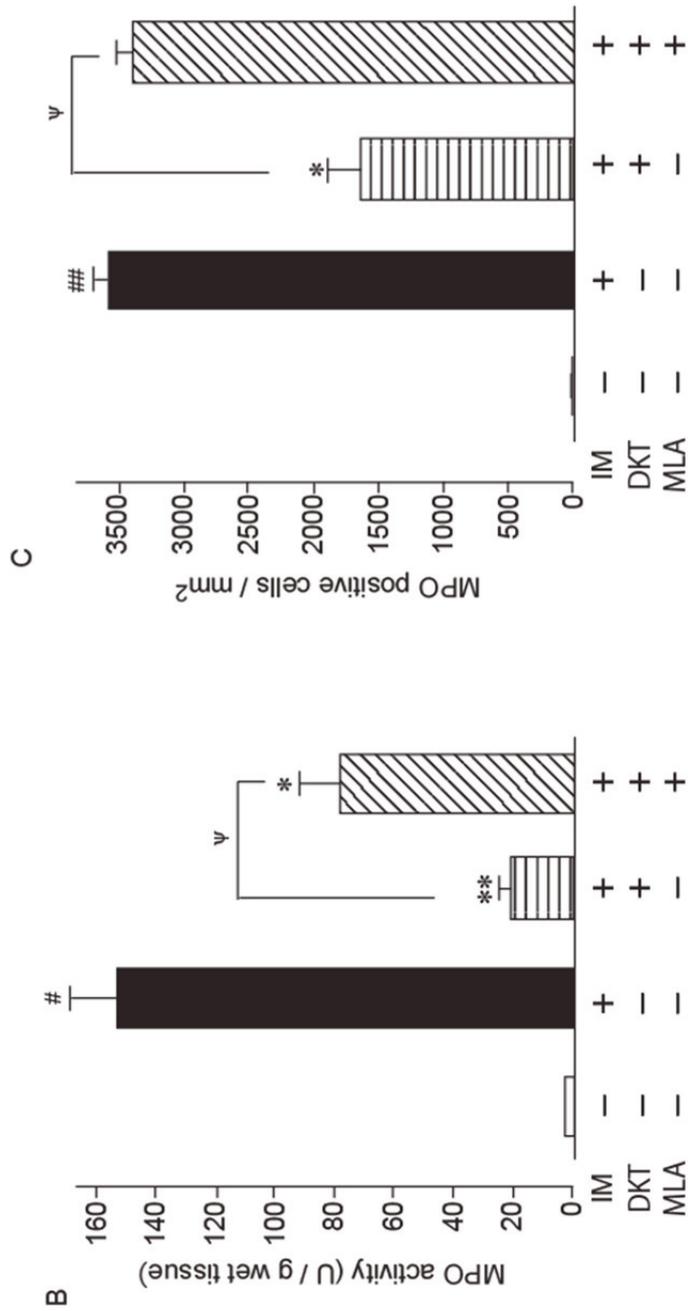
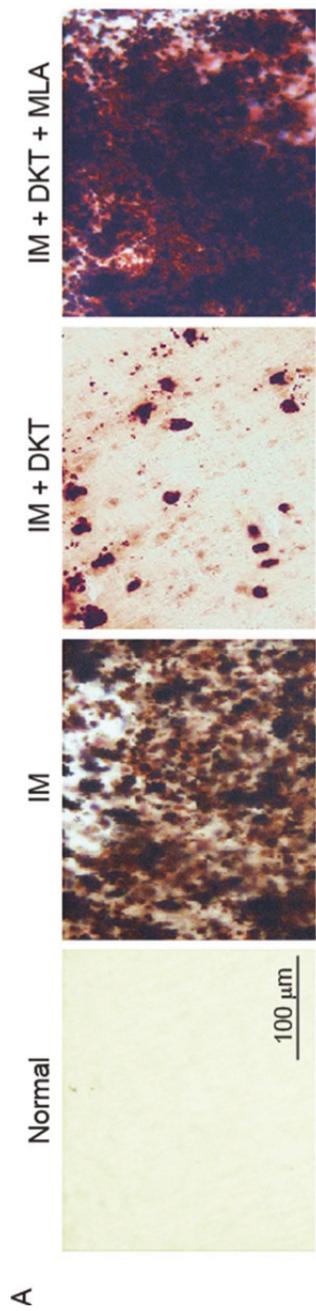


図 23. MLA による大建中湯の MPO 活性と MPO 陽性好中球浸潤抑制の解除

A と C は筋層部における MPO 陽性好中球浸潤の様子と定量結果を示した。各カラムは n=4/正常群、IM+vehicle 群、n=5/IM+DKT+MLA 群の平均±標準誤差を示した。B は MPO 活性の結果を示した。各カラムは n=4/群の平均±標準誤差を示した。##; 正常群と P<0.01 で有意差あり。*; **; IM+vehicle 群と P<0.05、P<0.01 で有意差あり。ψ; IM+DKT 群と IM+DKT+MLA 群との間に P<0.05 で有意差あり。

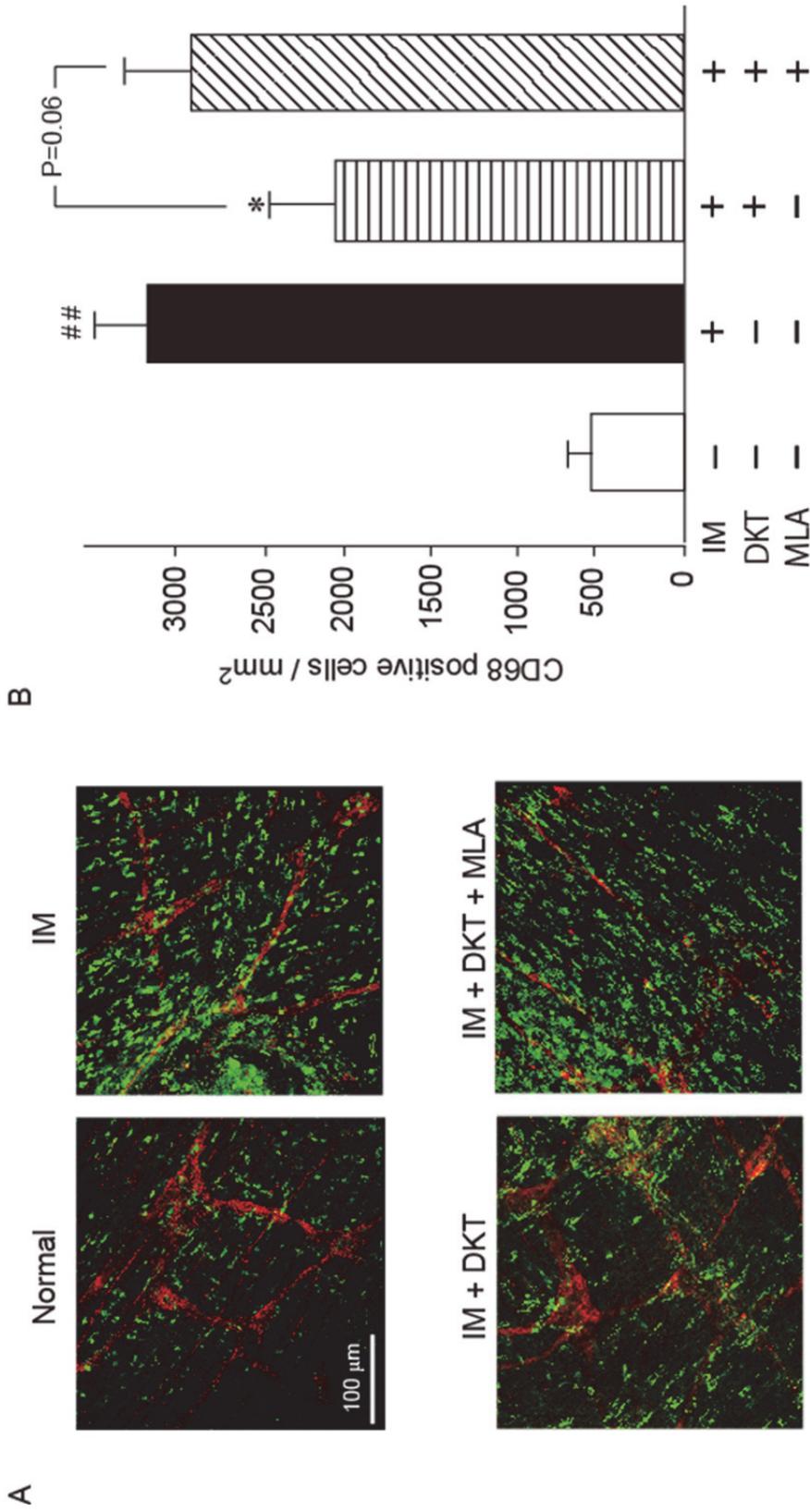
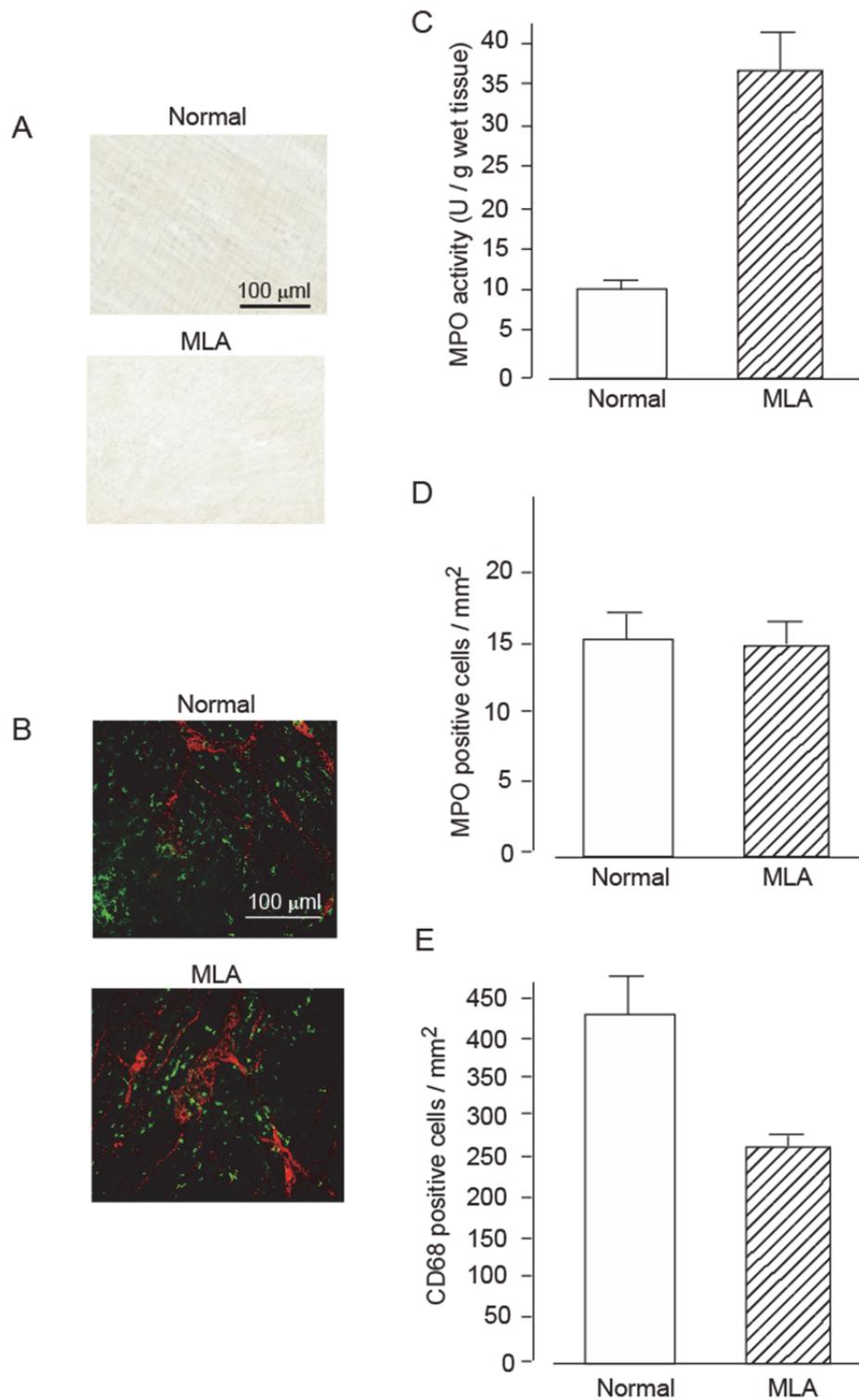


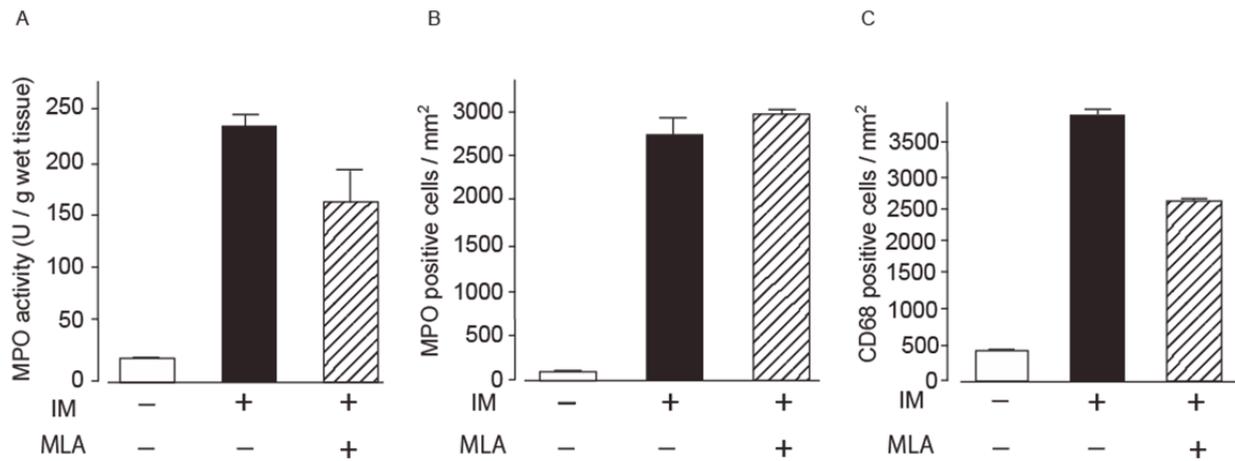
図 24. MLA による大建中湯のマクロファージ浸潤抑制の解除

AとBは筋層部におけるCD68陽性マクロファージ浸潤の様子と定量結果を示した。各カラムはn=4/正常群、IM+vehicle群、IM+DKT群、n=5/IM+DKT+MLA群の平均±標準誤差を示した。##、*、それぞれ正常群とIM、vehicle群とP<0.01、P<0.05で有意差あり。



**図 25. 正常マウスにおける
MLA の好中球とマクロファージに対する影響**

A と D は、MPO 陽性細胞に対する影響を示した。C は MPO 活性に対する影響を示した。B と E は CD68 陽性マクロファージに対する影響を示した。各カラムは n=3/群の平均±標準誤差を示した。



**図 26. マウス POI における
MLA による好中球とマクロファージ
浸潤に対する影響**

A と B は筋層部における MPO 活性と MPO 陽性好中球に対する影響を示した。
C は CD68 陽性マクロファージに対する影響を示した。
各カラムは n=2/群の平均±標準誤差を示した。

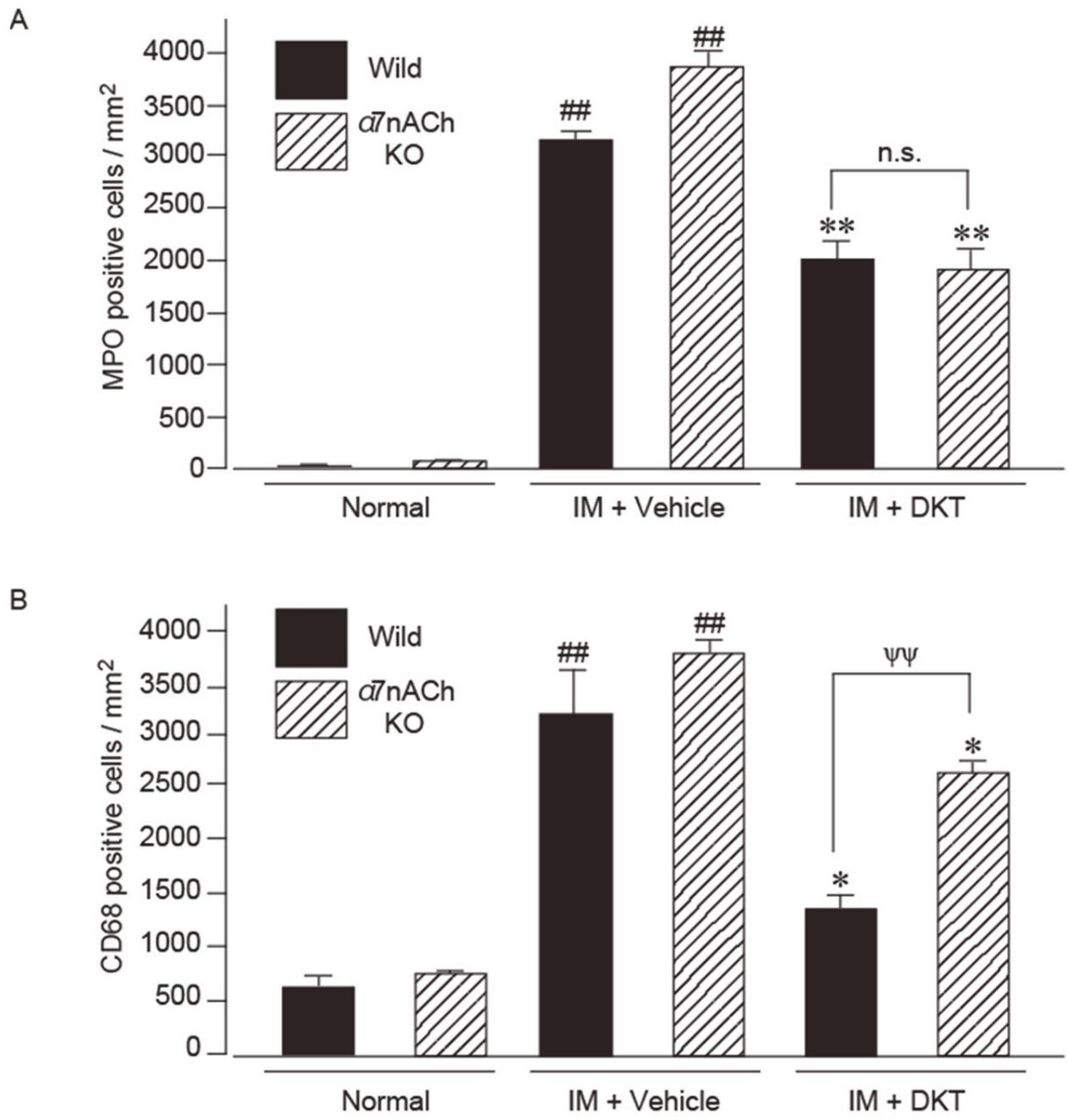


図 27. Alpha7nAChR ノックアウトマウスにおける大建中湯の抗炎症作用の減弱

AとBはそれぞれ、大建中湯のIMによるMPO陽性好中球とCD陽性マクロファージ浸潤に対する影響を示した。各カラムはn=7/ワイルドタイプマウス、n=8/ $\alpha 7nAChR$ KOマウスにおける正常群、IM+vehicle群、n=9/ $\alpha 7nAChR$ KOマウスにおけるIM+DKT群の平均±標準誤差を示した。ワイルドタイプマウスはC57BL/6Jマウスで、 $\alpha 7nAChR$ KOマウスはC57BL/6Jマウス由来のマウスを用いた。##; 正常群とP<0.01で有意差あり。*、**;
IM群とIM+DKT群との間にP<0.05、P<0.01でそれぞれ有意差あり。 $\Psi\Psi$; ワイルドタイプと $\alpha 7nAChR$ KOマウスとの間にP<0.01で有意差あり。

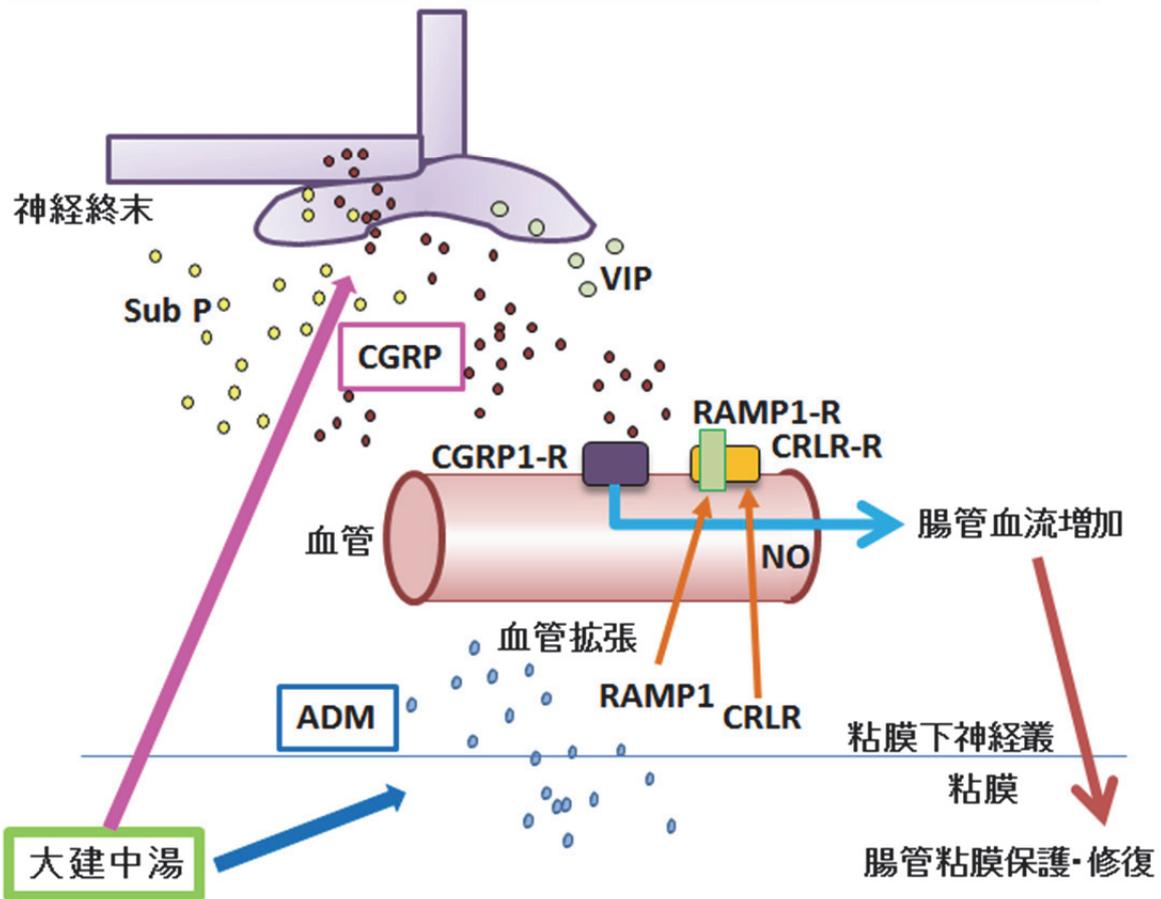
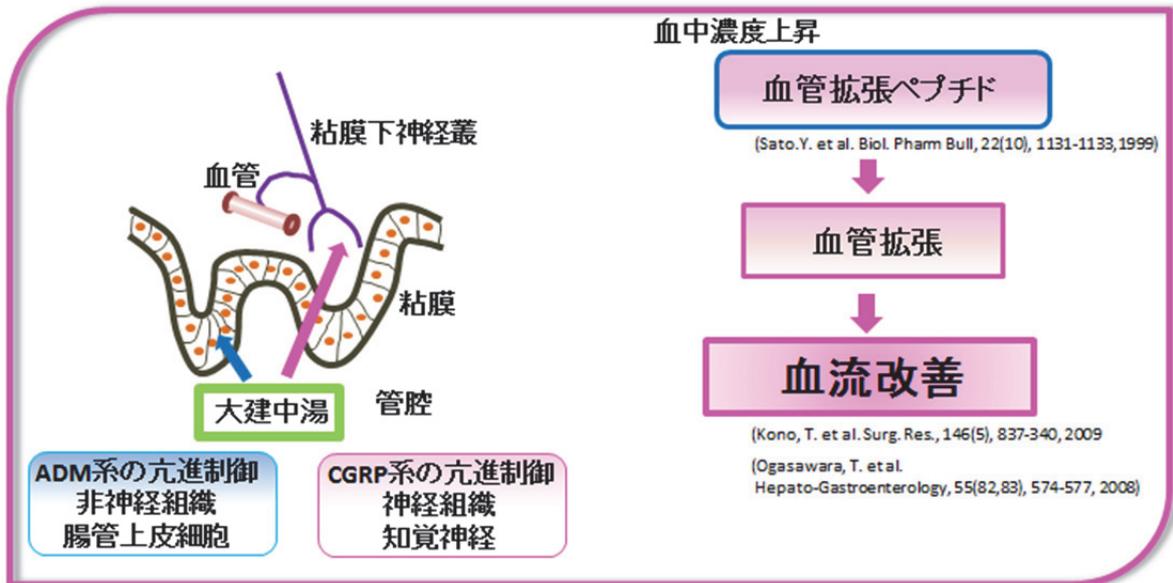
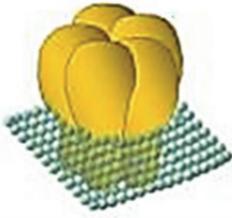
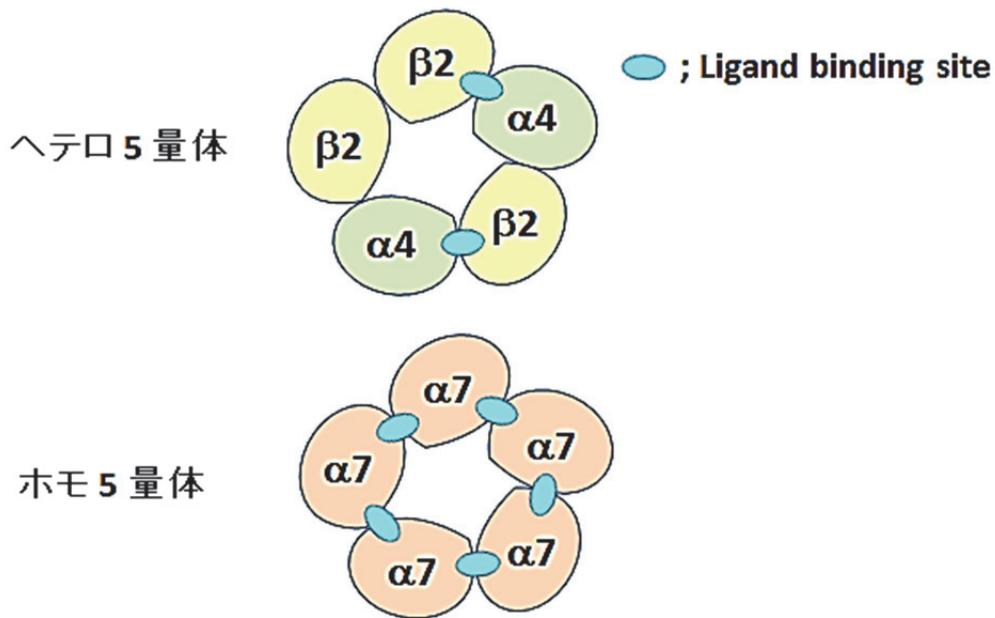


図 28. 大建中湯の血流改善作用

Nicotinic Acetylcholine receptors (nAChRs)



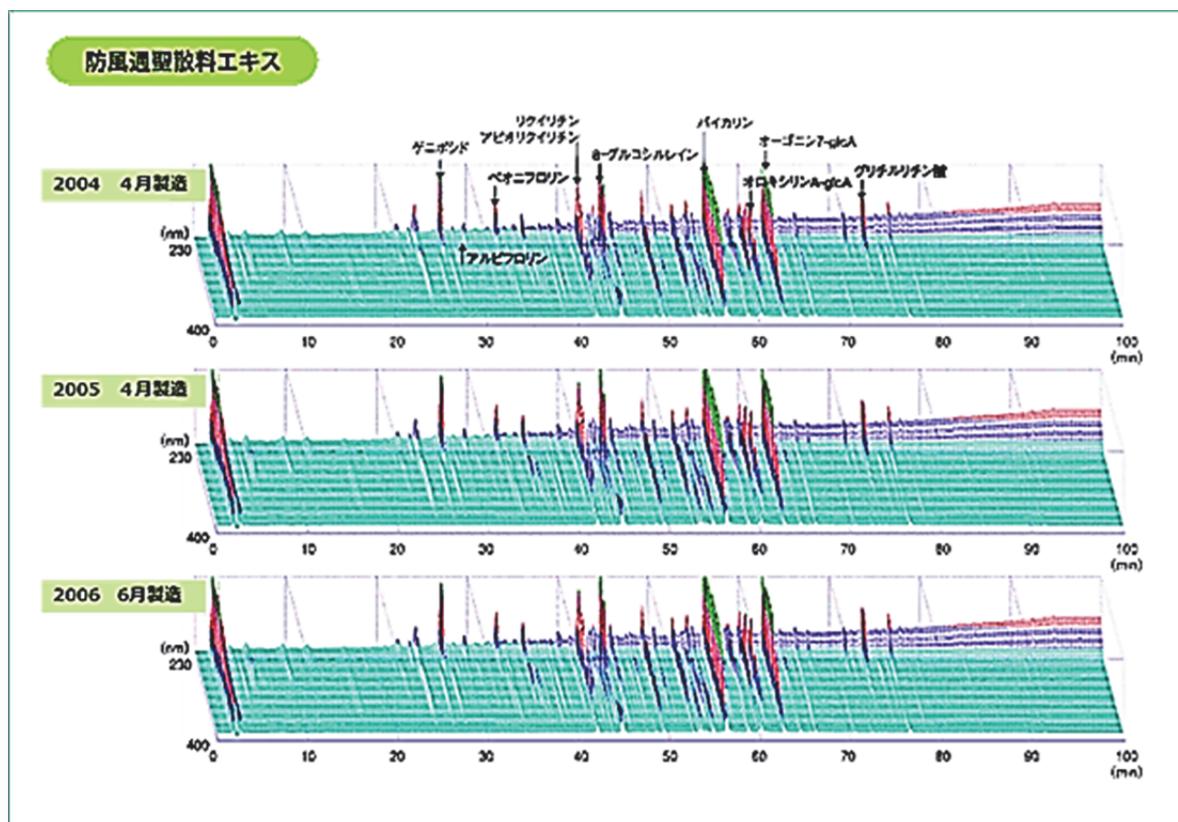
5量体形成
5量体の組み合わせにより多数のサブタイプが存在
イオンチャンネル型受容体
Caチャンネルを保有



α -bungarotoxin (α -BTX) : $\alpha 7, \alpha 9$ 選択的阻害剤
Methyllycaconitine (MLA) : $\alpha 6, \alpha 7$ 親和性阻害剤

図 29. Nicotinic AChR ファミリーと $\alpha 7$ nAChR の生理作用

製造日の異なる漢方凍結乾燥エキス の 3D-HPLC チャートの例



Kracieホールディングス株式会社
ホームページより転記

HPLC

特定物質の同定

ピークの高さ、面積；含有量の検討

未知の物質も含めたピーク；チャートで表示

起源植物、産地、採取時期、作成時期の異なるエキス



同じチャートパターン



品質の安定を示す

図 30. 漢方薬品質維持の為の HPLC