

201110030A

---

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

漢方薬によるメタボリック症候群の病態基盤「自然炎症」の制御

---

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 丸山 征郎

平成24年3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

侵襲の運命決定因子HMGB1を分子標的とした救命的治療法の開発 鹿児島大学・丸山征郎	1
---	---

### II. 分担研究報告

1. 漢方薬によるPPARsの活性化とその機序の研究 鹿児島大学・伊藤隆史	3
2. 生薬成分の分画化、純化とそれによる細胞刺激、シグナル伝達の解析 大阪工業大学・川原幸一	5
3. 漢方薬による患者治療と効果判定（血液と症状） 鹿児島大学・橋口照人	8
4. 腎炎ラットにおける漢方薬の治療効果と作用機序の解明 鹿児島大学・大山陽子	10
5. 薬理学的基盤の解釈と指示 大阪大谷大学・谿 忠人	12

# I. 総括研究報告

研究課題: 漢方薬によるメタボリック症候群の病態基盤「自然炎症」の制御

丸山 征郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究要旨

メタボリック症候群(以下メタボ)の病理学的基盤は“くすぶり型”炎症である。一方加齢もまた“くすぶり型炎症”、自己-非自己のプロセスの騒乱に基づく免疫系の異常が根底に在ることが判明してきた。ここに、メタ患者に加齢が加わると、その病勢は加速度的に進行することが予想される。特にメタボと加齢が“腎”を障害することが、病態の進行を加速することになる。一方、我々をはじめとする内外のグループがこのくすぶり型炎症には核内 DNA 結合蛋白 HMGB1 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。そしてさらに我々はある種の漢方薬が HMGB1 の細胞外遊離を抑制し、抗炎症に働くこと、また甘草中のグリチルリチンが直接 HMGB1 と結合し、その炎症活性を阻害することが判明してきた。ここに現代の最大の病態である自然炎症を生薬で介入しうる可能性がでてきたことになる。本研究のゴールは漢方薬による自然炎症性制御の検証とその方策の確立である。

A. 研究目的

メタボリック症候群(以下メタボ症)の病態基盤: **【自然炎症】を制御する漢方薬**の特に既に我々が動物実験で有効性を証明している五苓散の臨床展開を目指す(下図1、2)。

	恒常性	自然炎症	炎症
トリガー		内邪(高血糖、高血圧、Ox-LDL, AGEs, DAMPs)	外邪(病原微生物, PAMPs)
応答細胞		上皮、善状細胞	マクロファージ、好中球
メディエーター		ILβ, HMGB1	HMGB1, TNFα, IL-6, IL-8
形態	恒常性	自然炎症・遠隔障害	浮腫・再生、血管新生リモデリング
病態		慢性化で動脈硬化・血栓症、CKD	(急性) 臓器炎症(肺炎、リウマチ等) SIRS, DIC, ショック
治療法		五苓散他の漢方薬 現代西洋医学には決定的なものなし	ステロイド、HSAID系、生物学的製剤

図 1. 自然炎症の概念

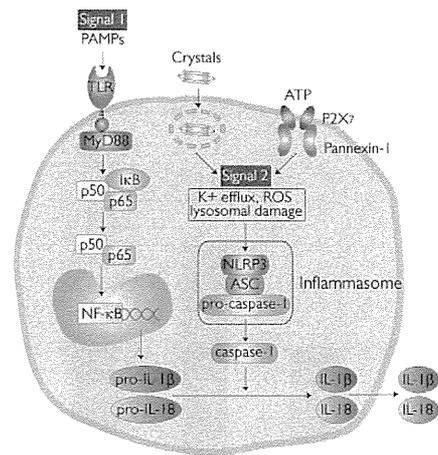


図 2. メタボリック症候群と加齢による炎症の促進

B. 研究方法

*in vitro*(培養細胞系), *in vivo*(小動物)で安全性と有効性を確認した後、ヒトへトランスレーションする。

1. *in vitro* study: 培養細胞における五苓散の効果

HMGB1 添加による尿管上皮細胞からの MCP-1 放出と五苓散、その各成分の効果: DAMPs(図2)で細胞を刺激して炎症性サイトカイン

ン MCP-1 放出と五苓散、その構成生薬エキスの効果を調べた。

**2. *in vivo* study: アデニン投与実験的腎不全ラットにおける五苓散の効果**

難溶性の 2,8-dihydroxyadenin e(2,8-DHA, 以下アデニン)をラットに経口投与して、腎不全ラットを作製した。

1)この腎不全ラットに五苓散を投与して、血中炎症性サイトカインの濃度からその抗炎症効果を検証した。

2)同じくこの腎不全ラットの血中の活性酸素を調べた。

**C. 研究結果**

**1) *in vitro* study: 培養細胞における五苓散の効果**

ラット尿管上皮細胞 NRK-52E に対し、2,8-DHA 結晶を刺激し MCP-1 の放出を測定した。結果、72 時間刺激にて五苓散同時投与および3 時間後投与双方で有意に MCP-1 の放出が抑制された。(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )(図3)。

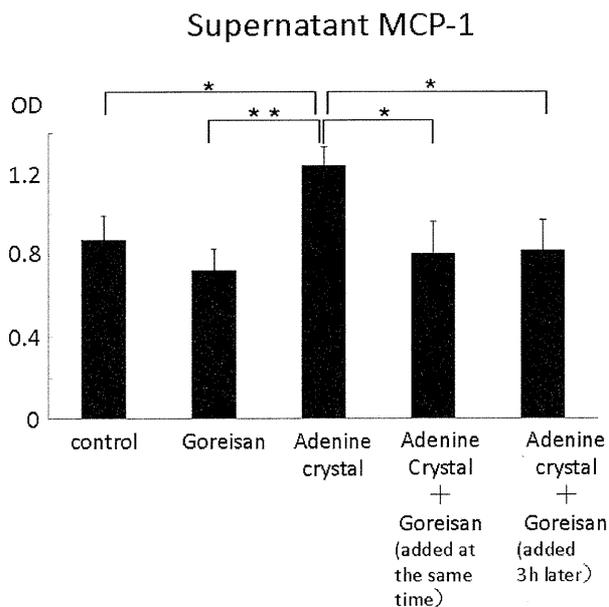
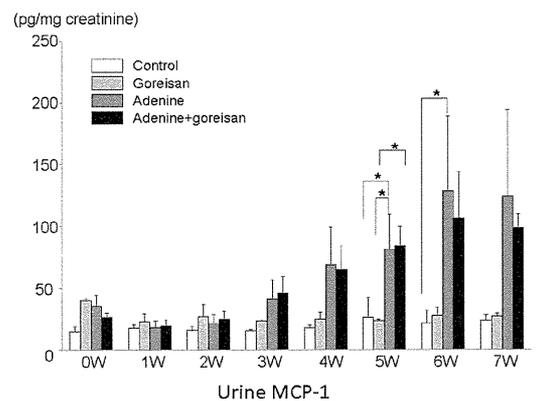
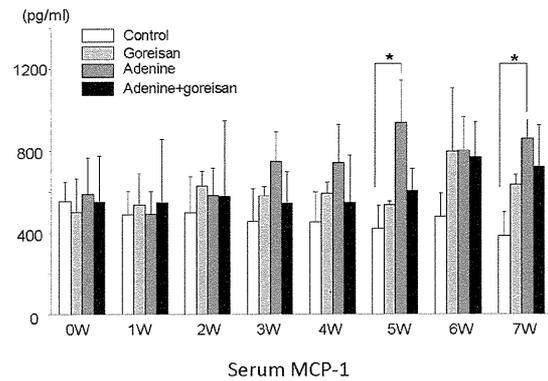


図3

**2) *in vivo* study: アデニン投与実験的腎不全ラットにおける五苓散の効果**

腎炎群と比較し、腎炎+五苓散投与群での血中、尿中 MCP-1 上昇は抑制傾向であった。(\* $p < 0.05$ )

**①血中 (図4)、尿中 MCP-1(図5) 発現に対する効果**



②血中活性酸素に対する効果(図6)

**D. 考察**

五苓散は、慢性腎炎ラットの血中、尿中 MCP-1 値の上昇を抑制する傾向にあり、腎炎において抗炎症作用を持つ可能性が示唆された。しかしながらラット間での数値のバラつきが大きく、有意差を示すまでには至らなかった。五苓散の炎症抑制の機序として細胞実験の結果より、ラット尿管上皮細胞における 2,8-DHA 結晶刺激からの MCP-1 放出抑制が考えられた。

**F. 健康危険情報**

特になし

**G. 研究発表**

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## II. 分 担 研 究 報 告

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)  
分担研究報告書

分担課題: 漢方薬による PPARs の活性化とその機序の研究

研究分担者 伊藤 隆史 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・特任講師

#### 研究要旨

メタボリック症候群は重篤な血栓症を引き起こす病態基盤であり、東洋医学的アプローチによる介入が望まれている。本研究において、食薬の抗血栓作用を検討した結果、涼寒性食品に分類される食品の中に、抗血栓作用を有するものを同定した。また、無核の血小板中に核内受容体として知られる PPARs が豊富に含まれていることが判明し、食薬由来成分が PPARs を介して薬理効果を発揮している可能性が考えられた。次年度は PPARs の関与をより詳しく解析するとともに、食薬由来の有効成分の同定を目指す。

#### A. 研究目的

メタボリック症候群は心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な血栓症の病態基盤であり、慢性のくすぶり型の病態であることから、東洋医学的アプローチによる介入が望まれている。本分担課題においては、生薬由来成分が血栓傾向を是正するかどうかを検討するとともに、その分子メカニズムとしての PPARs の関与を検討する。

#### B. 研究方法

血小板凝集能検査装置、リアルタイム血栓モニタリングシステム(T-TAS)を用い、食薬の抗血栓作用を検討した。また、その中で強い抗血栓作用を認めたものに関しては、その有効成分を調べた。また、核のない血小板が核内受容体として知られる PPARs を有しているかどうかを検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヒトの血液を用いた研究は、鹿児島大学の倫理委員会の承認を得たうえで行った。提供者に不利益が生じないよう十分配慮し、インフォームドコンセントを書面にて得た。

#### C. 研究結果

涼寒性食品に分類される食品の中に、血小板凝集を抑制し、血栓形成を抑制する食薬を同定した。また、核のない血小板中に、有核細胞である白血球と同等かそれ以上の PPAR が含まれていることを確認した。

#### D. 考察

無核の血小板に含まれている PPARs は、遺伝子発現の調節ではなく、細胞内シグナル伝達を直接修飾することで、抗血小板作用を発揮していると考えられる。今年度の研究で明らかになった食薬の抗血栓作用が、実際に PPARs を介したもののなかのどうかを検討するために、次年度は PPAR 活性を測定するとともに、PPAR 拮抗薬を用いた阻害実験を行う。また、現在、抗血栓作用を示す食薬中の有効成分を抽出中であり、同定に向けた作業を進めていく。

#### E. 結論

食薬由来成分が血栓傾向を是正する可能性が示された。また、その薬理作用機序として、PPARs が関係している可能性が考えられた。

#### F. 健康危険情報

当該研究に関わる人員に、健康被害は認められなかった。

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

分担課題:生薬成分の分画化、純化とそれによる細胞刺激、シグナル伝達の解析

研究分担者 川原 幸一 大阪工業大学生命工学科・教授

研究要旨

細胞増殖は、多くの疾患の根源であり、それを制御することは新規治療法の確立に繋がる。従来、細胞増殖の抑制には化学療法、放射線治療等が行われているが、副作用を危惧しつつ行う必要がある。最近、天然配合物の細胞増殖抑制が発見されており非常に注目されている。なぜなら、従来の治療法と同等な効果が得られ、なおかつ、副作用が殆どないからである。しかしながら、天然配合物の細胞増殖抑制機構の解明は殆どなされていない。本研究は、非常に増殖性、浸潤性の強いメラノーマ細胞が、ウメ抽出物 MK615 により bHLH 転写因子ファミリーの Id-1 タンパク質の発現制御されることを見出した。よって、新たな天然配合物による増殖抑制の機構の解明と治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

メラノーマの治療方法は、未だに確立されていない。メラノーマは、皮膚、口腔粘膜上皮などに発生するメラノサイト由来の悪性腫瘍である。発生原因は不明であるが、皮膚に発生するメラノーマは紫外線曝露と、足底に発生するものは機械的刺激と関連性が深いと考えられている。近年、精力的に基礎的、臨床的に研究が行われているにも関わらず、治療方法は、早期段階での外科的摘出によるものだけである。化学療法、免疫療法そして放射線治療もその効果は、非常に限定されている。したがって、メラノーマに対する新規治療法の開発が期待されている。

様々な天然配合物は、化学療法と同じような効果を示し、しかも副作用が殆ど無いことから癌治療に対して非常に注目されている。具体的には、抗酸化作用により癌細胞の増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する。さらには免疫応答をも調節する。メラノーマ細胞に関しては、天然配合物の緑茶

カテキン、大豆イソフラボン等は、細胞死を誘導出来る。最近、日本の杏と言われているウメは、その抽出物 MK615 が強力な抗腫瘍、抗増殖性、抗炎症性を *in vivo*、*in vitro* で証明されている。MK615 の抗腫瘍効果のエビデンスは蓄積されているが、そのメカニズムは未だ解明されていない。

塩基性ヘリックスループヘリックス (basic-helix-loop-helix; bHLH) 転写因子ファミリーの inhibitory of DNA binding-1 (Id-1) は、DNA の結合と転写調節に必須タンパク質である。Id-1 は、細胞の寿命と Bcl-2 のような抗アポトーシスタンパク質の発現を調節している。腫瘍の初期段階の不死化の時に Id-1 は key regulator として同定された。最近、Id-1 の発現レベルが、メラノーマの未分化度と悪性度と関係し、そして、メラノーマを含む他の多くのがん細胞に増加している。したがって、本研究の目的は、A375 メラノーマ細胞において、MK615 と Id-1 とその関連リン酸化タンパク質についてである。

## B. 研究方法

### 細胞培養

ヒトメラノーマ細胞株 A375 は RPMI-1640 (含 10% 仔牛胎児血清)、37°C 5%CO<sub>2</sub> incubator 内にて培養した。実験時には 6 cm ディッシュに播種し 24 時間静置後に実験を開始した。細胞へのトランスフェクションは RNAiMAX (インビトロジェン) を使用した。

### マイクロアレイ解析

アフィメトリクス社の Human Genome U (HGU)133 Plus 2.0 Array を用いて、MK615 を A375 細胞に添加有り無しで遺伝子の発現解析を行った。

### 細胞増殖試験

A375 細胞 (2-3×10<sup>4</sup> 細胞) を播種後、MK615 を 0-20ul/ml を添加した。96 時間までの細胞増殖を MTT 試験により解析した。

### ウェスタンブロット解析

Id-1 タンパク質の発現確認、タンパク質のリン酸化の有無は、それぞれに対する 1 次抗体を用いて ECL 法にて検出した。

### リアルタイム PCR 解析

MK615 の刺激後の A375 細胞より RNA を抽出し、cDNA に合成後、Id-1 特異的な Primer を用い解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. MK615 による Id-1 の発現調節

A375 細胞に MK615 を 0-20ul/ml 添加し 96 時間増殖効果を検討した。その結果、24 時間後、細胞増殖に有意な差は認められなかったが、48、96 時間後には、有意な差が得られた (Figure 1A)。同時に、Id-1 の発現を mRNA、タンパク質レベルで解析すると MK615 の濃度依存的

に Id-1 が抑制されていた (Figure 1 B,C)。

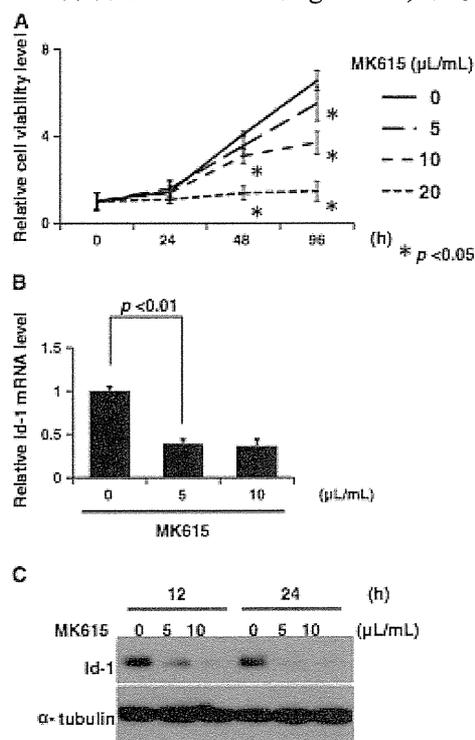


Figure 1. MK615 suppresses cell growth via the regulation of Id-1 expression in A375 cells. (A) Growth inhibition of MK615-treated A375 cells. The cells were incubated with MK615 (0–20 μL/mL) for 0–96 h and cell viability was measured by MTT assay. Values are expressed as the mean ± SE of triplicate experiments. \**p* < 0.05. (B) Expression of Id-1 mRNA in MK615-treated A375 cells. The cells were incubated for 1 h with MK615 (0–20 μL/mL) and Id-1 mRNA expression was analysed by real-time RT-PCR. Data are the mean ± SE of triplicate determinations. Values of *p* were assessed by Student's *t*-test (\**p* < 0.05). (C) Expression of Id-1 protein in MK615-treated A375 cells. The cells were incubated with MK615 (0–20 μL/mL) for 12 or 24 h. Cell lysates were analysed by western blotting using anti-Id-1 (upper panel) or anti-α-tubulin antibody (lower panel) as a loading control.

### 2. Id-1-siRNA による A375 の細胞増殖抑制

Id-1 mRNA の発現を特異的に抑制する siRNA とそのスクランブルを A375 細胞にトランスフェクションし、増殖抑制を検討した。その結果、Id-1 の発現抑制はスクランブルと比較して有意に増殖抑制した (図 2)。

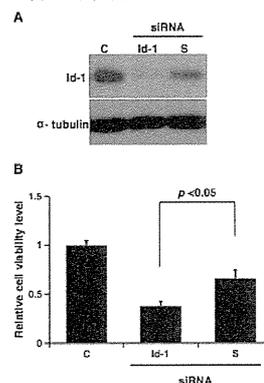


Figure 2. Id-1 regulates viability in A375 cells. (A) Reduction of Id-1 protein in Id-1 siRNA-transfected A375 cells. The cells were transfected with siRNA of Id-1 or the scramble (S) for 4 days, and then cells lysates were analysed by immunoblot with anti-Id-1 (upper panel) or anti-α-tubulin antibody as a protein loading control (lower panel). (B) Decrease in the viability of Id-1 siRNA-treated A375 cells. The cells transfected with Id-1 siRNA- or scramble (S) were subjected to MTT assay. Data indicate the mean ± SE of triplicate determinations. Values of *p* were assessed with Student's *t*-test (\**p* < 0.05).

### 3. ERK1/2 の活性化による A375 細胞増殖制御

A375 細胞のシグナル伝達経路をみると ERK1/2 だけが活性化（リン酸化）されていた。したがって、MK615 が ERK1/2 のリン酸化を抑制するかを検討した。MK615 を 0-10 $\mu$ l/ml 添加し 12 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法にてリン酸化を解析した。その結果、ERK1/2 のリン酸化が抑制され（Figure 3A）、同時に Id-1 の発現（Figure 3B,C）、A375 細胞増殖も抑制されていた（Figure 3D）。また、ERK1/2 の抑制剤 U0126 にも同じ効果がみられた（Figure 3C）。

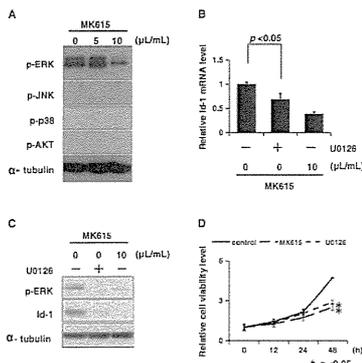


Figure 3. ERK1/2 activation reduces the viability of A375 cells. (A) Decrease in ERK1/2 activation in MK615-treated A375 cells. The cells were incubated with MK615 (0-10  $\mu$ L/mL) for 12h. Then cell lysates were analysed by immunoblot with an antibody against p-ERK, p-JNK, p-p38 or p-AKT.  $\alpha$ -tubulin was the protein loading control. (B) Down-regulation of Id-1 expression by U-0126 in A375 cells. The cells were incubated with U-0126 (5  $\mu$ M) and MK615 (0-10  $\mu$ L/mL) for 3h and then analysed by real-time RT-PCR (b) or western blot (c). (D) Growth inhibition of A375 cells by U-0126. The cells were treated with MK615 or U-0126 for 0-48h and assessed by MTT assay. Data indicate the mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. Values of  $p$  were assessed by Student's  $t$ -test ( $^* p < 0.05$ ).

### 4. MK615 の Bcl-2 の発現抑制

Id-1 は、Bcl-2 の発現を調節しているのので、MK615 添加により Bcl-2 の発現検討を行った。MK615 の濃度依存的に Bcl-2 の発現が抑制された（図 4A）。コントロール実験として、Id-1 の発現抑制による Bcl-2 の発現検討も行った（図 4B）。

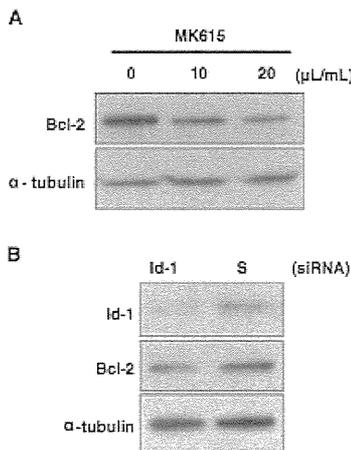


Figure 4. MK615 inhibits the Id-1/Bcl-2 pathway in A375 cells. (A) Inhibition of Bcl-2 expression in MK615-treated A375 cells. The cells were incubated with MK615 (10 or 20  $\mu$ L/mL) for 48h and cell lysates were analysed by western blots using an anti-Bcl2 (upper) or anti- $\alpha$ -tubulin antibody (lower). (B) Inhibition of Bcl-2 expression in siRNAs-treated A375 cells. The cells were transfected with Id-1-specific (Id-1)- or scramble (S) siRNA for 4 days and analysed by western blots using an anti-Id-1 (upper), an anti-Bcl2 (middle), or an anti- $\alpha$ -tubulin antibody (lower). Anti- $\alpha$ -tubulin antibody was the protein loading control.

### D. 考察

本研究では、メラノーマ細胞株 A375 細胞を用いてウメの抽出物である MK615 の新規機能を証明した。すなわち、Id-1 タンパク質の発現が MK615 によって抑制された。さらに、その下流である Bcl-2 の発現抑制をも証明し、MK615 は、Id-1/Bcl-2 経路を遮断した。その結果、MK615 は、A375 細胞の増殖抑制を行った。

既に、MK615 での臨床研究は進み、肝疾患などでの報告がなされている。メラノーマにおいても臨床研究が行われ、一例の症例報告ではあるがメラノーマに対しても転移の抑制効果が示された。しかしながら、その効果は全く不明であった。本研究から、Id-1/Bcl-2 経路に MK615 が関与している可能性が強く示唆された。したがって、本研究で得られた結果は、がん細胞に限らずあらゆる細胞増殖性疾患にも効果が得られると期待できる。

### E. 結論

本研究で得られた結果は、がん細胞に限らずあらゆる細胞増殖性疾患にも効果が得られると期待できる。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

該当なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

該当なし

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし

## 分担課題:漢方薬による患者治療と効果判定(血液と症状)

研究分担者 橋口照人 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授

### 研究要旨

漢方薬における腹腔内環境の修飾の観点から以下の研究を遂行した。血管代謝研究における世界的研究の流れの中で、血管内皮細胞にかかる機械的刺激(ずり応力、張力)と血管平滑筋細胞のシグナル応答(弛緩、収縮、サイトカインの分泌等)の研究が確立されている。メタボリック症候群は心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の基盤病態を形成するものである。しかしながら、世界規模にて研究されているメタボリック症候群の研究のフォーカスは最終的に脂肪細胞の挙動を軸とするものが、ほとんど全てであると言ってよい。内臓(消化管)平滑筋は、“食”を代表とする生活習慣と環境からの刺激を神経性調節、液性調節のもとに直接受ける組織である。これらの背景より、今回の研究は『内臓平滑筋は消化管の運動に寄与するのみでなく、積極的に腹腔内環境の制御に関わっているのではないか?』の仮説を立証する目的であり、漢方薬の効果発現の機序解明に寄与すると考える。

### A. 研究目的

漢方薬における腹腔内環境の修飾の観点からメタボリック症候群の成因・病態を内臓平滑筋細胞の役割を軸とした観点から考察し、「内臓平滑筋細胞による腹腔内環境制御」の概念を提案する。

### B. 研究方法

内臓(消化管)平滑筋は神経性、体液性調節の最終効果組織として“運動”するのみでなく、血管平滑筋細胞の如く“運動”と関連したエフェクター分子を分泌しており積極的に腹腔内環境を制御(リモデリング)している可能性を突き止める。方法としては、マウス内臓平滑筋細胞の組織染色と培養系の樹立および既に作出に成功した内臓平滑筋特異的 VEGF-A 発現マウスの解析の二方向よりアプローチする。

#### (倫理面への配慮)

本申請においては個人情報取り扱いの配慮を必要とする研究およびヒト遺伝子解析研究は含まれない。VEGF 関連疾患トランスジェニックマウスについては、鹿児島大学遺伝子組換え

実験安全委員会の承認済み(承認番号 12034)である。

### C. 研究結果

内臓平滑筋細胞における VEGF-A の過剰発現マウスを作成したところ、腓ラ氏島のリモデリング、炎症性脂肪細胞、下部消化管の拡大等の組織学的・マクロの所見が得られた。これらの事実より、内臓平滑筋と腹腔内環境制御の関連を示すものであり、新規の概念である。

### D. 考察

内臓平滑筋は“食”行動のシグナリングの終末組織として運動しているだけでなく、積極的にサイトカイン/ケモカイン/増殖因子を産生し腹腔内環境をリモデリングしている可能性が示唆された。これらの知見は漢方薬の腹部臓器-生体環境への効果発現の機序として内臓平滑筋がターゲット組織の1つである可能性を示唆すると考える。

## E. 結論

「内臓平滑筋による能動的な腹腔内環境の調節」の概念は新規のものである。本概念の証明は世界的に研究されているメタボリック症候群の研究に新たな視点を与えるものであり、また、漢方薬における効果発現機序の解明の新規基盤に発展しうる可能性を持つと考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
論文発表準備中
2. 学会発表  
なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 分担課題: 腎炎ラットにおける漢方薬の治療効果と作用機序の解明

研究分担者 大山 陽子・鹿児島大学医学部歯学部附属病院検査部・特任助教

### 研究要旨

五苓散は、体内の水分調節作用により症状を改善する漢方薬として広く使われ、腎疾患では腎炎やネフローゼ症候群などに用いられている。経験的に使われている五苓散の腎炎における分子生物学的な作用機序について、我々は慢性腎炎を引き起こす結晶誘発腎肉芽腫モデルを用い検討した。結果、五苓散は *in vivo*、*in vitro* において炎症性サイトカインであり、肉芽腫の形成・維持の促進因子である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の上昇を緩和させた。以上より、五苓散は慢性腎炎において抗炎症作用をもつ可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々はアデニンを経口投与することで、腎臓に難溶性の 2,8-dihydroxyadenine (2,8-DHA) 結晶を誘発させ、慢性腎炎を引き起こす結晶誘発性肉芽腫モデルにおいて、炎症の程度と比例して時間存性に血中、尿中 MCP-1 が上昇することを明らかにしている。今回、我々は本モデルに五苓散を投与し、MCP-1 を指標に慢性腎炎へ与える影響を検討した。

### *in vitro*

我々はラット尿細管上皮細胞を 2,8-DHA 結晶刺激することで、MCP-1 が放出量されることを明らかにしている。そこで五苓散投与によって MCP-1 の放出が抑制されるかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は鹿児島大学動物実験委員会にて承認されている。

### B. 研究方法

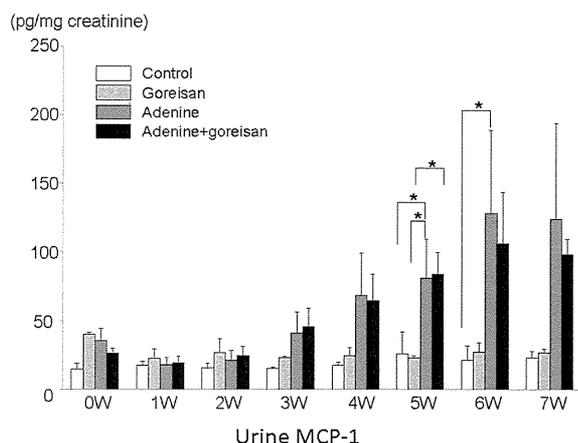
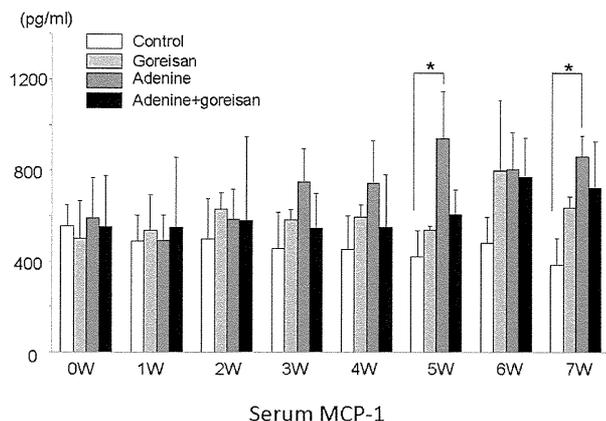
#### *in vivo*

結晶誘発性腎炎ラットを用い、コントロール群、五苓散投与群、腎炎群、腎炎+五苓散投与群の 4 群に分け 7 週間観察、炎症性マーカーのひとつである MCP-1 の血中、尿中濃度を測定した。

### C. 研究結果

#### *in vivo*

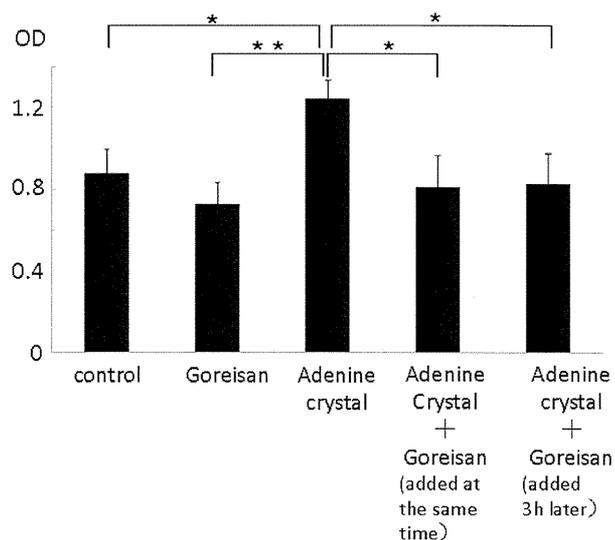
腎炎群と比較し、腎炎+五苓散投与群での血中、尿中 MCP-1 上昇は抑制傾向であった。(\* $p < 0.05$ )



*in vitro*

ラット尿細管上皮細胞 NRK-52E に対し、2,8-DHA 結晶を刺激し MCP-1 の放出を測定した。結果、72 時間刺激にて五苓散同時投与および 3 時間後投与双方で有意に MCP-1 の放出が抑制された。(\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ )

Supernatant MCP-1



D. 考察

五苓散は、慢性腎炎ラットの血中、尿中 MCP-1 値の上昇を抑制する傾向にあり、腎炎において抗炎症作用を持つ可能性が示唆された。しかしながらラット間での数値のバラつきが大きく、有意差を示すまでには至らなかった。五苓散の炎症抑制の機序として細胞実験の結果より、ラット尿細管上皮細胞における 2,8-DHA 結晶刺激からの MCP-1 放出抑制が考えられた。

E. 結論

五苓散は慢性腎不全動物モデルにおいて抗炎症作用をもつ可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 分担課題:薬理学的基盤の解釈と指示

研究分担者 谿 忠人 大阪大谷大学薬学部漢方医療薬学講座・教授

### 研究要旨

複数の生薬から構成されて「複合薬」として作用を発現する漢方の理論的基盤から、実験結果について解釈した。五苓散全体としては *in vitro* の実験で抗炎症活性を発揮したが、その効果を構成生薬別に観ると、いわゆる君薬と考えられる茯苓には抗炎症活性はなく、猪苓(臣薬)、桂枝(使薬)に効果が観察された。これは「引経報使」という理論から観ると興味深く、五苓散の効果が茯苓が、腎での水代謝、抗炎症作用に臓器志向性を付加している可能性もあり、今後茯苓とその他の生薬の組み合わせを検討する必要がある。

### A. 研究目的

生薬学としての立場から本プロジェクトの結果と全体の方向性について考察する。

まず、生薬学の視点からは、漢方薬の構成生薬は次のように分類、位置づけされて考えられている。すなわち、複合処方としての「漢方薬」は各構成生薬を、「君薬」、「臣薬」、「佐薬」、「使薬」に分けて考えられる。すなわち、

**君薬**: 処方全体の薬効のベクトルを決め、かつ副作用などを軽減する、

**臣薬**: 君薬をサポートし、その働きを増強させる、

**佐薬**: 君薬や臣薬の働きをサポートし、薬効発現を強める。しばしば君臣薬とは反対の

性質を持つ、

**使薬**: 直接的に病そのものに作用する、  
という位置づけの分類である。

この理論に従って、今回の**五苓散の実験的腎炎に対する効果**、さらには、**メタボリック症候群の根底に介在する自然炎症への効果発現の可能性とその機序**について漢方理論の視点から考察する。

### B. 研究方法

研究目的を挙げたように漢方薬は構成される個々の生薬の薬効を超えた効果が発現する。この視点から今回の**五苓散の実験的腎炎に対する効果**、さらには、**メタボリック症候群の根底に介在する自然炎症への効果発現の可能性とその機序**

について漢方理論の視点から考察した。個々の生薬を目的に項にあげた理論に基づいてカテゴリー化、ランキ付けし、実際の実験結果と照合して考察した。

### C. 研究結果

「君薬」、「臣薬」、「佐薬」、「使薬」の理論に従って、今回の**五苓散の実験的腎炎に対する効果**、さらには、**メタボリック症候群の根底に介在する自然炎症への効果発現の可能性とその機序**について漢方理論の視点から考察すると、

君: 茯苓、臣: 猪苓、佐: 白朮、使: 澤瀉、桂枝と考えうる。

この点から今回の実験的腎炎に対する効果を観ると、DAMPs 刺激によるマクロファージ系細胞からの MCP-1, TNF- $\alpha$ , HMGB1 などの炎症性サイトカインの産生放出に対して、五苓散は全体として抑制している。しかし、構成生薬成分ごとに観ると、君薬である茯苓には効果がなく、臣薬である猪苓、使薬である桂枝にも効果が確認されている。

メタボリック症候群の場合の腎機能障害は最近、注目されているものであるが、この場合に腎障害の原因物質としては、糖化蛋白(AGE)、酸化変性 LDL などが考えられる。これらが腎臓に作用して、酸化ストレスを与えると考えられているが、腎不全ラットにおいて五苓散が血中に増加した活性酸素を抑制したことなどは、五苓散がメタボリック症候群に伴う腎機能低下に効果が期待さ

れる。

#### D. 考察

今回の結果は生薬の複合体である「漢方」の効果発現を考察する際に非常に参考になる結果と考えられる。注目されるのは五苓散のなかの「君薬」とみなされる茯苓が、単味では抗炎症効果を示さなかったことである。今後、この点についての実験が望まれる。その具体的方法の一例としては君薬「茯苓」に臣薬、佐薬、使薬などを添加して効果を観るといふ分析的方法から、五苓散全体の効果を帰納する方法がある程度のヒントを与えるものと考えられる。あとひとつ漢方の効果発現を考察する方法は、「引経報使」という漢方の思考法である。

すなわち構成するある生薬が、漢方薬全体に臓器志向性を与えるという思想である。五苓散は一般的には「水毒」、現代西洋医学の病理から観ると、広義の“水分代謝の異状”に対して効果を発現する。これに対して、丸山らは、五苓散の構成生薬エキスが、アクアポリンの発現に対して作用するという *in vitro* のデータを出しているが、臓器としてアクアポリンの発現が一番強い腎に対して、茯苓が君薬として臓器志向性を与えている可能性などを次に検討すべきであろう。

#### E. 結論

五苓散は、*in vitro* で DAMPs による炎症性サイトカインの産生を抑制する効果が観られたが、各構成生薬では、君薬である茯苓にはその効果は確認されなく、臣薬である猪苓と使薬である桂枝に効果が観られた。君薬の茯苓がどのような役割を果たしているのか、は今後検討すべき課題である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表  
特になし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特記すべきことなし。

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	なし				

