

論文内容の要旨

氏名	栗田 隆 <small>くり た たかし</small>
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医第1064号
学位授与の日付	平成23年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Effects of Gorei-san, a traditional Japanese Kampo medicine, on aquaporin 1, 2, 3, 4, and V2R mRNA expression in rat kidney and forebrain (漢方薬の五苓散がラットの腎と脳においてアクアポリン1, 2, 3, 4およびバゾプレッシン2型受容体 mRNA 発現に及ぼす作用)
論文審査委員 (主査)	教授 東野 英明
(副主査)	教授 植村 天受
(副主査)	教授 重吉 康史

【目的】

漢方方剤の一つである五苓散は、利尿作用に加えて体内の水分調節作用を有するとされており、これを利尿作用と呼んでいるが、現在までその詳細な薬理学的作用機序が解明されていなかった。そこで、水負荷のために予め生理食塩水を投与したラットに五苓散を投与し、腎と脳におけるアクアポリン (AQP) 1、2、3、4、およびバゾプレッシン2型受容体 (V2R) mRNA 発現を測定することにより、その調節作用機序を分子レベルで解明しようとした。

【方法】

8週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを6群各6匹に振分け、それぞれをコントロールA群、コントロールB群、五苓散100mg/kg投与群、五苓散300mg/kg投与群、フロセミド10mg/kg投与群、アセタゾラミド50mg/kg投与群とした。コントロールB群を除く各群には、予め生理食塩水50ml/kgを負荷した。加えて五苓散100mg/kg投与群、五苓散300mg/kg投与群には五苓散の熱水抽出エキス末 (ツムラ製) をそれぞれ投与し、ポジティブコントロールとしてフロセミド投与群とアセタゾラミド投与群を用意した。なお、コントロールA群は薬剤投与を行わない群とし、コントロールB群は生理食塩水の負荷も薬剤投与も行わない群とした。生理食塩水と薬剤を投与して代謝ケージに入れる処置を3日間続け、経時的に尿量を測定し、3日後にペントバルビタール麻酔下で腎と脳を摘出した。得られた腎皮質、髄質、脳の各サンプル中の mRNA から一本鎖 cDNA を合成し、Real-time PCR 法により腎は β -actin、脳は GAPDH を用いて AQP1、2、3、4 と V2R の mRNA 発現量を測定した。

【結果】

五苓散100mg/kg投与群はコントロールA群と比較して有意な24時間尿量の増加と腎髄質 AQP2、AQP3 mRNA と、腎皮質 AQP2 mRNA 発現低下が認められたが、V2R mRNA 発現には変化は認められなかった。一方、五苓散300mg/kg投与群ではこれらの変化は全く認められなかった。フロセミド投与群では投与後4、6時間に、アセタゾラミド投与群では投与後2、4、6、24時間に尿量の有意な増加が認められたが、腎皮質と髄質、脳の mRNA 発現には変化は認められなかった。生理食塩水を負荷したコントロールA群と負荷しないコントロールB群の比較では、A群で生理食塩水負荷により脳 AQP1 mRNA 発現の有意な低下が認められた。

【考察】

腎において、AQP2、AQP3 はそれぞれ腎集合管主細胞管腔側細胞膜と基底側細胞膜に存在しており、五苓散100mg/kg投与群で腎髄質 AQP2、AQP3 mRNA と、腎皮質 AQP3 mRNA 発現に低下が見られたことから、水再吸収のためのアクアポリン経路が減少したことによって利尿作用が生じたと考えられた。脳において AQP1 は脈絡叢上皮細胞で発現し脳脊髄液代謝に関わっていることから、生理食塩水負荷による脳の AQP1 mRNA 発現抑制は、脳圧の恒常性を保つための脳脊髄液産生調節作用と考えられた。なお、高濃度の五苓散投与でアクアポリン mRNA 発現量に変化が認められなかったのは、腸管内での浸透圧差による薬物の吸収阻害のためだと推察した。

論文審査結果の要旨

五苓散は沢瀉、蒼朮、猪苓、茯苓、桂皮で構成される漢方方剤であり、利尿作用に加えて体内の水分調節作用を有するとされている。この作用は利尿作用と呼ばれているが、現在までその詳細な薬理学的作用機序が解明されていなかった。そこで、五苓散の水分調節作用と水透過フィルター蛋白であるAQPとの関連に注目し、ラットに五苓散を投与して腎と脳におけるアクアポリン(AQP) 1、2、3、4、およびバソプレッシン2型受容体(V2R) mRNA発現を測定することにより、その調節作用機序を分子レベルで解明しようとした。

【方法】

8週齢雄性Sprague-Dawley (SD) ラットを6群各6匹に分け、それぞれをコントロールA群、コントロールB群、五苓散100mg/kg投与群、五苓散300mg/kg投与群、フロセミド10mg/kg投与群、アセタゾラミド50mg/kg投与群とした。コントロールB群を除く各群には、利尿を観察するために予め生理食塩水50ml/kgを負荷した。加えて五苓散の熱水抽出エキス末(ツムラ製)をそれぞれ投与し、ポジティブコントロールとしてフロセミド投与群とアセタゾラミド投与群を用意した。なお、コントロールB群は生理食塩水の負荷も薬剤投与も行わない群とした。生理食塩水と薬剤を投与して代謝ケージに入れる処置を3日間続け、経時的に尿量を測定し、3日後にペントバルビタール麻酔下で腎と脳を摘出した。得られた腎皮質、髄質、脳の各サンプル中のmRNAから一本鎖cDNAを合成し、Real-time PCR法により腎は β -actin、脳はGAPDHを用いてAQP1、2、3、4とV2RのmRNA発現量を測定した。

【結果】

コントロールA群を1としたAQP1、2、3、4とV2Rの各mRNAの発現比(mean \pm S.E.M.)は、腎皮質において五苓散100mg/kg投与群、五苓散300mg/kg投与群、フロセミド10mg/kg投与群、アセタゾラミド50mg/kg投与群でAQP1、AQP2、

博士論文の印刷公表	公表年月日	出版物の種類及び名称
	2011年3月 日 公表予定	出版物名
	公表内容	Journal of Medical Sciences Vol. 11 No. 2
	全文と要約	2011年3月 日 発行予定

AQP4, V2R mRNA には差異が無かったが、AQP3 mRNA は 0.806 ± 0.034 、 1.007 ± 0.040 、 0.888 ± 0.046 、 0.922 ± 0.062 と五苓散 100mg/kg 投与群で低下した。腎髄質では AQP1, AQP4, V2R mRNA には差異が無かったが、AQP2 mRNA は 0.590 ± 0.140 、 0.891 ± 0.110 、 0.789 ± 0.062 、 1.005 ± 0.106 、AQP3 mRNA は 0.580 ± 0.126 、 0.883 ± 0.096 、 0.765 ± 0.073 、 0.850 ± 0.111 と五苓散 100mg/kg 投与群で AQP2 と 3 mRNA 発現量が低下した。脳では AQP2、AQP3、V2R の各 mRNA 発現は測定限界を下回り、AQP1 と 4 mRNA 発現量にも差異が無かった。一方、五苓散 300mg/kg 投与群、フロセミド 10mg/kg 投与群、アセトゾラミド 50mg/kg 投与群では何らの変化も認めなかった。

生理食塩水を負荷したコントロール A 群と負荷しないコントロール B 群の比較では、コントロール B 群を 1 とした場合に腎皮質と髄質の AQP1、2、3、4 と V2R の各 mRNA の発現比 (mean \pm S.E.M.) に差異が無かったが、脳では AQP1 mRNA が A 群で 0.204 ± 0.052 と有意な低下 ($P < 0.05$) を認めた。腎皮質の腎髄質に対する相対的 mRNA 発現は AQP1 mRNA 0.900 ± 0.100 、AQP2 mRNA 0.052 ± 0.004 、AQP3 mRNA 0.092 ± 0.007 、AQP4 mRNA 0.021 ± 0.003 、V2R mRNA 0.091 ± 0.004 で、AQP2、3、4 mRNA ($P < 0.05$) と V2R mRNA ($P < 0.001$) は皮質で髄質に比較して有意に低い値を示した。

【考察】

腎において、AQP2、AQP3 はそれぞれ腎集合管主細胞管腔側細胞膜と基底側壁部細胞膜に存在しており、五苓散 100mg/kg 投与群で腎髄質 AQP2、AQP3 mRNA と、腎皮質 AQP3 mRNA 発現に低下が見られたことから、水再吸収のためのアクアポリン経路が減少したことによって利尿作用が生じたと考えられた。脳において AQP1 は脈絡叢上皮細胞で発現し脳脊髄液代謝に関わっていることから、生理食塩水負荷による脳の AQP1 mRNA 発現抑制は、脳圧の恒常性を保つための脳脊髄液産生調節作用と考えられた。なお、高濃度の五苓散投与でア

クアポリン mRNA 発現量に変化が認められなかったのは、腸管内での浸透圧差による薬物の吸収阻害のためだと推察した。腎の AQP2、3、4 と V2R の各 mRNA の発現は髄質に比較して皮質で有意に少なくこれらの AQP については髄質でより重要な働きをしていることが示唆された。

【結論】

1) 五苓散エキス末 (100mg/kg) での尿量増加は、腎における皮質の AQP3 mRNA、髄質の AQP2 mRNA、AQP3 mRNA の発現低下があったことから、腎集合管主細胞管腔側細胞膜と基底側壁部細胞膜での水分子移動が抑制されたために利尿が起こったと考えられた。しかし、V2R mRNA の発現に変化は認められなかったことから、五苓散の V2R への直接作用は否定されたものの、アルギニンバソプッシン遊離促進の可能性が考えられた。尚、脳においては AQP mRNA 発現に影響は無かった。2) 生理食塩水の過剰投与で脳 AQP1 mRNA 発現が抑制されたことから、水過剰状態においては脳組織への過剰な水移動を抑制する調節機能があるのではないかと考えられた。フロセミドとアセトゾラミドは、利尿作用が大であったものの AQP を介してでは無いことが明らかになった。

以上の分子化学的な五苓散の作用機序解明の努力と結果は、医学博士の学位に値すると考える。