

氏 名 Fei WEI

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1730 号

学位授与の日付 平成26年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 The Chinese herb, Danshen (Radix Salviae Miltiorrhizae),
induces salivary fluid secretion

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴
教授 箕越 靖彦
教授 吉村 由美子
教授 村上 政隆
教授 杉谷 博士 日本大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

[INTRODUCTION] Xerostomia is mainly caused by salivary gland hypofunction. The incidence of salivary gland hypofunction in the population over 65 years old is 30-40%. However, the common current treatments for salivary gland hypofunction by parasympathomimetic drugs are accompanied by systemic side effects. Danshen has been clinically used to relieve dry mouth in Chinese medicine. However, only a few reports addressed the direct effect of Danshen on the salivary glands. Murakami et al. (2009), examined 20 Chinese herbs, focusing on their capability to promote salivary fluid secretion in the submandibular glands of rats. The results of that study showed that Danshen not only promotes during muscarinic stimulation with carbamylcholine, but it also induces salivary fluid secretion without the addition of any other stimulants.

[PURPOSE] In this study, Danshen was chosen as a candidate for the relief of xerostomia, and the capability of Danshen to induce salivary fluid secretion and its mechanism were examined.

[METHODS] The submandibular gland was isolated from the rat and vascularly perfused, and also acinar cells were isolated to measure the Ca^{2+} influx. The excretory duct was cannulated and the secreted volume was measured by electronic balance. Arterio-venous difference of partial oxygen pressure was measured as an indicator of oxygen consumption. Arterio-venous pressure difference was also measured as indicator of increase in microcirculation.

[RESULTS & DISCUSSION] Although Danshen induced salivary fluid secretion in the submandibular glands, the time course of that secretion differed from fluid secretion induced by carbamylcholine. There was a latency associated with the fluid secretion induced by Danshen, followed by gradual increase in the secretion until it reached its highest value, and thereafter there was a slow decline to a near zero level. These characteristics suggested that the mechanism for Danshen-induced salivary fluid secretion could be different from that induced by carbamylcholine.

Carbamylcholine activates the M_3 receptor to release IP_3 and quickly releases Ca^{2+} from the intracellular calcium stores. The elevation of intracellular Ca^{2+} level induces chloride release and quick osmosis, resulting in an onset of fluid secretion.

Furthermore, the α_1 adrenergic and neurokinin A receptors use the same signalling

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

sequence after binding the individual receptors. Therefore, IP₃-store Ca²⁺ release signalling may not be involved in secretion induced by Danshen, but rather, there may be a distinct signalling process. During Danshen stimulation, the additional application of either ouabain (inhibitor of Na⁺/K⁺ ATPase) or bumetanide (inhibitor of NKCC1), inhibited the oxygen consumption and suppressed the fluid secretion by more than 90%. These results indicated that Danshen activates Na⁺/K⁺ ATPase and NKCC1 to maintain Cl⁻ release and K⁺ release for fluid secretion. Next, we examined the involvement of the main membrane receptors, M₃ muscarinic and α₁ adrenergic receptors. Neither atropine nor phentolamine inhibited the fluid secretion induced by Danshen. Accordingly, Danshen does not bind with M₃ nor α₁ receptors. An increase in [Ca²⁺]_i is essential for the activation of the luminal Cl⁻ and basolateral K⁺ channels. The nominal removal of extracellular Ca²⁺ and chelating of intracellular Ca²⁺ by BAPTA-AM totally abolished the fluid secretion induced by Danshen, suggesting the involvement of Ca²⁺ in the activation of these channels. However the fluorescent Ca²⁺ indicators could not show the changes in the [Ca²⁺]_i due to the dark color of Danshen and its extract, Salvianolic acid B. The quick drop seen in the arterio-venous pressure difference suggests an increase in the microcirculation due to Danshen. However, the paracellular fluid secretion indicated by the fluorescent dye was smaller than that induced by carbamylcholine, suggesting that the transcellular fluid secretion was dominant in the whole fluid secretion during Danshen stimulation.

[CONCLUSION] The present findings support the use of Danshen in the treatment of xerostomia, and we consider that Danshen is a promising secretagogue which could avoid the systemic side effects induced by the recent muscarinic drugs such as cevimeline, pilocarpine and so on.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

本論文は、漢方薬丹参 (*Radix Salviae miltiorrhizae*)が、唾液腺を刺激して大量の唾液を分泌すること、丹参刺激はムスカリンM₃受容体、アドレナリンα₁受容体を介さずに既知の唾液分泌機構を活性化して水分分泌を誘発することを明らかにした。従来副作用の多かったムスカリン受容体刺激剤に代る新しい治療薬としての可能性がある。

唾液分泌は支配する神経の活動により誘発される。臨床的にドライマウスの治療に用いられている20種類の漢方薬について直接唾液腺の唾液分泌に増強効果があるかどうかを生理研と南京医科大学の共同でスクリーニングした結果、15種類が、carbamylcholine (CCh) 誘発の唾液分泌を増強した。出願者は、この中から丹参 (Danshen、DS)が単独投与で唾液分泌を誘発することを見だし、その分泌機序を明らかにする実験計画を実施した。顕微鏡下で雄性ラットから顎下腺を摘出し、動脈から灌流液を一定流量で灌流した。導管に挿入したチューブの先端を電子天秤上のカップに導き、唾液の累積重量を測定した。CChは急速に分泌を誘発して1分以内にピークを示し、一旦、低下した後に再び増加してプラトー値となる。DSは投与後数分間、分泌が誘発されない潜時を示した。しかし、分泌が誘発されると増加して20分後に最大分泌速度を示し、その後、40分かけて低下した。これは、DSがIP₃依存Ca²⁺ storeからのCa²⁺放出を起こさない可能性を示した。これを発端にDSがどの作用点に働き、最終的な水分分泌をもたらすかを系統的に検討した。

唾液水分分泌経路には唾液腺細胞を通過する経細胞経路と唾液腺細胞間隙を用いる傍細胞経路がある。CChによる分泌刺激開始時の最初のピークは経細胞輸送によるもので、続いて増加する水分分泌の2/3は傍細胞輸送によるものと推定される。傍細胞輸送の駆動力は主としてmicrocirculationの静水圧による。動静脈灌流系に三方活栓を置いて動静脈静水圧差を測定した。DS投与直後に静水圧差は急速に低下し、microcirculationに灌流液が流入することが示された。細胞内に進入しない蛍光色素Lucifer Yellow (LY)を灌流液に加え、DSによるLY分泌を測定した。DSによるLY分泌はCCh刺激に比べて低値であり、大量の水分分泌増加は傍細胞輸送では説明できないため、DSは主に経細胞分泌を誘発すると結論づけた。

ムスカリンM₃受容体とアドレナリンα₁受容体は唾液腺水分分泌のための基本受容体である。阻害剤の投与実験を行うと、DSによる分泌はムスカリンM₃受容体、アドレナリンα₁受容体いずれを阻害しても抑制されず、これらの受容体の関与は否定された。経細胞水分分泌は、管腔側膜のCa²⁺依存性Cl⁻チャネルによってCl⁻が流出し、これにNa⁺イオンが電気的に追従して浸透圧勾配が生じることによって細胞から水がaquaporin5を通過して流出することによっておこると考えられている。DS刺激中にNKCC1及びNa⁺/K⁺ ATPaseの阻害剤のbumetanide及びouabainを投与してCl⁻流出を示す水分分泌、エネルギー代謝の活性化を示す酸素消費を測定し、NKCC1及びNa⁺/K⁺ ATPaseが通常ムスカリン受容体刺激同様にDS刺激でも大きく関与していることが示された。

こうした結果から出願者は、DSは未知の経路により細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、これによりCa²⁺活性化Cl⁻チャネルが活性化し、水分分泌を起こすと考えた。灌流液Ca²⁺除去、BAPTA-AMによる細胞内Ca²⁺キレートによりDSによる分泌は誘発されず、細胞内外Ca²⁺の必要性が示された。次に、単離した顎下腺細胞を用いて細胞内Ca²⁺の測定を試みた。予備実験でDSはCa²⁺指示薬の蛍光をマスクしCa²⁺濃度測定は不調に終わったので、刺激にはDSの抽出物 Salvianolic Acidを用いた。しかし、同様にCa²⁺指示薬の蛍光をマスクしたため、Ca²⁺指示薬による細胞内Ca²⁺濃度は確認できなかった。

以上のように、出願者は漢方薬丹参の唾液腺による分泌誘発現象を、水分分泌、酸素消費、傍細胞輸送、microcirculationなど種々の臓器機能を経時的に測定することによって初めて客観的な記述を行った。本研究は、漢方薬等客観的記載のない薬物機能について、系

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

統的に臓器生理機能を測定してその機構を議論した優れた研究であり、臓器生理学としての方法論を含め、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。