

薬理研究

五苓散のカルシウム感受容体活性化を介したアкваポリン2のリン酸化調節による利尿促進作用（マウス、*in vitro*）

Goreisan promotes diuresis by regulating the abundance of aquaporin 2 phosphorylated at serine 269 through calcium-sensing receptor activation
Ogura, K et al. Sci Rep. 2024, 14 (1), 29650. doi:10.1038/s41598-024-81324-y.

本論文の著者は全員、株式会社ツムラの社員である。

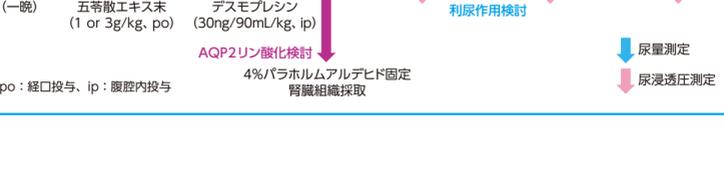
試験デザイン

試験1（マウス）

- 7週齢雄性C57BL/6Jマウスを、蒸留水（五苓散エキス末対照）+生理食塩水（デスマプレシン対照）群、蒸留水+デスマプレシン群、五苓散エキス末（1g/kg）+デスマプレシン群、五苓散エキス末（3g/kg）+デスマプレシン群の4群に割り付けた（各群n=18）。
- 五苓散エキス末または蒸留水（10mL/kg）を経口投与し、その30分後に溶媒（生理食塩水）またはデスマプレシン（30ng/kg）を90mL/kgの投与量で腹腔内投与し、尿量減少を伴う体内水分過剰状態を誘発させた。その後、ただちにマウスを代謝ケージに移し、6時間後まで自由飲水下で累積尿量を30分間隔で測定した（⇒結果1-1）。尿浸透圧の検討（各群n=7）では、6時間後まで自由飲水下で尿を2時間間隔で採取し、蒸気圧法オスモメーターで浸透圧を測定した（⇒結果1-1）。
- マウスを安楽殺後に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、腎臓の凍結切片を製作して269番セリンでリン酸化されたアкваポリン2（Ser269リン酸化AQP2*）を蛍光免疫染色で検出した。画像解析ソフトImageJで腎臓の組織切片中のSer269リン酸化AQP2陽性領域の割合を算出した（⇒結果1-2）。

* AQP2の細胞膜上への局在と相関するリン酸化部位

スケジュール

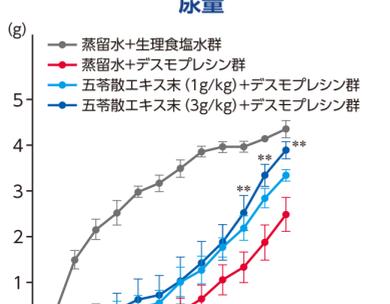


結果 1-1

デスマプレシン誘発尿量減少に対する五苓散エキス末の作用（マウス）

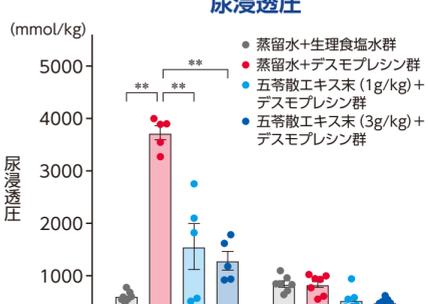
五苓散エキス末（3g/kg）+デスマプレシン群では蒸留水+デスマプレシン群と比較して、5時間以降に尿量の増加がみられました。尿浸透圧は2～4時間で低下がみられました。

尿量



mean±SEM, n=6 (3匹/代謝ケージ)*
** P<0.01 vs. 蒸留水+デスマプレシン群
two-way ANOVA+Tukey's test
※尿サンプルはマウス3匹分の尿を1サンプルとして回収

尿浸透圧



mean±SEM, 各群n=7*
** P<0.01, two-way ANOVA+Tukey's test
※2～4時間時点で排尿しなかった個体は欠損値

結果 1-2

マウス腎臓におけるAQP2のリン酸化（膜移行）に対する五苓散エキス末の作用

- 蒸留水+デスマプレシン群の腎臓では、蒸留水+生理食塩水群と比較して、Ser269リン酸化AQP2の量が増加し（P<0.01*）、AQP2の膜移行が示唆されました。
- 五苓散エキス末（3g/kg）+デスマプレシン群の腎臓では、蒸留水+デスマプレシン群と比較して、Ser269リン酸化AQP2の量が減少しました（P<0.01*）。

* one-way ANOVA+Tukey's test
各群n=6

試験デザイン

試験2（*in vitro*）

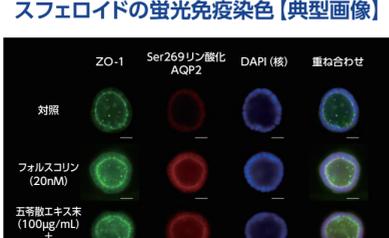
- マウス腎集合管細胞株mIMCD-3をマトリゲル中で3次元培養し、管腔構造を伴うスフェロイドモデルを構築した。五苓散エキス末（100μg/mL）を添加し、30分後にフォルスコリン（細胞内cAMP濃度を上昇させる試薬）で1時間刺激後、4%パラホルムアルデヒドでスフェロイドを固定した。ZO-1（スフェロイド管腔構造の頂端膜側に局在）およびSer269リン酸化AQP2の局在を蛍光免疫染色で解析した。画像解析はImageJを用いた（⇒結果2-1）。
- mIMCD-3細胞を五苓散エキス末（12.5～100μg/mL）で15分間前処理し、フォルスコリンで15分間刺激後にcAMP量を測定した（⇒結果2-2）。カルシウム感受容体（CaSR）の関与を確認するため、CaSR拮抗薬のNPS-2143で処置後に同様の試験を行った（⇒結果2-3）。

結果 2-1

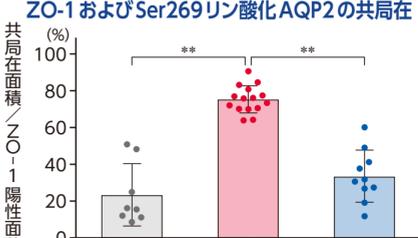
mIMCD-3細胞スフェロイドモデルにおけるフォルスコリン誘発AQP2の膜移行に対する五苓散エキス末の作用（*in vitro*）

五苓散エキス末（100μg/mL）+フォルスコリン群では、フォルスコリン群と比較して、管腔膜（ZO-1陽性領域）に共局在するSer269リン酸化AQP2の量が減少し、AQP2の管腔膜への移行が抑制されたことが示唆されました。

スフェロイドの蛍光免疫染色【典型画像】



ZO-1およびSer269リン酸化AQP2の共局在

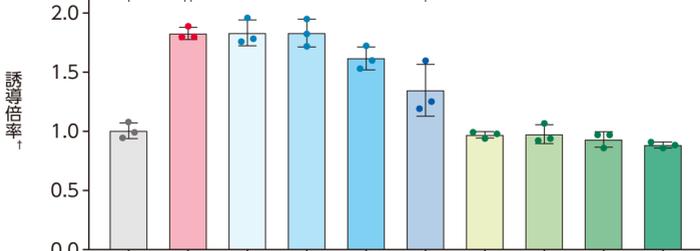


mean±SEM
** P<0.01, one-way ANOVA+Tukey's test

結果 2-2

mIMCD-3細胞におけるフォルスコリン誘発cAMP産生に対する五苓散エキス末の作用（*in vitro*）

五苓散エキス末（100μg/mL）+フォルスコリン群では、フォルスコリン群と比較して、フォルスコリン刺激によるcAMP産生量が減少しました。

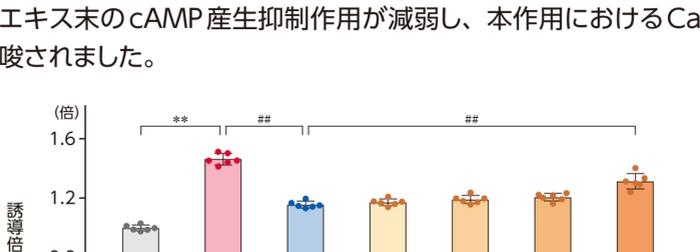


mean±SEM, 各群n=3
** P<0.01, unpaired t test+Welch's correction
P<0.01, one-way ANOVA+Dunnnett's test
↑ フォルスコリン(-) / 五苓散エキス末(-)群を1.0とする

結果 2-3

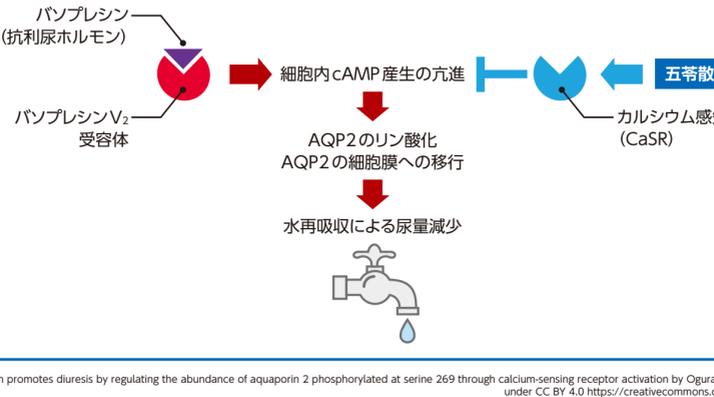
mIMCD-3細胞におけるフォルスコリン誘発cAMP産生に対するCaSRを介した五苓散エキス末の作用（*in vitro*）

五苓散エキス末（100μg/mL）+フォルスコリン（20nM）+NPS-2143（1000nM）群では、五苓散エキス末（100μg/mL）+フォルスコリン（20nM）群と比較して、五苓散エキス末のcAMP産生抑制作用が減弱し、本作用におけるCaSRの関与が示唆されました。



mean±SEM, 各群n=6
** P<0.01, unpaired t test+Welch's correction
P<0.01, one-way ANOVA+Tukey's test
↑ フォルスコリン(-) / 五苓散エキス末(-)群を1.0とする

腎臓集合管における水再吸収と五苓散による利尿促進作用



Goreisan promotes diuresis by regulating the abundance of aquaporin 2 phosphorylated at serine 269 through calcium-sensing receptor activation by Ogura, K. et al. is licensed under CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

17 ツムラ五苓散エキス顆粒(医療用)

日本標準商品分類番号	薬効分類名	薬価基準
875200	漢方製剤	取裁

名	製品名	和名	ツムラ五苓散エキス顆粒(医療用)	薬価基準
	洋名	TSUMURA Goreisan Extract Granules for Ethical Use		
称	一般名	和名	五苓散	
		洋名	goreisan	

3. 組成・性状

3.1 組成
販売名 ツムラ五苓散エキス顆粒(医療用)
有効成分 本品7.5g中、下記の割合の混合生薬の乾燥エキス2.0g含有する。
日局 タクシャ(沢瀉).....4.0g 日局 フリョウ(茯苓).....3.0g
日局 ソウジュツ(蒼朮).....3.0g 日局 ケイヒ(桂皮).....1.5g
日局 チョレイ(猪苓).....3.0g

添加剤 日局ステアリン酸マグネシウム、日局乳糖水和物

3.2 製剤の性状
剤形 顆粒剤 におい 特異なにおい
色 淡灰褐色 味 わずかに辛い

3.3 識別コード ツムラ / 17

4. 効能又は効果

口渴、尿量減少するもの次の諸症：
浮腫、ネフローゼ、二日酔、急性腎臓カタル、下痢、悪心、嘔吐、めまい、胃内潣水、頭痛、尿毒症、暑気あたり、糖尿病

《証に関する情報》 使用目標＝証 監修：大塚恭彦、花輪尚彦（北里大学）

口渴ならびに尿量減少を主目標として用いる。
1) 浮腫、悪心、嘔吐、めまいなどの症状を伴う場合。
2) 心窩部に振水音を認める場合。

※詳細については製品電子添文をご覧ください。電子添文の改訂にはご注意ください。

6. 用法及用量
通常、成人1日7.5gを2～3回に分割し、食前又は食後に経口投与する。なお、年齢、体重、症状により適宜増減する。

8. 重要な基本的注意
8.1 本剤の使用にあたっては、患者の証(体質・症状)を考慮して投与すること。なお、経過を十分に観察し、症状・所見の改善が認められない場合には、継続投与を避けること。
8.2 他の漢方製剤等を併用する場合は、含有生薬の重複に注意すること。

9. 特定の背景を有する患者に関する注意

9.5 妊婦 妊娠又は妊娠している可能性のある女性には、治療上の有益性が危険性を上回ると判断される場合にのみ投与すること。
9.6 授乳婦 治療上の有益性及び母乳栄養の有益性を考慮し、授乳の継続又は中止を検討すること。
9.7 小児等 小児等を対象とした臨床試験は実施していない。
9.8 高齢者 高齢者など注意すること。一般に生理機能が低下していること。

11. 副作用
次の副作用があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止するなど適切な処置を行うこと。
11.2 その他の副作用

過敏症	発疹、発赤、痒疹等	程度不明
肝臓	肝機能異常(AST、ALT、γ-GTP等の上昇)	

20. 取扱い上の注意
20.1 本剤の品質を保つため、できるだけ湿気を避け、直射日光の当たらない涼しい所に保管すること。
20.2 開封後は特に湿気を避け、取扱いに注意すること。
20.3 本剤は生薬を原料としているので、色調等が異なることがある。

22. 包装

500g[ポトル]	5kg(500g×10)[バッチ]	2.5g×42包[分包装]	2.5g×189包[分包装]
承認番号	承認年月	薬価基準収載	販売開始
16100AMZ03287000	1986年5月	1986年10月	1986年10月
貯法	有効期間	製造販売会社	2023年12月改訂の電子添文より作成
室温保存	3年	株式会社ツムラ	