

## ニンニク成分アリシンによる大腸起電性イオン輸送制御および腸管蠕動運動との関連性の検討

土谷 庸<sup>1</sup>, 川俣 幸一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>東北女子大学家政学部健康栄養学科, <sup>2</sup>東北生活文化大学家政学科

**概要** ニンニクの香り成分であるアリシンには、疲労回復、癌細胞成長抑制、殺菌効果、整腸作用など様々な生理的効果があることが報告されている。本実験ではアリシンの整腸作用効果に着目した。これまでアリシンによる腸管蠕動運動調節作用は報告されているが、腸管イオン輸送や水輸送制御に対する効果は不明であった。腸管でのイオン輸送は体液保持や効率的な栄養素吸収に寄与し、また腸管蠕動運動と同期して起こる事で腸管内容物移動促進にも寄与している。

本研究では実験標本としてラット大腸および回腸を使用し、カロメル電極を用いた腸管膜電位差測定法を用いてアリシンが腸管起電性イオン輸送に及ぼす効果を検討した。また、その効果がアリシン誘発性腸管蠕動運動亢進と機能的に関連しているかを検討するため、腸管内のプラスチック製模型糞便(以下ペレット)移動速度を録画した動画解析法にて実施した。

大腸粘膜標本の基底膜側にアリシン 30  $\mu\text{M}$  を投与した場合、腸管膜電位の正側への上昇がみられた。アリシン投与における電位変化は、上皮性 Na チャネル Enact 阻害剤であるアミロライドを頂端膜側に前投与した場合と非投与時を比較しても有意差は見られなかった。一方、クロライドイオン輸送体である Na-K-2Cl 共輸送体の阻害剤ブメタニドを基底膜側に前投与した場合、電位変化はブメタニド非投与時に比べ約 60%有意に低下した。またアリシン誘導電位変化は TRP 受容体ファミリー TRPA1 の阻害剤である AP-18 前投与により有意に抑制されたが、同受容体ファミリー TRPV1 阻害剤であるカプサイゼン前投与の場合は抑制が見られなかった。以上の結果から、アリシンは大腸粘膜基底膜側に存在する TRPA1 を介して主に Na-K-2Cl 共輸送体経由の起電性クロライド分泌を亢進することが示唆された。回腸部でもアリシン投与による電位変化が確認され、培養液から重炭酸イオンを除いた条件下ではこの効果は完全に抑制された。以上の結果から、回腸部ではアリシンは主に起電性重炭酸イオン分泌を亢進することが示唆された。

ペレット移動速度測定実験では、アリシン非投与時の自発的蠕動規模が大きい回腸を用いた。培養液にアリシン 30  $\mu\text{M}$  を投与すると空腸内ペレット移動速度は増大した。培養液から重炭酸を除いた条件下では、回腸内ペレット移動速度は低下する傾向が見られた。これらの結果は、アリシン誘発性回腸蠕動運動亢進作用は細胞外重炭酸イオンに依存していることを示唆している。

### 1. 研究目的

腸管でのイオン輸送は体液保持や効率的な栄養素吸収に寄与し、また腸管蠕動運動と同期して起こる事で腸管内容物移動を促進すると考えられる。我々は整腸作用を持つことが知られているニンニク成分アリシンに注目した。アリシンは香辛料として広く利用されているニンニクの

におい成分である。アリシンは生ニンニクを刻んだりすり下ろしたりする際、ニンニクに含まれるペプチド誘導体であるアリインが酸素に触れて酸化されることで、酵素アリナーゼの作用によってアリルスルフェン酸を経て生成される。アリシンの生理的役割として、消化管においては抗癌作用および蠕動運動促進作用が報告されているが<sup>(1,2)</sup>、イオ

ン輸送に対する効果は未解明であった。これまで本研究室では、アリシンが大腸および回腸での起電性イオン輸送を変化させることを明らかにした(未発表データ)。その起電性イオン輸送の候補として、ナトリウム吸収、クロライド分泌および重炭酸イオン分泌が挙げられる。そこで本研究では、Ussing チャンバーを用いた腸管膜電位差測定法を用いて、アリシンによる大腸イオン輸送制御に関与するイオン輸送体の検討を行った。またアリシンは TRP チャンネルファミリーである TRPA1(ワサビ受容体とも呼ばれる)に結合することが知られている<sup>(3)</sup>。よってアリシンによる腸管イオン輸送制御機構とワサビ受容体 TRPA1 の機能的関連性も検討した。

さらに本研究では、アリシンによる蠕動運動制御作用が腸管イオン輸送制御作用に依存した機構であるかどうかを検討した。この実験では、自発的蠕動運動が活発な回腸部を用いてペレット移動速度測定法を行った。上記したように、アリシンが大腸蠕動運動に及ぼす効果の検討が他研究者によってなされてきたが、いずれも腸管内容物を含まない状態でアイソメトリックトランスデューサによる測定方法であった。我々はプラスチック製模型糞便を使用し、その腸管内移動速度を測定する方法を実施する。これによって、大腸蠕動運動をより生理的条件に近い状態でかつ視覚的に理解することが可能になると期待出来る。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験に使用した動物および飼育条件

実験時点で9週齢(平均体重295g)のラットを用いた。ラットは明暗を12時間おきに自動切り替えした室温25°C・湿度50%の飼育室の中で飼育し、標準食および水を自由摂取させた。実験前日から12時間以上絶食させた。全ての動物実験は、東北女子大学動物実験委員会による実験計画審査・承認を得た上で実施した。

### 2.2 実験に用いた溶液の調整

ラット大腸粘膜および回腸標本は Tyrode 溶液中(119 NaCl, 2.4 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>, 10 Glucose(in mM)でインキュベートした。重炭酸イオンを除去した実験では、全ての重炭酸イオンをグルコン酸で置換したHEPES溶液を使用した。重炭酸イオンとクロライドイオンの両者を除去した実験では、両イオンを全てグルコン酸で置換した無クロライド・HEPES 緩衝液を使用した。

### 2.3 大腸粘膜および回腸標本を用いたイオン輸送測定方法

ラットを開腹解剖し、大腸もしくは回腸を約5cm摘出したのちに注射器を用いて抽出した腸管内容物を Tyrode 液で洗浄した。Tyrode 液中で酸素95%・二酸化炭素5%の混合ガスでバブリングしながら腸管をハサミで切り開き、シート状にした。大腸を用いた実験では、実体顕微鏡下で観察のもと微細組織解剖用ピンセットを用いて、血管層、筋層および漿膜を一気に剥がした粘膜のみの標本(以後粘膜標本と表記)を作製した。回腸を用いた実験では、血管層と筋層を剥離するのが極めて困難であるため、大腸標本と同方法で漿膜のみを剥離した標本を用いた。粘膜標本および回腸標本を直径8mmの穴が開いた Ussing チャンバーに各腸管標本をセットした。その後チャンバーの左右の空洞部分にリンゲル液を10mlずつ加え、混合ガスで通気しながら37°C下で標本を培養した。膜電位差測定のため、ポリエチレン管で作成したKCl-2%寒天ブリッジを直径8mmの各腸管標本部の中心に位置するように接続し、カロメル電極を通じて高感度DC記録計に接続して記録した。

### 2.4 ペレット移動速度測定によるアリシン誘発性腸管蠕動運動制御作用の検討

プラスチック製模型糞便(以下ペレット)を使用し、ビデオ撮影による解析にて、ペレット腸管内移動速度測定を実施した。これによって、腸管蠕動運動をより生理的条件に近い状態でかつ視覚的に解析する事が可能となる。ラット回腸を約5cm切除し、張力を与えないように一部をピンで固定した状態でリンゲル液内に培養した。この条件下では回腸蠕動運動およびペレット移動は制限されない事を予備実験にて確認した。空腸標本の口腔側から模型糞便を挿入し、培養液中にアリシン投与および非投与の条件下で腸管内移動速度を比較した。

## 3. 研究結果

### 3.1 アリシン投与が大腸起電性イオン輸送に及ぼす影響

大腸粘膜および回腸標本を用いて、アリシン投与が腸管起電性イオン輸送に及ぼす影響を検討した。30 μM アリシンを大腸粘膜標本の血管側に投与すると電位差の上昇が見られ、約5分後に最大値に達したのちに緩やかに下降した(Fig. 1A)。この電位上昇は培養液からクロライドイオンを除いた条件下で抑制された(Fig. 1A, B)。また、Na-K-2Cl

共輸送体阻害剤ブメタニドを大腸粘膜血管側に前投与した条件下では、アリシン投与による電位変化の約 60%が抑制された (Fig. 2)。一方で上皮性 Na チャネル阻害剤であるアミロラド前投与下では、アリシン投与による電位変化に影響は見られなかった (Fig. 2)。以上の結果は、アリシンの大腸血管側投与が Na-K-2Cl 共輸送体を介したクロライドイオン分泌を亢進する事を示唆している。

### 3. 2 アリシン誘発性大腸クロライドイオン分泌活性化と TRP チャネルの関連性の検討

アリシンは TRP チャネルの一種である TRPA1 に結合することが薬理学的研究により報告されている<sup>(3)</sup>。よって本実験ではアリシン投与による大腸クロライドイオン分泌活性化が

TRPA1 を介したメカニズムかどうかを検討した。

TRPA1 阻害剤である 30  $\mu$ M AP-18 を大腸血管側に前投与した条件下では、アリシン投与による数分での大きな電位差上昇は見られず、非常に緩やかに上昇していくのみであった (Fig. 3A, B)。カプサイシン受容体で TRP チャネルの一つである TRPV1 の阻害剤カプサゼピン 30  $\mu$ M 前投与下の条件では、アリシン投与による電位変化は阻害剤非投与下実験との有意な差は見られなかった (Fig. 3C)。以上の結果により、アリシン誘発大腸クロライドイオン分泌の大部分は TRP チャネル TRPA1 を介した機構であることが示唆された。

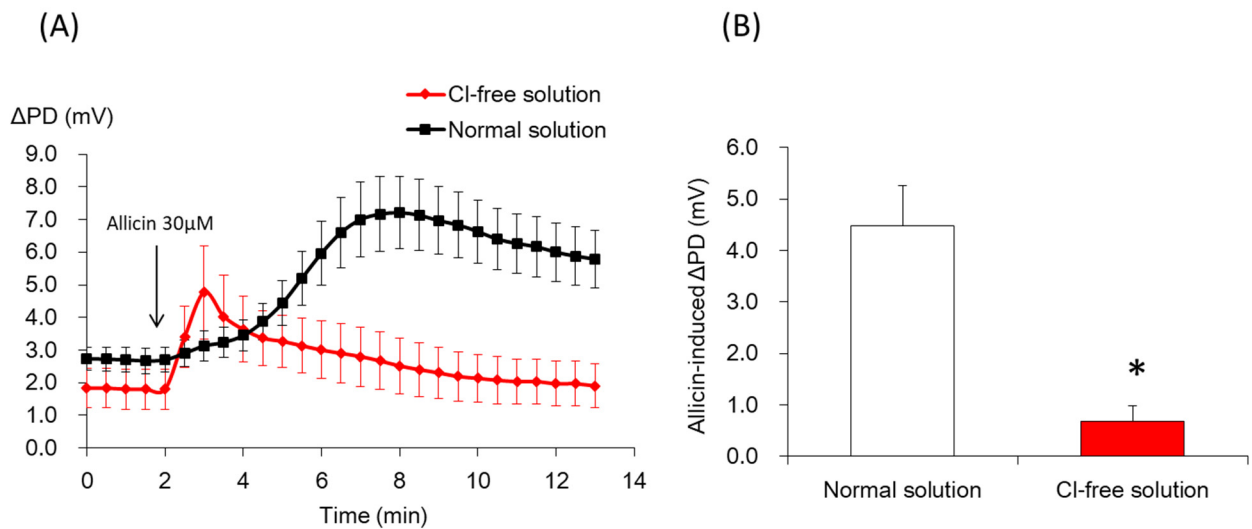
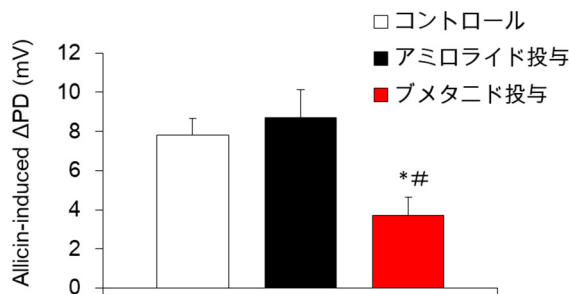


Fig. 1. The effect of allicin on electrogenic ion transport in the rat colon



\*  $P < 0.05$  compared to Control  
#  $P < 0.05$  compared to +Amiloride

Fig. 2. The effect of allicin on electrogenic sodium absorption and chloride secretion in the rat colon

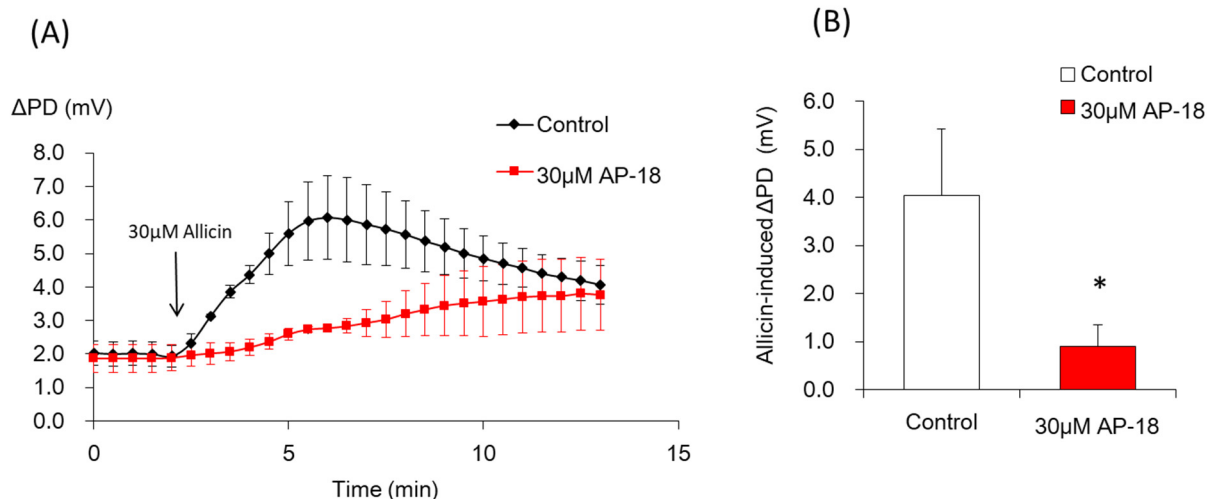
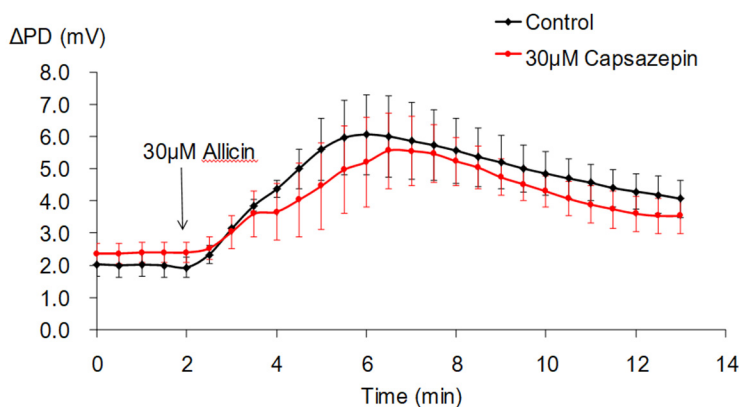


Fig. 3(C)



**Fig. 3.** Involvement of TRPA1 and TRPV1 in the increase of electrogenic chloride secretion induced by allicin in the rat colon

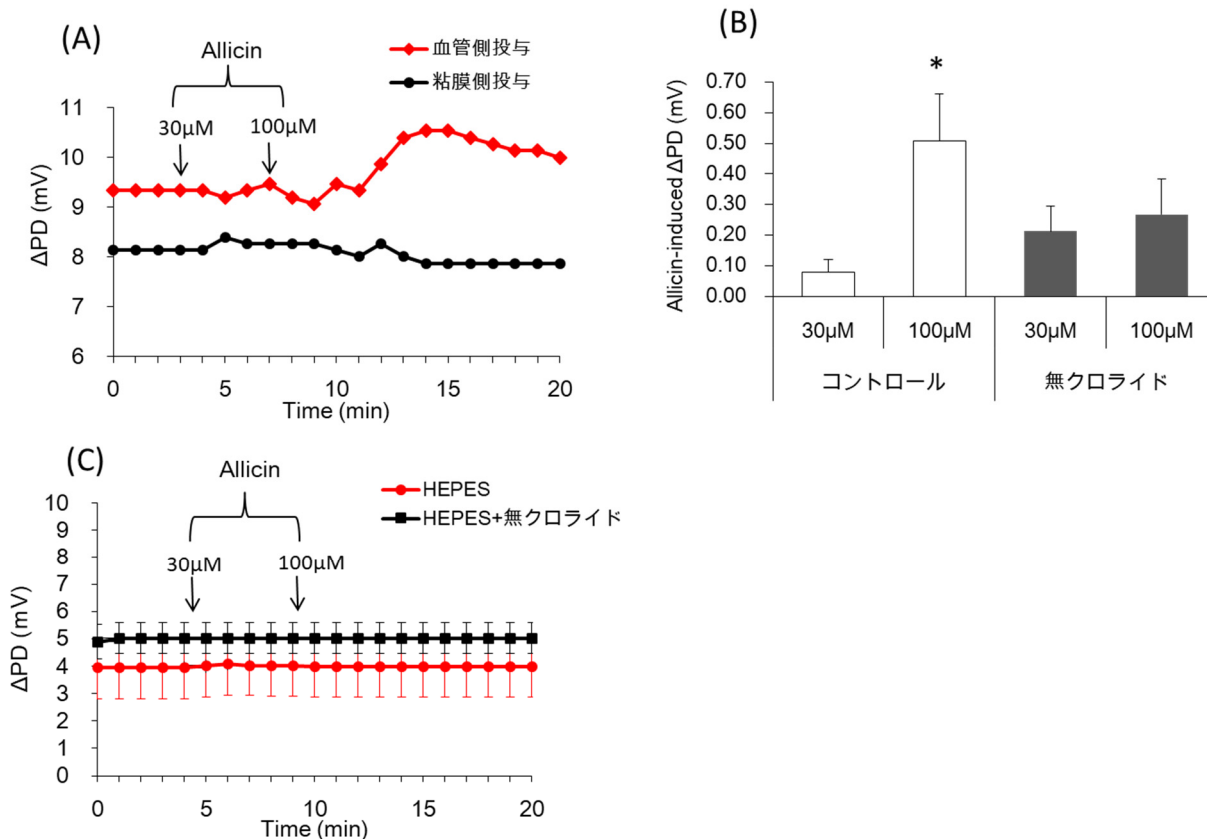
### 3. 3 アリシンが回腸イオン分泌に及ぼす影響の検討

本研究室では、大腸部と比較して回腸部はより強い自発的蠕動運動を行っていることを確認した。回腸部では蠕動運動に伴ってイオン輸送も活発に行われていると予測される。よって本実験では、アリシンが回腸イオン分泌に及ぼす影響の検討をした。**Fig. 4A** に示すように、回腸血管側にアリシンを投与した場合 100  $\mu\text{M}$  の濃度において回腸膜電位変化が著明に上昇した。一方、回腸粘膜側へのアリシン投与では100  $\mu\text{M}$  においても目立った回腸膜電位変化は見られなかった。アリシンの回腸側血管投与によるイオン輸送変化は培養液からクロライドイオンを除去した条件下でやや低下傾向が見られたが、完全に抑制されなかった(**Fig. 4B**)。培養液中から重炭酸イオンを除去した条件下では、アリシン投与によるイオン輸送活性化は全

く起こらなかった(**Fig. 4C**)。これらの結果から、アリシンは回腸においては主に重炭酸イオンの分泌を亢進する事が示唆された。

### 3. 4 回腸におけるアリシン誘発性重炭酸イオン分泌亢進と蠕動運動亢進作用の関連性

アリシンによる回腸蠕動運動亢進作用が3. 3で明らかにしたアリシン誘発性回腸重炭酸イオン分泌亢進に依存した機構かどうかを、腸管内ペレット移動速度測定法にて検討した。通常リンゲル溶液培養下では、30  $\mu\text{M}$  アリシン投与後 75 $\pm$ 17.6 秒後に空腸内ペレット移動速度の増大が見られた。一方重炭酸イオン除去したリンゲル溶液下では、アリシン投与後の空腸内ペレット移動速度は通常リンゲル溶液下と比較して低下する傾向が見られた(**data not shown**)。



**Fig. 4.** The effect of allicin on electrogenic bicarbonate ion transport in the rat ileum

#### 4. 考察および今後の課題

本研究ではまず、①アリシン誘発性大腸クロライドイオン分泌はTRP受容体TRPA1(ワサビ受容体)を介している事、②回腸においてアリシン投与は主に重炭酸イオン分泌の活性化を行う事が明らかになった。過去に本研究室では、ニンニク同様に香辛料として利用されているショウガの成分・6-ジゲロールが別種のTRP受容体でカプサイシン受容体と呼ばれるTRPV1を介してラット大腸ナトリウムイオン吸収を亢進する事を報告している<sup>(4)</sup>。香辛料成分によって関与するTRP受容体の種類が異なる事は、それらの成分が消化管機能に及ぼす影響の差を考慮する上でも興味深い。またアリシンは回腸においては、クロライドイオンよりも重炭酸イオン分泌の方を主に亢進させることが示唆された。回腸と大腸ではクロライドイオンや重炭酸イオンの輸送機構が異なることが報告されている<sup>(5)</sup>。アリシン作用に部位差が生じる直接的理由はまだ不明であり、今後の検討が必要である。また一般的に、大腸クロライドイオン分泌亢進は水分分泌亢進を伴うと考えられている。こ

の量が過剰であれば下痢を引き起こすが、適度な水分分泌は腸管内容物の円滑な移動を促すので整腸作用の範囲として考えられる。今回の研究では、アリシン誘発クロライドイオン分泌亢進により水分分泌が同時に伴うかどうかを直接検討することは出来なかったため、今後の課題として取り組みたい。

さらに回腸では、アリシン誘発性蠕動運動活性化が重炭酸イオン分泌に依存する可能性が示唆されたことは大変興味深い。アリシンは回腸蠕動運動活性化に加え、弱アルカリ性重炭酸イオン分泌亢進によって回腸内の酸性化を中和するという整腸作用に寄与している役割が考えられる。本研究で用いた空腸内ペレット移動速度測定法は、腸管蠕動運動および腸管内内容物移動速度を解析するのに十分な精度であることが確認された。その一方で現時点では実験結果の有意差を示すには実験例数が不足しており、今後は例数を増やす事でアリシン誘発性蠕動運動活性化が重炭酸イオン分泌活性化に直接依存した機構であることをより明確に示す必要がある。

## 5. 参考文献

- (1) Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2. Bat-Chen W, Golan T, Peri I, Ludmer Z, Schwartz B. *Nutr Cancer*. 2010, 62:p947-957.
- (2) Contractile effect of TRPA1 receptor agonists in the isolated mouse intestine. Penuelas A, Tashima K, Tsuchiya S, Matsumoto K, Nakamura T, Horie S, Yano S. *Eur J Pharmacol*. 2007, 576:p143-150.
- (3) The pungency of garlic: activation of TRPA1 and TRPV1 in response to allicin. Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. *Curr Biol*. 2005, 15:p929-934
- (4) [6]-gingerol induces electrogenic sodium absorption in the rat colon via the capsaicin receptor TRPV1. Tsuchiya Y, Fujita R, Saitou A, Wajima N, Aizawa F, Iinuma A. *J Nutr Sci Vitaminol*. 2014, 60: p403-407.
- (5) Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Cotransport in Normal and Cystic Fibrosis Intestine. Seidler U, Bachmann O, Jacob P, Christiani S, Blumenstein I, Heidi R. *J Pancreas*. 2001, 2:p247-256.

## Effects of Allicin on Electrogenic Ion Transports and Its Correlation with Contraction in the Colon

Yo Tsuchiya<sup>1</sup>, Koichi Kawamata<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Health and Nutrition, Faculty of Home Economics, Tohoku Women's College

<sup>2</sup>Department of Domestic Science, Faculty of Domestic Science, Tohoku Seikatsu Bunka University

### Summary

Allicin, a main component of garlic, possesses a variety of beneficial pharmacological and therapeutic properties, including anti-carcinogenic, bactericidal, and intestinal regulatory effects. Although it is known to regulate intestinal contraction, its effect on intestinal ion transport is unclear. The aims of this study were (1) to examine the role of allicin in the regulation of electrogenic ion transport in the rat intestine by measuring transmural potential difference ( $\Delta$ PD) with an Ussing chamber system and (2) to study the correlation between the effects of allicin on ion transport and intestinal peristalsis. Allicin (30  $\mu$ M) induced significant positive  $\Delta$ PD when administered to the serosal side of the colon and ileum. In experiment (1), allicin-induced increase in colonic  $\Delta$ PD was mainly suppressed by bumetanide, an inhibitor of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  co-transporter (NKCC1). In addition,  $\Delta$ PD induction by allicin was greatly diminished by 30  $\mu$ M AP-18, an inhibitor of the TRP receptor TRPA1. In the ileum, removal of bicarbonate ion from the incubating solution completely suppressed allicin-induced increase in  $\Delta$ PD. These results suggest that allicin mainly induces the electrogenic absorption of chloride ion in the rat colon via TRPA1 and the electrogenic absorption of bicarbonate ion in the ileum. In experiment (2), allicin induced significant ileal peristalsis, and this effect was suppressed when bicarbonate ion was removed from the incubation solution. These results suggest the possibility that allicin-induced ileal peristalsis depends on the extracellular bicarbonate ion electrogenically secreted in the ileum.