

表 題 胃全摘後の摂食量低下、体重減少に対する六君子湯の治療効果と作用機構の解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 田口 昌延

担当指導教員氏名 佐田 尚宏 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
消化器疾患学 分野
消化器外科学

2016年1月8日申請の学位論文

目次

1. はじめに	2
2. 材料と方法	4
3. 結果	10
4. 考察	22
5. おわりに	27
6. 謝辞	28
7. 引用文献	29

1. はじめに

胃癌罹患数の多いわが国をはじめ、胃切除後の体重減少は深刻な問題である。特に胃全摘術を受けると15~20%の体重減少を認め(1-3)、患者の quality of life (以下、QOL) は著しく低下する(4-6)。体重は術後1か月で著明に減少し(7)、その後、増加することなく5年以上変化しない(1, 3)。日本では、Body mass index の低下は循環器疾患、悪性腫瘍を含む様々な疾患による死亡リスクを増加すると報告されている(8)。さらに胃癌に対する胃切除後の15%以上の体重減少は、S-1による補助化学療法の継続性を低下させる(9)。適切な術後体重を維持することは、患者予後向上のために非常に重要である。

体重減少を防ぐためには、胃全摘後に生じる食欲不振(6)の改善が必要である。食欲回復は摂取エネルギーの増加につながり、術後患者のQOLを維持する。胃全摘後の食欲不振は、従来、胃貯留能消失が原因とされてきた。しかし、代用胃を作成しても摂食量の増加はわずかであり、その効果は議論の余地を残している(10, 11)。最近では胃全摘後にみられる複数の消化管ホルモンの変動が食欲を低下させると考えられている。これまで胃全摘後に上昇するコレシストキニン(12)、セロトニン(13)、術後に低下する食欲亢進ホルモンのグレリン(14, 15)をターゲットとした研究が行われてきた。しかし、臨床応用に繋がる成果は得られていない。

六君子湯(以下、RKT)は日本独自に発展した漢方薬の一つである。六君子湯は経口内服する医薬品であり、ソウジュツ(18.6%)、ニンジン(18.6%)、ハンゲ(18.6%)、ブクリョウ(18.6%)、タイソウ(9.3%)、チンピ(9.3%)、カンゾウ(4.7%)、ショウキョウ(2.3%)の8種類の生薬から構成され、これらの組み合わせにより治療効果を示すと考えられている。その主な作用点は胃であり、胃排出能の亢進により胃腸症状を改善する(16)。近年、RKTが抗癌剤投与により低下する血中グレ

リンレベルを回復し、食欲不振を改善することが報告され(17)、食欲改善薬として注目されている。しかし、グレリンの主要な産生臓器である胃を失った胃全摘後において、六君子湯が食欲改善効果、体重増加作用を示すかどうかは分かっていない。

胃全摘後の食欲不振、体重減少のメカニズムは未だ不明な点が多く、現在でも有効な改善策が無い。そこで本研究は、ラット胃全摘モデルを用いて、六君子湯の摂食と体重に対する効果と作用機序を明らかにすること、また術後の摂食低下、体重減少の原因解明を行うことを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 動物

Wistar ラット雄、5 週齢 (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を 12 時間毎の明暗サイクル (7:30-19:30)、コントロールされた室温の環境下で飼育した。通常の餌 (CE-2 ; CLEA Japan, Tokyo, Japan) と飲水ボトルで水を自由に与えた。手術前は 1 週間の慣らし飼育を行った。手術前には餌の制限はしなかった。全ての実験は、自治医科大学の動物実験委員会の承認を得て行った。

2.2 手術

6 週齢、体重 150-210g のラットに手術を行った。麻酔薬はトリブromoエタノール (40mg/body) を腹腔内投与し、正中切開で開腹した。術中は適宜、麻酔を追加投与した。十二指腸を結紮切離し、食道胃接合部で食道を切離後、胃を全摘出した。消化管の再建は Roux-en-Y 法で行った。トライツ靭帯から 2-3cm の空腸を切離・挙上し、食道空腸吻合を 7-0 PDS (ETHICON Inc., USA) を用いて、端側結節縫合で行った。Y 脚の吻合は 7-0 PDS を用いて食道空腸吻合から 4-5cm 肛門側の空腸に端側結節縫合で行った (図 1A, B)。腹壁は 5-0 ETHILON (ETHICON Inc., USA) を用いて 2 層連続縫合を行って閉腹した。Sham 手術は上腹部正中切開で開腹し、胃と小腸を優しく刺激した後に閉腹した。術直後から術後 2 日目までは水のみを与え、術後 3 日目から通常の餌を与えた。術後に鎮痛剤や抗生剤は使用しなかった。

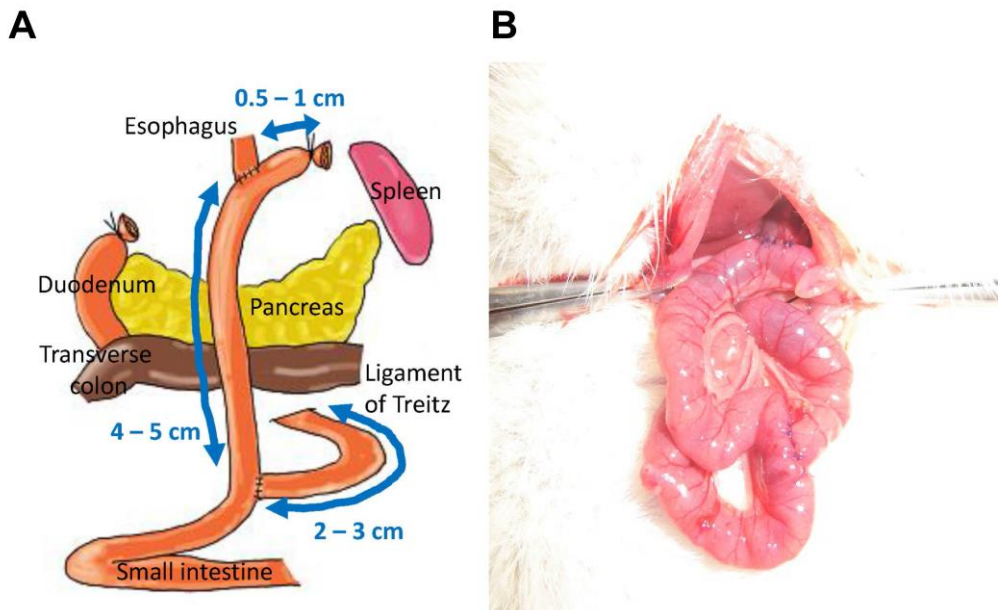


図1. ラット胃全摘手術

胃を全摘出し、Roux-en-Y法で再建する。

A：手術模式図

B：実際の画像

2.3 RKTによる治療の検討

RKT (Tsumura Co., Tokyo, Japan) は8種の生薬 (ソウジュツ (18.6%)、ニンジン (18.6%)、ハンゲ (18.6%)、ブクリョウ (18.6%)、タイソウ (9.3%)、チンピ (9.3%)、カンゾウ (4.7%)、ショウキョウ (2.3%)) から得られた熱水抽出物をスプレードライヤーで乾燥させ、エキス粉末としたものである。RKTは蒸留水に溶解し、1.2% weight per volume に調整し、遮光したボトルでラットに飲水投与を行った。投与期間は術後3日目から14日間とした。コントロール群は蒸留水を投与した。またRKTの投与期間を術後17日目から14日間投与する実験と、RKTの濃度を0.2% weight per volume に調整し術後3日目から14日間投与する

実験を行った（図 2、文献 18 より改変引用）。ラットはSham 群、Sham+RKT 群、胃全摘群、胃全摘+RKT 群の 4 群へランダムに振り分けた。各実験において、累積摂食量と体重を測定した。また以下の数式により体重改善率を算出した。

$$\text{体重改善率(\%)} = \frac{\left(\text{平均体重(胃全摘 + RKT)} - \text{平均体重(胃全摘)} \right)}{\text{平均体重(Sham)} - \text{平均体重(胃全摘)}} \times 100$$

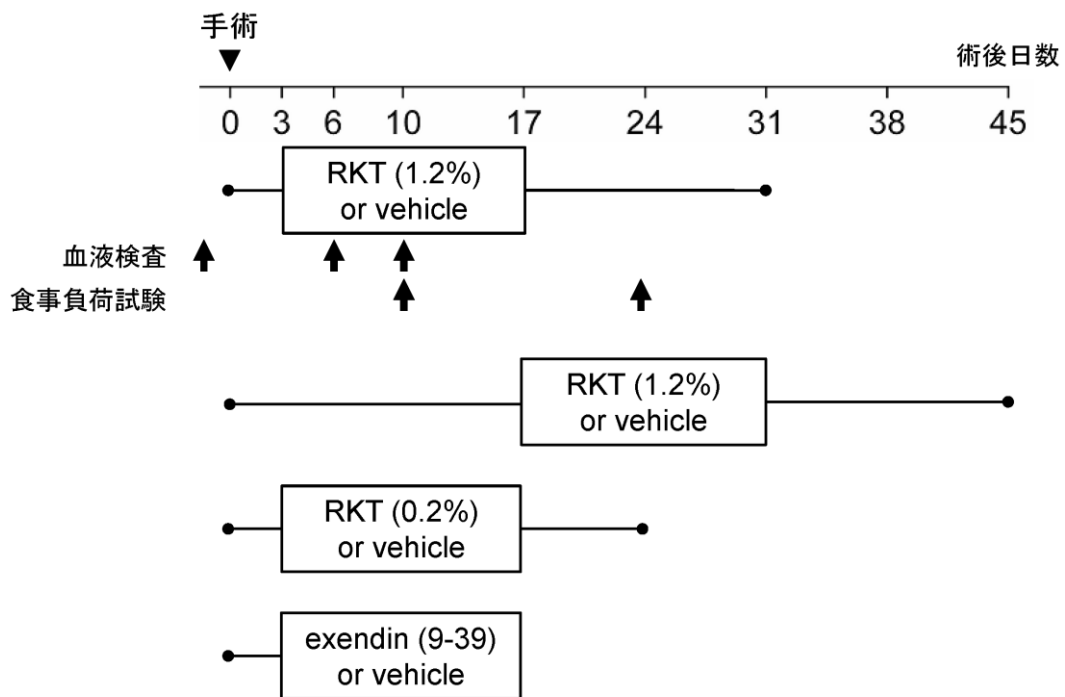


図 2. 実験プロトコール
(文献 18 より改変引用)

2.4 血液検査

6週齢の術前ラットに対し、トリブロモエタノールの腹腔内投与で全身麻酔を行い、開腹し下大静脈から血液を採取した。胃全摘ラットに対し、術後6日目、尾静脈から採血を行い、術後10日目は開腹し下大静脈から血液を採取した。採血前の絶食はせず、明期の15:00-16:00に採血を行った。

2.5 食事負荷試験

術後10日目と24日目に行った。一晚絶食を行ったラットへ、経腸栄養剤のエンシュア・H (66% carbohydrate、17% protein、17% fat ; Abbott Japan, Tokyo, Japan) を0.5ml (0.75kcal) /100g 体重の用量でゾンデを用いて経口投与した。投与前 (0分)、投与30分後、60分後、120分後に尾静脈から血液を採取した。血糖値は血糖測定器で測定した。

2.6 活性型 glucagon-like peptide-1 (GLP-1)、アシルグレリン、インスリン、オキシトシンの血中濃度測定

ラットから採取した血液はヘパリンを添加したサンプリングチューブへ入れた後、アイスボックスに乗せ、速やかに遠心分離器にかけ (15,000 rpm、2分)、血漿成分を採取した。GLP-1 用検体には 100 μ mol/l に調整した dipeptidyl peptidase-IV 阻害剤 (Vildagliptin) を血漿の 1/10 量を加えた。グレリン用検体には血漿の 1/10 量の 1N 塩酸を加えた。検体は測定に供するまで -80°C で冷凍保存した。活性型 GLP-1 は GLP-1 (Active) ELISA KIT (Shibayagi, Gunma, Japan) を用いて測定した。本キットで使用される抗体は rat GLP-1 (7-36) に対し 100% の交差性、GLP-1 (7-37) に対し $<0.1\%$ の交差性をもつモノクローナル抗体である。アシルグレリンは active Ghrelin ELISA kit (Mitsubishi Kagaku Iatron, Tokyo,

Japan)を用いて測定した。インスリンは ELISA kit (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan)を用いて測定した。オキシトシンは Oxytocin EIA Kit (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA)を用いて測定した。

2.7 GLP-1 受容体拮抗薬 (exendin (9-39)) の投与による検討

ラットに対し、GLP-1受容体の特異的拮抗薬である exendin (9-39) (Abgent, San Diego, CA)を持続皮下投与した。Sham 群に対し 0.5mg、胃全摘群に対し 0.4mg の exendin (9-39)を蒸留水に溶解し、浸透圧ミニポンプ (Alzet mini-osmotic pump model 2002, Durect Corporation, Cupertino, CA) へ充填した。このポンプは溶液を 14 日間持続放出する。ラットの術後 3 日目にポンプの植え込み手術を行った。ラットは Sham 群、Sham+exendin (9-39) 群、胃全摘群、胃全摘+exendin (9-39) 群の 4 群へランダムに振り分けた。トリブromoエタノールの腹腔内投与で全身麻酔を行い、後頸部を切開し、皮下を剥離してミニポンプを植え込んだ。皮膚は 5-0 ETHILON を用いて連続縫合閉鎖した。手術後に通常食を開始した。exendin (9-39)の投与量は、ラットへ同薬剤を投与して摂食量と体重に対する影響を検討した Dailey MJ らの報告を参考に設定した(19)。

2.8 臨床試験 (パイロット試験) によるヒト胃全摘後の血中 GLP-1 濃度の測定

自治医科大学附属病院で 2013 年から 2014 年まで、胃全摘を行われた患者に対して臨床試験を行った。選択基準は (1) 胃癌に対して治癒切除が可能な症例 (2) 胃全摘術を行う症例 (3) 術前化学療法を行われていない症例 (4) 年齢が 20~80 歳の症例 (5) Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status 0~1 の症例 (6) 臓器機能が保たれている症例 (7) 本研究について本人からインフォームド・コンセントを受けられることのできる症例とした。除外基準は (1) 腫瘍により

食事摂取量が減少している症例 (2) 同時性あるいは異時性重複癌の症例 (3) 出血傾向のある症例 (4) 糖尿病で血糖コントロールが不良な症例 (5) ステロイド剤を処方されている症例 (6) 6 か月以内に不安定狭心症あるいは心筋梗塞を発症した症例 (7) 酸素投与を必要とする肺疾患がある症例 (8) 妊娠中・授乳中あるいは妊娠を予定している女性とした。手術当日朝、術後 1 日目朝の空腹時に静脈血を採血した。術後 3~4 日目に経口摂取を開始した。採取した血液は EDTA 入りの容器に回収し、遠心分離 (1,000 g、30 分) し、血漿成分を回収し測定に供するまで -80°C で冷凍保存した。その後、総 GLP-1 を Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Total ELISA KIT (EMD Millipore Corporation, USA)で測定した。本キットで使用される抗体は、GLP-1 (7-36)と GLP-1 (9-36)を測定する。この研究は自治医科大学の臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行われた (受付番号: 臨 A14-052)。参加したすべての患者から署名による同意を得た。この臨床試験は UMIN.ac.jp に登録した。(UMIN Clinical Trials Registry number, UMIN000010568)

2.9 統計解析

すべての測定値は平均値±標準誤差で標記した。統計解析は paired または unpaired t-test、one-way または repeated measures two-way analysis of variance (Tukey-Kramer multiple-comparison test)で行った。統計ソフトは Prism 6 (GraphPad Software)を使用した。P<0.05 を有意差ありとした。

3. 結果

3.1 RKT 投与による摂食量と体重の変化

ラット術後 21 日間の累積摂食量と 28 日間の体重を測定した。胃全摘群は Sham 群と比較して有意に摂食量と体重が減少した (図 3A、B、文献 18 より改変引用) ($P<0.05$)。胃全摘群に RKT (1.2 % weight/volume) を術後 3 日目から 14 日間飲水投与を行うと、摂食量と体重は投与後 7 日より増加傾向を示し、投与後 12 日または 10 日以降は統計学的に有意に増加した ($P<0.05$)。一方で、Sham 群に RKT を投与しても摂食量と体重に変化は認めなかった (図 3A、B、文献 18 より改変引用)。胃全摘群において RKT 投与によりもたらされた摂食量と体重の回復は、RKT 投与終了後も観察期間中は維持された。RKT 投与終了時の術後 17 日目の累積摂食量は、RKT を投与した胃全摘群では、胃全摘群に比べ、36.3g 高かった。一方、RKT 投与終了後 1 週間経過した術後 24 日目の累積摂食量は、RKT を投与した胃全摘群では、胃全摘群に比べ、59.9g 高かった。このように、RKT 投与による摂食量の増加は、RKT 投与終了後にさらに 23.6g 拡大した。RKT 投与が終了した術後 17 日目と、その 2 週間後である術後 31 日目の体重改善率 (%) を計算すると、各々、34.3 %、34.8 %であった。これは RKT の投与終了後、少なくとも 2 週間は効果が持続したことを示す。RKT を術後 17 日目から 14 日間、胃全摘群に投与したところ、摂食量と体重に変化は認めなかった (図 4A、B、文献 18 より改変引用)。以上から、RKT を胃全摘後早期に投与することで、摂食量と体重が有意に増加すること、RKT は投与終了後も効果が持続することが分かった。

RKT の濃度を 0.2 % weight/volume とし、術後 3 日目から 14 日間投与したが、胃全摘群の摂食量と体重の変化は認めなかった (図 5A、B)。このことから RKT は摂食量と体重に対し、用量依存性の効果を示すことが分かった。

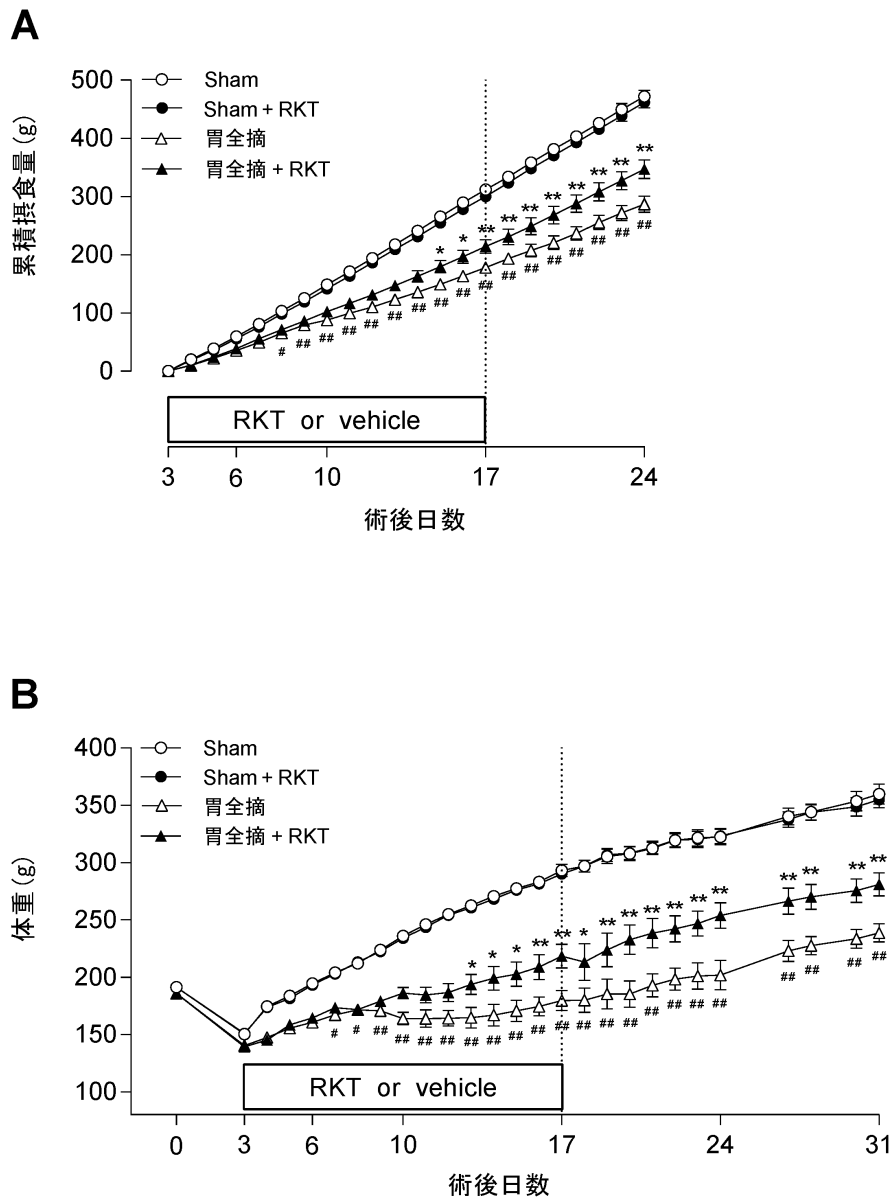


図 3. 術後 3 日目から RKT (1.2 % weight/volume) を投与したときの摂食量と体重の変化
 胃全摘群の累積摂食量 (A) と体重 (B) は、Sham 群と比較して有意に低下した。胃全摘群
 に RKT を投与すると累積摂食量 (A) と体重 (B) は有意に増加した。一方、Sham の群の累
 積摂食量 (A) と体重 (B) には RKT は影響を与えなかった。

Sham (n=4)、Sham+RKT (n=4)、胃全摘 (n=9)、胃全摘+RKT (n=8)。

Tukey-Kramer's post-test ; *P < 0.05、**P < 0.01、胃全摘 vs 胃全摘+RKT ; #P < 0.05、##P < 0.01、Sham vs 胃全摘。

(A、B いずれも文献 18 より改変引用)

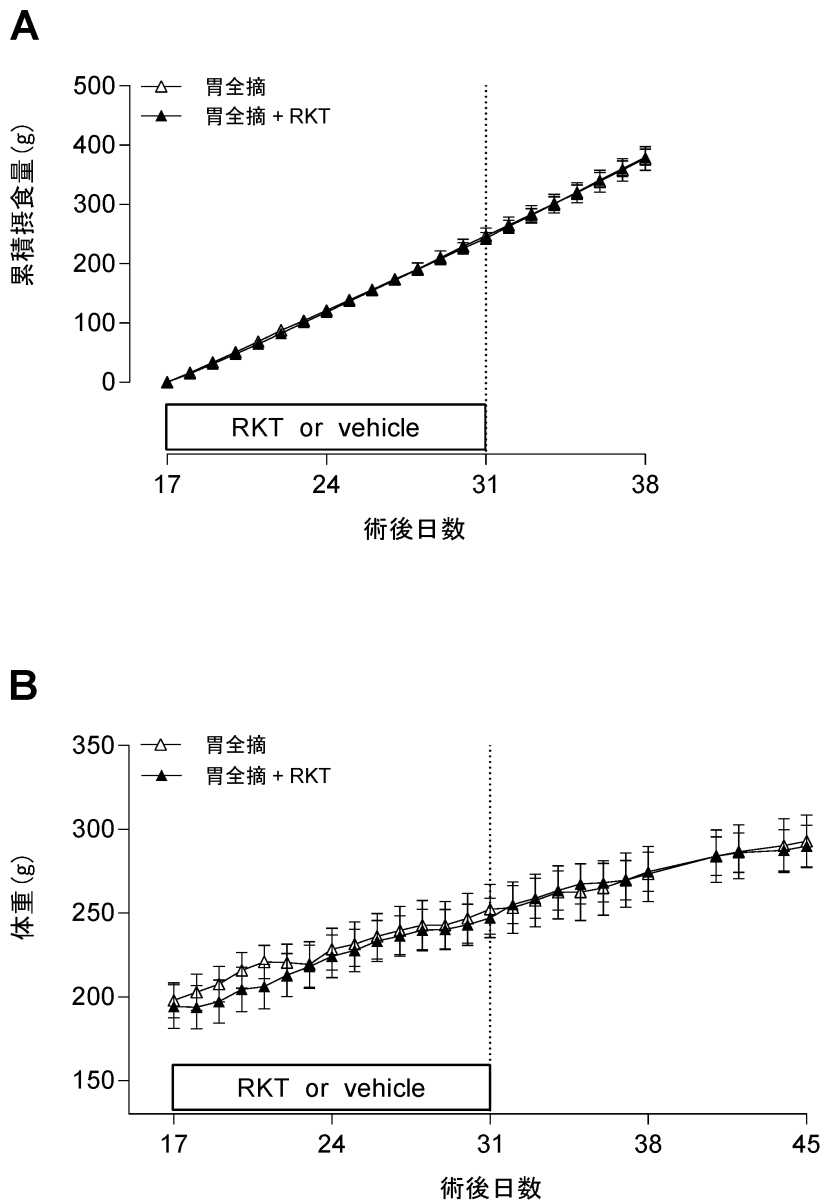


図 4. 術後 17 日目から RKT (1.2 % weight/volume) を投与したときの摂食量と体重の変化
RKT の投与は累積摂食量 (A) と体重 (B) に影響しなかった。

胃全摘 (n=10)、胃全摘+RKT (n=10)。

(A、B いずれも文献 18 より改変引用)

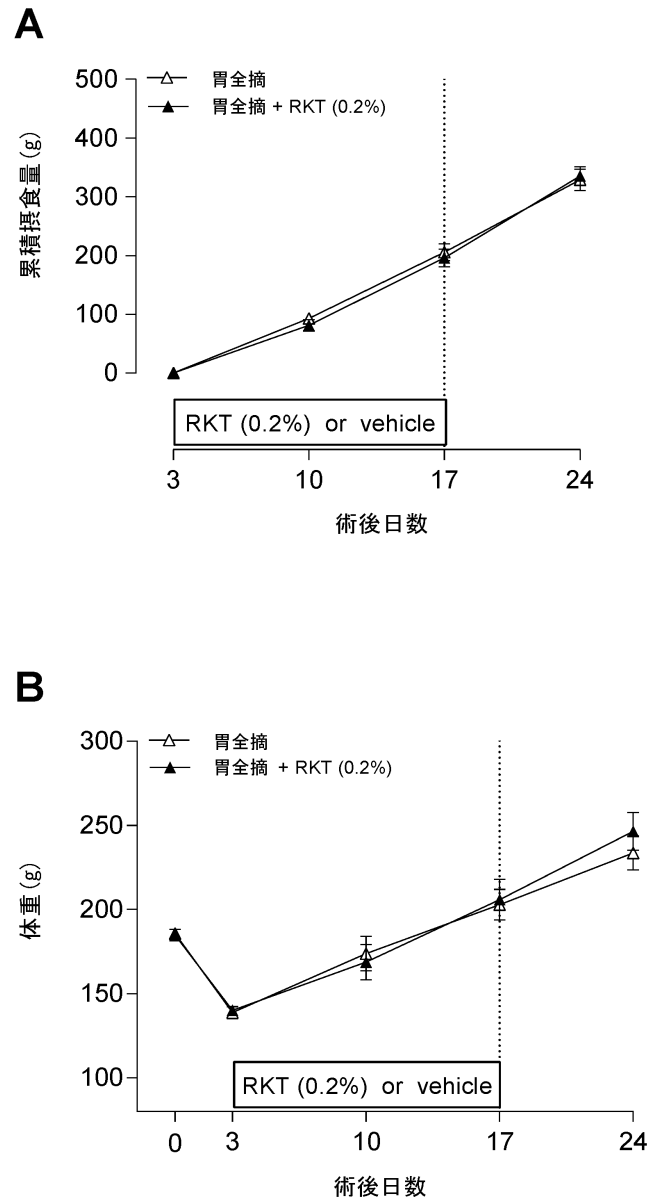


図 5. 術後 3 日目から RKT (0.2 % weight/volume)を投与したときの摂食量と体重の変化
 RKT の投与は累積摂食量 (A) と体重 (B) に影響しなかった。
 胃全摘 (n=7)、胃全摘+RKT (n=7)。

3.2 胃全摘後における血中摂食関連ホルモン濃度、血糖値の変化と RKT 投与の影響

RKT の作用機序を解明するため、術後 6 日目と 10 日目に自由摂食の条件下でラットの血液を採取し、各種ホルモン濃度と血糖値を測定した。血中活性型 GLP-1 濃度は術前値(9.2 ± 0.5 pg/ml)と比較して、胃全摘後 6 日目(12.1 ± 1.3 pg/ml)と 10 日目(14.1 ± 1.6 pg/ml)で継時的に緩やかな増加を認めた。一方、RKT 投与群は術前値とほぼ変わらない値で推移した (図 6A、文献 18 より改変引用)。胃全摘後 10 日目をみると、RKT 投与群は非投与群と比較して、血中活性型 GLP-1 濃度は有意に低下した($P < 0.05$) (図 6A、文献 18 より改変引用)。一方、血中アシルグレリン濃度は術前と比較して、胃全摘後 6 日目と 10 日目は低下し、これらの値に対して RKT の投与は影響しなかった (図 6B、文献 18 より改変引用)。以上から、自由摂食の条件下で、RKT は胃全摘後に上昇する血中活性型 GLP-1 濃度を抑制し、一方、血中アシルグレリン濃度には影響しないことが分かった。さらに、術後 6 日目、10 日目の血中オキシトシン濃度、血糖値を測定したが、RKT 投与の有無で変化を認めなかった (図 6C、D)。

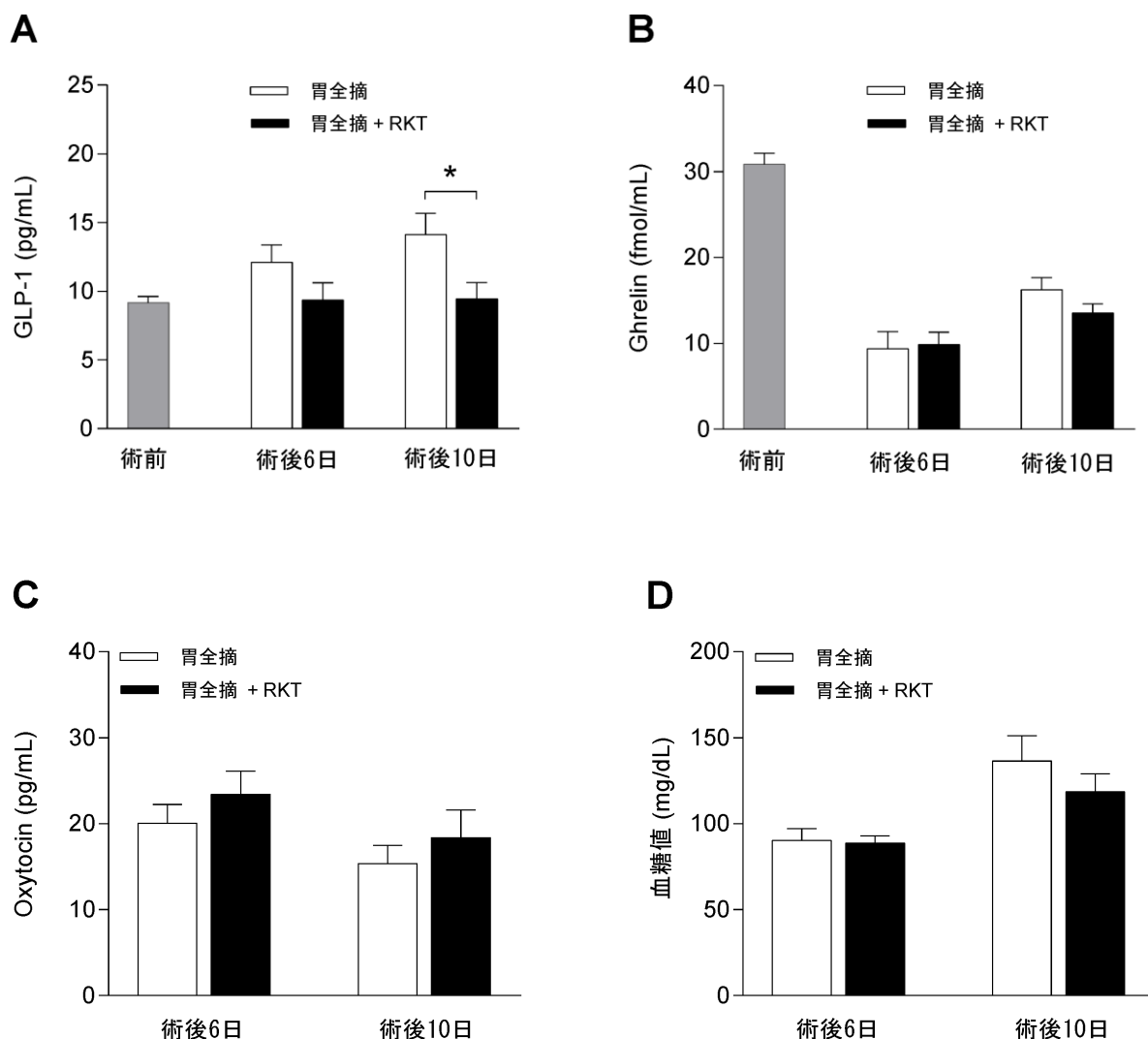


図 6. 自由摂食条件下での血中摂食関連ホルモン濃度、血糖値と RKT 投与による影響

A: 術前、術後 6 日、術後 10 日目の血中活性型 GLP-1 濃度。胃全摘後の 10 日目では、RKT 投与群は非投与群と比較して、活性型 GLP-1 濃度は有意に低下した。

B: 術前、術後 6 日、術後 10 日目の血中アシルグレリン濃度。胃全摘後の 6 日目と 10 日目で、RKT 投与による変化は認めなかった。

C: 術後 6 日、術後 10 日目の血中オキシトシン濃度。RKT 投与による変化は認めなかった。

D: 術後 6 日、術後 10 日目の血糖値。RKT 投与による変化は認めなかった。

術前 (n=6)、胃全摘 (n=6)、胃全摘+RKT (n=6)。

Unpaired t-test ; *P < 0.05.

(A、B は文献 18 より改変引用)

次に、GLP-1 に対する RKT の効果を詳細に検討するため、術後 10 日目 (RKT 投与開始から 7 日後) に、一晩絶食させたラットに対し食事負荷試験を行った。食前 (0 分) の血中活性型 GLP-1 濃度は、胃全摘群は Sham 群と比較して有意に高値であった ($P < 0.01$)。一方、RKT を投与した胃全摘群は胃全摘群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$) (図 7A、文献 18 より改変引用)。食後の血中活性型 GLP-1 濃度は、胃全摘群では 30 分後および 60 分後で食前値よりわずかに上昇する傾向を示したが、RKT を投与した胃全摘群はこの上昇は認めず、胃全摘群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.01$) (図 7A、文献 18 より改変引用)。Sham 群では RKT 投与の有無で血中活性型 GLP-1 濃度に変化は認めなかった (図 7A、文献 18 より改変引用)。食事負荷試験における血中活性型 GLP-1 濃度を、area under the curve (AUC) で解析すると、胃全摘群は他の 3 群と比較して有意に高値を示し、RKT 投与により有意に低下した ($P < 0.01$) (図 7B、文献 18 より改変引用)。

さらに術後 24 日目 (RKT 投与終了から 7 日後) に食事負荷試験を行ったところ、血中活性型 GLP-1 濃度と、その AUC は 4 群間で有意な差は認めなかった (図 7C、D、文献 18 より改変引用)。RKT を投与した胃全摘群において、術後 24 日目は術後 10 日目とほぼ同じ AUC 値を示した (図 7B と図 7D、文献 18 より改変引用)。

術後 10 日目の食事負荷試験において、血中インスリン値と血糖値の AUC 値は、4 群間で有意差は認めなかった (図 7E、F、文献 18 より改変引用)。

以上から、胃全摘後早期は食前及び食後の血中活性型 GLP-1 濃度が上昇すること、RKT 投与はこれらの上昇を強く抑制することが分かった。

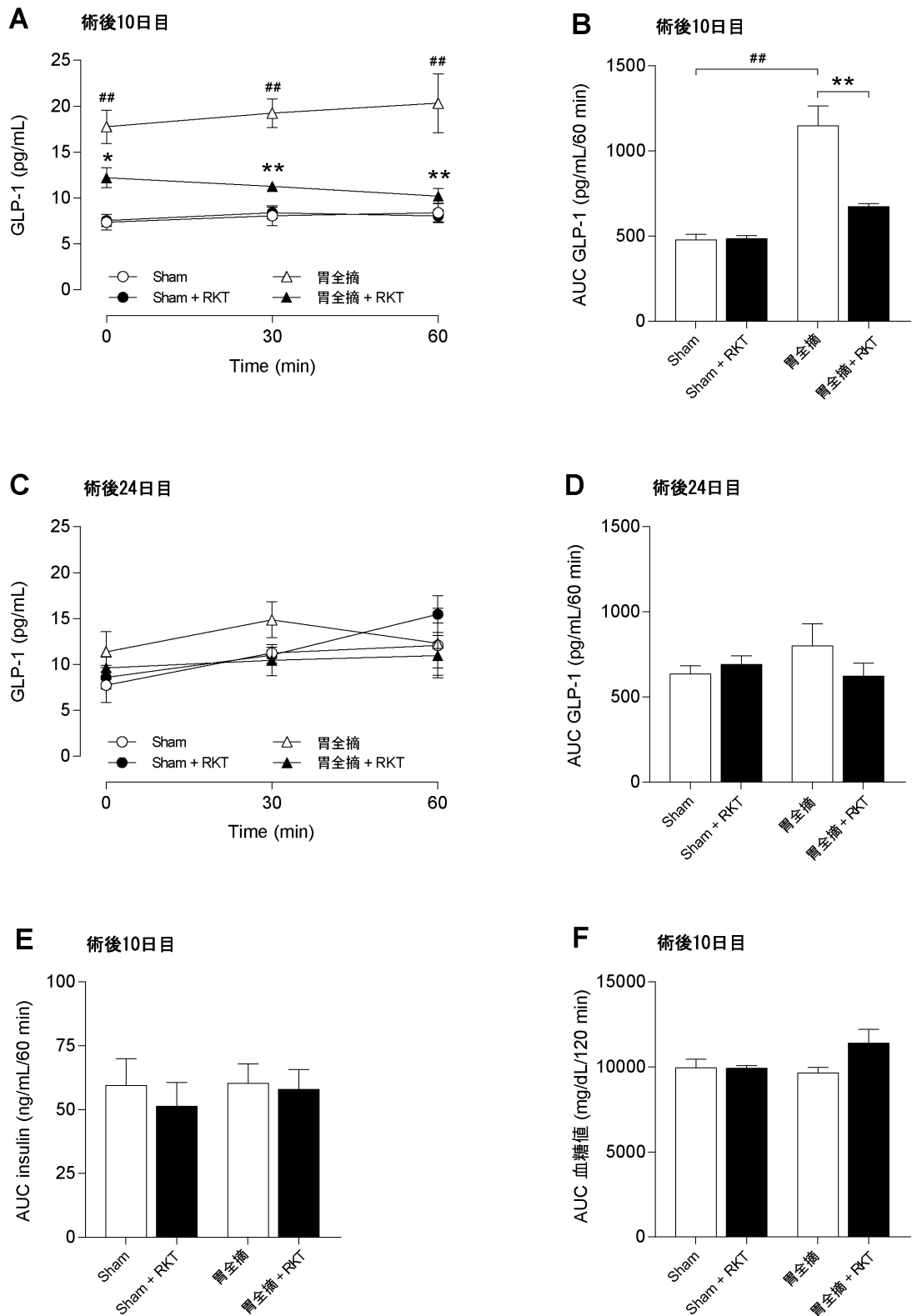


図7. 食事負荷試験における血中活性型 GLP-1 濃度の胃全摘による変化と RKT 投与の効果

A：術後 10 日目（RKT 投与開始から 7 日後）において、胃全摘群は Sham 群と比較して、食前および食後の血中活性型 GLP-1 濃度が有意に上昇した。RKT の投与は胃全摘後に上昇する活性型 GLP-1 濃度を食前から食後にかけて有意に抑制した。

B：AUC 解析でも、胃全摘後に上昇した血中活性型 GLP-1 値は、RKT の投与により有意に低下した。

C、D：術後 24 日目（RKT 投与終了から 7 日後）において、血中活性型 GLP-1 濃度とその AUC 値は 4 群間で有意な差は認めなかった。

E、F：術後 10 日目における血中インスリン濃度と血糖値の AUC 値は、4 群間で有意な差は認めなかった。

Sham (n=4)、Sham+RKT (n=5)、胃全摘 (n=8)、胃全摘+RKT (n=8)。

Tukey-Kramer's post-test ; *P<0.05、**P<0.01、胃全摘 vs 胃全摘+RKT ; #P<0.05、##P<0.01、Sham vs 胃全摘。

(A~F いずれも文献 18 より改変引用)

3.3 GLP-1 受容体拮抗薬の投与による摂食量と体重の変化

胃全摘後早期の血中 GLP-1 上昇が摂食量や体重に与える影響を調べるため、術後 3 日目から GLP-1 受容体拮抗薬である exendin (9-39) を、ミニポンプを用いて持続皮下投与を行った。コントロール群は蒸留水を持続皮下投与した。術後 9 日間の累積摂食量と体重を測定した。胃全摘群と比較して、exendin (9-39) を投与した胃全摘群は投与後 2~3 日より摂食量と体重が増加傾向を示し、投与後 7 日または 6 日以降は統計学的有意差を示した (P<0.05)。一方、Sham 群においては、exendin (9-39) の投与の有無で摂食量と体重の変化は認めなかった (図 8A、B、文献 18 より改変引用)。以上より、胃全摘後に上昇する血中 GLP-1 は、摂食量低下と体重減少の一因になっていることが示唆された。

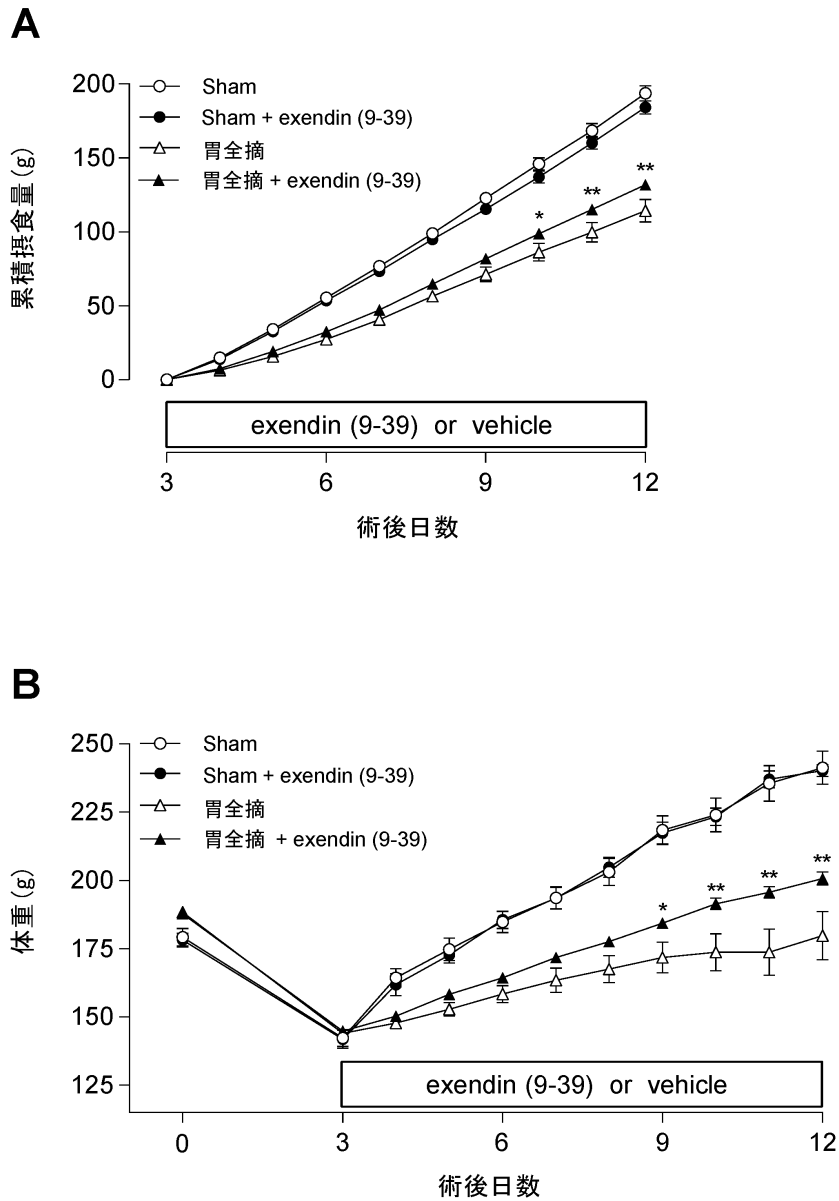


図 8. GLP-1 受容体拮抗薬の投与による摂食量と体重の変化

胃全摘群に exendin (9-39) を投与すると累積摂食量 (A) と体重 (B) は有意に増加した。

Sham (n=4)、Sham+exendin (9-39) (n=4)、胃全摘 (n=11)、胃全摘+exendin (9-39) (n=13)。

Tukey-Kramer's post-test ; *P < 0.05、**P < 0.01、胃全摘 vs 胃全摘+exendin (9-39) ; #P < 0.05、###P < 0.01、Sham vs 胃全摘。

(A、B いずれも文献 18 より改変引用)

3.4 胃癌患者の胃全摘後における血中 GLP-1 濃度の検討

ラットと同様に、ヒトにおいても胃全摘後に血中 GLP-1 濃度が上昇するかどうかを検討するために、臨床試験（パイロット試験）を行った。今回の試験に 5 名の患者が参加した。患者の臨床背景を示す（表 1）。胃癌ステージ分類は胃癌取扱い規約第 14 版（日本胃癌学会）に則って表記した。手術当日の朝と術後 1 日目の朝、空腹時に血液を採取し、血中総 GLP-1 濃度を測定した。

人数	5
年齢	62.0 ± 2.4
性別（男/女）	4/ 1
体重（kg）	57.6 ± 2.8
Body mass index (kg/m ²)	21.9 ± 0.8
術式（腹腔鏡下/開腹下）	2/ 3
臨床病期（1A/1B/3A）	3/ 1/ 1

表 1 患者背景

個別の血中総 GLP-1 値をみると、術前値は 5 名ともばらつきなく分布していた。術後値はある程度ばらつきはあるものの、5 名すべてにおいて、血中総 GLP-1 濃度が上昇し（図 9A、文献 18 より改変引用）、統計学的有意差を認めた（ $P < 0.05$ ）（図 9B、文献 18 より改変引用）。以上より、ラットの研究で得られた血中 GLP-1 濃度の結果がヒトに適用できる可能性が示唆された。

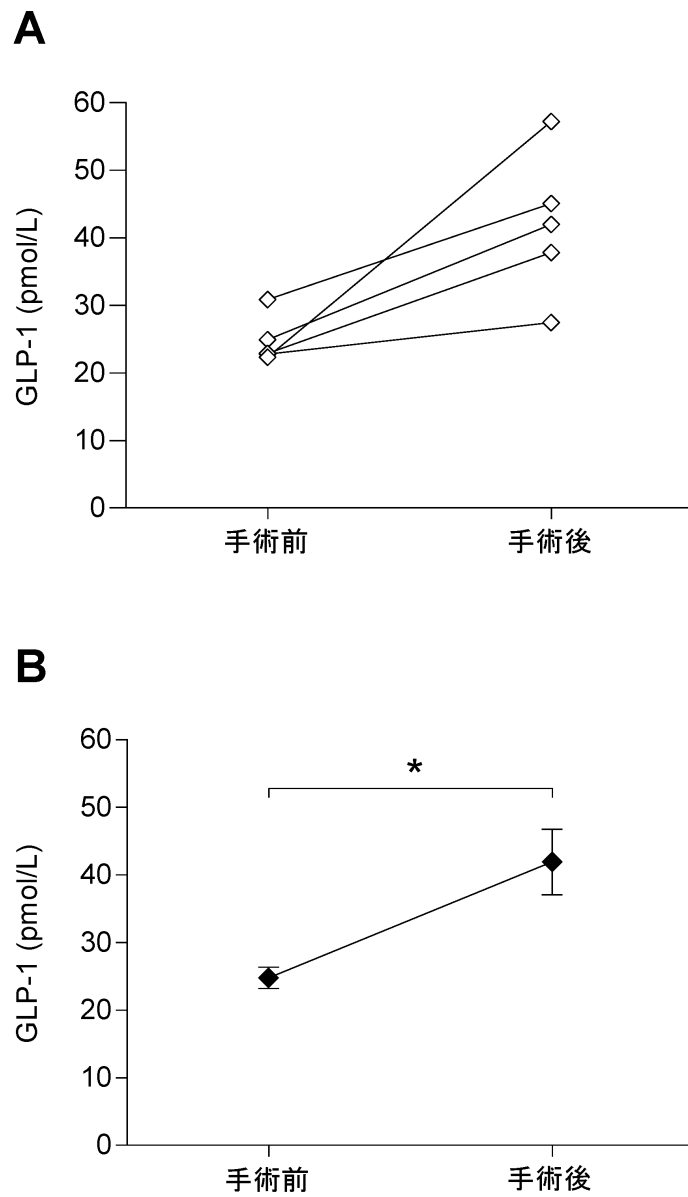


図 9. 胃癌患者の胃全摘後における血中 GLP-1 濃度の変化

A：個別データを示す。血中総 GLP-1 濃度は、術前と比較し術翌日は 5 名とも上昇した。

B：統計学的有意差を認めた。

Paired t-test ; *P < 0.05.

(A、B いずれも文献 18 より改変引用)

4. 考察

ラットの胃全摘後は摂食量と体重が減少する。これに対し、術後 3 日目から RKT を投与すると、有意に摂食量と体重が増加し、投与終了後も観察期間中 (2 週間) は効果が持続した。胃全摘後 6 日目、10 日目は随時の血中 GLP-1 が上昇する。一方、RKT を投与するとこの GLP-1 上昇が抑制された。術後 10 日目に食事負荷試験を行い、血中 GLP-1 動態を検討すると、胃全摘後は食後だけでなく、空腹時からすでに血中 GLP-1 が高値を示すことが分かった。そして、RKT を投与すると食前および食後の血中 GLP-1 上昇が有意に抑制された。さらに胃全摘後、術後 3 日目から GLP-1 受容体拮抗薬を投与すると有意に摂食量と体重が増加し、RKT の効果を模倣した。これらの結果は胃全摘後早期に RKT を投与することで、食欲抑制ホルモンである血中 GLP-1 の上昇が抑制され、摂食量と体重が増加することを示唆している。さらに胃癌患者に対する胃全摘後において空腹時の血中 GLP-1 が上昇することが分かり、ラットから得られた本研究の知見がヒトへ応用できる可能性を示した。

RKT は胃全摘後、3 日目からという早期投与を行うことで摂食量と体重を増加させた。RKT は投与終了後もリバウンド現象が無く、摂食量増加と体重増加が維持される。これは、胃全摘後、早期に治療介入し、摂食量低下と体重減少を抑制することが、長期的な予後の改善につながることを示唆している。一方、RKT を術後 17 日目から投与すると効果は認めなかったことから、RKT は胃全摘後の早期にみられる生体内の変化に作用していることが示唆される。まず考えられたのは、食欲亢進ホルモンのグレリンに対する RKT の作用である。RKT はマウスや健常人に投与すると、グレリンの活性型であるアシルグレリンの血中濃度が上昇することが報告されている(20)。胃全摘を行うと即座に血中グレリンは低下する(21, 22)。

グレリンを胃全摘後に補充すると摂食量と体重を改善することがマウス、ヒトで報告されている(14, 15)。しかし今回の実験では、胃全摘ラットの術後 6 日目、10 日目における血中アシルグレリンに対する RKT の効果は認めなかった。次に RKT が食欲抑制ホルモンを調節する可能性を検討したところ、胃全摘後は空腹時、食後ともに血中 GLP-1 が大きく上昇すること、この上昇を RKT が強く抑制することを発見した。

GLP-1 は代表的な食欲抑制ホルモンである(23-26)。健常人に GLP-1 を投与すると用量依存性に食欲と摂取カロリーを低下させる(27)。さらに、2 型糖尿病患者に GLP-1 製剤を投与すると体重減少をもたらすことが報告されている(28)。今回の実験で、胃全摘後早期に上昇する血中 GLP-1 が、摂食量と体重にどのような影響を与えるかを検討するため、GLP-1 受容体に対し特異性の高い拮抗薬である exendin (9-39)を、術後 3 日目から投与する実験を行った。すると胃全摘群と比較して exendin (9-39)を投与した胃全摘群は有意に摂食量と体重が増加した。一方で Sham 群には投与の有無で変化を認めなかった。これらの結果は、胃全摘後早期に上昇する血中 GLP-1 が摂食量低下、体重減少の一つの原因になっていることを示唆している。

GLP-1 は主に下部小腸に存在する L 細胞が小腸内の食事刺激を直接的、間接的に感知することで血中へ分泌される(23-25, 29)。胃全摘後に血中 GLP-1 が上昇する機序はよく分かっていない。しかし胃全摘後の再建は消化管をバイパスしているという観点からみると、肥満手術から得られた知見を参考にすることができる。すなわち、消化管をバイパスすると未消化で未吸収な食事内容が小腸に急速に流れ込み、L 細胞を刺激することでより多くの GLP-1 が血中に分泌されるという機序が考えられる(30, 31)。Roux-en-Y gastric bypass などの肥満手術を行うことで食後の GLP-1 が上昇することから(30, 32, 33)、胃全摘後も同様の機序が当てはまるこ

とが推察される。しかしこの考えだけでは、空腹時の血中 GLP-1 濃度の上昇を説明することはできない。胃全摘後早期に空腹時の血中 GLP-1 が上昇する機序として、胃が無くなったことで発生した何らかのシグナルが、L 細胞を持続的に刺激することで、食事刺激が無い状態でも GLP-1 が過分泌される可能性が考えられる。例えば、Roux-en-Y gastric bypass 手術を行うと、空腹時の血中胆汁酸濃度が上昇するという報告がある(34)。胆汁酸は L 細胞の G タンパク共役受容体を直接刺激することで、GLP-1 の分泌を促進するとされている(35)。しかし、胃全摘後の血中胆汁酸と GLP-1 の関連を示す報告はなく、さらなる検討が必要である。健常人に食前から GLP-1 を投与すると、用量依存性に空腹感を減弱し(27)、さらに高用量の GLP-1 アナログ製剤を投与すると嘔気を誘発する(36)。このように、GLP-1 は食後だけでなく空腹時の食行動も抑制し、摂食量低下、体重減少に関与する可能性がある。

血中に過分泌された GLP-1 は 2 つの経路で摂食を抑制すると考えられている。一つ目の経路は、Blood-brain barrier を通過し脳に作用する直接経路である。GLP-1 は比較的 low molecular weight であり、末梢 GLP-1 の一部は、Blood-brain barrier を通過すると言われている(24, 25, 37)。GLP-1 受容体拮抗薬を脳室内投与すると摂食量が増加することから(38)、GLP-1 が中枢神経に作用して食欲を抑制することが分かっている。さらに脳内の GLP-1 受容体が活性化されることで褐色脂肪組織の熱産生が増加することから(39, 40)、GLP-1 は摂食抑制作用に加え、エネルギー消費促進作用も持つと考えられている。二つ目の経路は GLP-1 が腹部迷走神経求心路を介して、摂食抑制シグナルを中枢へ伝達する経路である。GLP-1 は dipeptidyl peptidase-IV により速やかに不活化されその作用を失うことから(半減期約 2 分)、腸 L 細胞から分泌された GLP-1 が速やかに求心性迷走神経に受容され、脳に情報伝達する経路が指摘されている(23-25, 41)。ラット胃全摘術は胃との境界で食道を

離断するため、この高さで左右の迷走神経が切離される。しかし、肝枝は比較的高位から分岐するため(42)、切離を免れている可能性がある。迷走神経肝枝は神経終末を門脈に分布し(42, 43)、肝門脈の神経終末は GLP-1 受容体を発現していることが報告されている(44)。門脈内には L 細胞から分泌された高濃度の GLP-1 が存在し、この情報が求心路を介して中枢神経へ伝達され、摂食と体重を調節する可能性が考えられる。

RKT は Sham 群の血中 GLP-1 濃度には影響しなかったことから、L 細胞に直接作用するというより、胃を全摘することで特異的に発生した L 細胞へのシグナルを調節することが推察される。一方、L 細胞は GLP-1 と共に GLP-2、Peptide YY を産生する細胞であることを考慮すると、RKT が GLP-1 分泌に加えて GLP-2 や Peptide YY の分泌も低下させる可能性がある。GLP-2 は食欲抑制への関与が指摘されている(45-47)。Peptide YY は食欲抑制作用、体重減少作用をもち(48-50)、さらに腸管運動を抑制する(48)。RKT が GLP-1 以外にもこれら複数の消化管ホルモンを調節することで、胃全摘後の食欲不振、体重減少を抑制する可能性があり、より詳細なメカニズムは今後の検討課題である。

術後 24 日目の胃全摘群では、空腹時だけでなく食後も GLP-1 の上昇が鈍くなり、Sham 群との有意な差は消失する。詳細な機序は不明であるが、術後後期になると何らかの代償機構が働き、GLP-1 濃度が正常化に向かうものと推察される。術後 17 日目から RKT を投与しても摂食量や体重の改善がみられなかったが、このタイミングでは主な治療標的である GLP-1 の血中濃度が上昇していないことが原因として考えられる。

今回ラットで得られた知見が、ヒトに当てはまるかどうかを検討するため、予備的な臨床試験を行った。その結果、ヒト胃全摘後 1 日目に血中総 GLP-1 濃度が上昇することが分かった。例数は限られているものの、参加者全員で術前値より上昇

することを示した。今回測定した GLP-1 は空腹時の値であり、ラットで得られた結果と一致する。つまり、胃全摘術を受けた患者において、術後早期の血中 GLP-1 上昇が食欲不振と体重減少に関与する可能性を示している。

近年では、胃全摘後の早期経口摂取は安全かつ実行性があり(51, 52)、術後合併症を減少させる可能性があることから(52)、術後食の開始時期が早くなる傾向にある(52, 53)。これに従えば、胃全摘術後の早期から RKT を内服することは充分可能と思われる。今回のラットの実験結果から、RKT を比較的短期間投与することで得られた摂食と体重の増加が、投与終了後も持続することが分かった。ヒトにおいても術後早期の短期間の内服で、長期的に食欲と体重の回復が維持できるならば、患者にとって大きな利益となる。

今回の実験は若齢の雄ラットを用いたが、老齢ラットや雌ラットでも同様の結果が得られるかどうかは検討の余地がある。また、術後長期間におけるフォローアップは行っておらず、今後の検討課題である。また今回の実験で得られた RKT の食欲と体重における作用は、RKT に含まれる単独の構成成分でも認めるのか、あるいは構成成分の組み合わせにより効果を示すのかは未検討である。しかし一般的に、RKT はその構成成分が複合的に作用することで相乗効果を示すとされている(54, 55)。また、今回の臨床試験(パイロット試験)は例数が少なく、術後1日目以降の GLP-1 変動や、摂食量や体重に対する影響も現時点では不明である。今後はヒト胃全摘患者における術後翌日以降の GLP-1 動態の詳細な検討と、食欲や体重との相関を十分に検討する必要がある。さらに、臨床試験に参加した5名の中で、最も大きく血中 GLP-1 値が上昇した1名の症例は、術後に腸閉塞を合併している。腸閉塞と血中 GLP-1 高値の因果関係は不明であるが、術後合併症と血中 GLP-1 の関連も今後の検討すべき課題である。

5. おわりに

胃全摘後の早期は空腹時および食後の血中 GLP-1 が上昇し、摂食量低下、体重減少の一因になっている。RKT を術後早期に投与することで、胃全摘後の摂食量低下と体重減少を改善することが可能である。この RKT の作用メカニズムの一つとして、胃全摘後に上昇する血中 GLP-1 濃度の低下作用を発見した。ヒト胃全摘患者においても術後に空腹時の血中 GLP-1 濃度が上昇することが分かった。本研究を基盤とし、今後は術後の食欲と体重変化を評価項目とした、質の高い臨床試験が望まれる。

6. 謝辞

本論文を書き終えるにあたり、研究の推進に始終適切なお指導をいただきました自治医科大学生理学講座統合生理学部門教授矢田俊彦先生、同准教授出崎克也先生に深く感謝いたします。

そして、研究にあたり統合生理学部門へご紹介くださり、さらに貴重なお指導をいただいた外科学講座消化器一般外科学部門前教授安田是和先生、および、最後まで研究の継続のためにご尽力くださった同教授佐田尚宏先生に深く感謝いたします。また、実験および論文作成の過程で助言をいただいた消化器一般外科学部門講師小泉 大先生、同講師倉科憲太郎先生、同教授細谷好則先生、統合生理学部門准教授中田正範先生、同講師岩崎有作先生、貴重な論文指導をしていただいた消化器一般外科学部門教授 Alan Lefor 先生、貴重な助言をくださった株式会社ツムラの服部智久氏に深く感謝いたします。

7. 引用文献

1. Liedman B, Bosaeus I, Hugosson I, Lundell L. Long-term beneficial effects of a gastric reservoir on weight control after total gastrectomy: a study of potential mechanisms. *Br J Surg* 85:542-547, 1998
2. Kiyama T, Mizutani T, Okuda T, Fujita I, Tokunaga A, Tajiri T, Barbul A. Postoperative changes in body composition after gastrectomy. *J Gastrointest Surg* 9:313-319, 2005
3. Fein M, Fuchs KH, Thalheimer A, Freys SM, Heimbucher J, Thiede A. Long-term benefits of Roux-en-Y pouch reconstruction after total gastrectomy: a randomized trial. *Ann Surg* 247:759-765, 2008
4. Wu CW, Hsieh MC, Lo SS, Lui WY, P'eng FK. Quality of life of patients with gastric adenocarcinoma after curative gastrectomy. *World J Surg* 21:777-782, 1997
5. O'Gorman P, McMillan DC, McArdle CS. Impact of weight loss, appetite, and the inflammatory response on quality of life in gastrointestinal cancer patients. *Nutr Cancer* 32:76-80, 1998
6. Kim AR, Cho J, Hsu YJ, Choi MG, Noh JH, Sohn TS, Bae JM, Yun YH, Kim S. Changes of quality of life in gastric cancer patients after curative resection: a longitudinal cohort study in Korea. *Ann Surg* 256:1008-1013, 2012
7. Koizumi M, Hosoya Y, Dezaki K, Yada T, Hosoda H, Kangawa K, Nagai H, Lefor AT, Sata N, Yasuda Y. Serum ghrelin levels partially recover with the recovery of appetite and food intake after total gastrectomy. *Surg Today* 44:2131-2137, 2014
8. Tsugane S, Sasaki S, Tsubono Y. Under- and overweight impact on mortality among middle-aged Japanese men and women: a 10-y follow-up of JPHC study cohort I. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:529-537, 2002

9. Aoyama T, Yoshikawa T, Shirai J, Hayashi T, Yamada T, Tsuchida K, Hasegawa S, Cho H, Yukawa N, Oshima T, Rino Y, Masuda M, Tsuburaya A. Body weight loss after surgery is an independent risk factor for continuation of S-1 adjuvant chemotherapy for gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 20:2000-2006, 2013
10. Liedman B, Andersson H, Berglund B, Bosaeus I, Hugosson I, Olbe L, Lundell L. Food intake after gastrectomy for gastric carcinoma: the role of a gastric reservoir. *Br J Surg* 83:1138-1143, 1996
11. Liedman B. Symptoms after total gastrectomy on food intake, body composition, bone metabolism, and quality of life in gastric cancer patients--is reconstruction with a reservoir worthwhile? *Nutrition* 15:677-682, 1999
12. Zittel TT, von Elm B, Teichmann RK, Rabould HE, Becker HD. Cholecystokinin is partly responsible for reduced food intake and body weight loss after total gastrectomy in rats. *Am J Surg* 169:265-270, 1995
13. Zittel TT, Glatzle J, Weimar T, Kless S, Becker HD, Jehle EC. Serotonin receptor blockade increases food intake and body weight after total gastrectomy in rats. *J Surg Res* 106:273-281, 2002
14. Dornonville de la Cour C, Lindqvist A, Egecioglu E, Tung YC, Surve V, Ohlsson C, Jansson JO, Erlanson-Albertsson C, Dickson SL, Håkanson R. Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomised mice. *Gut* 54:907-913, 2005
15. Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M, Doki Y. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: a prospective, randomized, placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology* 138:1312-1320, 2010

16. Tatsuta M, Iishi H. Effect of treatment with liu-jun-zi-tang (TJ-43) on gastric emptying and gastrointestinal symptoms in dyspeptic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 7:459-462, 1993
17. Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Ohkawara T, Nagai K, Asaka M. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology* 134:2004-2013, 2008
18. Taguchi M, Dezaki K, Koizumi M, Kurashina K, Hosoya Y, Lefor AK, Sata N, Yada T. Total gastrectomy-induced reductions in food intake and weight are counteracted by rikkunshito by attenuating glucagon-like peptide 1 elevation in rats. *Surgery* (in press).
19. Dailey MJ, Moghadam AA, Moran TH. Jejunal linoleic acid infusions require GLP-1 receptor signaling to inhibit food intake: implications for the effectiveness of Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E1184-E1190, 2011
20. Matsumura T, Arai M, Yonemitsu Y, Maruoka D, Tanaka T, Suzuki T, Yoshikawa M, Imazeki F, Yokosuka O. The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice. *J Gastroenterol* 45:300-307, 2010
21. Jeon TY, Lee S, Kim HH, Kim YJ, Son HC, Kim DH, Sim MS. Changes in plasma ghrelin concentration immediately after gastrectomy in patients with early gastric cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5392-5396, 2004
22. Takachi K, Doki Y, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Imaoka S. Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy. *J Surg Res* 130:1-7, 2006
23. Dailey MJ, Moran TH. Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol Metab* 24:85-91, 2013

24. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157, 2007
25. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 87:1409-1439, 2007
26. Cummings DE, Overduin J. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23, 2007
27. Gutzwiller JP, Göke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, Winterhalder R, Conen D, Beglinger C. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 44:81-86, 1999
28. Amori RE, Lau J, Pittas AG. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 298:194-206, 2007
29. Rocca AS, Brubaker PL. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 140:1687-1694, 1999
30. Karra E, Yousseif A, Batterham RL. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab* 21:337-344, 2010
31. Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2608-2615, 2004
32. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, Tran H, Egger JR, Colarusso A, Kovack B, Bawa B, Koshy N, Lee H, Yapp K, Olivan B. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2479-2485, 2008
33. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M,

- Kern B, von Fluee M, Beglinger C. Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. *Obes Surg* 22:740-748, 2012
34. Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ, Badman MK, Maratos-Flier E, Mun EC, Pihlajamaki J, Auwerx J, Goldfine AB. Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity* 17:1671-1677, 2009
35. Katsuma S, Hirasawa A, Tsujimoto G. Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 329:386-390, 2005
36. Nauck M, Frid A, Hermansen K, Shah NS, Tankova T, Mitha IH, Zdravkovic M, Düring M, Matthews DR; LEAD-2 Study Group. Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study. *Diabetes Care* 32:84-90, 2009
37. Kastin AJ, Akerstrom V, Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci* 18:7-14, 2002
38. Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T. Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 451:276-281, 2014
39. Lockie SH, Heppner KM, Chaudhary N, Chabenne JR, Morgan DA, Veyrat-Durebex C, Ananthakrishnan G, Rohner-Jeanrenaud F, Drucker DJ, DiMarchi R, Rahmouni K, Oldfield BJ, Tschöp MH, Perez-Tilve D. Direct control of brown adipose tissue

- thermogenesis by central nervous system glucagon-like peptide-1 receptor signaling. *Diabetes* 61:2753-2762, 2012
40. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, Serrano M, Fernø J, Salvador J, Escalada J, Dieguez C, Lopez M, Frühbeck G, Nogueiras R. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 63:3346-3358, 2014
 41. Kakei M, Yada T, Nakagawa A, Nakabayashi H. Glucagon-like peptide-1 evokes action potentials and increases cytosolic Ca²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *Auton Neurosci* 102:39-44, 2002
 42. Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85:1-17, 2000
 43. Berthoud HR. Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 280:827-835, 2004
 44. Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, Ellis KS, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, D'Alessio DA. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology* 148:4965-4973, 2007
 45. Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Rømer J, Vrang N. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med* 6:802-807, 2000
 46. Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem* 276:21489-21499, 2001
 47. Guan X, Shi X, Li X, Chang B, Wang Y, Li D, Chan L. GLP-2 receptor in POMC

- neurons suppresses feeding behavior and gastric motility. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E853-E864, 2012
48. Ballantyne GH. Peptide YY(1-36) and peptide YY(3-36): Part I. Distribution, release and actions. *Obes Surg* 16:651-658, 2006
 49. Batterham RL, Heffron H, Kapoor S, Chivers JE, Chandarana K, Herzog H, Le Roux CW, Thomas EL, Bell JD, Withers DJ. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell Metab* 4:223-233, 2006
 50. Nguyen AD, Herzog H, Sainsbury A. Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18:56-60, 2011
 51. Liu X, Wang D, Zheng L, Mou T, Liu H, Li G. Is early oral feeding after gastric cancer surgery feasible? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 9:e112062, 2014
 52. Sierzega M, Choruz R, Pietruszka S, Kulig P, Kolodziejczyk P, Kulig J. Feasibility and outcomes of early oral feeding after total gastrectomy for cancer. *J Gastrointest Surg* 19:473-479, 2015
 53. Yamada T, Hayashi T, Cho H, Yoshikawa T, Taniguchi H, Fukushima R, Tsuburaya A. Usefulness of enhanced recovery after surgery protocol as compared with conventional perioperative care in gastric surgery. *Gastric Cancer* 15:34-41, 2012
 54. Sadakane C, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M, Takeda H. 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 412:506-511, 2011
 55. Arai T, Maejima Y, Muroya S, Yada T. Rikkunshito and isoliquiritigenin counteract 5-HT-induced 2C receptor-mediated activation of pro-opiomelanocortin neurons in the

hypothalamic arcuate nucleus. *Neuropeptides* 47:225-230, 2013