

氏名	小林 亮平
学位の種類	博士（健康科学）
学位記番号	甲第3号
学位授与年月日	平成26年3月31日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	Effect of bofutsushosan on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットの インスリン抵抗性に対する防風通聖散の効果
論文審査委員	主査 教授 大澤 功 副査 教授 佐藤 祐造 副査 教授 大澤 俊彦 副査 名古屋大学教授 下村 吉治

1. 論文の内容の要旨

1-1. 本論文の特色

小林亮平氏の学位申請論文は和漢医薬学会から発行の海外誌、*Journal of Traditional Medicines* 29巻：1-9、2012に小林氏をトップネームとして発表された「Effect of bofutsushosan on insulin resistance in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats」に基づくものである。この論文では、肥満誘発性2型糖尿病モデルラットにおいて防風通聖散を4週間経口投与することによって、体重増加の抑制と末梢組織におけるインスリン感受性の低下を抑制する可能性が考えられたことが述べられている。以上の事実は、漢方薬である防風通聖散の投与が2型糖尿病の発症・進展を抑制する可能性を示唆している。

1-2. 本論文の内容の要旨

本論文では研究の背景がまず述べられ、研究方法、続いて肥満、高血圧、便秘などの症状を呈した場合に処方される防風通聖散を用いて、肥満誘発性2型糖尿病モデル（OLETF）ラットにおける防風通聖散の有用性について検討を加えるに至った経緯が詳しく記されている。結果では防風通聖散の経口投与後、体重増加率、GIR（glucose infusion rate）で有意な改善がみられたことが報告されている。最後に、これらの結果についての多面的な考察が加えられている。以下項目ごとにその要旨を述べる。

(1) 背景

近年、食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴う運動不足によりメタボリックシンドロームが急激に増加している。メタボリックシンドロームの根底にある肥満はインスリン抵抗性を誘発する最も重要な危険因子である。先行研究において、漢方処方である防風通聖散は抗肥満作用があることが認められている。しかしながら、インスリン抵抗性を改善させる効果については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、肥満誘発性2型糖尿病モデルである Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットにおける防風通聖散の有用性について検討を加えた。

(2) 方法

A. 実験動物と漢方薬

実験には雄性 OLETF ラットおよび、その対照である雄性 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを大塚製薬株式会社徳島研究所から供給を受け、6週齢より飼育を開始した。動物は、個別ケージ内で飼育し、飼料は CE-2 (日本クレア、東京) を与え、水は自由摂取とした。飼育室は、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、12時間明暗サイクル (点灯;AM8:00、消灯;PM8:00) の条件に設定した。本研究は愛知学院大学心身科学部動物実験委員会指針に従って実施した。漢方薬は株式会社ツムラ (東京) より供与された医療用防風通聖散エキス粉末 (TJ-62) を用いた。

B. 実験プロトコール

対照群として13週齢の LETO ラットを、LETO+生理食塩水 (n=5) と LETO+防風通聖散 (n=5) の2群に、肥満群として13週齢の OLETF ラットを、OLETF+生理食塩水 (n=5) と OLETF+防風通聖散 (n=5) の2群に、それぞれ無作為に分けた。生理食塩水と防風通聖散を4週間経口投与した。15週齢で経口ブドウ糖負荷試験 (Oral-glucose-tolerance test : OGTT)、16週齢で麻酔下にて頸動静脈カテーテル挿入・留置手術を行い、17週齢でグルコースクランプ (クランプ) 法を実施した。クランプ終了後、直ちに副睾丸脂肪 (EF: epididymal fat) を摘出し、重量を測定した。

C. 経口ブドウ糖負荷試験

ラットを一晩 (14-16時間) 絶食させた後に、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) を行った。OGTTには20% (w/v) ブドウ糖溶液 (光製薬株式会社、東京) を用いて 2g/kg BW の用量を経口投与した。採血は尾静脈より行い、0分、30分、60分、90分、120分の血糖値を測定した。

D. 頸動静脈カテーテル挿入・留置手術

手術は Qin らの方法に従い、以下の手順で行った。ラットは手術実施の 2 時間前に絶食させた。ソムノペンチル（共立製薬株式会社、東京）を腹腔内へ投与し、麻酔下とした。前頸部の表皮を切開し、皮下組織を取り除き、頸静脈を露出させ、35mm のカテーテルを挿入した。そこへ、ヘパリン（富士製薬工業株式会社、東京）を注入し、シリンジを替えて、術後感染を防ぐ目的でペニシリン G カリウム（明治製薬株式会社、富山）を注入した。その後、カテーテル内を凝固防止のために粘稠性の液体である 50%polyvinylpyrrolidone (PVP) で充填させ、ストッパーで栓をした。続いて、頸動脈を露出させ、25mm のカテーテルを挿入した。同様にヘパリンを注入し、PVP で充填させ、ストッパーで栓をした。頸静脈・動脈のカテーテルは頸部の表皮を通過させ上側の皮下に埋め込み、固定した。術後、下肢筋へゲンタシン (Schering-Plough Corporation, USA) を 0.4ml 筋注した。

E. グルコースクランプ（クランプ）法

手術 1 週間後、一夜(14-16 時間)絶食させた後に、すべてのラットに DeFronzo らの方法に従い覚醒下で 2 段階グルコースクランプ法を実施した。静脈・動脈に充填されている PVP を取り除き、静脈カテーテルには 20%ブドウ糖溶液とインスリン (Novolin-R 100、Novo Nordisk A/S、Denmark) を注入ポンプ (テルモ株式会社、東京、日本) により注入し、動脈カテーテルは血液を採取するために用いた。インスリン注入率は 3mU/kg/min (低濃度) および 30mU/kg/min (高濃度) を連続して 90 分間行った。血糖値と GIR (glucose infusion rates, mg/kg/min) は 10 分ごとに測定した。2 段階でのクランプ中の 60 分~90 分と 150 分~180 分までの GIR を個体のインスリン作用の指標として用いた。

F. 血液生化学検査

空腹時血糖値および血清インスリン値の測定は、14~16 時間絶食後、尾静脈から約 0.8ml 採血、直ちにグルコースアナライザー (Yellow Springs Instrument Inc. Yellow Springs, USA) にて血糖値を測定した。約 1 時間後に遠心処理し、上清を血清サンプルとして-85°C で保存し、血清中におけるインスリンの測定に用いた。血清インスリンはインスリン測定キット (Rat Insulin ELISA KIT、U-E-type、AKRIN-130、シバヤギ、東京) を用いて測定した。

G. 統計解析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で標記した。統計解析は 2 元配置分散分析を採用し、有意な群の主効果が認められた場合と有意な投薬

の主効果が認められた場合には対応のない t 検定を用いて、群および投薬の違いを評価した。危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。データは SPSS (12.0 J for Windows) を用いて解析した。

(3) 結果

A. 体重

体重は防風通聖散投与開始から 4 週後まで群間に有意な主効果がみられ、OLETF 群は LETO 群よりも有意に高値であった。しかしながら、防風通聖散、生理食塩水両群間で有意な主効果はみられなかった。投与開始時から終了時までの 4 週間の体重増加率において、投薬による有意な主効果が認められ ($P = 0.043$)、OLETF+生理食塩水群は OLETF+防風通聖散群よりも有意に高値であった。

B. 摂餌量

摂餌量は防風通聖散投与開始から 3 週後まで OLETF、LETO 両群間に有意な主効果がみられ、OLETF 群は LETO 群よりも有意に高値であった。4 週後でも群間に有意な主効果がみられ、OLETF+生理食塩水群は LETO+生理食塩水群よりも有意に高値であった。しかしながら、防風通聖散、生理食塩水両群間で有意な主効果はみられなかった。

C. 経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT)

投与 2 週間後の OGTT での血糖値は、群間に有意な主効果がみられ、負荷後 30 分値と 60 分値および 120 分値において、OLETF+生理食塩水群は LETO+生理食塩水群よりも有意に高値であった。

D. GIR

防風通聖散投与 4 週間後の低濃度インスリン注入の GIR において、OLETF、LETO 群間で有意な主効果が認められ ($P = 0.001$)、また OLETF+防風通聖散、OLETF+生理食塩水群間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。OLETF+生理食塩水群は LETO+生理食塩水群と OLETF+防風通聖散群よりも有意に低値であった。高濃度インスリン注入の GIR においては、OLETF、LETO 両群間で有意な主効果が認められ ($P = 0.001$)、OLETF+生理食塩水群は LETO+生理食塩水群よりも有意に低値であり、また、OLETF+防風通聖散群は LETO+防風通聖散群よりも有意に低値であった。

(4) 考察

本研究は、肥満誘発性 2 型糖尿病モデル(OLETF) ラットのインスリン抵抗性に及ぼす防風通聖散 4 週間経口投与の効果を検証する目的で実施した。防風通聖散 4 週間経口投与の結果、防風通聖散は体重増加を抑制することが示唆された。LETO+生理食塩水群と LETO+防風通聖散群間および OLETF+生理食塩水群と OLETF+防風通聖散群間の摂餌量は投与期間を通じてほぼ一定であり、防風通聖散は摂餌量に対しては影響を及ぼさなかった。しかし、カテーテル挿入・留置手術の結果、すべての群で摂餌量は 3 週から 4 週で著しく減少したが、手術 2~3 日後には回復した。また、防風通聖散は構成生薬に瀉下作用を有する大黄を含むが、投与期間中に下痢などは認められなかった。このことから、体重増加率に対する防風通聖散の抑制作用は、下痢を伴う栄養吸収障害などに起因するものでないと考えられた。防風通聖散の構成生薬の 1 つである麻黄は、その成分のエフェドリンが交感神経終末でのノルアドレナリンの分泌を促進させることが知られている。同じく防風通聖散の構成生薬である甘草、荊芥および連翹は、cAMP 分解酵素の Phosphodiesterase (PDE) を阻害することが報告されている。したがって、これらの作用が相加的に働き、脂肪組織の脂肪分解を促進することにより体重を減少させ、抗肥満作用を発揮するものと考えられた。

我々は 2 段階グルコースクランプ法を用いて LETO および OLETF ラットのインスリンによる糖取り込みに検討を加えた。本研究で用いた正常血糖クランプ法は生化学的、生理学的に骨格筋を中心とした末梢組織のインスリン感受性を定量的に測定する方法である。現時点では、インスリン抵抗性評価法の **gold standard method** とされている。低濃度インスリン注入での **GIR** は、主に末梢組織のインスリン感受性を反映している。さらに、高濃度インスリン注入は、最大のインスリン作用と反応性につながる。クランプ実施中、健常者の脂肪細胞でのグルコース取り込み量は、すべてのグルコース取り込み量の 2 %に満たない。また、DeFronzo は骨格筋でのグルコース取り込み量は、健常者ですべてのグルコース取り込み量の 75%程度であると報告している。よって、クランプ実施中のインスリンにより刺激されたグルコースの代謝は骨格筋におけるグルコース取り込みが主な要因であると考えられる。肝臓においてグルコース産生能力はインスリンを 3 mU/kg/min の量で注入する場合 90%が抑制される。肝臓でのグルコース産生が抑えられることは、クランプ中のグルコース注入量が体全体のグルコース利用量となる。したがって、**GIR** を測定することで、全身グルコース利用量を評価できることから、本研究成績はインスリン抵抗性の標的組織である筋のインスリン作用を厳密に評価しているといえる。防風通聖散 4 週間経口投与におけるインスリン抵抗性に及ぼす影響は、OLETF+防風通聖散群の **GIR** (低濃度インスリン注入) は OLETF+生理食塩水群より有意に

大であり、防風通聖散投与によるインスリン抵抗性改善が示唆された。一方で、高濃度インスリン注入では有意差を認めなかった。糖取り込みの最大反応を改善するか否かは、更なる検討が必要である。さらに、副睾丸脂肪重量と低濃度インスリン注入の GIR との間に負の相関関係が成立し、副睾丸脂肪重量の増加に応じてインスリン抵抗性が増大することが示唆された。2型糖尿病の初期障害として骨格筋のインスリン抵抗性が考えられる。防風通聖散を投与することで筋におけるインスリン抵抗性を改善する可能性がある。一方、肥大した脂肪細胞からは TNF- α 、レジスチンなどのアディポサイトカインがインスリン抵抗性を惹起させるが、本研究では内臓脂肪減少の結果、体重増加が抑制され、その結果、関係する TNF- α などのサイトカインの分泌が低下したことにより、インスリン抵抗性が改善する可能性が示唆された。

2. 審査結果の要旨

本論文によって、以下のことが明らかにされた。まず、肥満誘発性 2 型糖尿病モデル(OLETF)ラットにおいて防風通聖散を 4 週間経口投与することによって、内臓脂肪の減少による体重増加の抑制と末梢組織におけるインスリン抵抗性の改善が明らかとなった。以上の事実は、漢方薬である防風通聖散の投与が 2 型糖尿病の発症・進展を抑制する可能性を示唆していると考えられた。

本論文は国際的にも優れたものであるが、以下の点についてはさらなる発展が期待される。第一に、防風通聖散と運動の併用効果について検討することは有益と思われる。第二に、防風通聖散のインスリンシグナル伝達系の分子生物学的な研究をすることによりメカニズム解明に役立つ可能性がある。

3. 口述試験および語学試験の結果

3-1. 口述試験

平成 25 年 10 月 16 日 (水) 18 時より 14205 教室において公開審査会を開催した。この審査会の開催についてはポスター掲示と共に、大学のホームページへの掲載によって学内外への情報周知に努めた。小林亮平氏はパワーポイントを用いて研究内容について詳しく説明した。その後、質疑応答に移り、審査員のみでなく多くの参加者から活発な質問が寄せられた。小林亮平氏はこれらの質問に、おおむね的確に回答した。公開審査会終了後、審査員のみで協議した。審査員全員が論文内容を高く評価し高い評点を与えた。また小林亮平氏が論文内容だけでなく健康科学全般について十分な知識と理解を有していると判断した。さらに、審査員合議の結果、小林亮平氏は論文内容と関連分野に関する知識と理解のいずれにおいても、博士(健康科学)を受けるに値すると判定した。

3 - 2. 語学試験

論文提出者小林亮平氏は平成 24 年 10 月 4 日に実施された博士候補者試験に合格しており、国際誌での発表があることでも明らかなように外国語（英語）に関して十分な能力を有するものと判定される。

4. 結論

論文提出者小林亮平氏の本論文は愛知学院大学学位規則第 3 条第 2 項により、博士（健康科学）の学位を受けるに値すると判断し、学位申請論文を合格と判断した。

審査委員

主査	愛知学院大学心身科学部教授	大澤 功
副査	愛知学院大学心身科学部客員教授	佐藤祐造
副査	愛知学院大学心身科学部教授	大澤俊彦
副査	名古屋大学大学院生命農学研究科教授	下村吉治