

論文提出者 小林 亮平 (心身科学研究科健康科学専攻後期課程)

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)

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は、動脈硬化性疾患が高頻度に発生することが明らかとなり、診断基準が確立された。メタボリックシンドロームの根本にある肥満はインスリン抵抗性を誘発する。インスリン抵抗性は糖代謝異常、脂質異常症、高血圧といった病態の基盤になり、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性疾患へとつながるため、最も重要な危険因子とされている。最近では、脂肪細胞は単に脂肪蓄積のための臓器ではなく、多数のホルモンやサイトカインを分泌する内分泌臓器であるということが明らかとなっている。肥満の治療は、食事療法および運動療法を主体に行われる。しかし、これらの療法を行っても十分な効果が表れない症例に対しては、薬物療法も行われる。適度な食事制限と身体トレーニングの継続は内臓脂肪を減少させ、インスリン抵抗性を改善させることにより、メタボリックシンドローム、肥満などの予防および治療に有用である。しかしながら、それらの療法は長期的実施が極めて困難であることから副作用が出現する可能性が少ない漢方薬により、インスリン抵抗性の病態改善を試みる価値があると考えられる。防風通聖散 (BOF) は肥満、高血圧、便秘の解消において有効であり、18種類の生薬が配合された漢方薬である。動物実験において、BOFは遺伝性肥満ラットや Monosodium glutamate (MSG) 肥満マウスおよびラットにおいて体重減少や正常マウスにおける体脂肪量の減少およびフルクトース負荷ラットの体脂肪蓄積の抑制が確認されている。臨床報告においては、耐糖能異常合併肥満症患者に食事療法と運動療法に併せ、BOFの投与を24週間続けることで内臓脂肪が有意に減少し、インスリン抵抗性改善効果を報告している。しかし、肥満誘発性2型糖尿病モデルにおけるインスリン抵抗性に対するBOFの影響については不明であ

り、Euglycemic hyperinsulinmic clamp 法を用いたインスリン抵抗性を評価する研究はほとんど報告されていない。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) ラットを用いて BOF を 4 週間経口投与し、BOF の有用性について検討した。

2. 方法

1) 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、個別ゲージ内で飼育し、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。

2) 実験プロトコール

6 週齢より OLETF ラットと LETO ラットともに無作為に 4 群に分けた。正常群として LETO + saline (n=5) と LETO + BOF (n=5)、肥満群として OLETF + saline (n=5) と OLETF + BOF (n=5) とした。その後、13 週齢より BOF の経口投与を 4 週間行った。15 週齢で FBG 測定と経口ブドウ糖負荷試験 (Oral-glucose-tolerance test:OGTT;2g/kg BW)、16 週齢で頸動静脈カテーテル挿入・留置手術、17 週齢で FBG 測定と Euglycemic hyperinsulinmic clamp 法を行った。

3) 経口ブドウ糖負荷試験

ラットを一晚 (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。

4) 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。ラットは手術を行う 2 時間前に絶食させた。

麻酔はソムノペンチル（共立製薬株式会社、東京）を腹腔内へ投与した。そこで、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。カテーテル内にヘパリン（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。

5) Euglycemic hyperinsulinemic clamp

手術 1 週間後、一晚（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 2 段階の Euglycemic hyperinsulinemic clamp 法を行った。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血するために用いた。インスリン注入率は 3mU/kg/min および 30mU/kg/min 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 は、全身のインスリン作用の指標として用いた。

6) 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 採血し、一滴は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。残りは約 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。

7) 統計解析

得られたデータは平均値 ± 標準誤差 (mean ± 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

1) 体重

体重は 0w~4w まで群による有意な主効果がみられ、OLETF ラットは LETO ラットよりも有意に高値であった。OLETF ラットの投与期間中の継続した体重の増加は 17 週齢で LETO ラットと比べて、ほぼ 1.3 倍であった。しかしながら、投薬の間に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みられ (P = 0.043)、OLETF + saline ラットは OLETF + BOF ラットよりも有意に高値であった。

2) 摂餌量

摂餌量は 0w~3w まで群による有意な主効果がみられ、OLETF ラットは LETO ラットよりも有意に高値であった。4w でも群による有意な主効果がみられ、OLETF + saline ラットは LETO + saline ラットよりも有意に高値であった。投与期間中を通じて、LETO ラットに比べて OLETF ラットの摂餌量は、ほぼ 1.3 倍であった。しかしながら、投薬の間に有意な主効果はみられなかった。なお、BOF 群では LETO、OLETF ラットともに下痢やその他の異常所見は認められなかった。

3) 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、群による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 + saline ラットは LETO + saline ラットよりも有意に高値であった。また、負荷後直後と 30 分値および 60 分値において、OLETF + BOF ラットは LETO + BOF ラットよりも有意に高値であった。area under the curves (AUC) においても、群による有意な主効果がみられ、OLETF ラットは LETO ラットよりも有意に高値であった。

4) GIR

投与 4 週間後の GIR は Low-dose において、群、投薬ともに有意な主効果がみられ ($P = 0.001$, $P = 0.036$, respectively)、OLETF + saline ラットは LETO + saline ラットと OLETF + BOF ラットよりも有意に低値であった。High-dose においては、群による有意な主効果がみられ ($P = 0.001$)、OLETF + saline ラットは LETO + saline ラットよりも有意に低値であり、また、OLETF + BOF ラットは LETO + BOF ラットよりも有意に低値であった。

4. 考察

本研究は、肥満とインスリン抵抗性に関する BOF の 4 週間経口投与を評価するために行われた。本研究で用いた OLETF ラットは、肥満を伴う 2 型糖尿病のモデル動物として開発されたもので、離乳直後から体重が顕著に増加し、生後 10 週齢では 380 g 以上となり、同週齢の LETO ラットと比べ 80g の体重差が見られる。本研究でも 13 週齢の LETO ラットと OLETF ラットの体重は 84.1g の差があり、OLETF ラットは肥満状態であった。

BOF の 4 週間経口投与における体重増加率に及ぼす影響から BOF は体重増加を抑制することが示唆された。LETO + saline ラットと LETO + BOF ラット間および OLETF + saline ラットと OLETF + BOF ラット間の摂餌量は投与期間を通じてほぼ一定であり、BOF は摂餌量に対しては影響を及ぼさなかった。しかし、すべての群で摂餌量は 3 週~4 週で著しく減少したが、手術後 2~3 日には回復した。また、BOF 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 BOF 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。BOF 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 BOF 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 段階の正常血糖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を調べた。本研究で用いた Euglycemic hyperinsulinmic clamp (クランプ) は生化学的、生理的に骨格筋を中心とした末梢神経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、インスリン抵抗性を測る評価法の golden standard method とされている。低濃度イ

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原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 **Low-dose** の場合 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、クランプでのグルコース注入が体全体のグルコース利用である。したがって、**GIR** を測定することで、全身のグルコース利用として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。**BOF** の 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 + BOF** ラットで低濃度インスリン **GIR** の低下抑制作用が示唆された。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の **GIR** との間に負の相関関係が成立し、副睾丸脂肪重量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。**BOF** 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。

本研究で示した結果は、肥満誘発性 2 型糖尿病モデルラットにおいて、**BOF** は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示唆された。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。