

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790623

研究課題名（和文） 生活習慣病に対する和漢薬の効果に関する基礎的研究

研究課題名（英文） The Study of Traditional Medicine on life style-related diseases

研究代表者

藤本 孝子（FUJIMOTO TAKAKO）

富山大学・人間発達科学部・講師

研究者番号：70377266

研究成果の概要（和文）：2種類の食事誘発性糖尿病モデルラット（高脂肪食負荷ラット、フルクトース負荷ラット）を用い、過剰エネルギーに起因するインスリン抵抗性の発現に対する和漢薬（八味地黄丸、防己黄耆湯）の効果を検討し、生活習慣病に対する和漢薬効果に関するデータを蓄積することを目的とした。以上の成績より、高脂肪食負荷ラットにおいて八味地黄丸は脂肪組織の遺伝子発現に変動を与え、インスリン抵抗性を改善させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to accumulate the scientific evidences about the effects of traditional medicines on life style-related diseases, we investigated the effects of Hachimijiogan and Bouiougito on diet-induced-insulin resistance in rats fed with high-fat diet and fructose-fed rats, animal models of type 2 diabetes. From these results, it was suggested that Hachimijiogan exerts beneficial effects on insulin resistance by the regulation of adipocytokine gene expression, although further experiments is needed to explain the detail mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：糖尿病、和漢薬

1. 研究開始当初の背景

（1）本邦において糖尿病が「強く疑われる人」と「可能性を否定できない人」の合計は約1,600万人にも上ると言われており、医療経済面からも深刻な社会問題となっている。このような変化に伴い、東洋医学（和漢薬）

の役割や重要性が再認識されてきている。欧米諸国においても「相補代替医療」が注目され、天然薬物への関心が高まっている。

（2）申請者らはこれまでに自然発症の2型糖尿病モデルである Zucker fatty rats を用

いた検討から、八味地黄丸と防己黄耆湯にインスリン抵抗性に対し、好影響を与える可能性を示唆する知見を得ている。

(3) 糖尿病の約 90%は 2 型糖尿病が占めている。その発症には食習慣・運動習慣・喫煙・飲酒などの環境的要因が重要である。本邦においては近年の食生活の欧米化に伴い、特に脂肪摂取量の著しい増加が指摘されており、これがインスリン抵抗性を引き起こす重要な環境因子であると考えられている。

(4) 高脂肪食の摂取により、肥大化した脂肪細胞からアディポサイトカインと呼ばれる様々な生理活性物質が分泌され、それらが末梢（筋肉や脂肪組織など）でのインスリンの情報伝達を阻害し、インスリン抵抗性を引き起こすことが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

高脂肪食負荷ラットとフルクトース負荷ラットはともに過剰エネルギー摂取に起因する 2 型糖尿病の病態モデルとして広く用いられている。本研究ではこの 2 種類の食事誘発性糖尿病モデルを用い、和漢薬（八味地黄丸、防己黄耆湯）の病態に対する有効性とその作用機序を検討し、生活習慣病に対する和漢薬の効果に関するデータを集積することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

①高脂肪食負荷ラット:Wistar 系雄性ラット(7 週齢)に高脂肪食飼料(脂肪分 60%カロリー比)を 3 週間投与した。

②フルクトース負荷ラット:Wistar 系雄性ラット(7 週齢)に 25%フルクトース水溶液を 4 週間投与した。

(2) 被検薬物

八味地黄丸、防己黄耆湯はそれぞれエキス原末が 7.5%(w/v)となるように水道水に溶かして用いた。

(3) 糖負荷試験

16 時間絶食後、グルコース(2g/kg 体重)を負荷し、負荷直後、30、60、120 分後に尾静脈

より血液を採取し血糖値を測定した。得られた血糖値から曲線化面積(AUC₀₋₁₂₀)を算出した。

(4) 血液中のインスリン、アディポネクチン、レプチン、TNF- α 、PAI-1、IL-6 は ELISA 法で測定した。

(5) 血糖、中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロール、遊離脂肪酸は市販キットを用いて測定した。

(6) 脂肪組織の RNA は RNeasy Mini Kit を用いて、カラム法により抽出した。得られた RNA を用いてリアルタイム PCR 法で目的遺伝子の発現量を解析した。

(7) マルトース負荷試験

24 時間絶食後、各漢方方剤エキス粉末を胃ゾンテにて経口投与し、その 5 分後にマルトース(2g/kg BW)を経口投与した。投与直後、60、120 分後に尾静脈より血液を採取し血糖値を測定した。得られた血糖値から曲線化面積(AUC₀₋₁₂₀)を算出した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食負荷ラット

高脂肪食(HFD-60)の負荷期間については、4 週間や 8 週間の研究が見られるが、本研究では 3 週間と比較的短期間の負荷を用いた。Normal(普通食)群と比較し、Control(高脂肪食)群では体重増加、精巢上体脂肪組織重量の増加、空腹時血糖値の有意な上昇が認められたが、インスリン値は変化していなかった(図 1, 2)。また、経口糖負荷試験においては AUC₀₋₁₂₀が有意に増加し、糖耐性の発現が認められ、インスリン抵抗性の発現以外は 2 型糖尿病の発症の前段階にある病態モデルであると考えられた。これに対し、八味地黄丸投与群では体重は変化しなかったが、精巢上体脂肪組織重量が有意に低下していた。経口糖負荷試験において増加した AUC₀₋₁₂₀の有意な減少が認められた(図 3)。血中脂質においては、遊離脂肪酸の減少が認められた(図 4)。その他(中性脂肪、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール)については有意な変化は見られなかった。一方、防己黄耆湯投与群ではこのよう

なパラメーターに対し有意な変化を示さなかった。

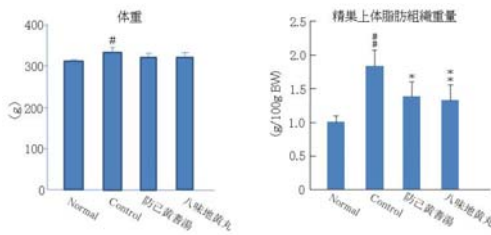


図1 体重、精巣上体脂肪組織重量に対する和漢薬の効果：高脂肪食負荷ラット

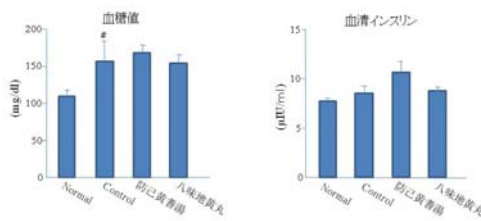


図2 血糖値、血清インスリンに対する和漢薬の効果：高脂肪食負荷ラット

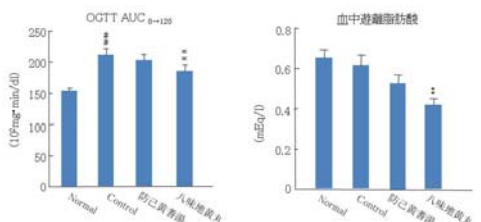


図3 糖負荷試験に対する和漢薬の効果：高脂肪食負荷ラット

図4 血中遊離脂肪酸に対する和漢薬の効果：高脂肪食負荷ラット

#p<0.05, ##p<0.01 vs. normal rats
*p<0.05, **p<0.01 vs. control rats

近年の研究から、脂肪組織は単に余剰エネルギーを中性脂肪として蓄えるだけではなく種々のアディポサイトカインを分泌する重要な内分泌臓器であることが明らかとなり、その分泌異常により末梢でのインスリン抵抗性が惹起されると考えられている。また、その分泌異常を是正することにより、肥満、糖尿病の発症を抑える可能性が示唆され、新たな創薬ターゲットとしても注目されている。

本研究では脂肪細胞より分泌されるアディポサイトカイン、グルカゴン分泌を調節するホルモンであるイレクチンの1つであるGLP-1の濃度を測定し、さらに、マルトース負荷試験によりα-グルコシダーゼ阻害活性を検討した。その結果、血中のTNF-α、

レプチン、PAI-1、アディポネクチン、GLP-1に対して八味地黄丸投与による影響は見られなかった。防己黄耆湯はレプチンの有意な上昇が認められた以外の変化は見られなかった。また、マルトース負荷試験に対しては、いずれの方剤も有意な変化を示さなかった。

さらに、脂肪組織中の遺伝子発現をリアルタイムPCR法で検討した結果(図5)、八味地黄丸投与によりIL-6の発現が半分以下に減少し、アディポネクチンは1.3倍の発現上昇が認められた。また、脂質代謝・エネルギー代謝に関連する遺伝子(UCP-2, ACOX-1)並びに脂肪細胞分化に関する遺伝子(C/EBPα, PPARγ)について検討した結果、八味地黄丸投与により増加傾向が見られた。

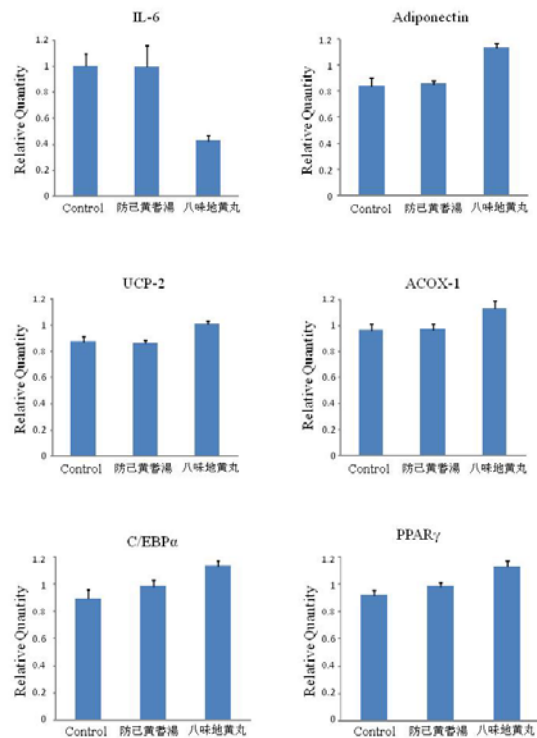


図5 脂肪組織中の遺伝子発現に対する和漢薬の効果：高脂肪食負荷ラット

(2) フルクトース負荷ラット

Normal(普通食)群に比べ、Control(高脂肪食)群では経口糖負荷試験において糖耐性の発現が認められたが(図8)、体重、精巣上体脂肪組織重量、血糖値、インスリン値には有意な変化は認められなかった(図6, 7)。血中脂質ではHDLコレステロールが増加していたが、中性脂肪、遊離脂肪酸、総コレステロール、LDLコレステロール値は有意な変

化を示さなかった。これに対し、八味地黄丸、防己黄耆湯いずれの投与群においてもインスリン、総コレステロール、LDL コレステロール値の上昇が認められた。

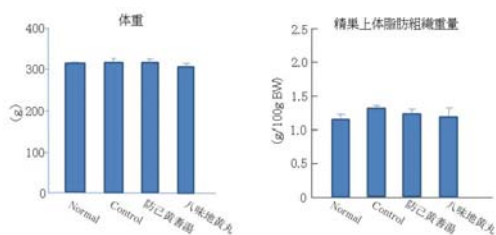


図6 体重、精巣上体脂肪組織重量に対する和漢薬の効果：フルクトース負荷ラット

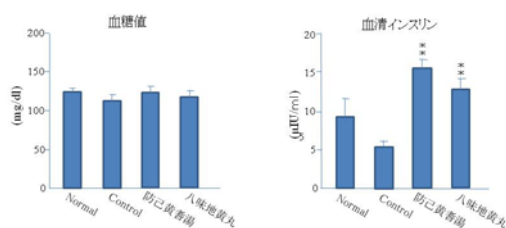


図7 血糖値、血清インスリンに対する和漢薬の効果：フルクトース負荷ラット

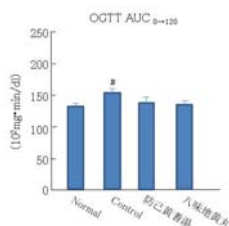


図8 糖負荷試験に対する和漢薬の効果：フルクトース負荷ラット

#p<0.05, ##p<0.01 vs. normal rats
*p<0.05, **p<0.01 vs. control rats

(3) これらの結果から、八味地黄丸投与により、脂肪組織重量の低下、血中遊離脂肪酸の低下、さらにアディポサイトカインの遺伝子発現に変動が認められ、これらの変動が高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性の発現に好影響を与え、抗糖尿病作用を有する可能性が示唆された。また、防己黄耆湯は臨床では肥満や発汗、浮腫、関節痛などを目標に使用される漢方方剤であり、近年は抗肥満効果を期待した一般薬としても利用されている。本モデルにおいては、体重に有意な変化は認められなかったが、脂肪組織重量が有意に低下していた。しかしながら、血中遊離脂肪酸および遺伝子発現に対する影響は認められ

ず、これら方剤の作用点の相違が示唆された。今後この点も踏まえ、作用機序に関する詳細な検討が必要である。

(4) 本研究は過剰エネルギー摂取に起因する生活習慣病の予防を目標とした和漢薬の効果に着目した研究である。本研究結果は2型糖尿病発症の前段階において、和漢薬が脂肪組織の遺伝子発現に与える影響に関連する新しい知見を示すものであり、今後さらに詳細な分析が必要であるが、臨床応用への裏付けとなる科学的データ基盤の蓄積に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計1件)

① 亀井貴志、藤本孝子、他、食事誘発性糖尿病モデルラットに対する和漢薬の効果、和漢医薬学会、2010年8月28日、京都薬科大学(京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 孝子 (FUJIMOTO TAKAKO)
富山大学・人間発達科学部・講師
研究者番号：70377266