

機関番号：37116

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790637

研究課題名 (和文) 悪液質における食欲不振に対する六君子湯の有効性及び作用機序の検討

研究課題名 (英文) Effects of Rikkunshito on the cachexia-anorexia syndrome in rats

研究代表者

米良 貴嗣 (MERA TAKASHI)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：20533053

研究成果の概要 (和文) : 我々はラットを用いた動物実験によって悪液質における食欲不振に対する六君子湯の有効性の検討を行った。まず、リポポリサッカライド (LPS) の腹腔内投与による摂食量低下モデルに対する六君子湯の効果を検討したが、LPS による摂食量の低下は六君子湯の投与によって有意な回復を認めなかった。異なったストレス性摂食量低下モデルとして拘束ストレスを用いた実験を行ったところ、拘束ストレスによる摂食量低下は六君子湯の投与によって有意に回復を認めた。

研究成果の概要 (英文) : Our purpose is to evaluate the effects of Rikkunshito on the cachexia-anorexia syndrome. At first, we investigated the effects of Rikkunshito on the lipopolysaccharide (LPS)-induced anorexia in rats. LPS-induced anorexia was not reversed by Rikkunshito. Secondary, we investigated effects of Rikkunshito on another stress-induced anorexia model. Restraint stress-induced anorexia was partially reversed by Rikkunshito.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：六君子湯、悪液質、東洋医学、急性炎症、食欲不振、体重減少、漢方薬、リポポリサッカライド

1. 研究開始当初の背景

悪液質は食欲不振と逆説的なエネルギー消費の増加による除脂肪体重と脂肪重量の減少からなる代謝障害で、癌、AIDS、心不全、腎不全、炎症性疾患など様々な病態によって引き起こされることが知られている。通常は摂食抑制因子であるレプチンの低値が視床下部の pro-opiomelanocortin (POMC) と cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) の活動性を減少させて摂

食行動を引き起こす。同様に摂食促進因子のグレリンの増加が視床下部の neuropeptide Y (NPY) と agouti-related protein (AgRP) を介して摂食行動を引き起こす。悪液質状態ではレプチンは低下している一方で、グレリンは正常もしくは上昇していることが報告されている。それにも関わらずエネルギー摂取量が増加しないのは、悪液質状態では POMC/CART の活動性が持続的に高く、NPY/AgRP の活動性が低いというメカ

ノコルチン系の機能異常が少なくとも部分的には関連していることが明らかになっており、この機能異常には炎症を促進するサイトカインと視床下部のセロトニンニューロンの関与が示唆されている。悪液質は基礎疾患と関係した病的状態と死の主要な原因で、過去これらの代謝異常の治療において十分な効果が証明された治療法は見出すことができなかったが、近年グレリン及びグレリン受容体作動薬の投与が摂食関連ペプチド (NPY/AgRP) の作用と抗炎症性変化 (IL-1 受容体 I の減少) を介して悪性腫瘍性悪液質による摂食量低下と除脂肪体重の低下を改善することが報告され、悪液質の治療薬としての可能性が示唆された。一方、六君子湯は中国の医書「万病回春」に記載されている漢方薬で、脾胃気虚の症候に、悪心・嘔吐・呑散・上腹部のつかえ・水様便、あるいは胸苦しい・咳嗽・痰が多い、あるいは浮腫などの痰湿の症候をともなう人に使用すると良いとされる。六君子湯は蒼朮、大棗、人参、陳皮、半夏、甘草、茯苓、生姜の8つの生薬で構成される漢方薬である。わが国では上部消化管症状の改善薬としてその効果が認められて使用されてきた漢方薬で、近年乳がん患者の化学療法時の補助的な制吐作用も報告されるなどその用途は広がっている。また、ラットにおけるシスプラチン投与による血中アシルグレリン濃度の低下と摂食量の低下を5-HT₂受容体の拮抗作用を介して改善することが報告されるなどその作用機序の一端が明らかとなっており、5-HT₂受容体拮抗作用を介したグレリン作動性の食欲不振改善薬として注目されている。悪液質に関する研究は国際的にも非常に盛んであるが、わが国で古くから用いられている漢方薬である六君子湯の効果に関する研究は皆無である。また、近年六君子湯はその作用機序の一端が明らかになっているとはいえ、脳内のストレス及び摂食関連ペプチドへの影響に関する研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究はリポポリサッカライド (LPS) や腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン1 β (IL-1 β) などのサイトカインの投与によって摂食量低下を生じたラットに六君子湯を投与することで、六君子湯の悪液質による食欲不振に対する有効性を検討するとともに、同時に血中グレリン濃度や脳内のストレス及び摂食関連ペプチドの mRNA の発現レベルなどを測定することでその作用機序の一端を明らかとすることを目的とする。本研究によって悪液質による摂食量低下への六君子湯の効果が実証されれば、悪液質状

態の患者の予後や QOL を改善する新たな治療法の確立に貢献することとなる。

3. 研究の方法

先行研究により、LPS、TNF、IL-1 β などの投与によってラットの摂食量が低下することは示されている。まずは六君子湯の前投与を行った後に LPS (必要に応じて TNF、IL-1 β など) をラットに投与し、体重及び代謝ケージを用いて一日の摂食量、尿量、糞量を計測する。LPS はその投与量によって摂食量低下の程度や持続期間に違いがあることがわかっており、六君子湯投与によって摂食量低下の程度や持続期間にどのような変化を生じるのかを詳細に検討することができる。また、六君子湯の投与量や投与方法についても先行研究では様々であり、本研究に関してはどのような方法適切なのか検討が必要である。次に血中グレリン濃度及び脳内のストレス関連及び摂食関連ペプチドの mRNA を検出し、六君子湯投与による変化を検討する。六君子湯の投与によって LPS (必要に応じて TNF、IL-1 β など) による摂食量の低下の改善が確認できたら、同様の実験を施行して血液と脳のサンプリングを行う。そして ELISA 法にて血中アシルグレリン濃度及び血中デアシルグレリン濃度を測定するとともに、*in situ* hybridization 法にて脳内ペプチド

(corticotropin-releasing hormone (CRH), NPY, AgRP, POMC, CART, Orexin, Prolactin-releasing peptide (PrRP) など) の mRNA を検出して LPS 投与によって生じた変化に対する六君子湯の影響を検討する予定であった。

2009 年は LPS の腹腔内投与による急性炎症による食欲低下モデルへの六君子湯の効果を検討した。実験動物は Wistar 系成熟雄ラットを使用した。ラットの飼育及びこの実験は 12 時間の明暗サイクルと温度と湿度が一定に保たれた当大学動物センター内で行ない、餌と水は自由に摂取可能な状態とした。ラットは少なくとも 5 日間のハンドリングの後、まずは体重を測定して、先行研究を考慮して六君子湯の経口前投与 (投与量は 1000 mg/kg 体重。投与方法は LPS 投与の 1 時間前に 1 回 or 16 時間前と直前に 2 回) を行った。六君子湯は蒸留水で溶解して投与する。コントロール群には同時刻に同量の蒸留水の投与を行う。六君子湯の前投与後、ラットには生理食塩水に溶解した LPS (250 and 1000 μ g/kg 体重) もしくは vehicle (生理食塩水) の腹腔内投与を行う。LPS の投与は 9:00~10:00 h の間に行う。LPS 投与後は個別に代謝ケージに入れて飼育を継続する。LPS 投与

から24時間後に体重測定及び代謝ケージを用いた摂食量の測定を行い、六君子湯投与によって摂食量低下・体重減少が改善するかどうかを検討した。

2009年度の結果を踏まえて、2010年度は実験プロトコルの変更し、六君子湯の投与とストレス負荷を暗期の出来るだけ直前に設定することを試みた。まず、六君子湯のストレス負荷の前に一回投与とし、他のストレス性食欲不振モデルとして拘束ストレスを用いて実験を行った。実験はSprague-Dawley (SD)成熟雄ラットを用いた。六君子湯は蒸留水に溶解して、1000 mg/kg体重を17:00 hに一回経口投与（コントロール群には同量の蒸留水）した。その後ラットを2時間（17:00 h-19:00 h）アクリルチューブで拘束した。非ストレス負荷群は無処置（NT）で2時間放置した。2時間の拘束後、19:00 h-7:00 hの暗期12時間の摂食量、体重変化を比較した。その結果六君子湯は暗期の直前の一投与で効果が得られると判断し、LPSの腹腔内投与による急性炎症による食欲低下モデルの実験のプロトコルを変更した。ラットはSD成熟雄ラットを用い、六君子湯は18:00 hに1000 mg/kg体重を一回経口投与とした。LPS（100 and 250 μ g/kg体重）or vehicle（生理食塩水）を18:30 hに腹腔内投与した後19:00 h-7:00 hの暗期12時間の摂食量および体重変化を比較した。

4. 研究成果

2009年の実験結果:

(1) LPS 1000 μ g/kg体重の投与 (n=9)

24時間の摂食量は蒸留水+vehicle群では24.3 \pm 1.8 g, 蒸留水+LPS群では2.2 \pm 1.2 g, 六君子湯+vehicle群では20.8 \pm 0.7 g, 六君子湯+LPS群では3.8 \pm 0.8 gであった。体重の増加は蒸留水+vehicle群では5.3 \pm 0.6 g, 蒸留水+LPS群では-25.2 \pm 1.2 g, 六君子湯+vehicle群では3.8 \pm 0.7 g, 六君子湯+LPS群では-20.8 \pm 1.5 gであった。

LPS 1000 μ g/kg体重の投与によって摂食量および体重増加はvehicle投与群と比べて有意に低下した。しかし、LPSによる摂食量低下および体重増加の減少は六君子湯投与によって有意な回復を認められなかった。

(2) LPS 250 μ g/kg体重の投与 (n=9)

24時間の摂食量は蒸留水+vehicle群では21.5 \pm 2.5 g, 蒸留水+LPS群では12.7 \pm 2.5 g, 六君子湯+vehicle群では23.6 \pm 1.1 g, 六君子湯+LPS群では14.9 \pm 2.4 gであった。体重の増加は蒸留水+vehicle群では5.3 \pm 1.8 g, 蒸留水+LPS群では-10.2 \pm 2.2 g, 六君子湯+vehicle群では2.3 \pm 1.3 g, 六君子湯+LPS群では-10.5 \pm 2.5 gであった。

LPS 250 μ g/kg体重の投与によって摂食量および体重増加はvehicle投与群と比べて有意に低下した。しかし、LPSによる摂食量低下および体重増加の減少は六君子湯投与によって有意な回復を認められなかった。

2010年度の実験結果:

(1) 拘束ストレス (RTS) (n=9):

暗期12時間の摂食量は蒸留水+NT群では23.7 \pm 0.9 g, 蒸留水+RTS群では13.6 \pm 1.7 g, 六君子湯+NT群では22.8 \pm 1.3 g, 六君子湯+RTS群では19.1 \pm 0.9 gであった。体重の増加は蒸留水+NT群では18.7 \pm 1.4 g, 蒸留水+RTS群では2.1 \pm 2.4 g, 六君子湯+NT群では18.5 \pm 2.5 g, 六君子湯+RTS群では10.3 \pm 1.5 gであった。拘束ストレスによって摂食量および体重増加は有意に減少し、六君子湯の一回の投与によって完全に元には戻らないものの有意な回復を示した。

(2) LPS 250 μ g/kg体重の投与 (n=9)

暗期12時間の摂食量は蒸留水+vehicle群では22.6 \pm 0.9 g, 蒸留水+LPS群では10.8 \pm 3.1 g, 六君子湯+vehicle群では21.4 \pm 1.4 g, 六君子湯+LPS群では10.1 \pm 2.4 gであった。体重の増加は蒸留水+vehicle群では17.5 \pm 1.5 g, 蒸留水+LPS群では-4.6 \pm 5.9 g, 六君子湯+vehicle群では16.6 \pm 2.5 g, 六君子湯+LPS群では-5.7 \pm 5.7 gであった。

LPS 250 μ g/kg体重の投与によって摂食量および体重増加はvehicle投与群と比べて有意に低下した。しかし、LPSによる摂食量低下および体重増加の減少は六君子湯投与によって有意な回復を認められなかった。

(3) LPS 100 μ g/kg体重の投与 (n=9)

暗期12時間の摂食量は蒸留水+vehicle群では23.0 \pm 1.9 g, 蒸留水+LPS群では16.9 \pm 4.1 g, 六君子湯+vehicle群では22.3 \pm 1.2 g, 六君子湯+LPS群では15.4 \pm 3.6 gであった。体重の増加は蒸留水+vehicle群では17.5 \pm 1.5 g, 蒸留水+LPS群では-4.6 \pm 5.9 g, 六君子湯+vehicle群では16.6 \pm 2.5 g, 六君子湯+LPS群では-5.7 \pm 5.7 gであった。

LPS 100 μ g/kg体重の投与によって摂食量および体重増加はvehicle投与群と比べて低下傾向を認めるものの、統計学的に有意な変化ではなかった。

結論および考察

悪液質による食欲低下の実験モデルとして、LPS腹腔内投与による摂食量低下モデルを用いて六君子湯の摂食量回復効果を検討した。2009年度の実験プロトコルではLPS 1000 μ g/kg体重による摂食量低下および体重増加の減少に対しては六君子湯の有効性は証

明出来なかった。実験上の問題点としてはLPSの投与量が多いと摂食および体重増加の抑制作用が強力すぎることが考えられた。そこでLPSの容量を250 μ g/kg体重に減量した。LPSによる摂食抑制作用は和らいだものの、六君子湯投与による摂食量および体重増加の回復は認められなかった。もう一つの問題点として六君子湯投与のタイミングが考えられた。通常摂食行動が行われる暗期の直前の方が効果的と考え、投与のタイミングをなるべく暗期の直前に行うようにプロトコルを変更した。2010年度はまずLPS腹腔内投与よりマイルドなストレス負荷となる拘束ストレスを用いて、六君子湯を暗期の前に一回投与するプロトコルを試みた。この実験により拘束ストレスによる摂食量および体重増加の減少は六君子湯によって有意な回復を示すことが証明された。この結果を受けて、プロトコルを変更してLPS 250 μ g/kg体重の投与による実験を行った。しかし、六君子湯による摂食量および体重増加の回復は示されなかった。LPSを100 μ g/kg体重に減量して同じプロトコルの実験を行ったが、これはLPSによる摂食抑制作用が不安定で統計学的に有意な変化は得られなかった。

我々は悪液質による摂食量および体重増加の減少のモデルとしてLPSの腹腔内投与モデルを用いたが、このモデルにおいて六君子湯の有効性は証明出来なかった。一方で拘束ストレスによる摂食量および体重増加の減少に対して六君子湯の有効性は示された。このことより、六君子湯はマイルドなストレス性の摂食量の抑制に対しては有効であることが示唆された。今回の我々の結果より悪液質に関しては重症例には無効である可能性が高いが、軽症の症例に関しては効果がある可能性があるかもしれない。少量の炎症性サイトカイン（TNFやIL-1 β など）の静脈投与などで、比較的軽症で安定した摂食低下状態を再現するモデルが作成出来れば六君子湯の効果が認められるかもしれない。

今回、我々は悪液質による摂食量低下に対する六君子湯の有効性を示すことは出来なかったが、拘束ストレスによる摂食量低下に対する六君子湯の有効性を示すことが出来た。これは生体に対するマイルドなストレス負荷による摂食量低下状態に対する六君子湯の有効性を示すものであると考える。また、いずれの実験においてもストレス負荷していないラットにおいて六君子湯は摂食量も体重も有意に変化させていない。このことは六君子湯が健常人にあまり影響を与えず、ストレスによる摂食量低下を生じた症例にだけ効果があることを示唆している。今後、この拘束モデルを用いて血中グ

レリン濃度や脳内のストレス及び摂食関連ペプチドのmRNAの発現レベルなどを研究していくとともに、よりマイルドな炎症性摂食量低下モデルの作成を進めていく予定である。

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 米良 貴嗣、林田 草太、高橋 昌稔、岡 孝和、辻 貞俊：拘束ストレスによる食欲不振に対する六君子湯の効果（第33回日本神経科学学会、神戸）

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米良 貴嗣 (MERA TAKASHI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号：20533053