

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790615

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪性肝障害に対する桂枝茯苓丸の効果

研究課題名（英文） The study of Keishibukuryogan on nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

藤本 誠（MAKOTO FUJIMOTO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・助教

研究者番号：30377337

研究成果の概要（和文）：NAFLD モデルマウスに対して、試験薬として桂枝茯苓丸を、陽性対照薬として pioglitazone を投与し、その病態進展予防効果を評価した。本実験では桂枝茯苓丸は NAFLD の進展予防効果は示さなかったが、陽性対照薬である pioglitazone の投与においてもまた、同様の結果であった。動物の飼育を無菌環境下で行ったことが、2種類の薬剤が NAFLD の進展予防効果を示さなかった原因ではないかと思われた。

研究成果の概要（英文）：In this study, to accumulate the scientific evidences about the effects of traditional medicines on NAFLD, we investigated the effects of Keishibukuryogan and pioglitazone on NAFLD mouse model induced by the subcutaneous injection treatment of monosodium glutamate. Both Keishibukuryogan and pioglitazone did not show the preventive effect for NAFLD. Sterile environment breeding may provoke these results.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医師薬学

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：メタボリックシンドローム、桂枝茯苓丸

1. 研究開始当初の背景

① 非アルコール性脂肪性肝障害 (Non-alcoholic fatty liver disease :NAFLD) はアルコール非摂取者で肥満、糖尿病、高脂血症、代謝疾患といったいわゆる“メタボリック症候群”を背景として出現する肝障害であり、その重症型は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と呼ばれる。NASH は無症状のうちに肝硬変や肝癌に進展する頻度も高く、患者数も急増しており、生活習慣病の背景と合わせて“21 世紀の肝臓病”と

も呼ばれ、対策が急務となっている。

②NAFLD/NASH の治療の基本が、メタボリックシンドロームの治療と同様に食事・運動療法といった生活習慣改善であることに異論を差し挟む余地はないが、この治療法を維持・継続することはメタボリックシンドローム患者においては非常に困難であることが報告されている。このため、糖尿病・高血圧などの基礎疾患に応じた薬物治療が行われているものの、特効薬がないのが現状である。

③漢方方剤、桂枝茯苓丸とは 5 種類の生薬か

ら構成される漢方方剤で、わが国ではすでに保険医療で処方可能な薬剤である。適応は、肩こり、めまい、頭痛、月経不順などである。我々の研究室ではこれまでに桂枝茯苓丸がウサギ動脈硬化モデルにおける粥状硬化病変の進行を抑制することなどについて報告してきた。メタボリックシンドロームの本体は動脈硬化の危険因子が集積した状態であるため、桂枝茯苓丸がNAFLDに有効である可能性が高いと考え、我々が報告したウサギNAFLDモデルにおいて実験を行い、桂枝茯苓丸が酸化ストレスを軽減し、NAFLD/NASHの進展を抑制することを明らかにしたが、その作用機序は明らかにはできていなかった。

2. 研究の目的

我々が用いたウサギNAFLDモデルは人のNAFLD患者が備えている肥満や中心性肥満、インスリン抵抗性を示さないなどの欠点が見られたため、より人のNAFLDに近い特徴を備えたモデル動物を用いて、桂枝茯苓丸の作用機序を明らかにする必要がある。そこで今回は、モデル動物として、我々が2009年に発表したメタボリックシンドローム・NAFLDモデルであるMSGマウスを用いる。MSGマウスは肥満・インスリン抵抗性を合併し、げっ歯類では自然発症が困難とされている肝線維化を合併するほか、一年間の飼育で約50%の確率で肝腫瘍が発生するモデルであり、ヒトのメタボリックシンドローム、NAFLDの病態に最も近似した症候・経過を呈する自然発症モデルである。本研究ではメタボリックシンドロームおよびNAFLDにおよぼす漢方方剤桂枝茯苓丸の効果をMSGマウスモデルを用いて評価し、桂枝茯苓丸の作用機序を調査することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

16週齢のオスMSGマウスを27匹購入(動物繁殖研究所)する。MSGマウスは摂取飼料に応じて3群(n=9、A、B、C群)に分けた。

(2) 被検薬物

A群には標準飼料を、B群には0.3%桂枝茯苓丸混餌飼料を、C群には0.02%Pioglitazone混餌飼料を投与して8週間飼育(24週齢)する。臨床において最もメタボリックシンドロームの改善を目標に使用されている、インスリン抵抗性改善薬Pioglitazoneをpositive controlとして用いる。24週齢時点で、全飼育群をpentobarbital sodiumの腹腔内投与で安楽死せしめて体重測定を行い、採血と肝臓、内臓脂肪の採取を行う。血液生化学的評価と採取臓器の病理組織学的評価を行い、桂枝茯苓丸のNAFLD進展抑制効果について評価

した。

(3) 血液生化学的試験 空腹状態で採取した

我々はMSGマウスが24週齢の時点でヒトのNAFLDに相当する肝病理組織所見を認めるだけでなく、内臓型肥満・高脂血症・糖尿病を呈することをすでに報告している。NAFLDの診断は現在のところ、血液検査その他、非侵襲的な方法での診断は不可能で、肝病理組織学的にのみ可能であるため、NAFLDの病状評価には肝病理組織学的検査が必須である。

(4) 血液中のインスリン、グルコース、アディポネクチン、レプチン、レジスチン、フェリチン、ALT、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸は市販キットで測定した。

(5) 肝臓組織中の総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸は市販キットを用いて測定した。

(6) 肝臓組織と内臓脂肪組織は、病理組織学的評価としてヘマトキシリン・エオジン染色を行い、NAFLD activity score systemで活動度を評価した。

(7) 肝臓組織と内臓脂肪組織の病理組織学的評価として、抗 α -SMA, TNF- α , CD31, CYP2E1, IL-6抗体を用いた免疫染色を行い、アポトーシス細胞の同定目的でTUNEL染色も実施した。

4. 研究成果

(1) 24週齢時点における各群の体重・肝体重比・内臓脂肪体重比
C(pioglitazone)群は、A(標準食)群よりも有意に高い体重を示し、このことは過去の研究結果と同じものであった。しかし、肝体重比・内臓脂肪体重比は3群間で有意差は観察されなかった。

(2) 血液検査項目

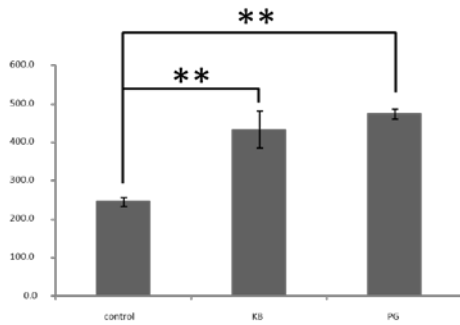
①糖代謝関連

インスリンについては3群間で有意差は見られなかった。グルコースについてはC(pioglitazone)群は他の2群よりも有意に低値を示した。このことから桂枝茯苓丸はpioglitazoneのようにインスリン抵抗性を改善させる作用はないと考えられ、我々の過去の実験結果を指示する結果が得られた。

②脂質代謝関連

総コレステロールは B (桂枝茯苓丸) 群、C (pioglitazone) 群はいずれも A (control) 群よりも有意に高い値を示した。中性脂肪は B (桂枝茯苓丸) 群と C (pioglitazone) 群はいずれも A (control) 群よりも有意に低値を示した。また、遊離脂肪酸においては C (pioglitazone) 群は A (control) 群・B (桂枝茯苓丸) 群のいずれよりも有意に低値を示した。

図1 血清総コレステロール値

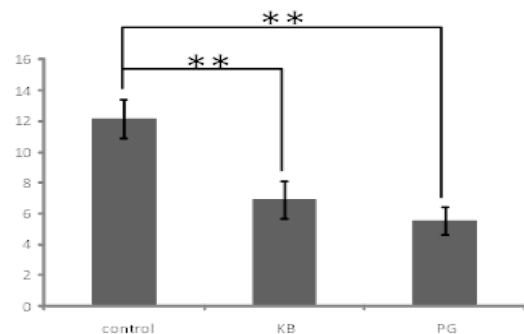


** $p < 0.01$ vs. control rats

③アディポサイトカイン関連

内臓脂肪から分泌され、メタボリックシンドロームの病態進展に深く関与していることが知られる、アディポサイトカインの血液中濃度を評価したが、レプチンとレジスチンは3群間で有意差は観察されなかった。アディポネクチンは B (桂枝茯苓丸) 群と C (pioglitazone) 群が A (control) 群よりも有意に低値を示した。pioglitazone は内臓脂肪の分化を誘導し、血中のアディポネクチンを上昇させることが知られているが、今回の実験では逆の結果が得られた。

図2 血清アディポネクチン値



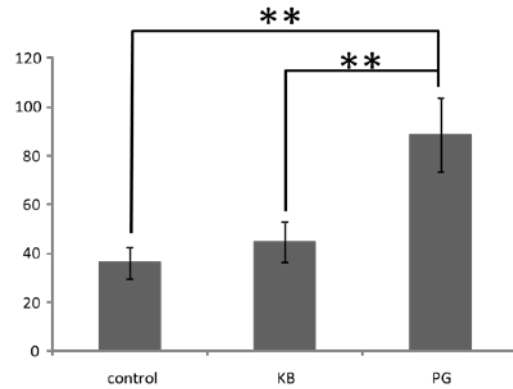
** $p < 0.01$ vs. control rats

④肝機能と鉄代謝関連

ALT においては C (pioglitazone) 群は A (control) 群、B (桂枝茯苓丸) 群よりも高値を示し、pioglitazone 摂取が肝障害を進行させる結果となった。過去の我々の報告や他の研究機関の報告とも異なる結果が得られ

た。また、非アルコール性脂肪性肝障害の進行と血中のフェリチン値との正の相関が知られているため、フェリチン値を評価したが、3群の間で有意差は観察されなかった。

図3 血清ALT値



** $p < 0.01$ vs. control rats

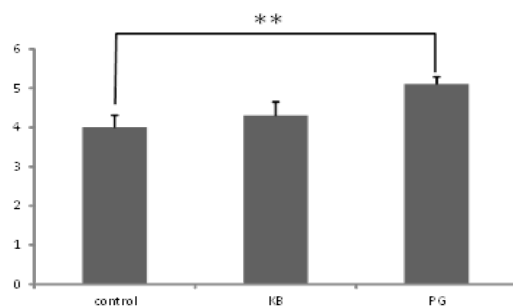
(3) 肝組織中脂質

肝組織に含まれる脂質の評価を行ったが、総コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸のいずれの項目も3群間で有意差は観察されなかった。

(4) 肝病理組織評価

NAFLD activity score system の評価では C (pioglitazone) 群は A (control) 群よりも有意に高い活動度を示していた。pioglitazone は臨床研究でも NAFLD の進行を抑制することが報告されているが、逆の結果が観察された。

図4 NAFLD activity score

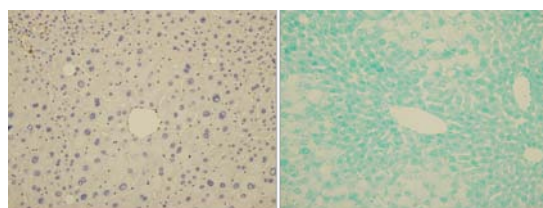


** $p < 0.01$ vs. control rats

(5) 肝・内臓脂肪組織に対する特殊染色

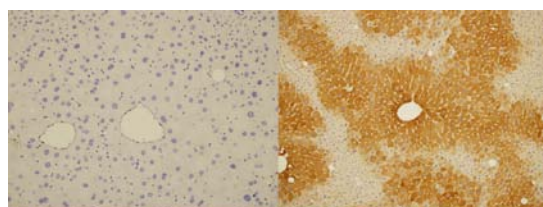
抗 α -SMA, TNF- α , CD31, CYP2E1, IL-6 の抗体を用いた免疫染色、およびアポトーシス細胞の同定目的で行った TUNEL 染色のいずれにおいても、3群間で著明な差は観察されなかった。

図5 A (control) 群の各特殊染色の結果



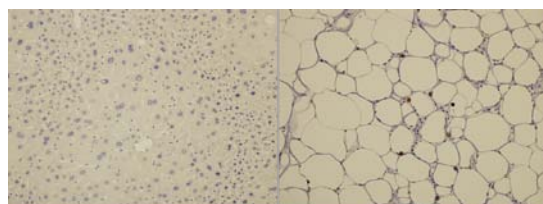
SMA 肝 200倍

TUNEL 肝 200倍



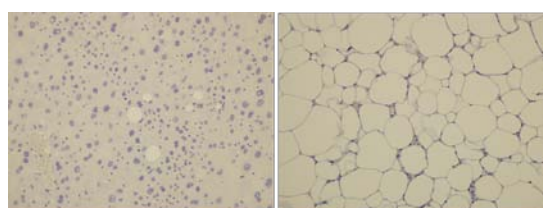
CD31 肝 200倍

CYP2E1 肝 100倍



IL-6 肝 200倍

IL-6 脂肪 200倍



TNF 肝 200倍

TNF 脂肪 200倍

(6) 考察

今回の実験では、我々が過去に行った実験結果と異なり、陽性対照群として設定した pioglitazone を含め、薬剤投与群がいずれも病的モデル群よりも悪い結果を示した。桂枝茯苓丸投与群、C (pioglitazone) 群は血清アディポネクチン値が A (control) 群 (病的モデル群) よりも有意に低い値を示し、血漿総コレステロールはコントロール群よりも有意に高い値を示した。その他の血液評価項目である血漿インスリン、レプチン、レジスチン、フェリチン、ALT、遊離脂肪酸、肝体重比、脂肪体重比は有意差は観察されなかった。また、肝組織中の遊離脂肪酸、中性脂肪、コレステロールも有意差が観察されなかった。非アルコール性脂肪性肝障害の評価で最も重要な病理組織学的評価結果と合わせると、桂枝茯苓丸の投与は肝組織中の中性脂肪沈着をコントロール群よりも有意に低下さ

せることは今回の実験で明らかになったものの、そのほかの評価項目については無効であった。ただ、今回の実験では、pioglitazone 群もまた、陽性対照薬としてまったく機能しておらず、これは我々の過去の実験だけでなく、他の研究機関の報告とも異なるものであった。我々が過去に行った実験系と今回の実験系との違いは、飼育環境の違いのみである。すなわち、今回の実験の飼育は外部動物飼育業者に委託し、クリーンルームにおいて放射滅菌処理をした飼料を投与したが、過去の実験ではそこまでの清潔環境下では飼育していなかった (本学の動物実験飼育施設内で実施した) ということである。NAFLD の進行と腸内細菌叢との関連が報告されているが、クリーン環境下での飼育は、非クリーン環境下での飼育とは、実験動物の腸内細菌叢が異なる可能性があり、今後、飼育環境を変えて実験を行うことによって、今回の実験結果の原因と、腸内細菌の NAFLD 進行への寄与に関して解明できる可能性がある。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 誠 (FUJIMOTO MAKOTO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・助教

研究者番号: 30377337