

防風通聖散がラットのインスリン感受性に及ぼす影響

小林 亮平*¹⁾ 宇野 智子*^{1,2)} 佐藤 祐造*^{1,3)}

背景: メタボリックシンドロームの基盤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 (BTS) は抗肥満作用のあることが認められている。しかしながら、インスリン感受性の影響については、ほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、Wistar ラットを用いて、インスリン感受性に及ぼす影響について検討した。

方法: 8週齢のWistar ラットを無作為に3群に分けた: Control, BTS 400mg/kg BW (BTS 400), BTS 800mg/kg BW (BTS 800)。生理食塩水とBTSの経口投与を3週間実施した。体重、摂餌量、血清インスリン値、Adiponectin, FFA, インスリン感受性、副腎脂肪重量、インスリンシグナル伝達系のタンパク量について評価した。インスリン感受性は、グルコースクランプ法を用いて評価した。インスリンシグナル伝達系 (IR- β , IRS-1, PI 3-kinase) のタンパク量は、Western blot 法により定量した。

結果: 体重、副腎脂肪 (EF) 重量が減少し (各々 $P < 0.05, 0.01$)、インスリン感受性が増加した ($P < 0.01$)。摂餌量、血清 Adiponectin, FFA とインスリンシグナル伝達系 (IR- β , IRS-1, PI 3-kinase) のタンパク量には有意差を認めなかった。

結論: これらの結果から、Wistar ラットにおける BTS の3週間の経口投与は、EF重量を減少させ糖の取り込みを増加させる可能性が示唆された。

キーワード: bofu-tsusho-san, insulin sensitivity, euglycemic-hyperinsulinemic clamp, skeletal muscle, Western blot technique

I. 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 (Mets) が急激に増加している。Mets は、内臓肥満 (腹囲が男性85cm以上、女性90cm以上) を基盤として、糖代謝異常 (110mg/dl以上)、脂質異常症 (高トリグリセリド血症150mg/dl以上/低HDLコレステロール血症40mg/dl未満)、高血圧 (収縮期血圧130以上/拡張期血圧85mmHg以上) のうち2個以上を合併した状態であり、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¹⁾。Metsの根本にある内臓肥満はインスリン抵抗性を誘発する^{2,3)}。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である。

肥満の治療は、一般的にはまず、食事療法および運動療法が主体に行われる。しかし、これらの治療を行っても継続性が低く、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、Mets、肥満などの予防および治療に有用である^{4,5)}。しかしながら、食習慣・運動習慣改善の長期的実施は極めて困難であり⁶⁾、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。漢方薬治療は病名で診断することだけでなく、「証」(患者の一人一人の体質や病気の状態)を見きわめながら、最適な漢方薬を使い分けていく「オー

* 1) 愛知学院大学大学院心身科学研究科健康科学専攻

* 2) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科

* 3) 愛知学院大学心身科学部健康科学科

(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: K0ba84agu@yahoo.co.jp

ダーメード」な薬である。西洋薬は多くの場合単一の有効成分で作られており、個々の症状や病気に対して、強い効果があるが、漢方薬は複数の有効成分が含まれているため、多様な症状に作用するのが大きな特徴である。このことから、複数の症状を併発する Mets に対しても有用性が期待されている。

防風通聖散 (BTS) は防風、黄芩など 18 種類の生薬で構成されており (表 1)、実証、卒中体質者で上半身肥満のいわゆる「固太り」に投与されている⁷⁾。効能・効果としては高血圧の随伴症状 (動悸、肩こり、のぼせ)、肥満症、むくみ、便秘となっており、脂肪組織を選択的に減少させ、抗肥満作用のあることが報告されている⁸⁻¹²⁾。我々は牛車腎気丸^{13, 14)}および桂枝加朮附湯¹⁵⁾、シナモン (桂皮)¹⁶⁾を用いて、ストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルラットのインスリン抵抗性を改善させ、臨床的検討においても 2 型糖尿病患者で牛車腎気丸投与によりインスリン作用改善効果のあることを確認している¹⁷⁾。

さらに、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、BTS の投与を 24 週間続けることで内臓脂肪が有意に減少し、インスリン抵抗性の評価法の一つである HOMA-R の測定によるインスリン抵抗性の改善や体重減少効果が報告されている¹⁸⁾。しかしながら、BTS 投与によるインスリン感受性の影響についてはこれまで明らかとなっておらず、グルコースク

表 1 防風通聖散構成生薬

| Crude drugs | 生薬名 | 必要量 (g) |
|----------------------|-----|---------|
| Scutellariae Radix | 黄芩 | 44.4 |
| Glycyrrhizae Radix | 甘草 | 44.4 |
| Platycodi Radix | 桔梗 | 44.4 |
| Gypsum Fibrosum | 石膏 | 44.4 |
| Atractylodis Rhizoma | 白朮 | 44.4 |
| Rhei Rhizoma | 大黄 | 33.3 |
| Schizonepetae Spica | 荆芥 | 26.7 |
| Gardeniae Fructus | 山梔子 | 26.7 |
| Paeoniae Radix | 芍薬 | 26.7 |
| Cnidii Rhizoma | 川芎 | 26.7 |
| Angelicae Radix | 当帰 | 26.7 |
| Menthae Herba | 薄荷 | 26.7 |
| Saposhnikoviae Radix | 防風 | 26.7 |
| Ephedrae Herba | 麻黄 | 26.7 |
| Forsythiae Fructus | 連翹 | 26.7 |
| Zingiberis Rhizoma | 生姜 | 6.7 |
| Talcum | 滑石 | 66.7 |
| Natrium Sulfuricum | 芒硝 | 15.6 |

防風通聖散エキス 100g を調整するために要する生薬の量

ランプ法を用いたインスリン感受性を評価する研究はほとんどない。そこで本研究では Wistar ラットに BTS を 3 週間経口投与し、インスリン感受性とインスリンシグナル伝達系タンパク量に及ぼす影響について検討した。

II. 方法

1. 実験動物と漢方薬

雄性 Wistar ラットを 7 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±1°C, 湿度 50±10%, 12 時間明暗サイクル (点灯: AM 8:00, 消灯: PM 8:00) 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) より提供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

8 週齢より Wistar ラットを無作為に Control (n=4) 群, BTS 400mg/kg BW (BTS 400; n=4) 群, BTS 800mg/kg BW (BTS 800; n=4) 群の 3 群に分けた。BTS は生理食塩水 (大塚製薬株式会社, 東京) で希釈し、400mg/kg BW, 800mg/kg BW の投与用溶液を作製した。この溶液を 1 日 1 回、5 ml/kg BW の用量で 3 週間経口投与した。11 週齢時に麻酔下で頸動静脈カテーテル挿入・留置手術を行い、その後 Euglycemic-hyperinsulinemic clamp (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) を摘出し、重量を測定した。さらに腓腹筋も摘出し、-85°C で保存した。摘出した腓腹筋を Western blot 法により、インスリンシグナル伝達系タンパクであるインスリン受容体 (insulin receptor; IR)- β , インスリン受容体基質 (IR substrate; IRS)-1, ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (phosphatidylinositol 3-kinase; PI 3-kinase) のタンパク量を定量した。

3. 体重および摂餌量の測定

体重は週に 1 回、摂餌量は毎日測定し、平均値をその週の値とした。

4. 血糖値および血清インスリン値, adiponectin, FFA の測定

クランプ前に頸動脈または尾静脈より約 0.8ml 採血

し、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後、約1時間後に日立多用小型遠心機を用いて遠心処理し、血清サンプルとして -85°C で保存した。血清インスリン値の測定はインスリン測定キット (株式会社シバヤギ, 東京) を用いて測定した。血清 adiponectin の測定はレビス®高分子アディポネクチン-マウス/ラット (株式会社シバヤギ, 群馬) を使用して測定した。血清 FFA の測定は血清 FFA 測定キット (NEFA C-テストワコー, 和光純薬工業株式会社, 大阪) を使用して測定した。

5. 頸動静脈カテーテル挿入・留置手術

手術は Qinら¹⁴⁻¹⁶⁾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する。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。

6. Euglycemic-hyperinsulinemic clamp 法

前日より絶食 (14-16時間) させた後に、すべてのラットに DeFronzoら¹⁹⁾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) 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 (低濃度) および30mU/kg/min (高濃度) を連続して、それぞれ90分間実施した。血糖値と Glucose infusion rates (GIR, mg/kg/min) は10分ごとに測定した (図1)。2段階でのクランプ中の60分~90分と150分~180分までのGIRを全身のインスリン作用の指標として用いた。

7. SDS-PAGE, Western blot 法

冷凍した筋肉 (200mg) は Qinら¹⁴⁻¹⁶⁾の方法を用いて、1mlの溶解液 (20mM Tris-Cl, 150mM NaCl, 1% NP40, 10mM NaF, 10mM Na_3VO_4 , 10mM EDTA, 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 1 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 1mM PMSF) 内にてホモジナイザーを使用して粉碎した。粉碎後、氷上で1時間静置し、 4°C , 130000G, 1時間の遠心分離を行った (日立分離用小形超遠心機: CS150GXL, ロータ: S80AT3)。分離後、上澄みを採取した。分光光度計 (Molecular Devices) で各上澄みのタンパク量濃度を測定し、 -85°C で保存した。

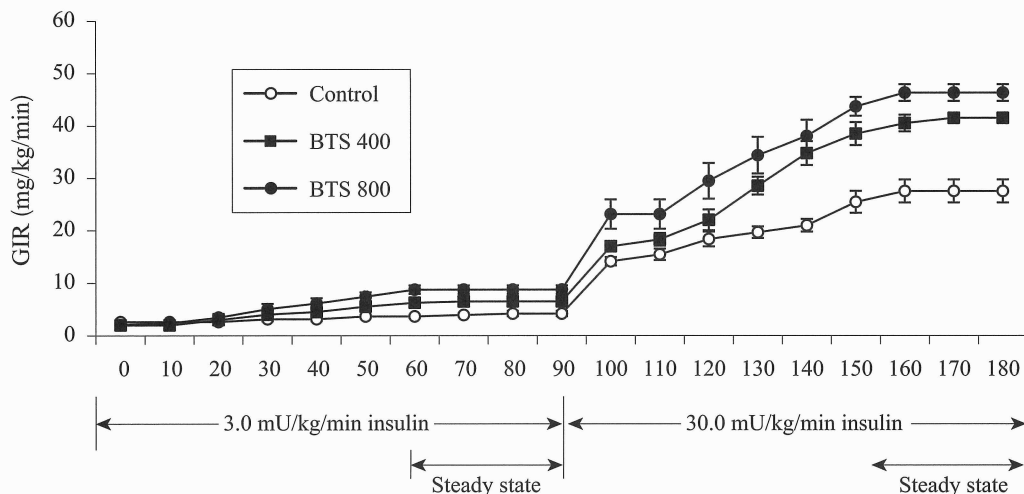


図1 GIRの経時変化

タンパク質 (40 μ g) をサンプルとして SDS-PAGE (7.5%~10% acrylamide gel) によって分画した。分画後, PVDF 膜に転写し, BSA (3%) でブロッキングし, 1次抗体として抗 IR- β 抗体(1:600), 抗 IRS-1 抗体(1:2000), 抗 PI 3-kinase 抗体 (1:2000) にて 4°C で一昼夜反応させた。PVDF 膜洗浄後, 2次抗体として Goat Anti-Rabbit IgG (1:5000) を用いて, 室温で1時間反応させた。反応後, ECL Plus Western Blotting Detection Regents に PVDF 膜を浸透し, 生じた化学発光を Light Capture (AE-6971 Light Capture, アトー株式会社, 東京) にて検出した。バンドの数値化は画像処理解析ソフト Image J を用いて行った。

8. 統計分析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で表記した。統計解析は一元配置分散分析を用いて, Tukey あるいは Games-Howell により多重比較を行った。各測定項目は危険率 5%未満を統計学的に有意差ありと判定した。データは SPSS (19.0 J for Windows) を用いて解析した。

III. 結果

1. 防風通聖散の経口投与が体重, 摂餌量, EF 重量に及ぼす影響 (表 2)

体重は, Control 群 (365.4g), BTS 400 群 (361.4g), BTS 800 群 (347.3g) であり, Control 群と比較して BTS 800 群で有意な減少を認めた ($P<0.05$)。摂餌量は, Control 群 (26.3g), BTS 400 群 (27.3g), BTS 800 群 (26.8g) であり, Control 群と比較して有意差はなかった。EF 重量は, Control 群 (1.18g/100g BW), BTS 400 群 (0.93g/100g BW), BTS 800 群 (0.90g/100g BW) であり, Control 群と比較して BTS 400 群と BTS 800 群で有意な減少を認めた (各々 $P<0.05, 0.01$)。

2. 防風通聖散の経口投与が血清 adiponectin, FFA およびクランプ前, 低濃度と高濃度の血糖値とインスリン値に及ぼす影響 (表 3)

血清 adiponectin は, Control 群 (33.9ng/ml), BTS 400 群 (35.1ng/ml), BTS 800 群 (33.7ng/ml) であり, Control 群と比較して有意差はなかった。血清 FFA も, Control 群 (0.96mEq/l), BTS 400 群 (1.06mEq/l), BTS 800 群 (0.85mEq/l) であり, Control 群と比較して有意差はなかった。クランプ前, 低濃度と高濃度の血糖値とインスリン値に関して, 血糖値は各群間で有

表 2 体重, 摂餌量, EF 重量に及ぼす影響

| | Control | BTS 400 | BTS 800 |
|----------------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| Body weight (g) | 365.4 \pm 2.4 | 361.4 \pm 3.7 | 347.3 \pm 7.6* |
| Food intake (g/day) | 26.3 \pm 0.7 | 27.3 \pm 0.6 | 26.8 \pm 1.2 |
| Epididymal Fat (g/100g BW) | 1.18 \pm 0.05 | 0.93 \pm 0.05* | 0.90 \pm 0.04** |

Data are expressed as means \pm S.E. * $P<0.05$ vs. Control, ** $P<0.01$ vs. Control.

表 3 血清 adiponectin, FFA およびクランプ前, 低濃度と高濃度の血糖値とインスリン値に及ぼす影響

| | Control | BTS 400 | BTS 800 |
|------------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Adiponectin (ng/ml) | 33.9 \pm 1.9 | 35.1 \pm 4.4 | 33.7 \pm 2.4 |
| FFA (mEq/l) | 0.96 \pm 0.10 | 1.06 \pm 0.12 | 0.85 \pm 0.02 |
| Glucose (mg/dl) | | | |
| Basal | 103.4 \pm 14.4 | 79.7 \pm 5.7 | 92.3 \pm 6.9 |
| Low-dose | 70.0 \pm 4.1 | 60.5 \pm 3.1 | 64.3 \pm 3.8 |
| High-dose | 72.3 \pm 5.8 | 59.8 \pm 8.4 | 69.1 \pm 3.6 |
| Insulin (μ IU/ml) | | | |
| Basal | 31.1 \pm 1.7 | 20.0 \pm 6.9 | 18.4 \pm 4.4* |
| Low-dose | 75.0 \pm 9.9 | 48.3 \pm 12.5 | 91.9 \pm 12.6 |
| High-dose | 285.0 \pm 31.8 | 256.6 \pm 29.7 | 300.9 \pm 0.1 |

Data are expressed as means \pm S.E. * $P<0.05$ vs. Control.

意差はなく、クランプ前のインスリン値が、Control群 (31.1 μ IU/ml) と比較して BTS 800群 (18.4 μ IU/ml) で有意な低下を認めた ($P < 0.05$).

3. 防風通聖散の経口投与が GIR (低濃度と高濃度) に及ぼす影響 (図2)

インスリン感受性の指標である GIR は、低濃度では Control 群 (4.0mg/kg/min), BTS 400群 (6.5mg/kg/min), BTS 800群 (8.7mg/kg/min) であり、Control 群と比較して BTS 400群と BTS 800群で有意な増加を認めた (各々 $P < 0.05, 0.01$). 高濃度では Control 群 (27.5mg/kg/min), BTS 400群 (41.3mg/kg/min), BTS 800群 (46.3mg/kg/min) であり、Control 群と比較して BTS 400群と BTS 800群で有意に増加した (各々 $P < 0.01, 0.01$).

4. EF 重量と GIR (低濃度と高濃度) の相関 (図3)

EF 重量と GIR (低濃度と高濃度) の間には、負の相関関係を認めた (各々 $P < 0.05, 0.001$). EF 重量の低下に応じて、GIR が増加した.

5. インスリンシグナル伝達系タンパク量 (IR- β , IRS-1, PI 3-kinase) に及ぼす影響 (図4)

IR- β タンパク量は Control 群を 100% とすると BTS 400群 (77.6%), BTS 800群 (88.2%), IRS-1 タンパク量は Control 群を 100% とすると BTS 400群 (97.3%), BTS 800群 (103.0%), PI 3-kinase タンパク量は Control 群を 100% とすると BTS 400群 (109.1%), BTS 800群 (127.3%) であった. しかしながら、各群間に有意差はなかった.

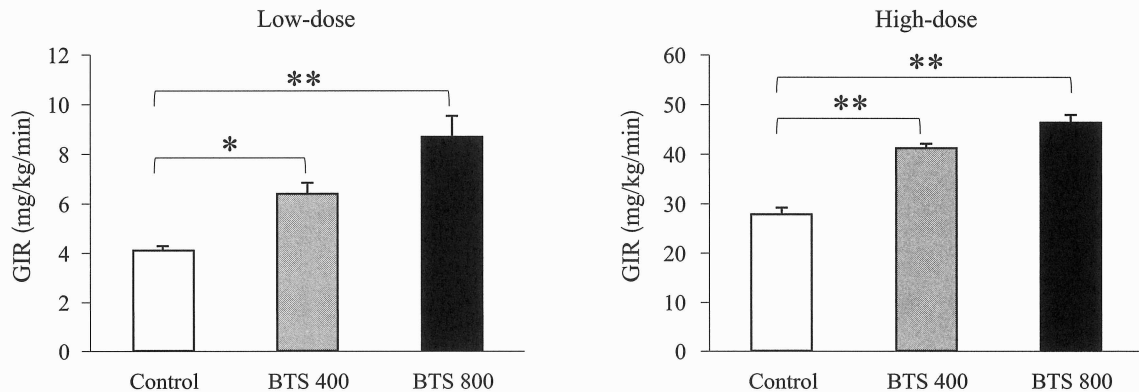


図2 GIR (低濃度と高濃度) に及ぼす影響

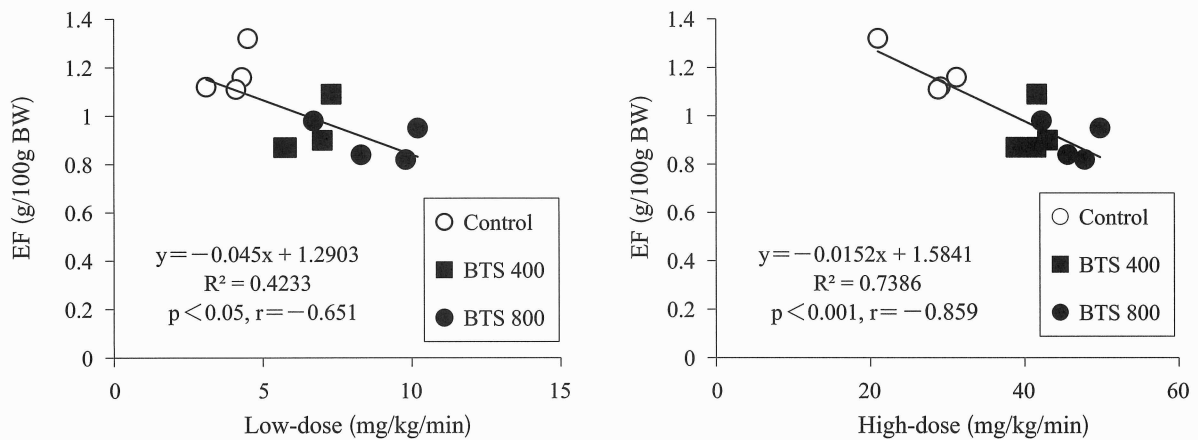


図3 EF 重量と GIR (低濃度と高濃度) の相関

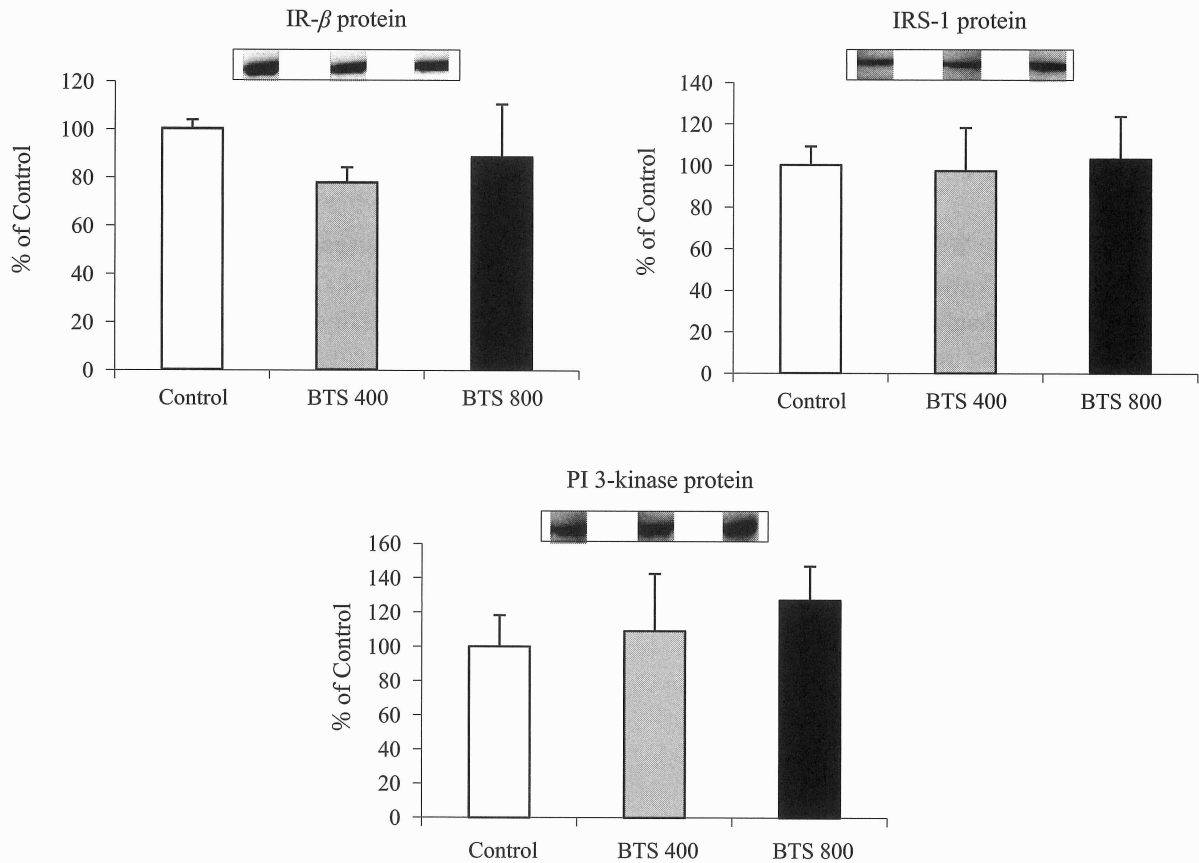


図4 インスリンシグナル伝達系タンパク量 (IR-β, IRS-1, PI 3-kinase) に及ぼす影響

IV. 考 察

本研究では、BTSがWistarラットのインスリン感受性とインスリンシグナル伝達系タンパク量に及ぼす影響を検討した。3週間の経口投与後、体重、摂餌量、血清インスリン値、adiponectin、FFA、インスリン感受性、EF重量、インスリンシグナル伝達系のタンパク量 (IR-β, IRS-1, PI 3-kinase) を測定した。本研究の結果から、BTS投与によって体重、EF重量が減少し、インスリン感受性が増加した。しかしながら、摂餌量、血清adiponectin、FFAとインスリンシグナル伝達系 (IR-β, IRS-1, PI 3-kinase) のタンパク量には影響を認めないことが示唆された。

BTSの3週間経口投与における体重とEF重量に及ぼす影響から、体重、EF重量が減少することが示唆された。摂餌量は投与期間を通じてほぼ一定であり、BTSは摂餌量に対しては影響を及ぼさず、手術後に摂餌量が減少したが数日後には回復した。また、BTS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、体重減少に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。さらに、Morimotoら¹¹⁾の研究ではフルクトース負荷ラットに6週間のBTS配合粉末飼料を自由摂取させた結果、褐色脂肪組織の熱産生能の指標であるチトクロムcオキシダーゼ活性を上昇させ、熱産生能を亢進させた報告がある。このことから、BTSは熱産生臓器である褐色脂肪組織を活性化させ、体重減少を惹起することが示唆される。脂肪細胞でのTG分解は、in vivoでは交感神経終末から分泌されたノルアドレナリンが脂肪細胞上のアドレナリンβ3受容体に結合した後、細胞内のcAMPを増加させ、TG分解を引き起こすと考えられている。BTSの構成生薬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BTS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 (PDF) を阻害することが報告されている⁸⁾。したがって、これらの作用が相加的に働き褐色脂肪組織を活性

化し、白色脂肪組織の脂肪分解を促進してEF重量を減少させる作用機序が示唆され、本研究でもこの作用機序により抗肥満作用を発揮するものと考えられた。

BTSの3週間経口投与におけるインスリン感受性に及ぼす影響では、インスリン感受性の指標であるGIRでLow-doseとHigh-doseともに増加させることが示唆された。BTSを投与することにより末梢組織、特に骨格筋でのインスリン刺激によるグルコース取り込みを増加させたものと考えられた。

本研究で用いたグルコース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golden standard methodとされている¹⁹⁾。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²⁰⁾。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²¹⁾。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Low-doseクランプの場合90%が抑制される²²⁾。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量が体全体のグルコース利用量に相当する。したがって、GIRを測定することで全身のグルコース利用率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。さらに、3週間のBTSの経口投与では、IR- β 、IRS-1、PI 3-kinaseタンパク量に各群間で有意差を認めなかった。先行研究によると、シナモンの投与ではIR- β 、IRS-1、PI 3-kinaseタンパク量に有意差がみられなかったことが報告されている¹⁶⁾。一方、インスリンの細胞内シグナル伝達機構については、チロシンリン酸化が重要であるとする興味深い先行研究が報告されている。シナモン投与によって、IR- β 、IRS-1チロシンリン酸化、IRS-1/PI 3-kinase associationが有意に増大したことが確認されている¹⁶⁾。同様に牛車腎気丸¹⁴⁾、桂枝加朮附湯¹⁵⁾においてもIR- β 、IRS-1のチロシンリン酸化が増加することが報告されており、インスリン抵抗性に対する漢方薬の影響はインスリンシグナル伝達系のタンパク量ではなく、チロシンリン酸化に対する影響が大きいことが示唆された。

V. まとめ

Wistarラットに対し、BTSを3週間の経口投与を行った結果、体重、副睾丸脂肪重量が減少し、インスリン感受性が増加した。摂餌量、血清Adiponectin、FFAとインスリンシグナル伝達系(IR- β 、IRS-1、PI 3-kinase)のタンパク量には有意差を認めなかった。今後、インスリンシグナル伝達系チロシンリン酸化についても検討を加える予定である。また、TNF- α 、レジスチンについても検索を加えたい。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました財団法人東洋医学研究財団（現公益財団法人）および財団法人愛知糖尿病リウマチ痛風財団（現一般財団法人中京長寿医療研究推進財団）に心より御礼申し上げます。

引用参考文献

- 1) The Examination Committee of Criteria for Metabolic Syndrome. (2005). The definition and criteria of metabolic syndrome. *J Jpn Soc Int Med*, **94**, 794-809.
- 2) Abdul-Ghani M. A. et al. (2010). Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 476279.
- 3) Peppas M. et al. (2010). Skeletal muscle insulin resistance in endocrine Disease. *J Biomed Biotechnol*, Article ID 527850.
- 4) Sato Y. et al. (2007). Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*, **77**, suppl 1, 87-91.
- 5) Sato Y. et al. (2003). Physical exercise improves glucose metabolism in lifestyle-related diseases. *Exp Biol Med*, **228**, (10) 1208-1212.
- 6) Knowler W. C. et al. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J med*, **333**, (6) 393-403.
- 7) 佐藤祐造 (2002). 疾患と漢方：代謝・内分泌。入門漢方医学，南江堂，190-193.
- 8) Yoshida T. et al. (1995). Thermogenic, anti-obesity effects of bofutsushosan in MSG-obese mice. *Int J Obes*, **19**, (10) 717-722.
- 9) Morimoto Y. et al. (1998). Effect of bofutsushosan on monosodium glutamate-induced obesity in rats. *J Trad Med*, **15**, 400-401.
- 10) Ohno A. et al. (2001). Effect of bofutsushosan (Fang-Feng-Tong-Sheng-San) on body weight and fat content in normal mice. *J Trad Med*, **18**, 33-38.
- 11) Morimoto Y. et al. (2001). Effect of bofutsushosan, a Chinese traditional medicine, on body fat accumulation in

- fructose-loaded rats. *Folia Pharmacol Jpn*, **117**, 77–86.
- 12) Morimoto Y. et al. (2010). Combination effects of pioglitazone and bofutsushosan on body weight and blood glucose levels in diabetic KKA^y mice. *J Trad Med*, **27**, (4) 157–165.
- 13) Hu X. et al. (2003). Effect of Gosha-jinki-gan (Chinese herbal medicine: Niu-Che-Sen-Qi-Wan) on insulin resistance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **59**, (2) 103–111.
- 14) Qin B. et al. (2004). Gosha-jinki-gan (a herbal complex) corrects abnormal insulin signaling. *eCAM*, **1**, (3) 269–276.
- 15) Qin B. et al. (2003). Effects of Keishi-ka-jutsu-to (traditional herbal medicine: Gui-zhi-jia-shu-fu-tang) on in vivo insulin action in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*, **73**, (21) 2687–2701.
- 16) Qin B. et al. (2003). Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes Res Clin Pract*, **62**, (3) 139–148.
- 17) Uno T. et al. (2003). Effects of Goshajinkigan on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, **69**, (2) 129–135.
- 18) Hioki C. et al. (2004). Efficacy of bofu-tsusho-san, an oriental herbal medicine, in obese Japanese women with impaired glucose tolerance. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **31**, 614–619.
- 19) DeFronzo RA. et al. (1979). Glucose clamp technique a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, **237**, E214–E223.
- 20) Marin P. et al. (1987). Glucose uptake in human adipose tissue. *Metabolism*, **36**, 1154–1160.
- 21) DeFronzo RA. et al. (1981). The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, **30**, (12) 1000–1007.
- 22) DeFronzo RA. et al. (1988). The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, **37**, 667–687.

(最終版平成25年7月26日受理)

Effect of Bofu-tsusho-san on Insulin Sensitivity in Rats

Ryohei KOBAYASHI, Tomoko UNO and Yuzo SATO

Abstract

BACKGROUND: Obesity is a key factor in the development of metabolic syndrome and is the most important risk factor for the development of insulin resistance. Previous studies have shown that bofu-tsusho-san (BTS), a Kampo medicine, has an anti-obesity effect. However, it remains unclear whether BTS could ameliorate insulin resistance. In the current study, we investigated the effects of BTS on the protein content of insulin sensitivity in Wistar rats.

METHODS: Male wistar rats aged 8 weeks were randomly divided into three groups: Control, BTS 400mg/kg BW (BTS 400), BTS 800mg/kg BW (BTS 800). Saline and BTS were orally administered for 3 weeks. Body weight, food intake, serum insulin, adiponectin, FFA, insulin sensitivity, epididymis fat (EF) weight and insulin-signaling protein content were evaluated. Insulin sensitivity was assessed with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. Protein content of insulin-signaling intermediates (insulin receptor- β : IR- β , IR substrate-1: IRS-1 and phosphatidylinositol 3-kinase: PI 3-kinase) were determined by the Western blot technique.

RESULTS: Body weight, EF weight were significantly decreased statistically ($P < 0.05$, 0.01 respectively), while the GIR was increased statistically ($P < 0.01$). The food intake, serum adiponectin, FFA concentrations and the protein content of insulin-signaling (IR- β , IRS-1, PI 3-kinase) didn't show any significant differences in the three groups.

CONCLUSIONS: These results suggest that the BTS extract could improve insulin action via decreasing adipose tissue.

Keywords: bofu-tsusho-san, insulin sensitivity, euglycemic-hyperinsulinemic clamp, skeletal muscle, Western blot technique

