

漢方薬の経口投与は糖尿病モデルマウスにおける進行性難聴を抑制する

堀 健志

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 耳鼻咽喉科学

(平成31年 1月)

## 目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	4
3. 目的	5
4. 方法	6
5. 結果	9
6. 考察	11
7. 結語	15
8. 研究資金	16
9. 謝辞	17
10. 参考文献	18
11. 図表	21
12. 図表の説明	26

## 1. 要旨

目的：ツムラスズキ肥満糖尿病（TSOD）マウスは早期加齢性難聴を呈する。これらのマウスの病理組織学的分析は、血管条における毛細血管の狭窄および蝸牛における血流の慢性的な減少を示す。本研究では、TSOD マウスの聴力に対する生薬またはカロリー制限の経口投与の影響を調べた。

方法：TSOD マウスを4つの群に分け、対照群（通常飼料投与群）、CR（カロリー制限群）、BF（防風通聖散投与群）とDS（大柴胡湯投与群）を作成した。体重、血糖値、および聴性脳幹反応（ABR）を経時的に測定した。実験終了時には、内耳を摘出し、組織病理学的に評価した。

結果：対照群と比べてCR、BF、DSの各群において血糖値は抑制された。さらに、ABR 閾値の上昇は、CR、BF、DS 群において抑制された。蝸牛血管についても、これらの群で狭小化が抑制されていた。これらの結果から漢方薬の投与により耐糖能が改善され、カロリー制限の場合と同様の結果が得られていると判断された。

結論：2種類の漢方製剤の経口投与は糖尿病モデルマウスにおける聴覚機能障害を予防した。使用した薬剤は広く使われている漢方製剤であり、今後の臨床応用の可能性を示唆するものである。

## 2. 研究の背景

近年、糖尿病患者数は増加傾向にあり、様々な疾患の原因となっている。糖尿病の合併症としての聴覚障害は **Jordao** によって最初に報告された[1]。さらに、その後の多くの疫学的研究により、糖尿病患者において難聴者の頻度が高いことが報告されている[2, 3]。

我々は以前、2型糖尿病を伴うメタボリックシンドロームのモデルマウス[4], [5]が進行性難聴を示し、内耳の血管が狭小化していることを報告した[6]。しかしながら、糖尿病モデルマウスにおいて難聴を予防する方法は明らかにされていなかった。

### 3. 目的

本研究では、糖尿病の血管障害に効果があると考えられる漢方製剤を、糖尿病モデルマウスに投与することにより、難聴の進行を予防できるかどうかを検討した。

## 4. 方法

### 実験動物

2型糖尿病の自発モデルであるツムラスズキ肥満糖尿病 (TSOD) マウスをこの研究に使用した。すべてのマウスは4週齢の雄で、正常なプライエル反射を示した。マウスは、動物繁殖研究所 (茨城, 日本) から入手した。

実験動物を4つの群に分けた。対照群では、TSOD マウスに無制限に通常の固形食を与えた。CR群では、カロリー制限のために動物に通常の固形飼料を摂取できるようにした [7, 8]。BF 群と DS 群では、防風通聖散 (BF 群) または大柴胡湯 (DS 群) を3%含む固形飼料を動物に自由に摂取させ、飼育した。実験終了時まで全ての動物に同じ方法で給餌した。各群は10匹のマウスを含む。各群6匹のマウスをABR測定と病理組織学的検査に使用し、各群とも4匹のマウスを蝸牛血流の測定に使用した。

### 体重と血糖値の測定

マウスの体重を7, 9および11か月齢で測定した。Glucose Pilot® (Aventir Biotech, LLC, Carlsbad, CA, USA) を使用して血糖値を測定した。血糖値のための採血は毎回午後2時に行った。

### 聴性脳幹反応 (ABR) の評価

マウスの聴覚機能を評価するために、音響刺激に対するABRの閾値を測定した。ABR閾値の測定は、塩酸メデトミジン (1 mg/kg), キシラジン塩酸塩 (2 mg/kg), およびペ

ントバルビタールナトリウム (24 mg/kg) の混合麻酔薬を腹腔内投与することによる全身麻酔下に行った。音響刺激は 10 cm のチューブをイヤホンに接続して外耳道に挿入して行った。使用した音響刺激は、2, 4, および 8 kHz のトーンバースト (立ち上がり, 立ち下がり時間 : 2 ms, 持続時間 : 4 ms) に設定した。頭頂と後頭部の皮下白金針電極間の反応を記録した。背部の電極は接地電極とした。シグナルプロセッサ (Synax 1100, NEC Co., 東京, 日本) を使用して 500 回の刺激に対する反応を記録した。ABR 閾値は、ABR 波形の III 波または V 波を確認することができる最低の刺激音圧と定義した。

#### 組織学的評価

蝸牛血管を評価するために、インドインク (Pelikan Fount India) による染色 [9, 10] を行った。11 か月齢のマウスを塩酸メデトミジン (1 mg/kg), キシラジン塩酸塩 (2 mg/kg), およびペントバルビタールナトリウム (24 mg/kg) の混合麻酔薬を用いて麻酔した。開胸後、左心室へインクを注入し、経心灌流を行った。マウスを断頭し、側頭骨を解剖、蝸牛を取り出し、そして蝸牛の固定のために 4%パラホルムアルデヒドを正円窓を通して注入した。試料を K-CX 脱灰溶液に室温で浸漬して脱灰した。標本をリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、次に側頭骨が透明になるまで 70%グリセリンに 2 日間浸漬した。標本は Surface preparation を用いて分解し、その後実体顕微鏡 (SMZ-800 ; 日本光学, 東京, 日本) によって観察された。ImageJ ソフトウェアを使用した画像化は蝸牛の基底回転における血管条の毛細血管の血管面積を比較するために実施された。

## 蝸牛血流の測定

対照群, BF 群, および DS 群の 10 か月齢の TSOD マウスを用いて, 蝸牛血流を測定した。局所麻酔 (0.3 ml 塩酸リドカイン) と同時に前述の 3 つの麻酔薬を使用して, 側頭骨を耳介後切開によって露出させた。正円窓を明視下に置くために, 4 mm のダイヤモンドバーを使用して中耳骨胞を開放した。

レーザー血流計 (AFL-21 ; アドバンス社, 東京, 日本) および細針プローブ (タイプ NT, 直径 0.55 mm ; アドバンス株式会社) を用いて, 各マウスの正円窓周囲 5 箇所の無作為化点で血流を測定した。結果は AD 変換器 (PowerLab, AD Instruments, シドニー, オーストラリア) を用いて記録した。

## 統計学的解析

全てのデータは平均値±標準偏差として表された。データは, マッキントッシュ用の StatView バージョン 5.0J (SAS インスティテュート社, ノースカロライナ州, ケアリー) で分析した。比較は, マン・ホイットニー U 検定を用いて行われた。p < 0. 05 で有意差ありと判断した。



## 5. 結果

### 体重と血糖値

対照群の **TSOD** マウスの体重は7か月齢で約 **60 g** であった (図 1 A)。生後7か月から11か月までの体重の変化はほとんど認めなかった。**BF** および **DS** 群でも体重も7か月から11か月齢までの変化はほとんど認めなかった。カロリー制限された **CR** 群の **TSOD** マウスにおいて、平均体重は他の群と比較して有意に減少していた。

血糖値に関しては、対照群のマウスの血糖値は、生後7および9か月の時点で **CR** 群のマウスの血糖値よりも有意に高かった (図 1B)。また、**BF** 群と **DS** 群の血糖値もまた対照群と比較して低い値を示しました。**BF** 群と **DS** 群の血糖値は、対照と比較して、有意差を認める時期もあったが、最終的に11か月齢では全ての群のマウスは正常レベルの血糖値を示した。

### ABR の評価

**ABR** 閾値は9か月齢以降でのすべての群で徐々に増大した (図 2)。しかしながら、対照群と比較して、**CR**、**BF**、および **DS** 群において **ABR** 閾値の上昇は抑制されていた。

この傾向は **8 kHz** で顕著であった。

### 組織学的評価

蝸牛外側壁の毛細血管を評価した。対照群では、蝸牛外側壁の毛細血管径は小さく、断続的に観察された。しかし、**CR** 群と漢方薬群 (**DS** と **BF**) では、毛細血管は比較的広

く保たれていた (図 3)。画像解析ソフトウェア (ImageJ) で測定した血管面積の比率は、対照群よりも CR 群および漢方製剤投与群で有意に大きかった (図 4)。

#### 蝸牛血流

正円窓付近の蝸牛血流をレーザードップラー流量計で測定した。測定値は電圧で示されるため、相対値で示された。これらの平均値を図 5 に示す。蝸牛血流は、対照群におけるよりも DS 群および BF 群において大きい傾向があった。ただし、この差は統計的に有意ではなかった。

## 6. 考察

TSOD マウスは、多食症、重度の肥満、高血糖、高インスリン血症、高脂血症など、ヒトの肥満型糖尿病と似た特徴を示す[4]。軽度の腎症や末梢神経障害による後肢運動機能障害などの合併症が報告されています[11]。量的形質遺伝子座解析では、ヒトと同様に多遺伝子性遺伝を伴う肥満型糖尿病に関与する多くの遺伝子座を同定されている [5]。内臓脂肪および皮下脂肪が蓄積している他の肥満マウスとは異なり、TSOD マウスは比較的皮下脂肪は少量である。彼らの体はラグビーボールに似た肥満に見え、そして大量の内臓脂肪の蓄積を示す。これはメタボリックシンドロームの病因として重要とされる。本研究では、聴覚障害の進行を防ぐために、2種類の漢方薬を投与することとカロリー制限を行い、評価した。

各群のマウスの食物の摂取総量に違いは認めなかった。よってBF群、DS群および対照群の間のカロリー摂取量の差は5%以内であると予想される。

以前、我々は蝸牛血管のアテローム性動脈硬化症が TSOD マウスの難聴の進行に影響を与えることを報告しました[6]。この研究で使用されている 2 種類の漢方薬は、代謝異常を改善し、血管の狭窄を防ぐことができるとされる[12, 13]。その結果、蝸牛血管径が通常の飼料を摂取している対照群と比較して広く保たれたと考えた。

蝸牛血流のドップラー測定は、以前報告された方法と同様の方法で行われた[14-16]。測定値は、蝸牛の位置によって異なるため、複数部位における平均値を試験動物の個体値として定義した。測定結果には小さな差が認められたが、有意差は認めなかった。

この研究で使用された 2 種類の漢方製剤は、複数の植物抽出物を含む。これらの薬は日本では肥満や高コレステロール血症を改善するための薬剤として使われている。Hioki らの無作為比較試験では防風通聖散の経口投与は糖尿病患者のインスリン抵抗性を改善したと報告されている[17]。また、Shimada は、防風通聖散が TSOD マウスの糖尿病に関連する血液所見（グルコース、総コレステロール、インスリン、および腫瘍壊死因子）を有意に抑制したことを報告した[18]。同研究では、防風通聖散を投与した際の代謝障害の進行に伴う末梢神経障害の有意な抑制も示された。

大柴胡湯で処置した TSOD マウスでは、耐糖能異常および末梢神経障害が抑制された[19]。防風通聖散抽出物の投与は、アテローム性動脈硬化症の加速の動物モデルにおいて、頸動脈の内膜領域における血管内皮肥厚および血管平滑筋細胞の増殖を抑制したという報告もある[12]。漢方薬の大柴胡湯の成分を含む小柴胡湯は高コレステロール血症マウスで抗アテローム性動脈硬化作用を示した[13]。

TSOD の対照マウスとしてはツムラスズキ非肥満 (TSNO) マウスが確立されている。TSNO マウスはメタボリックシンドロームの特徴を示さなかったと報告されている[4, 11]。以前の研究[6]では、TSNO マウスは全観察期間にわたって安定した体重と血糖値 (約 40 g, 200 mg/ml) を示した。これらの値は本研究の CR 群と同様であった。ABR の閾値もまた CR 群の TSOD マウスと TSNO マウスで同様の変化を示した。これに対し、TSNO の血管面積率は CR, BF および DS 群の TSOD マウスのものよりさらに大きく保たれていた。本研究では、CR, BF および DS 群において生後 4 か月までは通常飼料で飼育されていて高血糖に曝露されたことが原因と考えられた。

漢方薬投与後、体重が減少し動脈硬化が抑制されることが報告されています。さらに、カロリー制限による体重減少および血管機能の回復はよく研究されている。しかしながら、防風通散などの漢方薬の効果とカロリー制限の効果について科学的に比較した研究はこれまでになかった。この点は本研究の価値であると考えられる。将来的に我々はこれらの漢方薬の摂取量を詳細に研究する予定である。今回示された予防効果が普遍的な現象であるかどうかを複数の種類の動物での実験を通して確認することが必要である。これらの実験結果は臨床応用の可能性を明らかにすると考えられる。

この研究にはいくつかの制限があります。マウスの可聴周波数は人間のそれよりも高いことが知られている。この調査では、16 kHz と 32 kHz の音響刺激に対する ABR も測定する必要がある。しかしながら、この研究で使用された機器は、高周波の音響刺激が不可能であった。したがって、本研究では 16 kHz と 32 kHz における ABR 閾値を評価できなかった。さらに、本研究における TSOD マウスの ABR 閾値は、我々の以前の結

果における値とはわずかに異なる。TSOD マウスは遺伝的に同一ではなく、表現型の個体差を完全に排除することはできない。これが ABR 閾値の上昇率に差があると原因と予想された。我々は実験の開始時には正常な閾値を有する動物のみを選択して実験に使用したが、結果として以前の研究の結果と比較して本研究では ABR 閾値が急速に上昇した。

## 7. 結語

2 種類の漢方製剤の経口投与は、糖尿病のモデルマウスにおける聴覚機能障害を予防した。これらの実験結果は臨床応用の可能性を示唆するものと考えた[20]。

## 8. 研究資金

この研究は科学研究費補助金 (24592551, 15K10751, 18K09321) を用いて行われた。



## 9. 謝辞

本研究を行うにあたり丁寧に御指導いただきました山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学教授山下裕司先生に深謝いたします。

## 10. 参考文献

1. Jordao AMD. Consideration sur un cas du diabete. Union Medicale du Paris 1857;11:446.
2. Kakarlapudi V, Sawyer R, Staecker H. The effect of diabetes on sensorineural hearing loss. *Otol Neurotol* 2003;24:382-6.
3. Uchida Y, Sugiura S, Ando F, Nakashima T, Shimokata H. Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: a population-based study of age-related hearing loss. *Med Sci Monit* 2010;16:PH63-8.
4. Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Funo S, Yanagisawa T, Kimura M, et al. A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY strain. *Exp Anim* 1999;48:181-9.
5. Hirayama I, Yi Z, Izumi S, Arai I, Suzuki W, Nagamachi Y, et al. Genetic analysis of obese diabetes in the TSOD mouse. *Diabetes* 1999;48:1183-91.
6. Tsuda J, Sugahara K, Hori T, Kanagawa E, Takaki E, Fujimoto M, et al. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Otolaryngol* 2016;136:1097-106.
7. Mager DE, Wan R, Brown M, Cheng A, Wareski P, Abernethy DR, et al. Caloric restriction and intermittent fasting alter spectral measures of heart rate

- and blood pressure variability in rats. *Faseb j* 2006;20:631-7.
8. Geng Y, Wang J, Liang J, Xu C, Zhi Y. Expression of Sirt1 and Sirt2 in injured optic retina of calorie restricted rats. *Eye Sci* 2011;26:221-4.
  9. Iwagaki T, Suzuki T, Nakashima T. Development and regression of cochlear blood vessels in fetal and newborn mice. *Hear Res* 2000;145:75-81.
  10. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005;2:3-14.
  11. Iizuka S, Suzuki W, Tabuchi M, Nagata M, Imamura S, Kobayashi Y, et al. Diabetic complications in a new animal model (TSOD mouse) of spontaneous NIDDM with obesity. *Exp Anim* 2005;54:71-83.
  12. Ohno K, Chung H-J, Maruyama I, Tani T. Bofutsushosan, a traditional Chinese formulation, prevents intimal thickening and vascular smooth muscle cell proliferation induced by balloon endothelial denudation in rats. *Biol Pharm Bull* 2005;28:2162-5.
  13. Shen YR, Inoue M, Nagatsu Y, Ogiwara Y, Aburada M. Anti-hyperlipidemic and anti-atherosclerotic actions of shosaikoto (kampo medicine). *Biol Pharm Bull* 1996;19:1160-5.
  14. Miller JM, Marks NJ, Goodwin PC. Laser Doppler measurements of cochlear blood flow. *Hear Res* 1983;11:385-94.
  15. Nakashima T, Suzuki T, Iwagaki T, Hibi T. Effects of anterior inferior

- cerebellar artery occlusion on cochlear blood flow—a comparison between laser-Doppler and microsphere methods. *Hear Res* 2001;162:85–90.
16. Hultcrantz E, Nuttall AL. Effect of hemodilution on cochlear blood flow measured by laser-Doppler flowmetry. *Am J Otolaryngol* 1987;8:16–22.
  17. Hioki C, Arai M. Bofutsushosan use for obesity with IGT: search for scientific basis and development of effective therapy with Kampo medicine. *J Tradition Med* 2007;24:115–27.
  18. Shimada T, Kudo T, Akase T, Aburada M. Preventive effects of Bofutsushosan on obesity and various metabolic disorders. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1362–7.
  19. Tsunakawa M, Shimada T, Suzuki W, Nagata M, Takeda S, Mizuno A, et al. Preventive effects of Daisaikoto on metabolic disorders in spontaneous obese type II diabetes mice. *J Tradition Med* 2006;23:216–23.
  20. Hori T, Sugahara K, Tsuda J, Hirose Y, Hashimoto M, Takemoto Y, Tarumoto S, Yamashita H. Oral administration of an herbal medicine to prevent progressive hearing loss in a mouse model of diabetes. *Auris Nasus Larynx*. in press

この論文は **ScienceDirect** に掲載の Oral administration of an herbal medicine to prevent progressive hearing loss in a mouse model of diabetes. より引用したものである

1 1. 図表

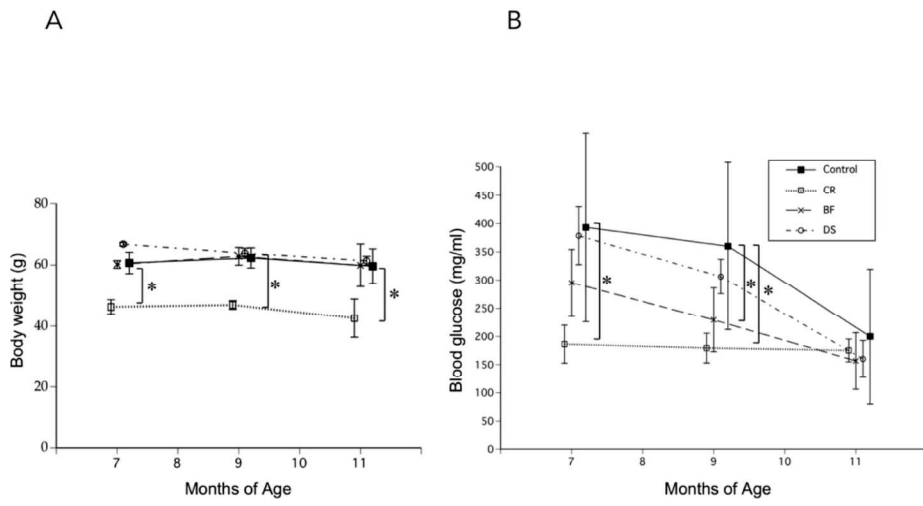


図 1.

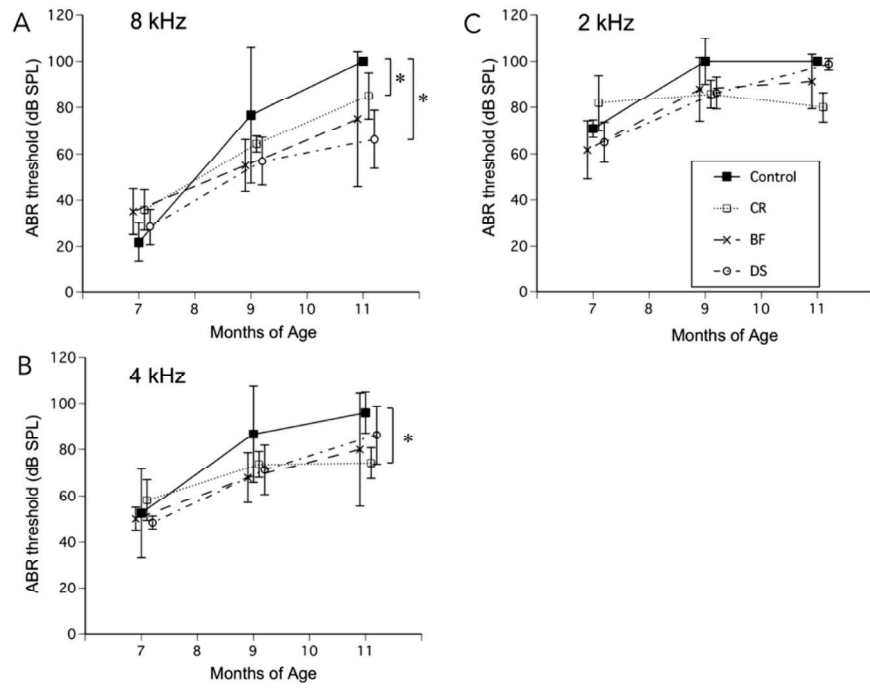


图 2.

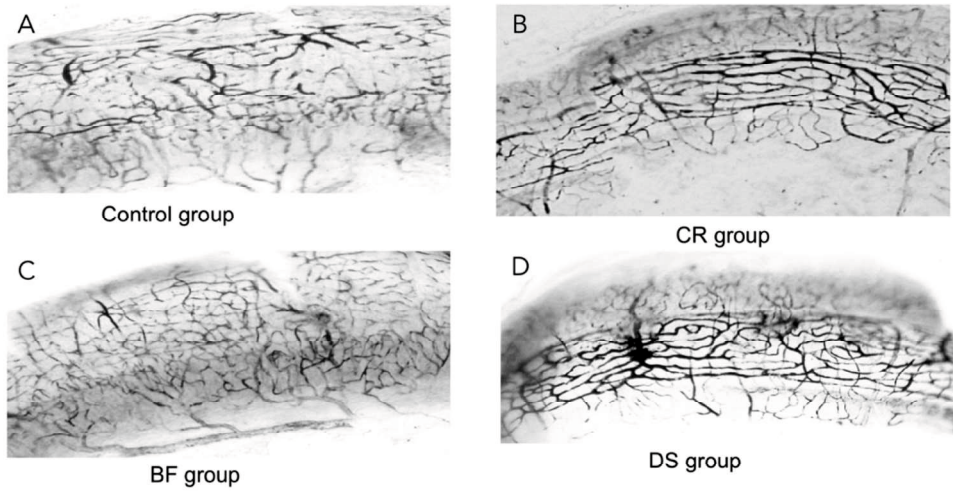


图 3.

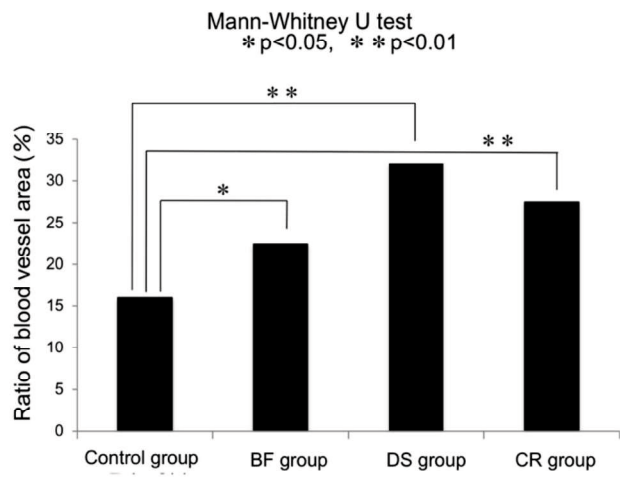


图 4.



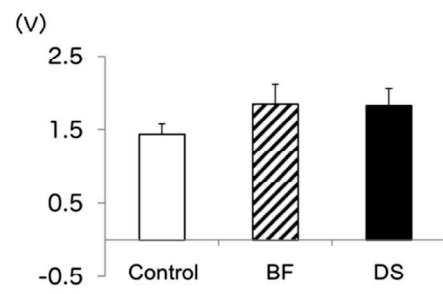


图 5.

## 1 2. 図の説明

図 1 : 体重と血糖

(A) 縦軸は体重, 横軸は年齢を示す。TSOD マウスは, 生後 7 か月から 11 か月まで, 60 g を超える重度の肥満を示す。CR 群の体重は, 他の 3 群より有意に小さかった。エラーバーは±1 の標準誤差を示す。\*  $p < 0.05$ 。

(B) 縦軸はグルコース濃度, 横軸は年齢を示す。血糖値は対照群では 7 か月で最も高く, 11 か月齢まで徐々に減少した。血糖値は, 漢方薬を投与されたマウス (防腐通聖散, 大柴胡湯) で抑制されていた。カロリー制限群の TSOD マウスは観察期間内に高血糖を示さなかった。エラーバーは±1 の標準誤差を示す。\*  $p < 0.05$ 。

図 2 : 聴覚脳幹反応閾値の変化

聴覚脳幹反応 (ABR) 閾値は, 2, 4, 8 kHz の音響刺激を用いて測定した。縦軸は ABR 閾値, 横軸は年齢を示す。すべてのマウスの ABR 閾値は徐々に増加したが, 9 か月齢まで群間の有意差は観察されなかった。しかしながら, 対照群と比較して, カロリー制限群, 防風舎群, 大柴胡湯群では ABR 閾値の上昇が抑制された。この傾向は 8 kHz で顕著であった。エラーバーは±1 の標準誤差を示す。\*  $p < 0.05$ 。

### 図 3 : 血管染色による蝸牛外側壁の評価

11 か月齢における蝸牛の血管染色は、TSOD マウスにおける蝸牛血管密度の減少を示唆した。対照群では、蝸牛外側毛細血管は非常に狭い直径と断続的な所見を示した。しかし、カロリー制限グループと漢方薬群 (DS 群と BF 群) では、毛細血管の幅は比較的保たれた。

### 図 4 : ImageJ で評価した蝸牛外側壁の血管密度

血管面積の比率は画像解析ソフトウェア (ImageJ) で測定した。血管面積の割合は、対照群よりもカロリー制限群および生薬群 (防風通聖散, 大柴胡湯) の方が有意に大きかった。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ 。

### 図 5 : 漢方薬を投与された TSOD マウスにおける蝸牛血流

正円窓周囲の蝸牛血流をレーザードップラー流量計で測定した。蝸牛血流は、対照群よりも大柴胡湯群および防房総山群の方が多い傾向がありました。しかし、その差は大きくも統計的にも有意ではありませんでした。