

目次

用語解説.....	1
第 1 章 緒論.....	3
第 2 章 研究目的とその背景.....	5
研究目的.....	5
糖尿病と合併症.....	5
糖尿病態モデル.....	6
糖尿病発症機序.....	7
インスリン分泌不足とインスリン抵抗性.....	8
防風通聖散.....	9
山梔子.....	11
第 3 章 実験方法.....	13
3.1 使用薬物.....	13
3.2 糖尿病態マウスの作製と薬物投与方法.....	14
3.3 パラメーター測定方法.....	15
3.4 肝臓脂質抽出方法.....	15
3.5 糖負荷、インスリン負荷方法と HOMA-IR 値計算方法.....	16
3.6 骨格筋におけるグルコースの取り込み測定方法.....	16
3.7 タンパク質の検出方法.....	17
3.8 脂肪組織から遊離された TNF- α 値, レプチン値と遊離脂肪酸値の測定方法.....	18
3.9 脂肪細胞面積の計算方法.....	18
3.10 データの解析方法.....	19
第 4 章 結果.....	20
4.1. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスの改善効果.....	20
4.1.1. STZ-糖尿病態マウスと正常マウスの比較.....	20
4.1.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血糖値に対する影響.....	21
4.1.3. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血清インスリン値に対する影響.....	22
4.1.4. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血清トリグリセリド値と血清コレステロール値に対する影響.....	23

4.1.5. 考察.....	25
4.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬 (発表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) の改善効果.....	27
4.2.1. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬 (発表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) の血糖値に対する影響.....	27
4.2.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび血糖降下作用を示した構成生薬 (発表剤、解毒剤、解熱剤、中和剤) の血清インスリン値に対する影響.....	29
4.2.3. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬 (発表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) の血清トリグリセリド値に対する影響.....	31
4.2.4. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬 (発表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) の血清コレステロール値に対する影響.....	33
4.2.5. 考察.....	35
4.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の改善効果.....	39
4.3.1. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血糖値に対する影響.....	39
4.3.2. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清インスリン値に対する影響.....	41
4.3.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清トリグリセリド値に対する影響.....	42
4.3.4. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清コレステロール値に対する影響.....	43
4.3.5. 考察.....	44
4.4. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの血糖降下機序.....	46
4.4.1. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの糖負荷に対する影響.....	46
4.4.2. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの HOMA-IR 値に対する影響.....	49
4.4.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスのインスリン負荷に対する影響.....	50

4.4.4.	STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋のグルコースの取り込みに対する影響	52
4.4.5.	STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋細胞膜の Glucose transporter 4 (GLUT4) の発現に対する影響.....	54
4.4.6.	STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋細胞質の Akt リン酸化に対する影響	56
4.4.7.	考察.....	58
4.5.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの改善効果.....	60
4.5.1.	HFD+STZ-糖尿病態マウスと正常マウスの比較.....	60
4.5.2.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による体重、給食量と飲水量に対する影響	62
4.5.3.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による血糖値、血清インスリン値、血清や肝臓のトリグリセリド値とコレステロール値に対する影響	64
4.5.4.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による皮下と内臓 (精巣周り) 脂肪組織重量と脂肪細胞面積に対する影響.....	70
4.5.5.	考察.....	74
4.6.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの血糖降下機序.....	77
4.6.1.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による糖負荷に対する影響	77
4.6.2.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による HOMA-IR 値に対する影響.....	79
4.6.3.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与によるインスリン負荷に対する影響	80
4.6.4.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による血清 TNF- α 値、レプチン値と遊離脂肪酸値に対する影響	82
4.6.5.	HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による皮下と内臓 (精巣周り) 脂肪組織から遊離された TNF- α 値、レプチン値と遊離脂肪酸値に対する影響	86
4.6.6.	考察.....	90
第 5 章	結論	92

第 6 章 引用文献.....	93
第 7 章 謝辞.....	100

用語解説

本論文において以下の略語を用いた。

AGEs	advanced glycation end products
BSA	bovine serum albumin
BOF	Bofutsushosan
2-DG	2-deoxy-D-glucose
DTT	dithiothreitol
FFA	free fatty acid
GAD	glutamic acid decarboxylase
GF	Gardeniae Fructus
GK	Goto and Kakizaki
Glc	Glibenclamide
GLP	glucagon-like peptide
GLUT4	glucose transporter 4
GP	geniposide
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFD	high-fat diet
HLA	human leukocyte antigen
HOMA-IR	homeostasis model assessment-insulin resistance
HSL	hormone sensitive lipase
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus
IDF	international diabetes federation
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin 6
IRS	insulin receptor substrate
JNK	c-jun <i>N</i> -terminal kinase
KHB	Krebs-Henseleit buffer
KRPB	Krebs-Ringer phosphate buffer

LDL	low density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NIDDM	noninsulin-dependent diabetes mellitus
PBS	phosphate buffered saline
PDX	pancreatic and duodenal homeobox
PI3-K	phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	protein kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	poly vinylidenedifluoride
ROS	reactive oxygen species
SDS	sodium dodecyl sulfate
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
STZ	streptozotocin
TBP	thioredoxin binding protein
TBS	tris-buffered saline
TCF7L2	transcription factor 7-like 2
TNF- α	tumor necrosis factor- α
UCP	uncoupling protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoprotein

第1章 緒論

防風通聖散は18種類の生薬から構成された漢方方剤であり、高血圧・脂質異常症・肥満症・糖尿病などの肥満からくる生活習慣病を改善する漢方薬として知られている。防風通聖散は、1172年に中国の劉河間によって著された『宣明論(せんめいろん)』に記され、古来中国や日本で余分なエネルギーや毒素を外に出し、体の熱をさまし、病因を発散させる薬能があるとされている。しかし、現状では、これらのことを証明する防風通聖散の病態薬理的な基礎研究はほとんどなされていない。そこで、本研究では先ず Streptozotocin (STZ)-誘発糖尿病マウスを作製して、糖尿病態パラメーターとして高血糖値や低血清インスリン値、高血清トリグリセリド値、高血清コレステロール値を取り上げ、これらに対する防風通聖散の効果を検討した。

防風通聖散は、發表剤や瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤から構成され、体の表面や内部に抗炎症作用を示し、さらに利尿作用や瀉下作用、発汗作用などを持つとされている。そこで、防風通聖散構成生薬を上記の6つにグループ分けして、高血糖降下作用を比較し、防風通聖散の作用における構成生薬の役割を検討した。これらの構成生薬エキスの血糖降下作用と血清インスリン増加作用を比較することにより、血糖降下作用とインスリン遊離作用との関連性を検討した。生薬エキスによっては強いインスリン遊離促進作用があるものと弱い作用しかないものが存在することが考えられた。防風通聖散エキスの高血糖低下作用機序にはインスリン遊離を促進する作用機序と、インスリン遊離が関与しない機序がある可能性を想定した。解熱剤であり利胆剤でもある山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスにおいてインスリン遊離を介さない機序により高血糖値を改善するかどうかを研究した。また、山梔子エキスの高血清トリグリセリド値と高血清コレステロール値に対する作用を防風通聖散のそれらに対する作用と比較した。さらに、山梔子エキスの作用を山梔子主要成分 geniposide の作用と比較した。

STZ-糖尿病態マウスは、Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) 値の増大や耐糖能異常、インスリン抵抗性を誘導する特徴を有していた。そこで、これらの HOMA-IR 値や耐糖能異常、インスリン抵抗性に対する山梔子エキスの効果を検討した。さらに、山梔子エキスによるインスリン抵抗

性改善作用機序を STZ-糖尿病態マウスの骨格筋における糖の取り込みと Glucose transporter 4 (GLUT4) 活性、Akt 活性を測定することにより詳細に検討した。

II 型糖尿病患者は糖尿病患者の 95 % を占め、肥満を伴う症例が多い。そこで II 型糖尿病患者の特徴に類似した肥満型糖尿病態マウスを、高脂肪食 (High-Fat Diet: HFD) と STZ 単回投与により作製し、山梔子エキスの抗糖尿病作用を詳細に検討した。肥満型 STZ (HFD+STZ) 糖尿病態マウスは STZ-糖尿病態マウスと比較して、体重や血清インスリン値と HOMA-IR 値が増加した。HFD+STZ 糖尿病態マウスと STZ-糖尿病態マウスにおいて、両方とも高血清トリグリセリド値と高血清コレステロール値を示したことから、その二つの糖尿病モデルには脂質代謝異常の存在が示唆された。

山梔子エキスは 3 週間連日経口投与により、HFD+STZ 糖尿病態マウスにおいて血糖値および血清と肝臓のコレステロール値やトリグリセリド値、血清インスリン値に対する効果を検討した。さらに、HFD+STZ 糖尿病態マウスの HOMA-IR 値やインスリン抵抗性に対する山梔子エキスの効果も検討した。この山梔子エキスの作用機序を解明するために、内臓脂肪組織から遊離される tumor necrosis factor- α (TNF- α) 値やレプチン値に対する効果を測定し、山梔子によるインスリン抵抗性改善作用と TNF- α 値やレプチン値との関連について研究した。

第2章 研究目的とその背景

研究目的

II型糖尿病態モデルに対する防風通聖散および構成生薬山梔子エキスの抗糖尿病作用機序を研究することを目的とした。II型糖尿病態モデルとしてSTZ-誘発糖尿病態マウスと高脂肪食(HFD)とSTZ単回投与により作製した肥満型(HFD+STZ)糖尿病態マウスを使用した。防風通聖散や山梔子エキスの血糖値や血清インスリン値、血清トリグリセリド値、血清コレステロール値、HOMA-IR値、インスリン抵抗性などに対する効果を測定し、山梔子エキスの作用機序を脂肪細胞組織から遊離するTNF- α 値やレプチン値との関連から検討した。

糖尿病と合併症

糖尿病は、インスリン作用の不足に基づく高血糖状態を主徴とする代謝疾患群である。成因からI型およびII型、特定の原因によるその他の型の糖尿病および妊娠糖尿病に分類される⁽¹⁾。I型糖尿病は自己免疫疾患であり、膵臓 β 細胞の破壊によるもので、通常は絶対インスリン欠乏に至る。II型糖尿病は遺伝因子と環境因子とが相互に作用しあって発症する多因子疾患である。糖尿病患者の90-95%はII型糖尿病が占めている⁽²⁾。II型糖尿病発症の特徴的病態は、インスリン抵抗性の増大とインスリンの分泌低下である。アジア人のII型糖尿病は主にインスリン分泌低下が特徴であり、欧米人のII型糖尿病はインスリン抵抗性の増大が特徴的である。いずれにしても、両者が種々の程度に重なりインスリン作用不全に陥り、高血糖が生じる。そして高血糖値自体が、インスリン分泌低下やインスリン抵抗性増大を助長し、その結果、耐糖能がさらに悪化するという悪循環が形成される⁽³⁾。

糖尿病は、慢性の高血糖を主徴とするが、同時に脂質代謝や蛋白質代謝にも各種の異常をきたす。すなわち、糖尿病は「合併症の病気」といっても過言ではない。合併症は糖尿病発症後一定期間の後に発症する。糖尿病の慢性合併症は基本的に血管障害であり、障害される血管の太さにより細小血管症と大血管症に分類される。細小血管症には三大合併症の腎症、網膜症と神経障害があり、大血管症には脳血管障害、虚血性心疾患と末梢血管障害がある。そのほか、足病変、骨病変、歯周病と皮膚疾患なども引き起こす。これらの病態の最も重要

な成因は「高血糖の維持」であり、高血糖値のコントロールは合併症の発症と進展を阻止するので、糖尿病治療に繋がる⁽⁴⁾。

糖尿病態モデル

糖尿病病態モデル動物は、膵臓摘出等の外科手術⁽⁵⁾および、STZ⁽⁶⁾などの化学物質や自然発症⁽⁷⁻⁹⁾、ウイルス⁽¹⁰⁾などによって作製される。その中でも化学物質によって誘発された I 型あるいは II 型実験動物モデルが広く利用されている。I 型糖尿病病態モデルに共通して、膵臓へのリンパ球浸潤 (膵島炎)、発症後の多飲、多尿、高血糖および急激なやせ、重度のケトosisによる死亡が報告されているので、生存を維持するために外来のインスリンが必要である。これらの特徴はヒト I 型糖尿病に類似している⁽¹¹⁾。II 型糖尿病病態モデル動物は、インスリン標的細胞でのインスリン抵抗性と膵臓 β 細胞からのインスリン分泌不全が関与して発症する。生存を維持するために外来のインスリンは重要でない。近年の動物モデルの解析により、ヒト糖尿病に共通する機序は、インスリン分泌異常によるものとストレス経路によるものであると考えられている⁽¹²⁾。

STZ は、特異的に膵臓 β 細胞を破壊するので糖尿病病態モデルの作製に広く用いられている。STZ は、膵臓 β 細胞の変性や壊死を起こすと考えられている。STZ 投与動物は、高血糖の他に、多飲や多渴、多食、多尿、脂質代謝不調などの IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) の特徴を有しているので、IDDM のモデルとして幅広く理解されている⁽¹³⁾。しかし、STZ 単回投与マウスは、STZ の投与量によって膵臓 β 細胞が完全には破壊されなく、障害を受けていない細胞からのインスリンの分泌が認められる。また STZ 投与後、実験動物は数カ月以上生き延びることから、単純に IDDM とは言い切れないところがある。さらに、胎児や成熟したマウスに STZ を単回投与して、非肥満でインスリン分泌不全を主因とする NIDDM (noninsulin-dependent diabetes mellitus) モデルを作製した報告^(14, 15)や経口糖尿病薬を投与すると高血糖が改善される報告がある⁽¹⁶⁾。従って、STZ 単回投与マウスは IDDM と NIDDM の特徴の両方を有しているので、NIDDM モデルとしても自然発症の糖尿病病態 Goto and Kakizaki (GK) ラットと同様に汎用されている⁽¹⁴⁻¹⁷⁾。STZ 誘発糖尿病態マウスは漢方薬の糖尿病研究においてよく用いられている^(18, 19)。

近年、肥満型Ⅱ型糖尿病の患者数は爆発的に増加しているが、生活習慣の欧米化による過食、脂肪摂取量の増加と活動量の低下、肥満などが大きく関与していることが指摘されている。そこで、高脂肪食と STZ 単回投与することにより作製された糖尿病態マウスは、ヒト肥満型Ⅱ型糖尿病に類似した特徴を有し、実験的糖尿病態マウスとして頻用されている。高脂肪食摂取は実験動物に肥満やインスリン抵抗性などを引き起こし、STZ の静脈内投与はインスリンの分泌を障害して高血糖値を誘発する。このモデルは肥満、高血糖値、高血清レプチン値、インスリン分泌障害、脂質代謝異常、耐糖能異常とインスリン抵抗性などの表現型を表わす⁽²⁾。

糖尿病発症機序

I型糖尿病の多くは、自己免疫機序によって、インスリン合成・分泌細胞である膵臓β細胞の大半が破壊されることにより、インスリンの絶対的欠乏が生じて発症する。遺伝的因子として、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) 遺伝子の関与が最も重要である。ある HLA タイプをもつヒトには膵臓β細胞に対する自己免疫が起こりやすく、I型糖尿病を発症しやすいといわれる。また、I型糖尿病では、膵臓β細胞を構成する分子を標的とする細胞傷害性 T リンパ球が活性され、膵臓β細胞を攻撃・破壊すると考えられている。I型糖尿病患者の血中には、膵臓構成成分に対する抗体が陽性に検出され、その代表が抗 GAD (グルタミン酸脱炭素酵素, glutamic acid decarboxylase: GAD) 抗体である。これはI型糖尿病のマーカーと考えられる。一方、膵臓構成成分に対する抗体が検出されないI型糖尿病も存在し、このような例の原因は今のところ不明である。以上のように、I型糖尿病は、自己免疫が原因と考えられる「(自己)免疫性」と、原因不明の「特発性=非(自己)免疫性」の2つに分類されている⁽²⁰⁾。

糖尿病の大多数を占めるⅡ型糖尿病は、遺伝的因子と環境因子を基盤として、インスリン標的細胞でのインスリン抵抗性と膵臓β細胞からのインスリン分泌不全の病態が種々の程度で関与して発症する。Ⅱ型糖尿病は、家族内発症がきわめて多い疾患であると以前から知られている。しかし、その原因遺伝子はまだ解明されていない。Ⅱ型糖尿病は特定の遺伝子異常が証明されておらず、多因子遺伝に基づく疾患群と考えられる。近年、全ゲノム解析によって、これまで、

NIDDM1 (Calpain 10, カルパイン 10) 遺伝子、NIDDM2 遺伝子、 β_3 アドレナリン受容体遺伝子、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ 遺伝子、アディポネクチン遺伝子、transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) 遺伝子、potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (KCNQ1) 遺伝子などが II 型糖尿病の強い疾患感受性遺伝子であることが明らかとなった^(21,22)。II 型糖尿病発症に関与する重要な環境因子は、食事エネルギー過剰摂取 (特に脂肪過剰摂取) や運動不足、ストレス、肥満などである。このような環境因子は、おもにインスリン抵抗性の増大をもたらし、II 型糖尿病の発症を促進する。

インスリン分泌不足とインスリン抵抗性

インスリンは、膵臓 β 細胞から分泌され、体内で唯一、血糖値を下げるホルモンであり、糖代謝の恒常性維持にきわめて重要な役割を果たしている。インスリンにより、骨格筋、脂肪細胞などの末梢組織では糖の取り込みが促進される。一方、肝臓ではグリコーゲン合成の促進と糖新生が抑制される⁽²³⁾。インスリン分泌不全とインスリン作用不全 (インスリン抵抗性) は糖尿病の病態の中心を占めている。

膵臓 β 細胞にはグルコースセンサー機能があり、血糖値に応じてインスリン分泌が精密に調節されている。インスリン分泌不全はグルコース刺激後に対するインスリンの分泌が低下し、十分に血糖を下げられない状態である。インスリン分泌は、様々な因子によって制御されている。例えば、グルコキナーゼ、nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)H シヤトル、膵ミトコンドリア、 K_{ATP} チャネル、カルシウムシグナリング、遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA)、小胞体ストレス、インクレチンなどがインスリンの分泌に影響している⁽²⁴⁾。糖尿病発症後の高血糖自体が、Pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX-1) などの転写因子を介してインスリン遺伝子発現の障害をきたす。また、この高血糖は膵臓 β 細胞のアポトーシスや繊維化を促進することにより、存在するインスリン分泌不全を更に悪化させる。これは糖毒性と言われる現象である⁽²⁵⁾。

糖尿病には、グルコース刺激後のインスリン分泌不全を認めるが、インスリン抵抗性も存在している。インスリン抵抗性とは、インスリンの作用が標的細胞で発揮できなくなり、血糖を低下させるのに必要なインスリン量が増大した

病態である。インスリンが標的細胞の細胞膜上に存在する「インスリン受容体」と結合することにより受容体チロシンキナーゼを活性化し、以後、細胞内に貯蔵されている糖輸送担体 glucose transporter (GLUT) が細胞膜上に移行し、血中のブドウ糖を細胞内へ取り込む⁽²⁶⁾。このシグナルのいずれかが障害されるとインスリン抵抗性をきたす。Insulin receptor substrate (IRS) や phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)、セリンスレオニンキナーゼである Akt、PPAR- γ などはインスリン抵抗性の発症に関与する。環境因子、特に内臓脂肪型肥満はインスリン抵抗性発症に大きく関与する。肥大化した脂肪細胞では、インスリン抵抗性を惹起するアディポカインである TNF- α や遊離脂肪酸などの産生が増加する一方、インスリン感受性改善作用を有するアディポネクチンの分泌が減少し、標的臓器のインスリン抵抗性をもたらす⁽²⁷⁻²⁹⁾。糖尿病成立後には、糖毒性はインスリン抵抗性にも深く関連する。このメカニズムは糖毒性により、酸化ストレスを引き起こし、さらに c-jun N-terminal kinase (JNK) 経路の活性化や TNF- α 、遊離脂肪酸などの産生が増加し、インスリン抵抗性による高血糖の重篤化を招く⁽²⁵⁾。

インスリン抵抗性の明確な診断基準は存在せず、これを臨床的に正確に診断するのは容易ではない。これはインスリン抵抗性を反映すると考えられるパラメーターが、インスリン分泌能や血糖コントロールの状態などの因子により変動するためである。インスリン抵抗性の指標としては、臨床の場では HOMA-IR 値などの簡易指標を用いることが多い⁽³⁰⁾。

防風通聖散

18種類の生薬が組み合わせられた防風通聖散は、伝統的薬能に従って以下のように6つのグループに分類される。1. 發表剤 (麻黄、防風、生姜、荊芥)、2. 瀉下剤 (大黄、芒硝、甘草)、3. 解毒剤 (連翹、荊芥、防風、桔梗、川芎)、4. 解熱剤 (黄芩、山梔子、石膏、滑石)、5. 中和剤 (当帰、芍薬、川芎、蒼朮、薄荷)、6. 利尿剤 (蒼朮、滑石、桔梗)。これらの複雑な配合によって、病毒を發表し、攻め下し、解毒、解熱し、中和、利尿に導こうとするものである⁽³¹⁾。發表剤は疏風、透表、解肌、発汗、瀉下剤は通便降火、解毒剤と解熱剤は清熱解毒、涼血、中和剤は和中和気血として作用し、肝臓を守る。防風通聖散は水分循環を改善し、便通をつける作用もある。体力のある太鼓腹の肥満タイプに向く処

方で、具体的には、肥満症、便秘、尿量減少、むくみ、のぼせ、肩こりなどに用いられる⁽²⁸⁾。近年、防風通聖散は、肥満に関してヒトとモデル動物の両方とも有効であるとの臨床報告がある^(32,33)。防風通聖散を摂取した食餌性肥満マウスの体重、皮下脂肪量と腹腔内脂肪量が有意に減少し、肥満による血清トリグリセリドとレプチン濃度の上昇も有意に低下した⁽³³⁾。また、防風通聖散は、8週間の投与により、肥満状態の糖尿病態マウスに対する内臓脂肪重量の減少、神経障害と血中 TNF- α の降下作用を示した⁽³⁴⁾。

構成する 18 種類の生薬の薬理作用を Table 1 にまとめた。

Table 1. Pharmacological actions of crude drugs composed in Bofutsushosan

1	麻黄	中枢興奮 発熱 鎮咳 抗炎症・抗アレルギー 血糖降下 腎機能改善
2	防風	抗炎症 血圧降下 中枢抑制 抗潰瘍 免疫賦活
3	生姜	発汗解表 中枢抑制 健胃 鎮吐 鎮咳 血圧降下 唾液分泌亢進
4	荊芥	発汗 発散 鎮痛 抗酸化
5	大黄	瀉下 利胆 消炎 健胃 腎機能改善 肝障害改善 脂質代謝改善
6	芒硝	瀉熱通便 血液凝固抑制
7	甘草	緩和止渴 利胆 鎮咳
8	連翹	清熱解毒 消炎 血圧降下 脂質代謝 鎮吐 利胆
9	桔梗	鎮痛・鎮静 解熱 血管拡張 鎮咳・去痰 利尿
10	川芎	活血 鎮痛鎮痙 抗血栓 腸血流量増加 免疫賦活
11	黄芩	解熱消炎 脂質代謝 血圧降下 肝障害予防
12	山梔子	鎮痛 瀉下 胃障害抑制 利胆 肝障害予防 血圧降下 脂質代謝改善
13	石膏	解熱 止瀉 利尿
14	滑石	利尿 消炎 清熱 抗腫瘍
15	当帰	鎮痛・解熱 免疫賦活 中枢抑制 (鎮静・血圧降下など)

		末梢血管拡張
16	芍薬	鎮痛鎮痙 末梢血管拡張 抗炎症・抗アレルギー 免疫賦活
17	蒼朮	発散 健胃 利尿 肝障害抑制
18	薄荷	発汗清熱 駆風 鎮痛 抗アレルギー

山梔子

防風通聖散の一つ構成生薬である山梔子は「神農本草経」の中品に「梔子」の名で収載されている。古代から黄色染料として頻用される。クチナシ *Gardenia jasminoides* Ellis (*Rubiaceae*) の果実を乾燥したものである。イリドイド配糖体の geniposide (主成分)、gentiobioside、gardenoside、shanzhiside などと、黄色色素の crocin (crocetin digentiobiose ester) を含有するほか、脂肪油 (種子に 14~18%)、フラボノイドの gardenin、 β -sitosterol、mannitol、nonacosane、tannin、pectin などを含む。山梔子の水またはエタノールエキスは、総胆管結紮のウサギまたはラットの経口または静脈内投与で、血中および末梢リンパ液中の bilirubin 量の上昇を抑制する。また、メタノールエキスはラットに十二指腸内投与で胆汁酸依存性胆汁分泌を促進する^(35,36)。さらに、熱水エキスはラットに経口投与することにより、エタノールによって誘発される胃障害発生を抑制する⁽³⁴⁾。熱水エキスは食餌性高脂血症ラットの血清総コレステロール量上昇を抑制し⁽³⁸⁾、水製エキスは血清トリグリセリドも有意に低下させ⁽³⁹⁾、煎剤およびメタノールエキスはマウスで緩和な瀉下作用を示す^(39,40)。

最近、山梔子の主成分 geniposide とそのアグリコンである genipin に関する研究が注目されている。Geniposide はラットの膵臓 β 細胞株 INS-1 における glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor の感受性を向上させて、グルコース刺激によりインスリンの分泌を促進する⁽⁴¹⁾。Geniposide は肝臓細胞 HepG2 における PPAR- α 活性を高めて細胞内の脂質蓄積を抑制する。Geniposide は、経口投与 8 週間後に肥満型 II 型糖尿病態マウスの血清や肝臓コレステロール値を有意に減少することが報告された⁽⁴²⁾。Geniposide は、ヒト臍帯部血管内皮細胞における reactive oxygen species (ROS) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B) を抑制して、糖尿病態血管性損傷を抑制した⁽⁴³⁾。また、genipin は筋管細胞 C₂C₁₂ における IRS と

PI3-K を活性化して、GLUT4 を増加させ、糖の取り込みを増加させた⁽⁴⁴⁾。また、genipin は、糖尿病態モデルから単離された膵臓細胞のミトコンドリアの uncoupling protein (UCP) 2 を抑制し、インスリンの分泌を促進すると報告されている⁽⁴⁵⁾。

第3章 実験方法

3.1 使用薬物

本実験では、防風通聖散エキスと構成生薬である麻黄 (Ephedrae Herba)、防風 (Saposhnikoviae Radix)、生姜 (Zingiberis Rhizoma)、荊芥 (Schizonepetae Spica)、大黄 (Rhei Rhizoma)、芒硝 (Natrium Sulfricum)、甘草 (Glycyrrhizae Radix)、連翹 (Forsythiae Fructus)、桔梗 (Platycodi Radix)、川芎 (Cnidii Rhizoma)、黄芩 (Scutellariae Radix)、山梔子 (Gardeniae Fructus)、石膏 (Gypsum Fibrosum)、滑石 (Kaolinum)、当帰 (Angelicae Radix)、芍薬 (Paeonia Radix)、蒼朮 (Atractylodis Lanceae Rhizoma)、薄荷 (Menthae Folium) はツムラ (Tokyo, Japan) から購入した。防風通聖散 26.3 g と構成生薬である麻黄 50 g、防風 50 g、生姜 20 g、荊芥 50 g、大黄 50 g、芒硝 20 g、甘草 50 g、連翹 50 g、桔梗 50 g、川芎 50 g、黄芩 50 g、山梔子 20 g、石膏 50 g、滑石 50 g、当帰 50 g、芍薬 50 g、蒼朮 50 g、薄荷 20 g は「文火」自動煎じ機 (Tochimoto, Osaka) を用いて 10 倍量の蒸留水で 1 時間熱水抽出した。抽出液をメッシュ (No.42, Sanpo, Tokyo) にろ過後、ろ液を凍結乾燥(DF-03G, ULVAC, Tokyo)してエキス末として使用した。それぞれの収率 (w/w %) を Table 2 にまとめた。

Table 2. Dosages of Drugs Composed in Bofutsushosan

		Recovery rate of extracted crude drugs (w/w %)	Dry weight of crude drugs in BOF (g)	Amount of extracted drugs in prescription (g)	Dosage of extracted crude drugs (mg/kg)
1	防風通聖散	27.5	26.3	7.22	300
2	麻黄	9.7	1.2	0.12	10
3	防風	9.0	1.2	0.11	10
4	生姜	8.5	0.3	0.03	3
5	荊芥	7.0	1.2	0.08	10
6	大黄	6.9	1.5	0.10	10
7	芒硝	96.7	0.7	0.68	100
8	甘草	14.3	2.0	0.29	30
9	連翹	31.8	1.2	0.38	30
10	桔梗	53.0	2.0	1.06	100
11	川芎	26.9	1.2	0.32	30
12	黄芩	42.3	2.0	0.85	100

13	山梔子	67.7	1.2	0.81	100
14	石膏	2.1	2.0	0.04	3
15	滑石	1.7	3.0	0.05	3
16	当帰	32.6	1.2	0.39	30
17	芍薬	30.6	1.2	0.37	30
18	蒼朮	28.4	2.0	0.57	100
19	薄荷	19.4	1.2	0.23	30

These extracts were prepared by being heated at 96-98°C in 10 volumes of distilled water for 60 min, and then filtered through a mesh and lyophilized with a freeze-drier.

各構成生薬の投与用量はエキスの回収率と方剤の配合比率から概算した。各構成生薬エキスのマウスへの投与用量は、防風通聖散エキス中に含まれると想定される各生薬エキス含量より約3倍多い用量を選定した。Glibenclamide と geniposide は和光純薬 (Osaka, Japan) から購入した。

3.2 糖尿病態マウスの作製と薬物投与方法

STZ-糖尿病態マウスは、ddY 系雄性マウス (4 週齢, Sankyo Labo Service, Tokyo) の尾静脈内に 150 mg/kg STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA) を単回投与して作製した。STZ 投与3週間後に高血糖 (648-987 mg/dl) になっているマウスを糖尿病態マウスとし、それに週齢を合わせた ddY 系雄性マウスをコントロール実験に用いた。マウスの飼育環境は室温 25~26 °C、湿度 55 %で、照明時間 7-19 時で飼育し、CRF-1 食餌 (Oriental Yeast Co., Tokyo) と水は自由摂取とした。3時間絶食した STZ-糖尿病態マウスの血糖値を測定した後、防風通聖散エキス (30-300 mg/kg) 又は Glibenclamide (0.3, 1 mg/kg)、防風通聖散構成生薬エキス、山梔子主要成分 geniposide (10-100 mg/kg) を絶食状態で腹腔内に単回投与し、6時間後に頸静脈から採血した。血清を単離し、血清中の各種糖尿病パラメーター量を測定した。

高脂肪食摂取と STZ 単回投与による誘発した HFD+STZ-糖尿病態マウスは、高脂肪餌 Diet D12492 (5.2 kcal/g, 60 % of the calories from fat, 20 % from protein and 20 % from carbohydrate. Research Diets, New Brunswick, USA) を給餌し、5 週齢マウスの尾静脈内に 150 mg/kg STZ を静脈内投与して作製した。STZ 投与3週間後

に高血糖 (465-654 mg/dl) であるマウスを HFD+STZ-糖尿病態マウスとして用い、週齢を合わせた CRF-1 食餌摂取 ddY 系雄性マウスをコントロールとして実験に用いた。マウスの飼育環境は室温 25~26 °C、湿度 55 %で、照明時間 7~19 時で飼育し、食餌と水は自由摂取とした。山梔子エキス (300、500、1000 mg/kg) を 3 週間連日経口投与し、山梔子エキス投与 1、2、3 週間後に HFD+STZ-糖尿病態マウスの体重および給餌量、飲水量を測定後、頸静脈から採血した。血清や肝臓、皮下脂肪、内臓脂肪を単離し、これらに含まれる各種糖尿病パラメーター量を測定した。

3.3 パラメーター測定方法

血液を 25°C、5,500×g (TOMY MX 150, TOMY SEIKO, Tokyo) で 5 分間遠心後、上清を得た。血糖値はメディセーフミニ (TERUMO Co., Tokyo) を用いて測定した。血糖降下率は下記の式により算出した。糖尿病態マウスの血糖値と 85 mg/dl (正常マウス 14 時間絶食時の平均血糖値) の差から、血糖増加分を算出し、薬物投与前と投与後の血糖値の差を血糖増加分の値で除し百分率で表した⁽⁴⁶⁾。

$$\text{血糖降下率 (\%)} = (b-a) / (b-85) \times 100$$

b : 薬物投与前の血糖値

a : 薬物投与後の血糖値

85 : 正常マウスの 14 時間絶食時の平均血糖値

血清インスリン値はインスリン測定キット (MORINAGA Co., Yokohama, Japan) を用いて測定した。血清や肝臓トリグリセリド値とコレステロール値はそれぞれの E-テストワコーキット (Wako, Osaka) を用いて測定した。TNF- α 値はマウス TNF- α キット (R&D Systems, Tokyo) で測定した。レプチン値はマウスレプチンキット (R&D Systems, Tokyo) を用いて測定した。遊離脂肪酸値は NEFA C-TEST キット (Wako, Osaka) を用いて測定した。

3.4 肝臓脂質抽出方法

Folch 方法を使って⁽⁴⁷⁾、肝臓中の脂質を抽出した。40~60 mg の肝臓を取って、

500 μ l の methanol を加え、適度に肝臓を切ってから手動ホモジナイザー (VP-5S, TAITEC, Saitama) で粉砕した。抽出液を共栓ガラス試験管に入れ替え、元のマイクロチューブを 1 ml の methanol で洗い、更に 1 ml の chloroform で洗い、共栓ガラス試験管に入れ栓をした。そして温浴で 40°C、30 分間加温抽出した。室温に戻してから、methanol/chloroform (2:1, v/v) 溶液を 5 ml まで加え、670 \times g (TOMY LC 06, TOMY SEIKO Co., Tokyo) で 5 分間遠心した。上清に 1 ml 蒸留水を加え、転倒混和して、5°C で一晩放置する。下層を移して、ロータリーエバポレーター (TOMY CC-105, TOMY SEIKO Co.) で 30 分間減圧濃縮した。濃縮液に 100 μ l の isopropyl alcohol/Triton X-100 (9:1, v/v) を加え混和し、肝臓トリグリセリドとコレステロール値を測定した。

3.5 糖負荷、インスリン負荷方法と HOMA-IR 値計算方法

各生薬エキスを投与した糖尿病態モデルマウスを 12 時間絶食した後に、グルコース (1.5 g/kg) または種々濃度のインスリンを腹腔内投与し、投与後 0 および 30、60、90、120 分間と経時的に血清中の血糖値とインスリン値を測定した。

12 時間絶食後の血清中の血糖値とインスリン値を用いて、以下のような計算式によって HOMA-IR 値を計算した。HOMA-IR = 絶食血糖値 (mg/dl) \times 絶食インスリン値 (μ U/ml) / 405⁽⁴⁸⁾。

3.6 骨格筋におけるグルコース取り込み測定法

水あるいは山梔子エキス (300 mg/kg) 投与 6 時間後に STZ-糖尿病態マウスのヒラメ筋を摘出した後、35 °C の 2 ml インスリン (10 nmol/ml) 存在または不在下の Krebs-Henseleit buffer (KHB, 0.1 % bovine serum albumin (BSA), 32 mM mannitol, and 8 mM glucose) 中で、95 % O₂ / 5 % CO₂ 条件で 30 分間インキュベートした。次に、ヒラメ筋を 2 ml インスリン (10 nmol/ml) 存在または不在下の KHB (0.1% BSA and 40 mM mannitol) 中で、29 °C、95 % O₂ / 5 % CO₂ 条件で 10 分間インキュベートした。さらに、ヒラメ筋を 2 ml インスリン (10 nmol/ml) 存在または不在下の KHB (0.1 % BSA, 1 mM 2-[³H]-deoxy-D-glucose (2-DG) (2.25 μ Ci/mmol), 39 mM [¹⁴C] mannitol (8.5 μ Ci/mmol)) 中で、29 °C、95 % O₂ / 5 % CO₂ 条件で 10 分間インキュベートした。ヒラメ筋を 0.5 N NaOH 溶液にいれ、60 °C、

1 時間振盪インキュベートして、溶解した。100 μ l 溶解液を 4 ml シンチレーション液体 (Triton X-100: methylbenzene, 1:2) の中に入れて、ヒラメ筋に取り込まれた糖の放射活性を測定した。計測された ^{14}C はバックグラウンド補正值として、差引き法で計算した⁽⁴⁹⁾。

3.7 タンパク質の検出方法

Sample 調製

糖尿病態マウスの大腿骨格筋 100 mg を、氷の上に置いた 0.5 ml の 0.1% (v/v) Nonidet P-40 を含む Buffer A [10 mM Tris at pH 7.8, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 5 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin] 中に入れて、超音波 (VP-5S, TAITEC, Saitama) で粉砕し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,000 \times g (TOMY MX 150, TOMY SEIKO, Tokyo) で 10 分間遠心した。ペレットを Buffer A で再懸濁してから、もう一度 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1,000 \times g で 10 分間遠心した。ペレットを 0.1% (v/v) Nonidet P-40 を含む Buffer A で再懸濁して、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10,000 \times g で 20 分間遠心した。ペレットを細胞膜の sample とした。

得られた上清を新しいプラスチックチューブに移して、4 $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 \times g で 30 分間遠心して、得られた沈殿は 0.5 ml Buffer B [10 mM Tris at pH 8, 150 mM NaCl, 1.0% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 mM DTT, 1mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin and 10 μ g/ml leupeptin] で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間、再懸濁した。懸濁液は 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16,000 \times g で 20 分間遠心して、得られた上清を細胞質画分の sample とした⁽⁵⁰⁾。

Western blotting

調製したサンプルを 10% または 8% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。バッファータンク転写装置 (Mini Trans-Blot Cell, BIO RAD Laboratoris, CA, USA) により電氣的にタンパク質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (BIO RAD Laboratoris) に転写した。PVDF 膜を Blocking buffer [5% non-fat milk, 0.1% Tween 20 を含む Tris-buffered saline (TBS, 3 g/l Tris, 8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, pH 7.6)] で 1 時間ブロッキングした。その後 Wash buffer [0.1% Tween 20 を含む TBS] で 3 回洗浄し、GLUT4 抗体 (G4048, Sigma)、セリン

スレオニンキナーゼ Akt 抗体 (9272, Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo) および Aktリン酸化 (Ser 473) 抗体 (9271, Cell Signaling Technology Japan) により 4 °Cで一晩反応させた。Wash buffer で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体により室温で1時間反応させた。Wash buffer で3回洗浄し、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare; Buckinghamshire, UK) を用い、バリアブルイメージアナライザー (Typhoon 9410, GE Healthcare) にて検出した。検出したタンパク質は Image QuantTL (GE Healthcare) により解析した。

3.8 脂肪組織から遊離された TNF- α 値, レプチン値と遊離脂肪酸値の測定方法

水あるいは山梔子エキス (1000 mg/kg) 投与 1、2、3 週間後の HFD+STZ 糖尿病態マウスの皮下脂肪組織と内臓 (精巣周り) 脂肪組織を摘出し、重量を測定した。その後、無菌の Krebs-Ringer phosphate buffer (KRPB, pH 7.4) を 1.0 ml media/100 mg 組織となるように加え、無菌条件下でハサミを用いて脂肪組織を 25-50 mg に小さく切った。下層の液層を捨てて、温めた BSA (4 g/100 ml) と glucose (1 mg/ml) を含む KRPB を 1.0 ml media/100 mg 組織となるように入れて、37 °C、2 時間振盪インキュベートした。その後、液層を回収して、遊離された TNF- α 濃度, レプチン濃度と遊離脂肪酸濃度を測定した⁽⁵¹⁾。

3.9 脂肪細胞数面積の計算方法

0.4~0.6 g の脂肪組織採取し、Phosphate buffered saline (PBS) で洗ってから、HEPES buffer (0.1M HEPES, 0.12 M NaCl, 0.05 M KCl, 0.005 M glucose, 1.5 % W/V BSA, 1 mM CaCl₂, pH 7.4, 1ml media / 100 mg tissue) に入れて、ハサミで小さく切る。得られた懸濁液を 500×g で 5 分間遠心した。下層の液層を捨てて、上層の細胞層に 1 mg/ml コラゲナーゼ (Type II, C-6885, Sigma)を含んだ HEPES buffer に入れて、37 °C、振盪インキュベーションし、室温で 5 分間、300×g で遠心した。下層の液層を捨てて、上層に HEPES buffer を入れて、室温で 360×g、10 分間遠心した⁽⁵¹⁾。上層の浮遊した細胞 (脂肪細胞) 懸濁液 10 μ l を取って、顕微鏡 (OLYMPUS IX71, Tokyo) で観察してから、カメラ (OLYMPUS DP70, Tokyo) で 200 倍拡大した細胞写真を撮った。撮った写真を Image J で解析して、細胞面積を測定した。

3.10 データの解析方法

実験データは平均値 \pm 標準誤差で表した。サンプルサイズが異なる二群間は、unpaired t-test を用いて検定した。 $P = 0.05$ を有意差の基準とした。

第4章 結果

4.1. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散の改善効果

4.1.1. STZ-糖尿病態マウスと正常マウスの比較

3時間絶食したSTZ-糖尿病態マウスと同じ週齢の正常マウスの体重および血糖値および血清インスリン値、トリグリセリド値、コレステロール値をTable 3に示した。

Table 3. The different characteristics between normal mice and STZ-diabetic mice

	Normal mice	STZ-diabetic mice
Body weight (g)	36.3 ±0.2	34.9 ±0.4**
Serum Glucose (mg/dl)	129.8 ±2.9	915.4 ±54.9**
Serum Insulin (pg/ml)	1020.8 ±68.6	299.0 ±31.6**
Serum Triglyceride (mg/dl)	100.2 ±5.2	150.4 ±13.3**
Serum Cholesterol (mg/dl)	135.4 ±3.7	168.4 ±4.4**
HOMA-IR	3.5 ±0.5	21.6 ±2.4**

Table 3 showed body weight, serum glucose, serum insulin, serum triglyceride and serum cholesterol levels in 3 hour-fasted STZ-diabetic and age-matched normal mice. Values represent means ±S.E.M. of 4 data (normal mice) and 31 data (STZ-diabetic mice). ** $P < 0.01$: Significantly different from normal mice.

STZ-糖尿病態マウスの体重は、正常マウスに比べ有意に低下し、血糖値(915.4 mg/dl) は正常マウス (129.8 mg/dl) の約7倍高かった。STZ-糖尿病態マウスの血清インスリン値 (299.0 pg/ml) は、正常マウスの (1024.2 pg/ml) より有意に低下しており、血清トリグリセリド値と血清コレステロール値は、正常マウスと比べてそれぞれ有意に上昇していた。また、12時間絶食したSTZ-糖尿病態マウスの血糖値と血清インスリン値を利用して、インスリン抵抗性を示すHOMA-IR値を計算した。STZ-糖尿病態マウスのHOMA-IR値は正常マウスの値より約6倍上がったことから、STZ-糖尿病態マウスはインスリン抵抗性が存在していると示唆された。STZ-糖尿病態マウスは高血糖値および高血清トリグリセリド値と高血清コレステロール値、低血清インスリン値、インスリン抵抗性を示した。

4.1.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血糖値に対する影響

3 時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに防風通聖散エキス (30-300 mg/kg) および経口糖尿病治療薬である Glibenclamide (0.3, 1 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態で投与 6 時間後の血糖降下率の変化を調べ、**Figure 1** に示した。

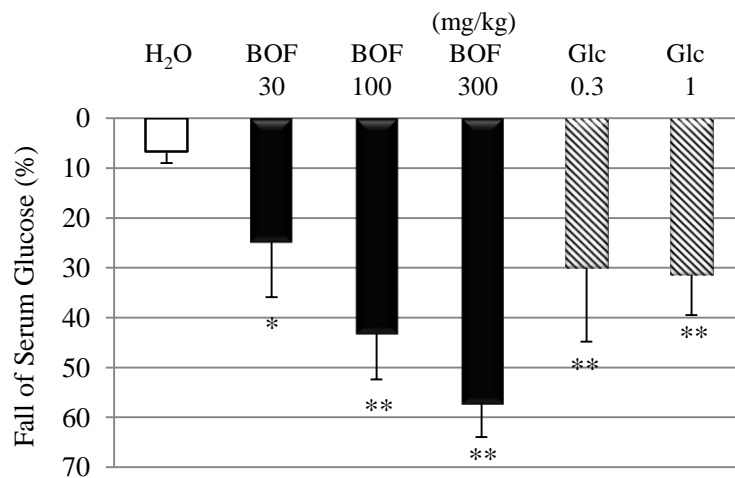


Figure 1. Effects of Bofutsushosan (BOF, 防風通聖散) and Glibenclamide (Glc) on the blood glucose levels in the STZ-diabetic mice. Serum glucose levels were measured before and 6 hours after *i.p.* administration of BOF and Glc into 3 hour-fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 4-10 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

防風通聖散エキスは、30 mg/kg の投与量では約 25 %、100 mg/kg では約 43 %、300 mg/kg では約 57 %、STZ-糖尿病態マウスの血糖値を降下させ、用量依存的に有意な血糖降下作用を示した。Glibenclamide は 0.3 mg/kg の投与量では約 29.9 %、1 mg/kg では約 31.4 % 血糖値を降下させ、有意な血糖降下作用を示した。経口糖尿病治療薬 Glibenclamide は防風通聖散エキスと同様に腹腔内投与により血糖降下作用を示した。

4.1.3. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血清インスリン値に対する影響

3 時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに防風通聖散 (30-300 mg/kg) および Glibenclamide (0.3, 1 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態で投与 6 時間後の血清インスリン値を測定し、**Figure 2** に示した。

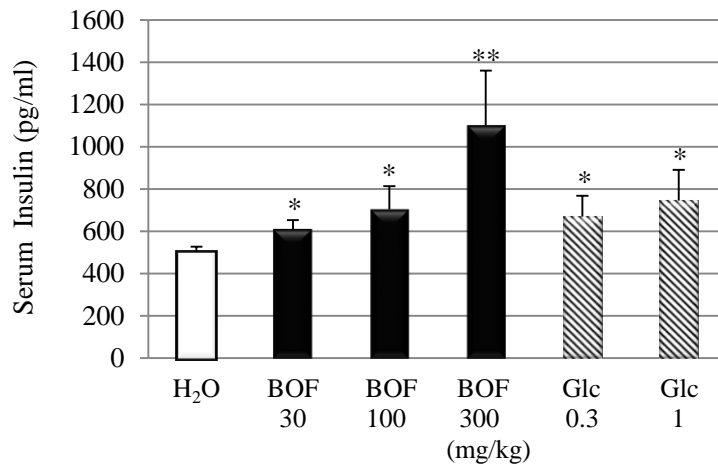


Figure 2. Effects of BOF and Glc on the serum insulin levels in the STZ-diabetic mice. Serum insulin levels were measured before and 6 hours after *i.p.* administration of BOF and Glc into 3 hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 4-10 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

水対照群と比べて、防風通聖散エキス (30-300 mg/kg) は用量依存的に STZ-糖尿病態マウスの血清インスリン値を有意に上昇させた。防風通聖散エキスの 30 mg/kg の投与量から有意な血清インスリン値の上昇作用が認められ、300 mg/kg の投与量では投与前の約 2 倍増加させた。Glibenclamide (0.3, 1 mg/kg) 投与 6 時間後には水対照群と比べて有意に STZ-糖尿病態マウスのインスリン上昇作用を示した。防風通聖散エキスは Glibenclamide と同様に、インスリン上昇作用と血糖降下作用を示した。

4.1.4. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の血清トリグリセリドと血清コレステロールに対する影響

3 時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに防風通聖散エキス (30-300 mg/kg) および Glibenclamide (0.3, 1 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態下で投与 6 時間後の血清トリグリセリド値と血清コレステロール値を測定し、**Figure 3** と **Figure 4** に示した。

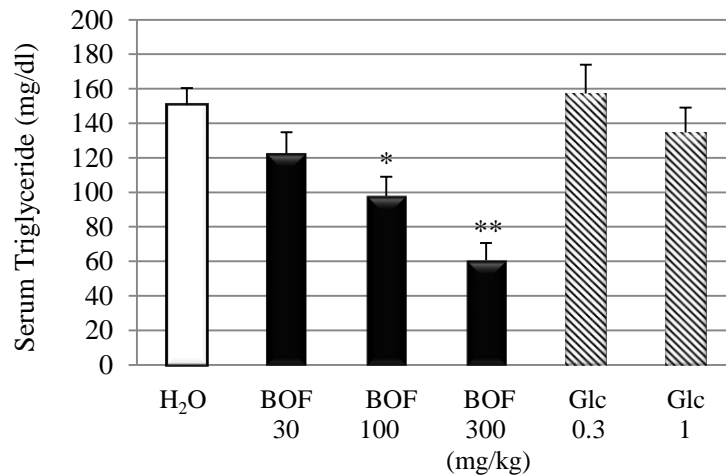


Figure 3. Effects of BOF and Glc on the serum triglyceride levels in STZ-diabetic mice. Serum triglyceride levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration with BOF and Glc into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-10 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

STZ-糖尿病態マウスにおいて、水対照群と比べて防風通聖散エキス (30-300 mg/kg) は用量依存的に有意な血清トリグリセリド値降下作用を示した。30 mg/kg の投与量では約 18.6 %、100 mg/kg では約 28.7 %、300 mg/kg では約 60 %、STZ-糖尿病態マウスの高血清トリグリセリドを降下させた。これらの作用は、100 mg/kg の投与量から有意な減少作用が認められた。Glibenclamide は、STZ-糖尿病態マウスの血清トリグリセリド値に有意な影響を及ぼさなかった。

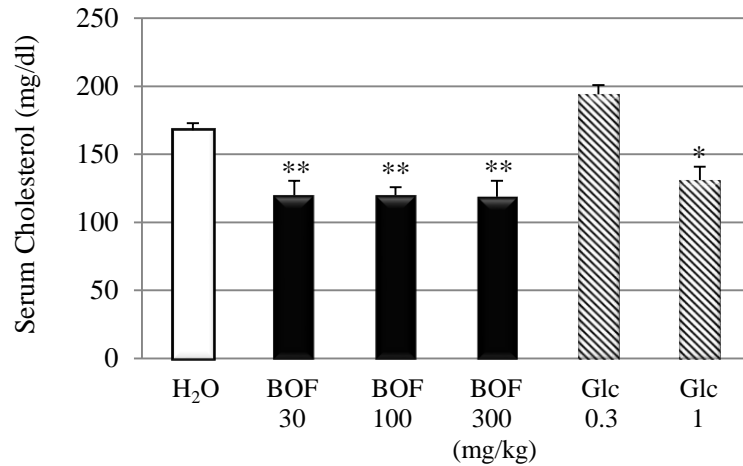


Figure 4. Effects of BOF and Glc on the blood cholesterol levels in STZ-diabetic mice. Serum cholesterol levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration with BOF and Glc into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-10 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

STZ-糖尿病態マウスにおいて、防風通聖散エキスは血清コレステロール減少作用を示した。30 mg/kg の投与量では約 28.4 %、100 mg/kg では約 28.6 %、300 mg/kg では約 29 %、血清コレステロール値を低下させた。水対照群と比べて、30 mg/kg 投与量から有意な減少作用が認められた。一方、Glibenclamide は STZ-糖尿病態マウスの血清コレステロール値に対しても 1mg/kg の投与量のみ有意な降下作用を示した。

4.1.5. 考察

結果から、防風通聖散エキスは腹腔内単回投与によっても STZ-糖尿病態マウスの高血糖値や低インスリン値、高トリグリセリド値、高コレステロール値を改善した。経口糖尿病治療薬 Glibenclamide も腹腔内単回投与により高血糖値や低インスリン値、高コレステロール値を改善したことから、腹腔内投与の有効性が裏付けられた。また本実験で用いられた STZ-糖尿病態マウスは、インスリン分泌能力を持っている II 型糖尿病モデルの特徴も併せ持っていることも証明できた⁽⁵³⁾。

STZ は膵臓 β 細胞の一部を破壊し、インスリンの分泌能を低下させるので、末梢組織の糖の利用率の低下や肝臓糖新生の亢進を誘発して、慢性的な高血糖状態を呈する。また、インスリン作用の欠乏によりホルモン感受性リパーゼ (hormone sensitive lipase : HSL) の阻害ができず、脂肪滴内のトリグリセリド分解が亢進し、遊離脂肪酸が大量に肝臓に流入する。一方、血中で利用されない糖も、トリグリセリドとコレステロールの原料として肝臓に流入し、肝臓の脂肪合成が亢進する。さらに、インスリン作用不足が VLDL (very low density lipoprotein, 超低比重リポ蛋白) 合成を促進するので、トリグリセリド含量が多い VLDL が大量に分泌される。血中に分泌される VLDL はリポ蛋白リパーゼ (lipoprotein lipase: LPL) で分解され、コレステロール主体の LDL (low density lipoprotein, 低比重リポ蛋白) に変化する。LDL は肝細胞や末梢細胞の表面に存在する LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれる。肝細胞に取り込まれる余分なコレステロールは、胆汁酸に変換され、小腸へ排泄される。糖尿病では LPL 活性が低下するため、VLDL の半減期が延長され、血中高トリグリセリド状態になる。そのほか、糖尿病では LDL 受容体も減少して、血中コレステロール含有量も高くなる⁽⁵⁴⁾。すなわち、STZ-糖尿病態マウスは高血糖値、低インスリン値、高血清トリグリセリド値と高血清コレステロール値の特徴を示すことになると考えられた。

本研究ではまず、防風通聖散エキスが STZ-糖尿病態マウスの血糖降下作用を示すことが認められた。防風通聖散エキスの血糖降下作用は Glibenclamide と同様に血中インスリン量を上昇させたことから、防風通聖散エキスの血糖降下作用機序にはインスリン分泌促進作用が関与すると考えられた。次に、STZ-糖尿

病態マウスの高トリグリセリド値と高コレステロール値に対して、防風通聖散エキスおよび Glibenclamide の作用を比較した。その結果、防風通聖散エキス 100 mg/kg から 300 mg/kg までの投与量で有意な血清トリグリセリド降下作用が認められた。また血清コレステロールに対しても、防風通聖散エキス 30 mg/kg から 300 mg/kg の投与量では水投与群と比較して有意な降下作用を示した。防風通聖散は、血清トリグリセリド値の降下作用より、血清コレステロール値の降下作用が強いと考えられた。Glibenclamide は血清コレステロール値に対して改善効果が見られたが、血清トリグリセリド値に対して効果を示さず、いずれも血糖値に対する効果より弱いものであった。防風通聖散エキスの STZ-糖尿病態マウスへの腹腔内単回投与によって、高血糖値や低インスリン値、高血清トリグリセリド値、高血清コレステロール値の改善作用が確認できた。また、防風通聖散の高血清トリグリセリド値に対する改善効果は、血糖値あるいは血清コレステロール値に対する効果と異なる機序によって生じる可能性が考えられた。

4.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬（發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤）の改善効果

4.2.1. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬（發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤）の血糖値に対する影響

防風通聖散は構成生薬の特徴から以下の6つのグループに分類されている。

1. 發表剤（麻黄、防風、生姜、荊芥）、2. 瀉下剤（大黄、芒硝、甘草）、3. 解毒剤（連翹、荊芥、防風、桔梗、川芎）、4. 解熱剤（黄芩、山梔子、石膏、滑石）、5. 中和剤（当帰、芍薬、川芎、蒼朮、薄荷）、6. 利尿剤（蒼朮、滑石、桔梗）。3時間絶食したSTZ-糖尿病態マウスに防風通聖散エキスおよび防風通聖散構成生薬エキスを腹腔内投与し、絶食状態下で投与6時間後の血糖降下作用を水対照群と比較し、**Figure 5**に示した。用いた各構成生薬エキスの用量はエキスの回収率と含有率から概算した。

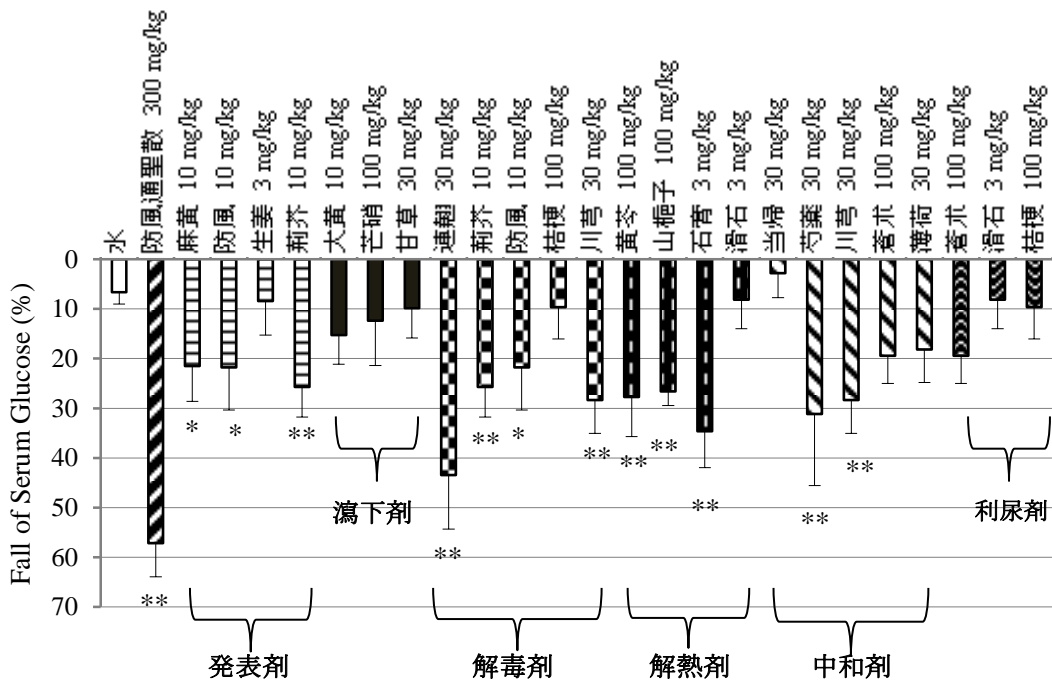


Figure 5. Effects of composed crude drugs in 6 groups of BOF on serum glucose levels in STZ-diabetic mice. Serum glucose levels were measured before and 6 hours after *i.p.* administration of BOF and each composed crude drug into 3-hour fasted STZ-diabetic mice. The values were expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

防風通聖散エキス (300 mg/kg) は水対照群と比べて有意な血糖降下作用を示した。この作用を構成生薬—發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤の作用と比較した。發表剤である麻黄エキス (10 mg/kg) は約 21.5 %、防風エキス (10 mg/kg) は約 21.8 %、荊芥エキス (10 mg/kg) は約 25.7 % 血糖値を降下させ、水対照群と比較して有意な血糖降下作用を示した。しかし、同じ發表剤である生姜エキス (3 mg/kg) は STZ-糖尿病態マウスの高血糖値に影響しなかった。防風と荊芥は發表剤だけではなく、また解毒剤でもある。同じ解毒剤である連翹エキス (30 mg/kg) は約 43.4 %、川芎エキス (30 mg/kg) は約 28.3 % 有意に血糖値を降下させ、桔梗エキス (100 mg/kg) の影響がなかった。解熱剤の中に、水対照群と比較して黄芩エキス (100 mg/kg) は約 27.7 %、山梔子エキス (100 mg/kg) は約 26.6 %、石膏エキス (3 mg/kg) は約 34.6 % 血糖値を有意に降下させた。川芎は解毒剤だけではなく、また中和剤である。同じ中和剤である芍薬エキス (30 mg/kg) は約 31.1 %、血糖値を降下させ、水対照群と比較して有意な血糖降下作用を示した。瀉下剤と利尿剤は STZ-糖尿病態マウスの高血糖値に影響しなかった。

4.2.2. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび血糖降下作用を示した構成生薬（発表剤、解毒剤、解熱剤、中和剤）の血清インスリン値に対する影響

STZ-糖尿病態マウスにおける血清インスリン値に対する防風通聖散エキスの効果と血糖降下作用を示した構成生薬（発表剤、解毒剤、解熱剤、中和剤）エキスの効果を比較した。3時間絶食したSTZ-糖尿病態マウスに血糖降下作用を示した構成生薬を腹腔内投与し、絶食状態で投与6時間後の血清インスリン値を測定し、Figure 6に比較した。

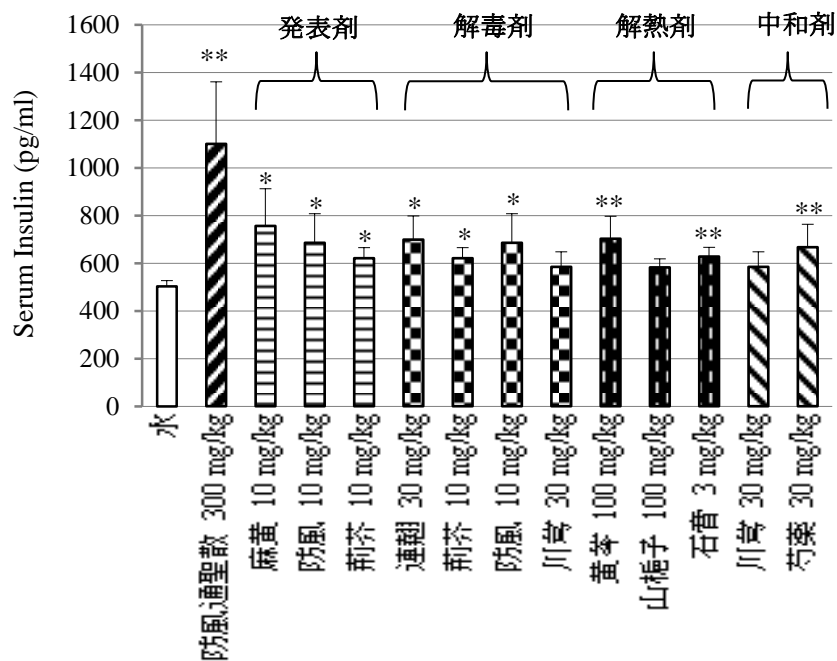


Figure 6. Effects of composed crude drugs in 6 groups of BOF, which lowered the high serum glucose levels, on serum insulin levels in STZ-diabetic mice. Serum insulin levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration of BOF and each composed crude drug which lowered the high serum glucose level into 3 hours fasting STZ-diabetic mice. The values were expressed as means \pm S.E.M. of 5-13 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

発表剤である麻黄エキス (10 mg/kg)、発表剤と解毒剤である防風エキス (10 mg/kg) と荊芥エキス (10 mg/kg)、解毒剤である連翹エキス (30 mg/kg)、解熱剤

である黄芩エキス (100 mg/kg) と石膏エキス (3 mg/kg)、中和剤である芍薬エキス (30 mg/kg) は水対照群と比べて有意に血清インスリン値を増加させた。しかし、解毒剤と中和剤である川芎エキス (30 mg/kg) と解熱剤である山梔子エキス (100 mg/kg) は有意なインスリン増加作用を示さなかった。以上の結果から、防風通聖散の構成生薬の血糖降下作用には、インスリン遊離を介する作用と介さない作用があると考えられた。従って、防風通聖散の血糖降下作用にはインスリン遊離を促進する作用機序とインスリン遊離に関与しない作用機序がある可能性があると考えられた。

4.2.3. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬 (發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) の血清トリグリセリド値に対する影響

STZ-糖尿病態マウスの血清トリグリセリド値に対する防風通聖散構成生薬 (發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤) エキスの効果を比較した。3時間絶食したSTZ-糖尿病態マウスに防風通聖散構成生薬を腹腔内投与し、絶食状態で投与6時間後の血清トリグリセリド値を調べ、Figure 7に示した。

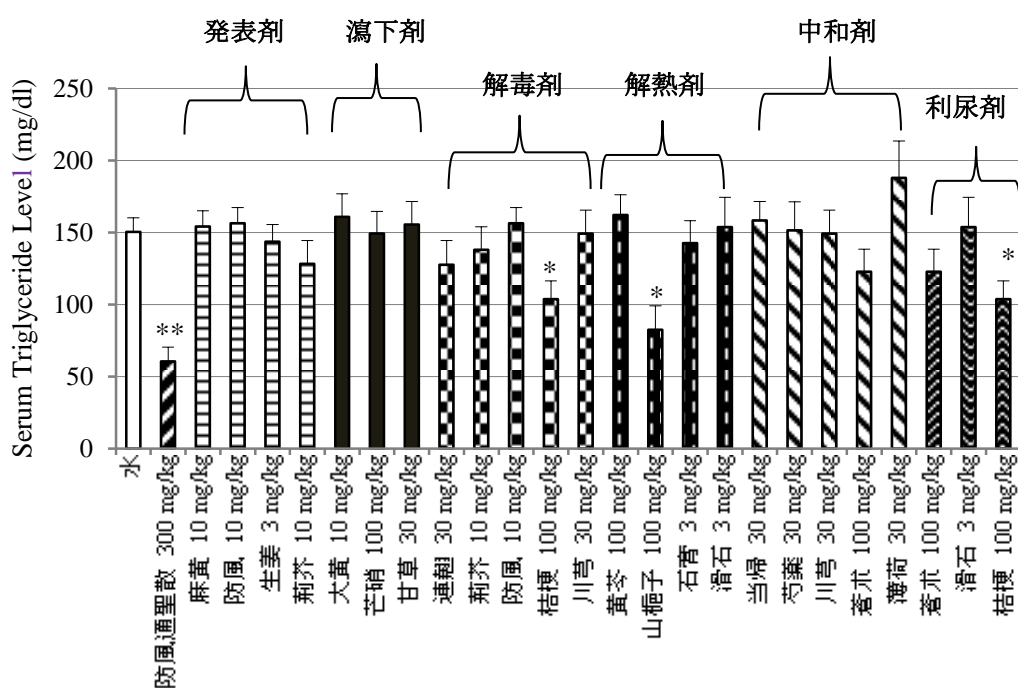


Figure 7. Effects of composed crude drugs in 6 groups of BOF on serum triglyceride levels in STZ-diabetic mice. Serum triglyceride levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration of BOF and each composed crude drug into 3 hours fasting STZ-diabetic mice. The values were expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

STZ-糖尿病態マウスの高血清トリグリセリド値に対して、解毒剤である桔梗エキス (100 mg/kg) と解熱剤である山梔子エキス (100 mg/kg) のみが水対照群

と比較して有意な血清トリグリセリド値の降下作用を示した。この結果は、防風通聖散の血清トリグリセリド値の低下作用は、山梔子と桔梗によって誘導されることがわかった。

4.2.4. STZ-糖尿病態マウスにおける防風通聖散エキスおよび構成生薬（發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤）の血清コレステロール値に対する影響

STZ-糖尿病態マウスの血清コレステロール値に対する防風通聖散構成生薬（發表剤、瀉下剤、解毒剤、解熱剤、中和剤、利尿剤）の効果を比較した。STZ-糖尿病態マウスに防風通聖散構成生薬を腹腔内投与し、絶食状態下で投与6時間後の血清コレステロール値を調べ、Figure 8に比較した。

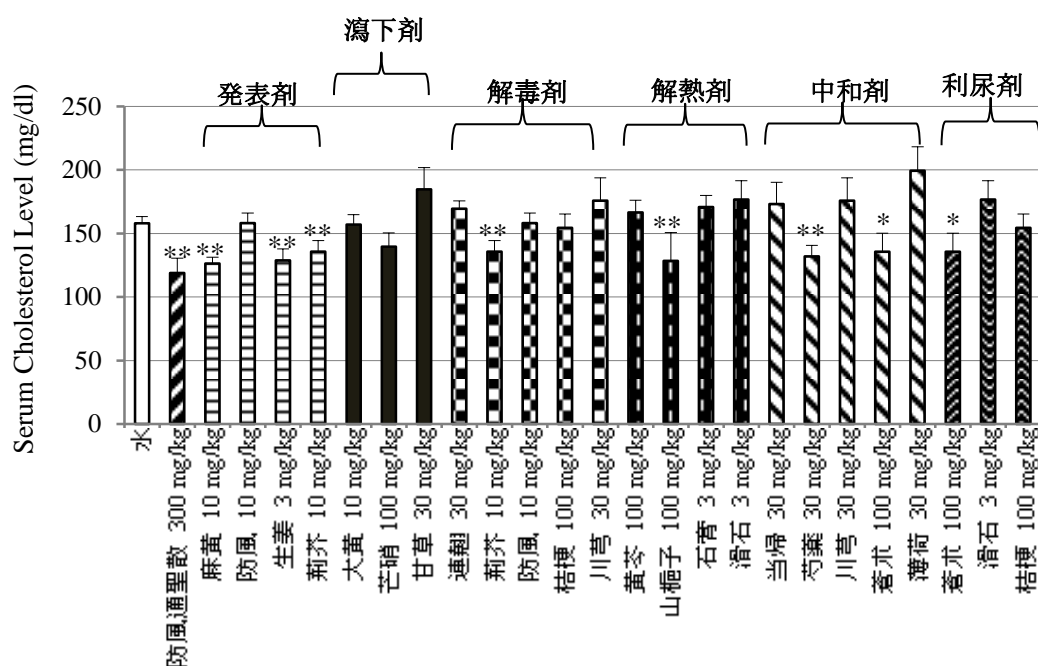


Figure 8. Effects of Composed Crude Drugs in 6 Groups of BOF on serum cholesterol levels in STZ-diabetic mice. Serum cholesterol levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration of BOF and each composed crude drug into 3 hours fasting STZ-diabetic mice. The values were expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

發表剤である麻黄エキス (10 mg/kg)、生姜エキス (3 mg/kg)、發表剤と解毒剤荊芥エキス (10 mg/kg) は水対照群と比較して STZ-糖尿病態マウスの有意な血

清コレステロール値の降下作用を示した。解熱剤である山梔子エキス (100 mg/kg) は血清トリグリセリド値の減少作用以外に血清コレステロール値についても水対照群と比べて有意な減少作用を示した。中和剤である芍薬エキス (30 mg/kg)、中和剤と利尿剤である蒼朮 (100 mg/kg) も有意に STZ-糖尿病態マウスの血清コレステロール値を降下させた。ほかの生薬については有意な降下作用が認められなかった。

4.2.5. 考察

本研究では、STZ-糖尿病態マウスを用いて、防風通聖散を構成している生薬単味の糖尿病態パラメーターに対する効果を、防風通聖散の効果と比較し、その結果を Table 4 にまとめた。

Table 4. Effects of composed crude drugs in 6 groups of BOF on serum parameters in STZ-diabetic mice.

		血糖値	インスリン値	トリグリセリド値	コレステロール値
防風通聖散		↓↓↓	↑↑↑	↓↓↓	↓↓
發表剤	麻黄	↓	↑↑		↓↓
	防風	↓	↑↑		
	生姜				↓
	荊芥	↓↓	↑		↓
瀉下剤	大黄				
	芒硝				
	甘草				
解毒剤	連翹	↓↓	↑↑		
	荊芥	↓↓	↑		↓
	防風	↓	↑↑		
	桔梗			↓↓	
	川芎	↓↓			
解熱剤	黄芩	↓↓	↑↑		
	山梔子	↓↓		↓↓	↓
	石膏	↓↓	↑↑		
	滑石				
中和剤	当帰				
	芍薬	↓↓	↑↑		↓
	川芎	↓↓			
	蒼朮				↓
	薄荷				
利尿剤	蒼朮				↓
	滑石				
	桔梗			↓↓	

The change between 0~25 % was showed as ↓ or ↑ ; between 25~50 % was showed as ↓ ↓ or ↑ ↑ , more than 50 % was showed as ↓ ↓ ↓ or ↑ ↑ ↑ .

發表剤（麻黄、防風、生姜、荊芥）は体表から病邪を汗によって除き、病邪を体表から発散させる漢方薬である。別に発汗剤、解肌剤とも言われる。Table 4 に示したように、防風通聖散の中に發表剤として麻黄、防風、生姜、荊芥が含まれているが、生姜以外の麻黄と防風、荊芥は水対照群と比べて STZ-糖尿病態マウスの血糖値を有意に降下させた。その中で麻黄、防風と荊芥はインスリン遊離促進作用も示した。以上の結果から、古来から發表剤として分類されている生薬は STZ-糖尿病態マウスに対して血糖降下作用を示すことがわかった。この血糖降下作用機序にインスリン遊離促進作用が関与することが示唆された。發表剤の麻黄と荊芥は STZ-糖尿病態マウスの血糖値の他に血清コレステロール値も低下させた。麻黄や荊芥の血糖降下作用機序と血清コレステロール減少作用機序の関連は明らかにできなかったが、古典で分類される發表剤は、糖尿病態マウスにおいて、血糖降下作用とコレステロール低下作用を有することを明らかにした。

瀉下剤（大黄、芒硝、甘草）は古来から腸の内容物を薬の力で軟らかくして、腸内運動を調節する効果がある薬物と言われている。これらの構成生薬は測定した糖尿病態パラメーターに対して改善作用を示さなかった。

解毒剤（連翹、荊芥、防風、桔梗、川芎）は古来から、生体が有毒な物質または薬物を摂取した際、その有毒物質を速やかに処理し毒性を消失または減弱させる目的で用いられる生薬をいう。解毒剤の中で、連翹や荊芥、防風、川芎が水対照群と比べて STZ-糖尿病態マウスの血糖値に有意な降下作用を示した。連翹や荊芥、防風の血糖降下作用はインスリン遊離に関与することを明らかにした。解毒剤は、STZ-糖尿病態マウスにおいて、血糖降下作用とインスリン遊離促進作用を示した。連翹や防風は血清トリグリセリド値や血清コレステロール値に効果を示さなかった。川芎は血糖降下作用を示したが、インスリン遊離や血清トリグリセリド値や血清コレステロール値に効果を示さなかった。桔梗は血清トリグリセリド値の低下作用のみを示し。解毒剤の中でも、共通した作用が見られなかった。桔梗による血清トリグリセリド値の低下作用は PPAR- γ を活性化させ、肝臓のトリグリセリド貯蔵の減少作用に関与することが報告されている^(55,56)。

解熱剤（黄芩、山梔子、石膏、滑石）は裏熱が原因である炎症や鎮痛、神経

興奮症状などの症状を解消させる生薬や漢方処方を指す。糖尿病状態では膵臓が熱を持ちインスリンが出にくくなっているため、消化器系統を冷やす方剤例えば白虎加人参湯、竹葉石膏湯、八味地黄丸、当帰建中湯などを用いる治療が報告されている⁽⁵⁷⁾。解熱剤の中で黄芩や山梔子、石膏は STZ-糖尿病態マウスの血糖値を有意に低下させた。その中に、山梔子以外の黄芩と石膏は、血糖降下作用とインスリン遊離促進作用を示した。しかし、黄芩と石膏は血清トリグリセリド値やコレステロール値に対して効果を示さなかった。山梔子は血糖降下作用を示したが、インスリン遊離作用がなかった。しかし、山梔子は血清トリグリセリド値と血清コレステロール値も低下した。山梔子の血糖低下作用と脂質代謝改善作用は、防風通聖散の作用と類似していたことから、山梔子は防風通聖散の作用の中で重要な役割を担っている可能性が示された。

中和剤（当帰、芍薬、川芎、蒼朮、薄荷）は、和解中和して病邪を排出するとされている。この中に芍薬と川芎が STZ-糖尿病態マウスの血糖値を低下させた。芍薬が血清インスリン値を増加し、血清コレステロール値を低下させた。STZ 糖尿病態マウスにおいて、芍薬の作用は發表剤の麻黄や荊芥の作用と類似していたが、その理由が不明である。蒼朮は血清コレステロール値以外の糖尿病パラメーターに影響がなかったことから、蒼朮固有のメカニズムも存在する可能性が示唆できた。

利尿剤（蒼朮、滑石、桔梗）は体内に停滞している水を体外に出すことをいう。また解毒剤である桔梗と中和剤である蒼朮以外は、これらは糖尿病態パラメーターの改善作用を示さなかった。

以上から、防風通聖散の糖尿病パラメーターに対する作用を構成生薬の作用から考察してみた。麻黄や荊芥、芍薬は、血糖降下作用と血清インスリン値増加作用、血清コレステロール低下作用を現した。防風や蓮翹、黄芩、石膏は、血糖降下作用と血清インスリン値増加作用を示した。川芎は、血糖降下作用のみを示した。山梔子は血糖降下作用と血清トリグリセリド値、血清コレステロール値低下作用を示した。従って、防風通聖散の血糖降下作用機序にはインスリン遊離を直接的に促進する作用機序と、インスリン遊離に関与しない機序がある可能性を見出した⁽⁵⁸⁾。防風通聖散は濃度依存的に STZ-糖尿病態マウスの血清トリグリセリド値とコレステロール値を低下した。構成生薬のうち、山梔子

は、血清トリグリセリド値とコレステロール値の両方を低下させた。桔梗は血清トリグリセリド値のみを低下させ、麻黄や生姜、荊芥、芍薬、蒼朮は血清コレステロール値のみを低下した。防風通聖散の作用のなかでこれらの生薬はどのような複合作用を示すかは今後の問題である。

山梔子は防風通聖散と同様に STZ-糖尿病態マウスにおける血糖降下作用と血清トリグリセリド値と血清コレステロール値の降下作用を示した。山梔子が防風通聖散の糖尿病改善作用に重要な役割を果たしていたが、防風通聖散とは異なり、血中インスリン量に影響しなかった。そこで、以降の研究で、山梔子の血糖降下作用機序をインスリン抵抗性改善作用に焦点を絞り詳細に検討した。

4.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の改善効果

4.3.1. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血糖値に対する影響

山梔子エキスの血糖降下作用を裏付けるために、主要成分 geniposide の作用と比較した。Geniposide の構造式は **Figure 9** に示した。

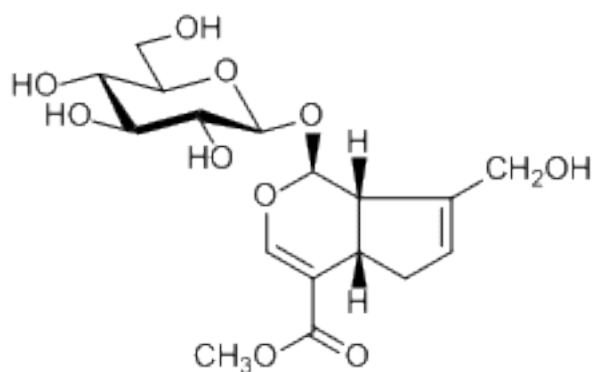


Figure 9. The structural formula of geniposide

3 時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに山梔子エキス (30-300 mg/kg) または geniposide (10-100 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態下で 6 時間後の血糖値に対する効果を調べ、**Figure 10** に示した。

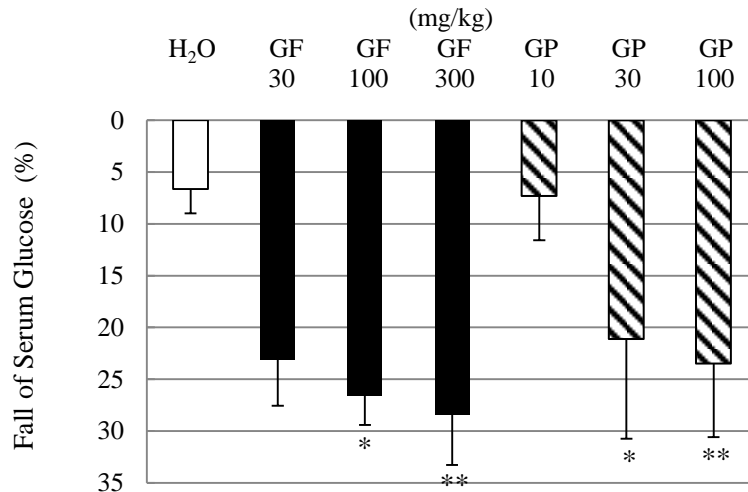


Figure 10. Effects of Gardeniae Fructus (GF, 山梔子) and geniposide (GP) on the serum glucose levels in STZ-diabetic mice. Serum glucose levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration with GF and GP into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

山梔子エキス投与 6 時間後の血糖降下率を調べたところ、30 mg/kg の投与量では約 23 %、100 mg/kg では約 26.6 %、300 mg/kg では約 28.4 % 用量依存的に STZ-糖尿病態マウスの血糖値を有意に降下させた。Geniposide は 10 mg/kg の投与量では血糖降下作用を示さなかったものの、30 mg/kg の投与量では約 21 %、100 mg/kg では約 23.5 % 血糖値を降下させ、有意な血糖降下作用を有した。Geniposide は山梔子エキス中に約 30 % 含まれていると推定される。この含有率と geniposide と山梔子エキスとの効力比に相関が見られたことから、山梔子エキスの血糖降下作用は geniposide によって引き起こされることが示唆された。

4.3.2. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清インスリン値に対する影響

3時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに山梔子エキス (30-300 mg/kg) および geniposide (10-100 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態で6時間後の血清インスリン値に対する効果を調べ、**Figure 11** に示した。

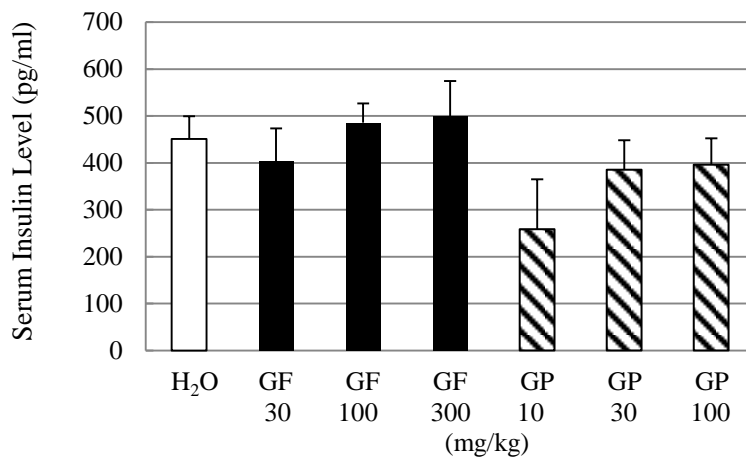


Figure 11. Effects of GF and GP on the serum insulin levels in STZ-diabetic mice. Serum insulin level was measured at 6 hours after *i.p.* administration with GF and GP into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data.

山梔子エキス (30-300 mg/kg) 投与により血清インスリン値に著しい変化は見られなかった。また、geniposide (10-100 mg/kg) の投与においても、血清インスリン値の上昇は認められなかった。この結果から、山梔子エキスの血糖降下作用は直接的にインスリン遊離促進作用とは関連していないことが成分レベルで裏付けられた。

4.3.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清トリグリセリド値に対する影響

3時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに山梔子エキス (30-300 mg/kg) および geniposide (10-100 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態で6時間後の血清トリグリセリド値に対する効果を調べ、**Figure 12** に示した。

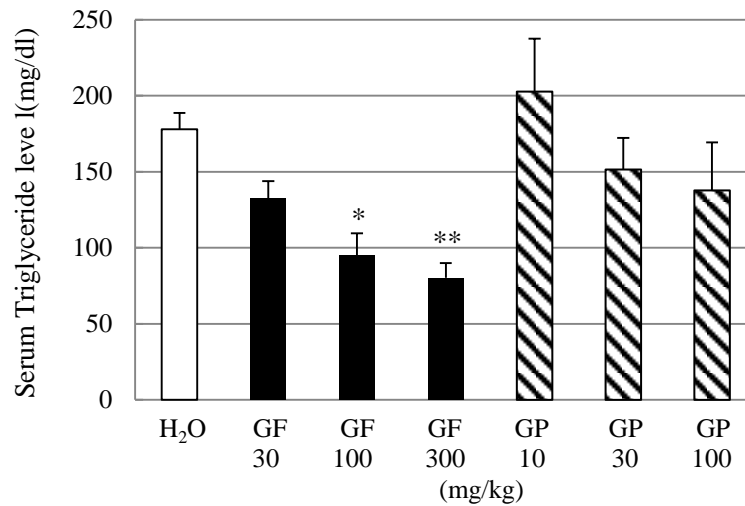


Figure 12. Effects of GF and GP on the serum triglyceride levels in STZ-diabetic mice. Serum triglyceride levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration with GF and GP into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

山梔子エキス (30-100 mg/kg) は用量依存的に血清トリグリセリド値を低下させ、100 mg/kg から 300 mg/kg の投与量では有意な降下作用が認められた。しかし、geniposide (10-100 mg/kg) の投与は有意な降下作用を示さなかった。

4.3.4. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスおよび主要成分 geniposide の血清コレステロール値に対する影響

3時間絶食した STZ-糖尿病態マウスに山梔子エキス (30-300 mg/kg) および geniposide (10-100 mg/kg) を腹腔内投与し、絶食状態で6時間後の血清コレステロール値に対する効果を調べ、**Figure 13** に示した。

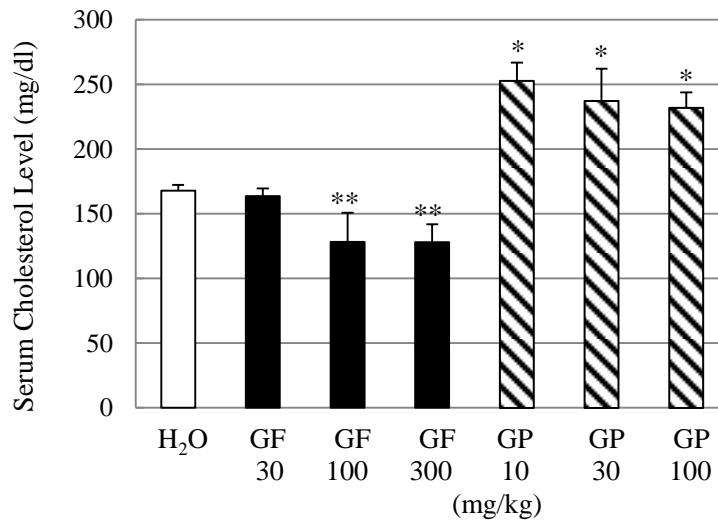


Figure 13. Effects of GF and GP on the serum cholesterol levels in STZ-diabetic mice. Serum cholesterol levels were measured at 6 hours after *i.p.* administration with GF and GP into 3-hour fasted diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-15 data. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

山梔子エキス (100, 300 mg/kg) は水対照群と比べて STZ-糖尿病態マウスの血清コレステロール値を低下させたが、geniposide (10-100 mg/kg) の投与はこれを逆に有意に増加させた。山梔子エキスによる血清トリグリセリド値やコレステロール値の低下作用が、主要成分 geniposide で再現されなかった。このことから、山梔子エキスの血清脂質低下作用には、山梔子エキス中の別の成分または geniposide と別の成分の複合作用が関与している可能性が考えられた。

4.3.5. 考察

防風通聖散の構成生薬山梔子エキスは、防風通聖散と同様に STZ-糖尿病態マウスの高血糖を用量依存的に低下させた。山梔子エキスは防風通聖散と異なりインスリン遊離に対して効果を示さなかったが、高トリグリセリド値や高コレステロール値を有意に低下させた。山梔子エキスの血糖降下作用は低い 30 mg/kg 投与量から有意に認められたが、血清トリグリセリド値や血清コレステロール値に対する降下作用は高用量である 100 mg/kg から示された。この結果は山梔子エキス単回腹腔投与が、インスリン遊離を介さずに STZ-糖尿病病態マウスの高血糖を低下させることを意味している。山梔子エキスが肝臓におけるコレステロール分解を介した胆汁酸排泄を促進することが知られているので^(32, 33)、本研究における山梔子エキスの血清コレステロール値減少作用には、山梔子の胆汁酸排泄促進作用が関与する可能性が考えられる。Watanabe らは、胆汁酸は肝臓の sterol regulatory element-binding protein (SREBP) -1c の抑制作用を介して、肝臓や血清のトリグリセリド値を減少させ、脂肪肝の抑制効果を示すと報告している⁽⁵⁹⁾。さらに、この胆汁酸排泄促進作用により、血清コレステロール値の他に血清トリグリセリド値も低下させると考えられた。

山梔子エキス (30-300 mg/kg) は、STZ-糖尿病態マウスにおいて水対照群と比べて有意に高血糖を低下させ、geniposide (30-100 mg/kg) も同程度の血糖降下作用を示した。また、山梔子エキスと geniposide は、ともに血清インスリン値に全く影響しなかったことから、山梔子エキスの血糖降下作用は直接的にインスリン遊離の促進作用を介していないことが成分レベルでも裏付けられた。山梔子エキスは血糖降下作用とともに、血清トリグリセリドとコレステロール含量を減少させたが、geniposide は血清トリグリセリド含量に効果を示さず、血清コレステロール含量を逆に増加させた。単回腹腔内投与後 6 時間では、STZ-糖尿病病態マウスの高血清トリグリセリド値とコレステロール値に対する効果が山梔子エキスと geniposide で異なったことから、geniposide だけで山梔子エキスのトリグリセリド、コレステロール降下作用を説明するには無理があると考えられる。山梔子エキス中の geniposide 以外の成分が血清脂質を減少させる可能性がある。山梔子のもう一つ成分 crocin (crocetin digentiobiose ester) はウサギ耳静脈内投与したとき、投与 1 時間後に胆汁分泌増加作用を示すことが報告されている⁽³⁹⁾。

この胆汁分泌増加作用を介して、コレステロールの排泄を促進し、血清コレステロール値を減少させていることが考えられた。山梔子の脂質減少作用はこの成分が関与する可能性が考えられる。

4.4. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの血糖降下機序

4.4.1. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの糖負荷に対する影響

STZ-糖尿病態マウスの糖負荷 (1.5 g/kg) による血糖値と血清インスリン値の経時変化に対する山梔子エキスの効果を検討した。正常マウスと水あるいは山梔子エキス (300 mg/kg) を投与した STZ-糖尿病態マウスを一晩絶食し、グルコース 1.5 g/kg を負荷してから経時的に採血して、血糖値 (**Figure 14 (a)**) と血清インスリン値 (**Figure 14 (b)**) を測定した。

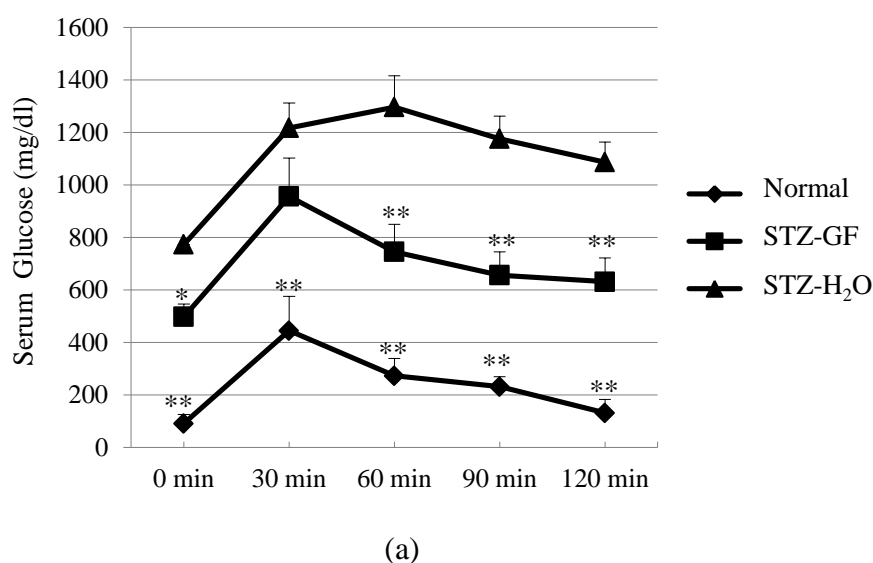
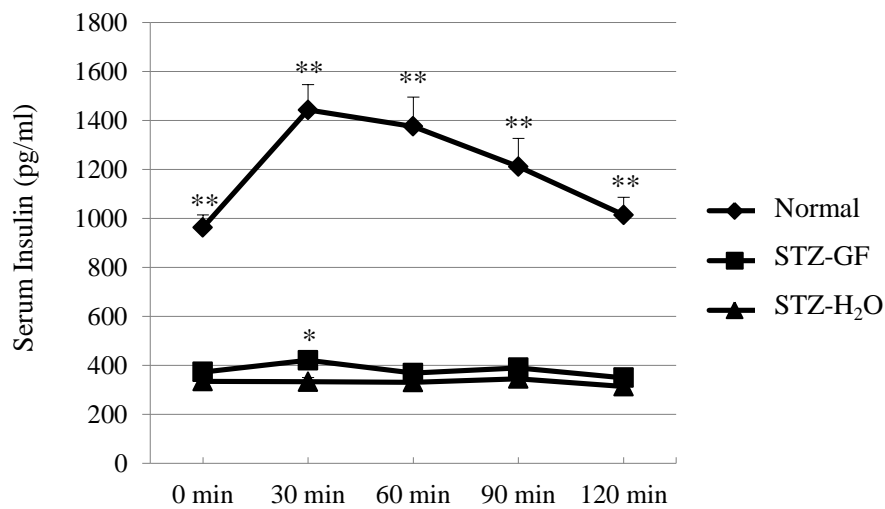


Figure 14 (a). Effects of GF on serum glucose levels in STZ-diabetic mice after loading a bolus of glucose. After overnight fasting, a bolus of glucose (1.5 g/kg) was intraperitoneally injected into H₂O or GF treated STZ-diabetic mice. Blood was collected sequentially from the neck vein at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 min and measured serum glucose level. Values represent means \pm S.E.M. of 4-7 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.



(b)

Figure 14 (b). Effects of GF on serum insulin levels in STZ-diabetic mice after loading a bolus of glucose. After overnight fasting, a bolus of glucose (1.5 g/kg) was intraperitoneally injected into H₂O or GF treated STZ-diabetic mice. Blood was collected sequentially from the neck vein at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 min and measured serum insulin level. Values represent means \pm S.E.M. of 4-7 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

グルコース負荷 30 分後に、STZ-糖尿病態マウスの水投与群の血糖値は投与前の 773.6 mg/dl から 1217.6 mg/dl までに上昇した。さらに、60 分後に、1296.4 mg/dl に到達し、120 分まで高い血糖値を維持した。山梔子エキス投与群の血糖値はグルコース負荷 30 分後に、投与前の 498.0 mg/dl から 882.5 mg/dl まで上昇し、その後時間依存的に降下した。60 分後から水投与群と比較して有意に血糖値が減少し、120 分後では 631.3 mg/dl まで降下し、投与前の血糖値とほぼ同じレベルに戻った。この山梔子エキス投与による血糖値降下パターンは正常マウスのパターンと類似した。この結果は、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスにおけるグルコース負荷後の血糖値コントロールを改善することを示している。

一方、STZ-糖尿病態マウスのグルコース負荷後の血清インスリン値の経時変化を測定すると、山梔子エキスはグルコース負荷 30 分後に有意に血清インスリン値を上昇させた(Figure 14 (b))。しかし、このグルコース負荷後の山梔子によ

る血清インスリン上昇作用は、正常マウスにおける作用と比べて非常に小さいものであった。従って、山梔子エキスの弱いインスリン遊離促進作用により、グルコース負荷された後の高血糖値を減少させることを完全に説明できないと考えられた。また、山梔子エキスはほかの機序により、血糖降下作用を示すことが示唆された。

4.4.2. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの HOMA-IR 値に対する影響

水あるいは山梔子エキス (300 mg/kg) を投与した 12 時間絶食した STZ-糖尿病態マウスの血糖値と血清インスリン値を測定し、HOMA-IR 値を計算した。STZ-糖尿病態マウスの HOMA-IR 値は正常マウスより有意に高くなった (Table 3)。この STZ-糖尿病態マウスの高い HOMA-IR 値に対して、山梔子エキスの影響を検討した (Figure 15)。

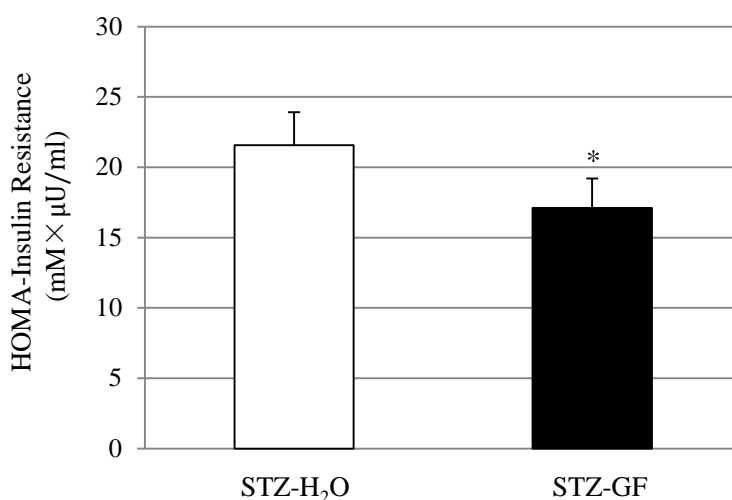


Figure 15. Effects of GF on HOMA-IR in STZ-diabetic mice. After overnight fasting blood was collected sequentially from the neck vein from STZ-diabetic mice, which were treated with GF or H₂O 6 hours. HOMA-IR analysis was used to assess insulin resistance. Values for HOMA-IR were calculated from the product of fasting plasma glucose (mmol/l) and insulin (μU/ml), using the following formula: HOMA=fasting serum insulin (μU/ml) x fasting plasma glucose (mmol/l)/405. Values represent means ±S.E.M. of 15 data (H₂O treated STZ-diabetic mice) and 18 data (GF treated STZ-diabetic mice). **P* < 0.05: Significantly different from control H₂O group.

山梔子エキスを投与した STZ-糖尿病態マウスの HOMA-IR 値は水投与群の HOMA-IR 値と比較して有意に小さくなった。山梔子エキスが STZ-糖尿病態マウスの HOMA-IR 値を減少させることを示している。山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスのインスリン分泌に影響せず、インスリン抵抗性を改善することにより血糖降下作用を示すと考えられた。

4.4.3. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスのインスリン負荷に対する影響

既に、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスのインスリン分泌に影響せず、血糖降下作用を示すことを確認した。また、山梔子エキスの投与による STZ-糖尿病態マウスの HOMA-IR 値の減少結果から、この血糖降下作用機序はインスリン抵抗性の改善に関わる可能性を考えた。そこで、STZ-糖尿病態マウスのインスリン負荷に対する山梔子エキスの効果を検討した。正常マウスと、水あるいは山梔子エキス投与した STZ-糖尿病態マウスを一晩絶食し、 0.7×10^6 pg/kg インスリンを負荷してから経時的に採血して、血糖値 (Figure 16) を測定し、血糖変化率を計算した。

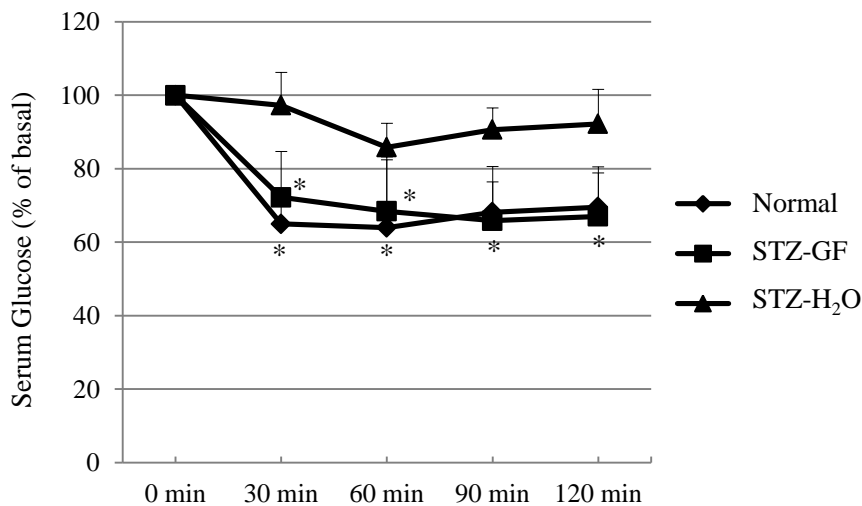


Figure 16. Effects of GF on serum glucose levels in STZ-diabetic mice after loading a bolus of insulin. GF was treated for 6 hours in 3 hour-fasted STZ-diabetic mice. After loading a bolus of insulin (0.65 U/kg), blood was collected sequentially from the neck vein at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 min and measured serum glucose level. The serum glucose level at 0 min in normal mice was 129.0 mg/dl; in GF treated STZ-diabetic mice was 447.3 mg/dl; in H₂O treated STZ-diabetic mice was 709.3 mg/dl. Values represent means \pm S.E.M. of 4-5 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

インスリン負荷 30 分後、山梔子エキスを投与した STZ-糖尿病態マウスの血糖

値は水対照群と比べて有意な降下作用を示した。この血糖降下作用は 120 分まで有意に継続した。山梔子エキスを投与した **STZ**-糖尿病態マウスは水投与群とは異なり、高濃度インスリン負荷により血糖降下作用を示すことがわかった。

4.4.4. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋のグルコースの取り込みに対する影響

末梢組織の骨格筋は、全身のインスリン依存的なグルコースの取り込みの約85%が行われる組織である。山梔子エキスのインスリン抵抗性の改善作用とともに、STZ-糖尿病態の骨格筋におけるグルコースの取り込みに対する山梔子エキスの効果を検討した (Figure 17)。

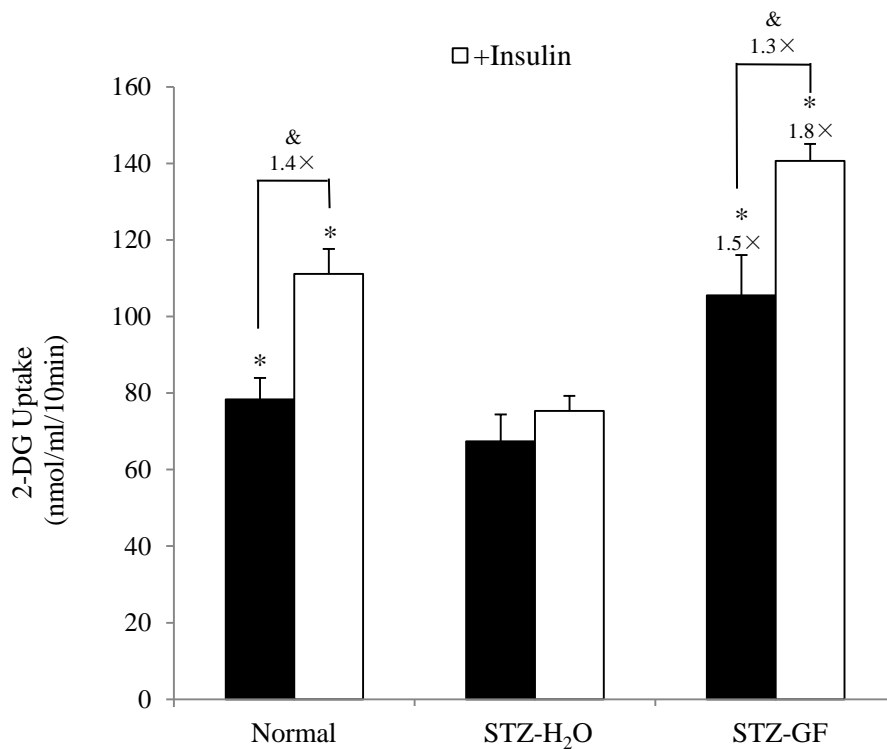


Figure 17. Effects of GF on 2-DG uptake in soleus muscles of STZ-diabetic mice. Soleus muscles were incubated for 10 min in 2-DG with or without insulin (10 nmol/ml). 2-DG uptake was normalized to tissue weight. Values represent means \pm S.E.M. of 3 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group. & $P < 0.05$: Significantly different from without insulin.

糖尿病態マウスの骨格筋におけるグルコースの取り込みは正常マウスのものより有意に減少し、さらに、インスリンによるグルコースの取り込み促進作用も消失したことから、インスリン抵抗性が見られた。山梔子エキス投与群マウスの骨格筋は水対照群と比べて、グルコースの取り込みを約1.5倍増加したことから、山梔子エキスはSTZ-糖尿病態マウスの骨格筋のグルコースの取り込みを

促進することを明らかにした。

山梔子エキスを投与した STZ-糖尿病態マウスの骨格筋は、インスリン (10 nmol/ml) 存在下ではさらにグルコースの取り込みを 1.3 倍増加した。インスリン (10 nmol/ml) 存在下では、山梔子エキス投与群は水対照群と比べて、約 1.8 倍グルコースの取り込みを促進した。以上の結果から、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスの骨格筋のグルコースの取り込みを促進し、更にインスリンによるグルコースの取り込み作用を増強することも明らかにした。

4.4.5. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋細胞膜の Glucose transporter 4 (GLUT4) の発現に対する影響

末梢組織の骨格筋のインスリンシグナルにおいて、細胞膜表面の GLUT4 を介して、糖を取り込むことが知られている。山梔子エキスの糖の取り込み促進作用は、細胞膜の GLUT4 の発現量に関与する可能性がある。そこで、STZ-糖尿病態マウスに山梔子エキスを (300 mg/kg) 投与した後、3 時間と 6 時間後の大腿骨格筋細胞膜画分における GLUT4 の発現量を Western blotting により測定した (Figure 18)。

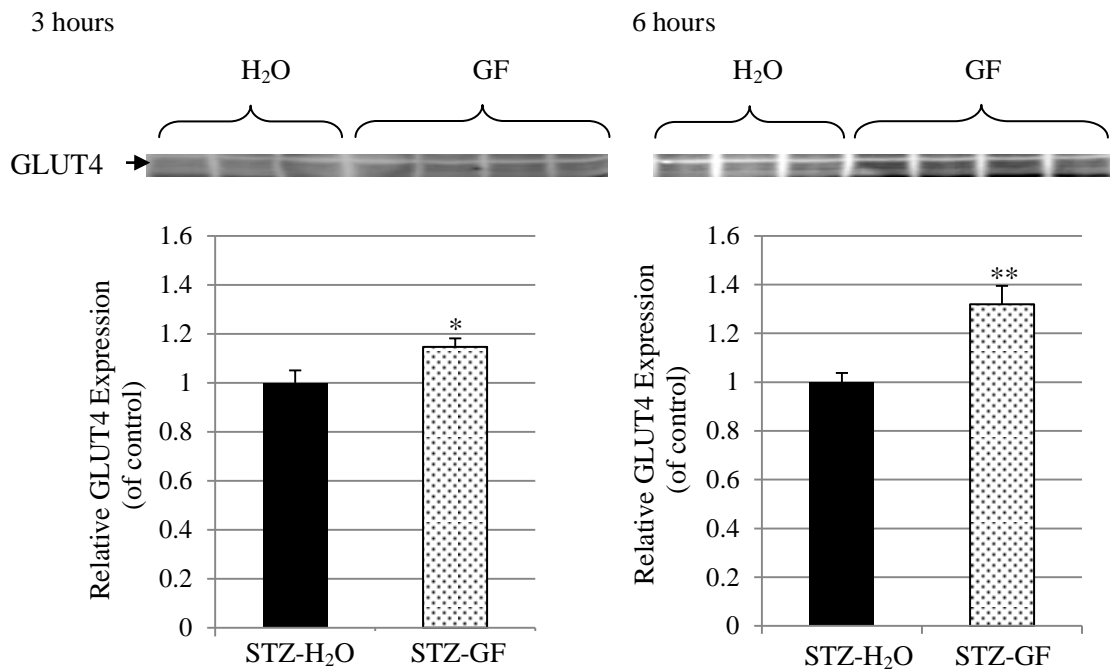


Figure 18. Effects of GF on GLUT4 expression in the plasma membrane of soleus muscle in STZ-diabetic mice. GF was treated in 3 hour-fasted STZ-diabetic mice for 3 hours (left) and 6 hours (right). The protein levels of GLUT4 in plasma membrane fraction of soleus muscle were detected by western blotting analysis. Values represent means \pm S.E.M. of 6-12 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

水あるいは山梔子エキス (300 mg/kg) 投与 3 時間と 6 時間後の STZ-糖尿病態マウスにおいて、骨格筋細胞膜画分の GLUT4 のバンドの濃さを測定し、その発現量を定量した。GLUT4 発現量は山梔子エキス投与 3 時間後と 6 時間後にそれ

それぞれ水投与群と比較して約 1.1 倍と 1.3 倍に増加していた。以上の結果から、山梔子エキスは、糖尿病態マウスの骨格筋細胞膜に GLUT4 の発現量を投与時間依存的に増加させることを明らかにした。山梔子エキス投与により骨格筋細胞膜に GLUT4 が増加し、糖の取り込みが促進され、血糖値が低下することが考えられた。

4.4.6. STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの骨格筋細胞質のAktリン酸化に対する影響

インスリンシグナル伝達において、GLUT4の細胞膜輸送にAktが重要な役割を果たしていることが知られている。山梔子エキスがSTZ-糖尿病態マウスの骨格筋細胞膜のGLUT4の発現量を増加させたことから、次に、細胞内シグナルに関与するAktの活性化に対する山梔子の効果を検討した。Aktの活性化はAktのリン酸化が導いているので、Akt量とリン酸化Akt量に対する山梔子エキスの効果を調べた (Figure 19)。

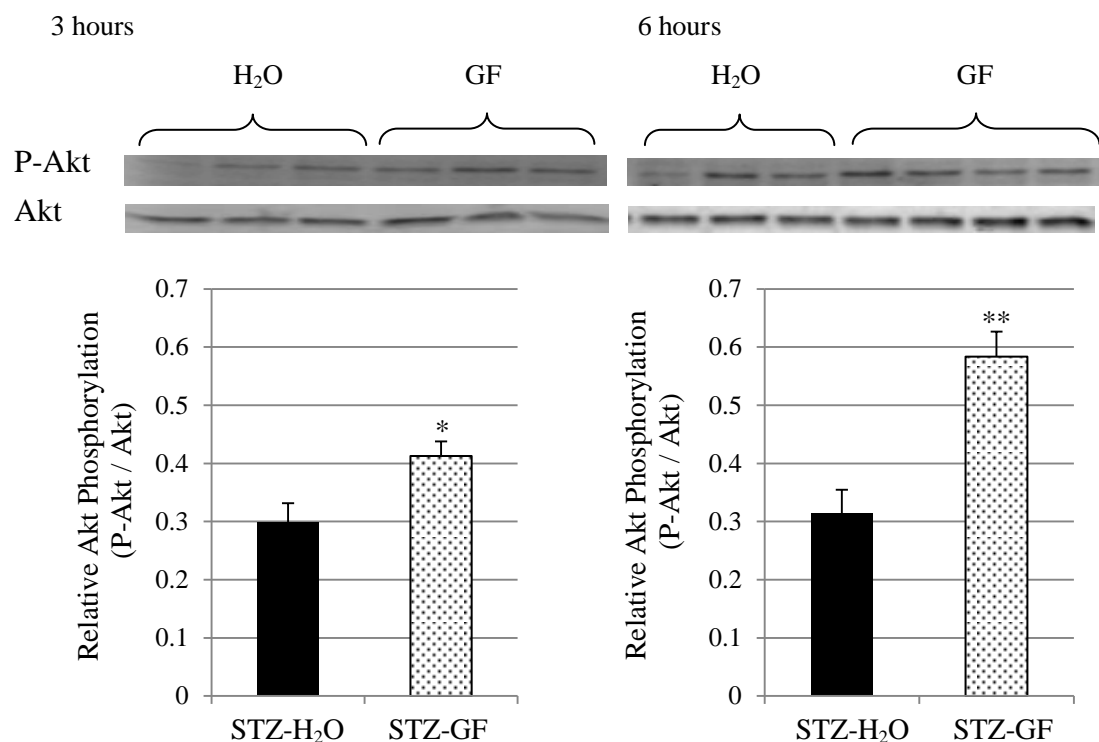


Figure 19. Effects of GF on proportion of P-Akt in Akt in cytosolic fraction of soleus muscle in STZ-diabetic mice. GF was treated in 3 hour-fasted STZ-diabetic mice for 3 hours (left) and 6 hours (right). The protein levels of Akt and P-Akt in cytosolic fraction of soleus muscle were detected by western blotting analysis. Values represent means \pm S.E.M. of 4-6 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

山梔子エキス (300 mg/kg) は、投与 3 時間後において、STZ-糖尿病態マウス

の骨格筋細胞の細胞質中のリン酸化 Akt 量を 1.4 倍に増加させ、投与 6 時間後では 1.9 倍に増加させた。以上の結果から、山梔子エキスは、STZ-糖尿病態マウスの骨格筋細胞の細胞質内の Akt を投与時間依存的にリン酸化させ、活性化することを証明した。山梔子エキスの投与はインスリンシグナルにおいて、Akt の活性化や GLUT4 の細胞膜の発現の増加を介して糖の取り込みを促進し、血糖値を低下させると考えられた。

4.4.7. 考察

STZ-糖尿病態マウスは血清インスリン値の低下とインスリン抵抗性を有し、高血糖値を示した。山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスにおける糖負荷後の血糖値コントロールを有意に改善した (**Figure 14**)。更に、山梔子エキスは HOMA-IR 値も低下させ、高用量インスリンによる血糖降下作用を示した (**Figures 15, 16**)。

以上のことから、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスにおける耐糖能異常やインスリンの抵抗性を改善することを明らかにした。末梢組織の骨格筋は、全身のインスリン依存性の糖の取り込みの約 85 % が行われる組織である。そこで、山梔子エキスのインスリン抵抗性改善作用をもとに、STZ-糖尿病態マウスの骨格筋における糖の取り込みに対する山梔子エキスの効果を検討した (**Figure 17**)。糖尿病態の骨格筋への糖の取り込みは正常と比べて有意に抑制され、インスリンは糖の取り込みに影響しなかったことから、STZ-糖尿病態マウスはインスリン抵抗性を有することが本実験系でも裏付けられた。山梔子エキスは骨格筋における糖の取り込みを促進し、インスリンによる糖の取り込み作用も増強した。このことから、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスの骨格筋のインスリン抵抗性を改善することが明らかになった。

インスリンはインスリン受容体に結合して、糖を骨格筋細胞や脂肪細胞へ取り込み、血糖値を低下させる。骨格筋の糖の取り込みは細胞膜での GLUT4 の発現量に強く関係がある。山梔子エキスのインスリン抵抗性改善作用に骨格筋細胞膜の GLUT4 の発現量が関与するかを検討した。その結果、山梔子エキスは投与時間依存的に、STZ-糖尿病態マウスの骨格筋細胞膜において GLUT4 の発現量を増加させた (**Figure 18**)。Akt の活性化は GLUT4 のトランスロケーションに中心的な役割を担っていることから、山梔子エキスの Akt の活性化に対する効果を検討した。山梔子エキスは投与時間に依存して、STZ-糖尿病態マウスの骨格筋の細胞質画分の Akt リン酸化を増加させた (**Figure 19**)。これらの結果から、山梔子エキスの単回腹腔内投与は、STZ-糖尿病態マウスのインスリン遊離に影響せず、Akt の活性化を介して GLUT4 の細胞膜の発現量の増加を誘導し、骨格筋細胞への糖の取り込みを亢進して、高血糖値を改善すると結論できた⁽⁶⁰⁾。

インスリン抵抗性は II 型糖尿病の特徴だけではなく、I 型糖尿病にもよく見ら

れる。慢性高血糖値自体は、もとより存在するインスリン分泌不全を悪化させ、インスリン受容体の障害などによる末梢組織でのインスリン抵抗性を招く⁽²⁵⁾。この慢性高血糖値によるインスリン抵抗性を招く機序は酸化ストレスが関与することが指摘されている。酸化ストレスによる TNF- α や IL-1 β 、 VEGF、 AGEs などの産生促進は、インスリン抵抗性や合併症を惹起する⁽⁶¹⁾。STZ-糖尿病態モデルにおいても高血糖値によるインスリン抵抗性が確認された⁽⁶²⁾。STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスのインスリン抵抗性改善作用機序は、直接的にインスリンシグナル制御因子を抑制する可能性があるが、現在は不明のままである。今後、山梔子によるインスリン抵抗性の改善機序を深く検討する必要がある。近年、肥満を伴う糖尿病の発症が爆発的に増加している。この肥満型 II 型糖尿病の発症機序はインスリン抵抗性である。山梔子エキスのインスリン抵抗性改善作用をもとに、この肥満型 II 型糖尿病の改善効果が期待できる。

一方、STZ-糖尿病態マウスにおいて、山梔子エキス投与 6 時間後において、有意なインスリン遊離促進作用が認められなかった。しかし、糖負荷の結果から **(Figure 14 (b))**、山梔子エキス 6 時間投与した STZ-糖尿病態マウスをさらに 12 時間絶食した後、外因性糖 (1.5 g/kg) 負荷 30 分後の水対照群と比較すると、山梔子エキス投与群では血清インスリン値が有意に増加した。この山梔子による血清インスリン値増加作用についていくつかの可能性が考えられた。1、山梔子エキス投与時間に依存する、膵臓 β 細胞の保護作用の可能性もある。この膵臓 β 細胞の保護作用は血糖降下作用を介した。糖毒性からの解除により、膵臓 β 細胞のアポトーシスなどが防がれ、外因性糖の刺激の下でインスリン遊離が促進される。2、山梔子エキスが胆汁酸分泌を促進することが考えられる。胆汁酸は腸管上皮細胞を刺激して、インクレチンの分泌を促進することが報告されている⁽⁶³⁾。インクレチンは膵臓 β 細胞でインスリン分泌を促進し、膵 α 細胞でグルカゴン分泌を抑制する。さらに膵臓の保護作用もある⁽⁶⁴⁾。また、山梔子エキスの主要成分 geniposide は膵臓細胞 INS-1 における glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor の感受性を向上させることも報告された⁽⁴¹⁾。これらのことから、山梔子エキスが胆汁酸排泄を促進することによってインクレチンの分泌を促進し、さらに膵臓細胞のインクレチン受容体の活性化を介して、インスリン分泌が促進されることが考えられた。

4.5. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの改善効果

4.5.1. HFD+STZ-糖尿病態マウスと正常マウスの比較

HFD+STZ-糖尿病態マウスと同じ週齢の正常マウスの体重および血糖値、血清インスリン値、血清や肝臓トリグリセリド値とコレステロール値、皮下と内臓（精巣周り）の脂肪組織重量を Table 5 に示した。

Table 5. The different characteristics between normal mice and HFD+STZ diabetic mice

	Normal	HFD+STZ
Body weight (g)	35.9 ±0.7	37.4 ±0.4 *
Serum Glucose (mg/dl)	133.1 ±7.0	619.4 ±19.9 **
Serum Insulin (pg/ml)	1118.9 ±95.9	814.2 ±36.6 *
Serum Triglyceride (mg/dl)	128.4 ±25.9	222.4 ±21.2 *
Serum Cholesterol (mg/dl)	124.2 ±7.6	194.8 ±11.2 *
Liver Triglyceride (mg/g)	5.4 ±0.3	46.5 ±4.1 **
Liver Cholesterol (mg/g)	4.5 ±0.5	10.9 ±0.3 **
Subcutaneous adipose tissue weight (g)	0.7 ±0.1	1.4 ±0.2 *
Epididymal adipose tissue weight (g)	0.5 ±0.1	1.0 ±0.1 **
HOMA-IR	3.9 ±0.4	26.8 ±1.3 **

Table 5 showed body weight, levels of serum glucose, insulin, triglyceride, cholesterol, liver triglyceride and cholesterol, the weights of subcutaneous and epididymal adipose tissues, and HOMA-IR were measured in HFD+STZ-diabetic mice and age-matched normal mice. Values represent means ±S.E.M. of 4 data (normal mice) and 32 data (HFD+STZ-diabetic mice). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from normal mice.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの体重は、正常マウスのそれと比べ有意に増加し、血糖値も約 4.7 倍と高かった。血清インスリン値は、正常マウスに比べて有意に低下し、血清や肝臓のトリグリセリド値と血清コレステロール値も有意に上昇していた。皮下と内臓（精巣周り）の脂肪組織は正常マウスより重かった。インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR 値は、HFD+STZ-糖尿病態マウスのほうが正常マウスより約 7 倍高くなった。更に、この HOMA-IR 値は STZ-糖尿病態マウスのものより大きいことから、HFD+STZ-糖尿病態マウスのインスリン抵抗性が大

きいことがわかった。以上から、HFD+STZ-糖尿病態マウスは肥満、高血糖値、脂質代謝異常、インリン分泌障害とインスリン抵抗性を表現した肥満型Ⅱ型糖尿病モデルであることを確認した。

4.5.2. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による体重、給食量と飲水量に対する影響

HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいて、水あるいは山梔子エキス（300、500と1000 mg/kg）の経口投与1、2、3週間後の、体重変化（**Figure 20**）、給食量と飲水量変化（**Table 7**）を比較した。

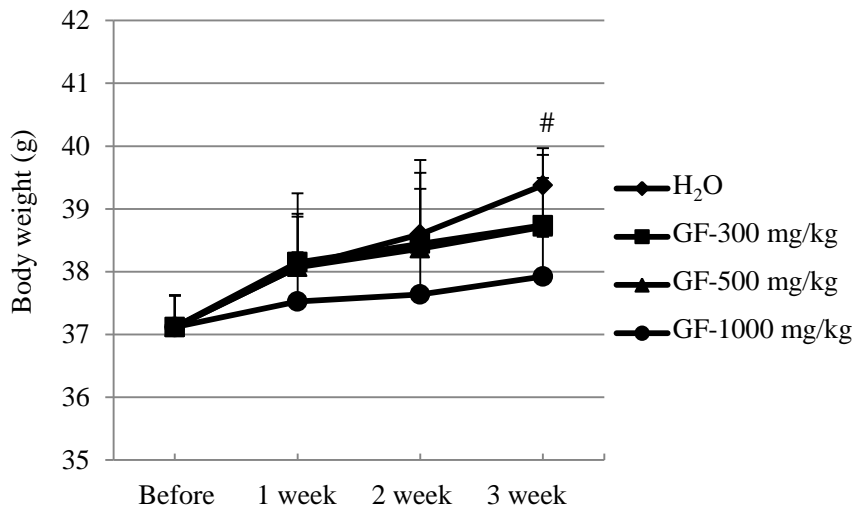


Figure 20. Effects of GF on body weights in HFD+STZ-diabetic mice. The body weights were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 6-16 data. [#] $P < 0.05$: Significantly different from un-treatment of GF.

水対照群の体重は水投与前に比較して時間依存的に増加しており、水投与3週間後では水投与前より有意に増加した。山梔子エキスは投与用量に依存してHFD+STZ-糖尿病態マウスの体重に対して抑制傾向を示したが、有意な差が見られなかった。

Table 7. Daily food intake and daily water intake into HFD+STZ-diabetic mice

	H ₂ O	GF		
		300 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Daily food intake (g/day)				
week 1	5.1±0.5	4.9±0.4	4.5±0.5	4.6±0.2
week 2	5.8±0.3	5.4±1.1	5.0±0.7	5.9±1.2
week 3	6.1±0.4	5.1±0.2	5.1±0.6	5.2±1.0
Daily water intake (g/day)				
week 1	11.9±1.3	11.9±0.5	9.3±0.5	8.5±1.1
week 2	15.9±0.8	12.9±3.3	11.4±1.4	10.3±1.5 *
week 3	18.4±2.8	14.1±2.9	10.2±1.6 *	10.0±1.6 *

Table 7 showed the effects of GF on daily food and water intake in HFD+STZ-diabetic mice. The daily food and water intake were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means ±S.E.M. of 3-5 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

給食量には対して、水と山梔子エキス投与群の間に有意な差がなかった。しかし、水摂取量に対しては、山梔子エキスが 1000 mg/kg 投与量で投与 2 週間後から、500 mg/kg 投与量で投与 3 週間後に、水対照群より、有意に減少した。以上から、山梔子エキスの 3 週間連続経口投与は HFD+STZ-糖尿病態マウスの給食量に影響せず、飲水量を減少させた。

4.5.3. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による血糖値、血清インスリン値、血清や肝臓のトリグリセリド値とコレステロール値に対する影響

HFD+STZ-糖尿病態マウスに、水あるいは山梔子エキス（300、500と1000 mg/kg）を経口投与し、投与前と投与1、2、3週間後において、血糖値変化を調べた (Figure 21)。

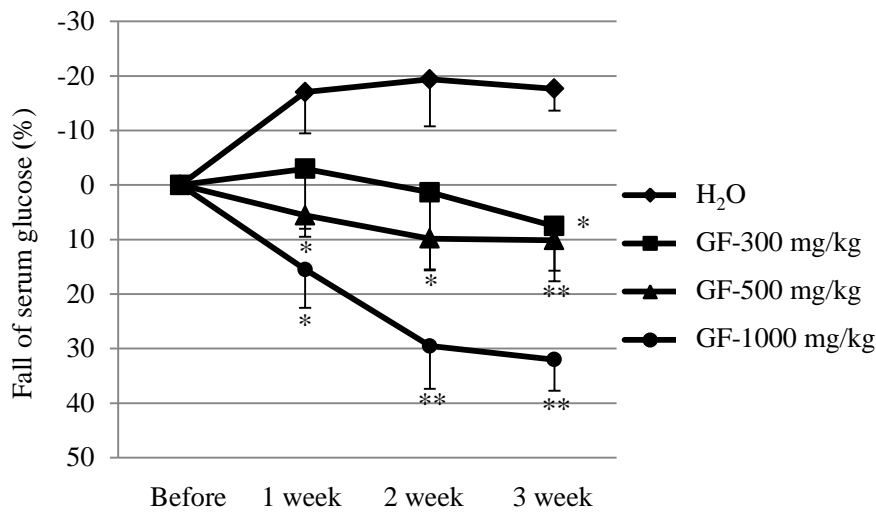


Figure 21. Effects of GF on serum glucose levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum glucose levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-5 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの水対照群の血糖値は水投与後、経時変化により高値を維持したが、山梔子エキスは投与用量と投与時間に依存的に血糖降下作用を示した。投与1週間後、山梔子エキス500 mg/kgでは約6%、1000 mg/kgでは約15%有意に血糖値を減少させた。この血糖降下作用は投与3週間後にさらに増強され、300 mg/kgの投与量では約8%、500 mg/kgでは約10%、1000 mg/kgでは約32%降下させた。

山梔子エキス(300-1000 mg/kg) 3 週間連続経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清インスリン量変化に対する影響を調べた (Figure 22)。

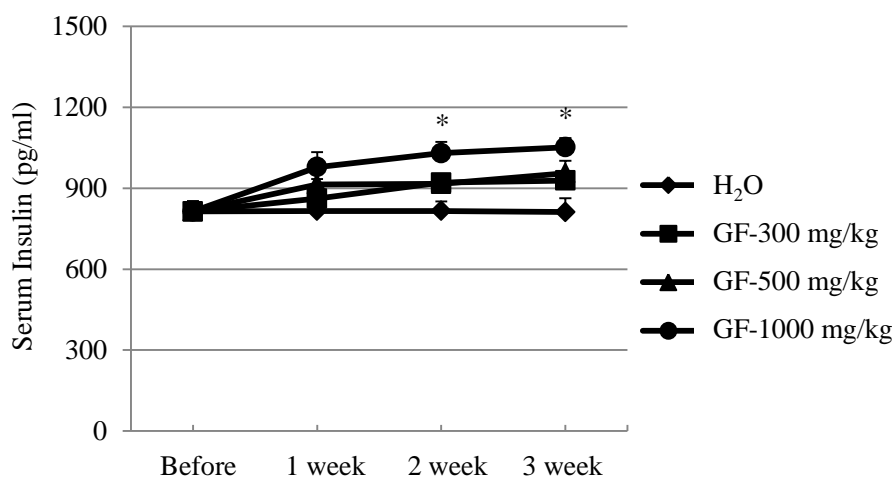


Figure 22. Effects of GF on serum insulin levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum insulin levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-6 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清インスリン値は正常マウスより有意に減少していた (Table 5)。山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群の血清インスリン値変化は、投与 2 週間後から水対照群と比べて有意な増加が認められ、投与 3 週間後には、さらに 1050 pg/ml まで上昇させた。山梔子エキス 300 と 500 mg/kg 投与群は水対照群と比べて有意ではなかったが増加傾向を示した。

HFD+STZ-糖尿病態マウスを用いて、水あるいは山梔子エキス (300-1000 mg/kg) を3週間連続経口投与し、血清トリグリセリド値とコレステロール値を測定した (Figures 23, 24)。

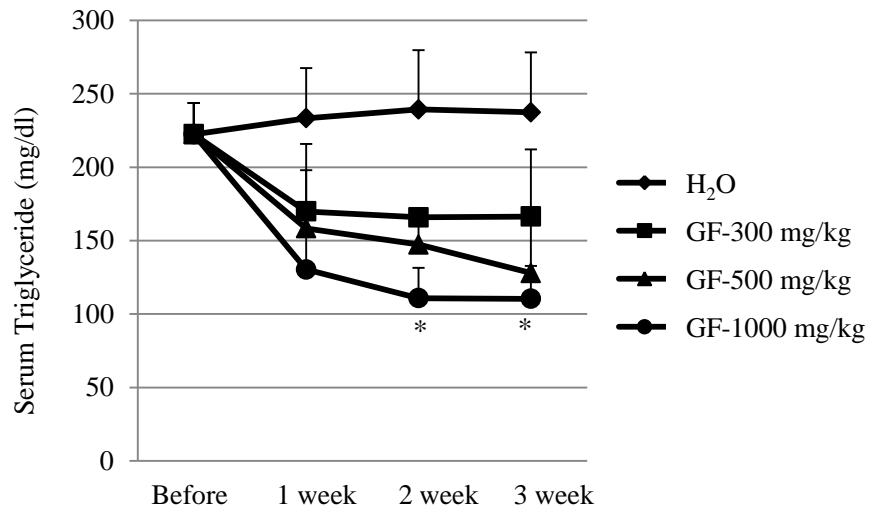


Figure 23. Effects of GF on serum triglyceride levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum triglyceride levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-7 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

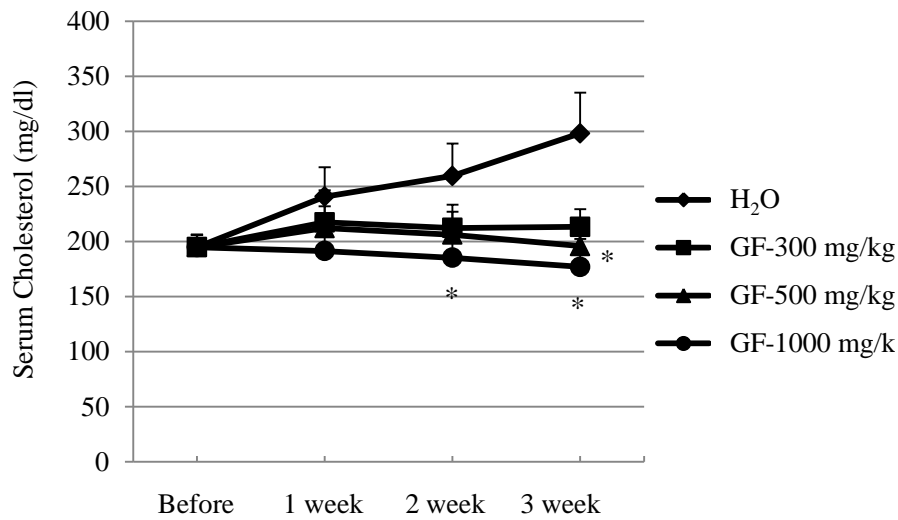


Figure 24. Effects of GF on serum cholesterol levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum triglyceride levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 4-5 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの水対照群は、測定期間中高い血清トリグリセリド値とコレステロール値を維持していた (Figures 23, 24)。山梔子エキスは投与量依存的な HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清トリグリセリド値の減少傾向を示し、1000 mg/kg 投与群は、投与 2 週間後から有意な降下作用を示した。山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群は投与 2 週間後から HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清コレステロール値に対して有意な降下作用を示した。この降下作用は投与 3 週間後まで維持された。500 mg/kg 投与群も投与 3 週間後有意な降下作用を示した。以上から、山梔子エキスは HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清トリグリセリドとコレステロール値に対して改善作用を示した。

さらに、水あるいは山梔子エキス (300-1000 mg/kg) を3週間連続経口投与した HFD+STZ-糖尿病態マウスを用いて、Folch 法により肝臓脂質を抽出し、肝臓中のトリグリセリドとコレステロール含量を測定した (Figures 25, 26)。

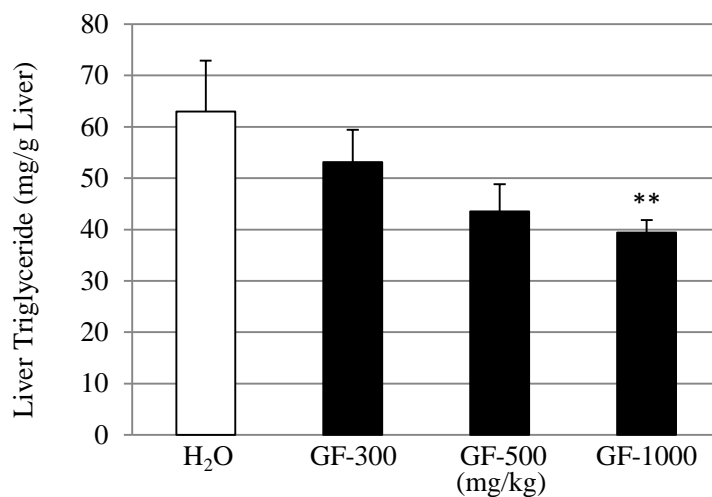


Figure 25. Effects of GF on liver triglyceride levels in HFD+STZ-diabetic mice. Liver triglyceride levels were measured before and 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-10 data. ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

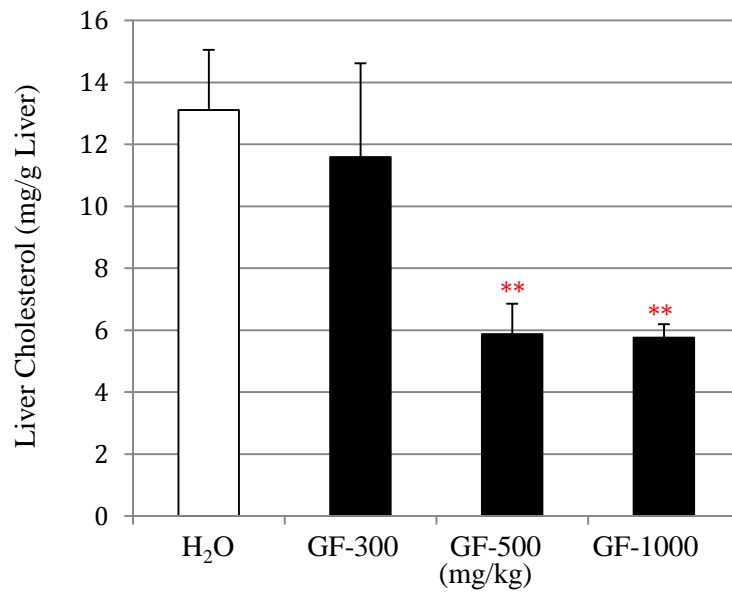


Figure 26. Effects of GF on liver cholesterol levels in HFD+STZ-diabetic mice. Liver cholesterol levels were measured before and 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-6 data. ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group.

山梔子エキスは、HFD+STZ-糖尿病態マウスの肝臓トリグリセリド値とコレステロール値を用量依存的に低下させた。山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群は肝臓トリグリセリド値を有意に減少させた。山梔子エキス 500-1000 mg/kg 投与群は肝臓コレステロール値を有意に減少させた。以上から、山梔子エキス 3 週間連続経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの肝臓の脂質代謝の改善効果を確認した。山梔子エキスのコレステロール値に対する効果はトリグリセリド値に対する効果より大きいことがわかった。

4.5.4. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織重量と脂肪細胞面積に対する影響

山梔子エキス 1000 mg/kg は HFD+STZ-糖尿病態マウスの体重増加や高血糖値、低インスリン値、血清と肝臓の高トリグリセリドと高コレステロール値を改善することを既に報告した。そこで山梔子エキス 1000 mg/kg を用いて3週間経口投与により HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織の重量 (**Table 8**) と細胞面積 (**Figure 27**) に対する効果を検討した。

Table 8. The weights of subcutaneous and epididymal adipose tissues

	Before	3 weeks	
		H ₂ O	GF
Subcutaneous adipose tissue (g)	1.4 ±0.2	1.6 ±0.4	1.4 ±0.1
Epididymal adipose tissue (g)	1.0 ±0.1	1.4 ±0.2	1.1 ±0.1

Table 8 showed the effects of GF on weights of subcutaneous and epididymal adipose tissues in HFD+STZ -diabetic mice. The weights of subcutaneous and epididymal adipose tissues were measured before and 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means ± S.E.M. of 3-7 data.

Table 8 で示したように、山梔子エキス 1000 mg/kg 投与量は、3週間経口投与しても HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下脂肪組織重量や内臓脂肪組織重量に有意な効果を示さなかった。

皮下

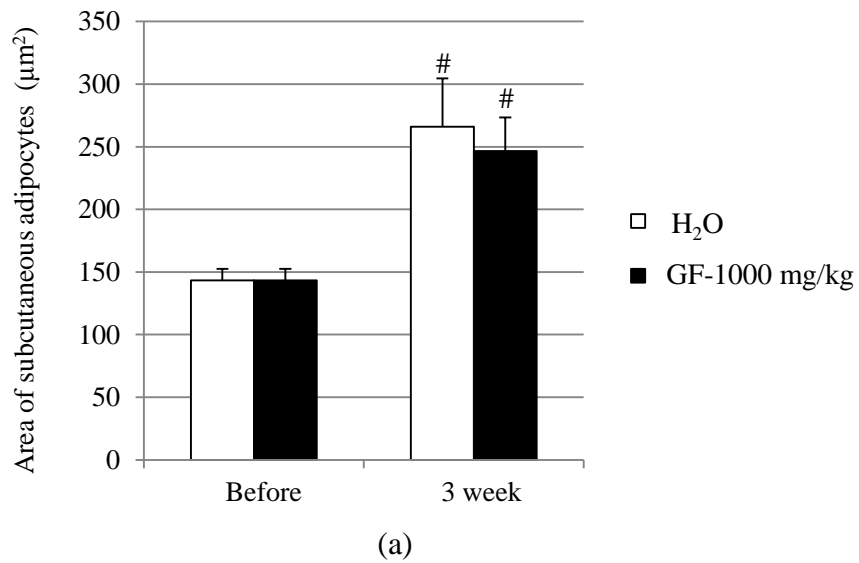


Figure 27 (a). Effects of GF on the area of subcutaneous adipocytes in HFD+STZ-diabetic mice. The area of subcutaneous and epididymal adipocytes were measured before and 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-8 data. [#] $P < 0.05$: Significantly different from un-treatment.

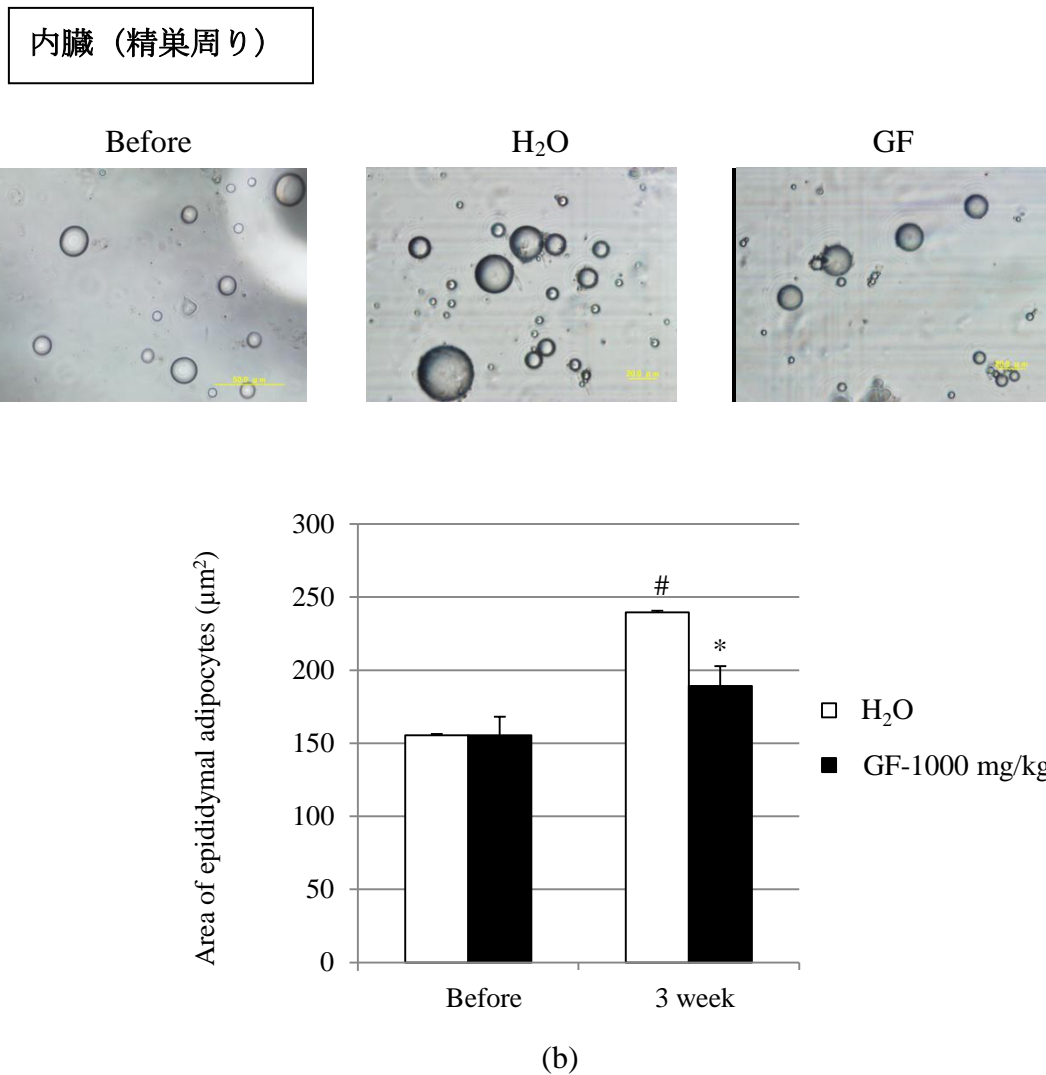


Figure 27 (b). Effects of GF on the area of epididymal adipocytes in HFD+STZ-diabetic mice. The area of subcutaneous and epididymal adipocytes were measured before and 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5-8 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group. # $P < 0.05$: Significantly different from un-treatment.

STZ 投与後、高脂肪食を 3 週間連続投与すると、HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下脂肪細胞と内臓 (精巣周り) 脂肪細胞の面積が共に有意に増加した (Figures 27 (a, b))。山梔子エキス投与群の皮下脂肪細胞面積は水投与群と比べて減少傾向を示したが、有意差が見られなかった (Figure 27 (a))。他方、山梔子エキス投与群の内臓脂肪細胞面積は水投与群と比べて、有意な減少作用が見られた (Figure

27 (b))。これらの結果から、**HFD+STZ-糖尿病態マウス**は経日的に内臓脂肪細胞と皮下脂肪細胞の肥大化を引き起こすことを見出した。山梶子エキスは、**HFD+STZ-糖尿病態マウス**において内臓脂肪細胞面積を強力に減少させたことから、**メタボリックシンドローム型肥満**を伴う糖尿病に改善効果があると考えられた。

4.5.5. 考察

近年、高脂肪食と STZ 単回投与により作製された糖尿病態マウスが、ヒト肥満 II 型糖尿病に類似した糖尿病態モデルマウスとして頻用されている⁽²⁾。高脂肪食は肥満やインスリン抵抗性などを引き起こし、更に STZ 投与はインスリン分泌を障害して高血糖値を誘発する。このモデルマウスはヒト肥満型 II 型糖尿病に類似した糖代謝異常やインスリン分泌障害、インスリン抵抗性、肥満などの表現型を示した。HFD+STZ-糖尿病態マウスでは非肥満型の STZ-糖尿病態マウスと比較して、体重や血清インスリン値、HOMA-IR 値が増加したことから、肥満型 HFD+STZ-糖尿病態マウスは STZ-糖尿病態マウスよりインスリン抵抗性が高いことが示された。両糖尿病態モデルとも高血清トリグリセリド値とコレステロール値を示し、同程度の脂質代謝異常を現した。また、HFD+STZ-糖尿病態マウスは、同週齢の正常マウスより皮下脂肪組織重量や内臓（精巣周り）脂肪組織重量を有意に増加させたことから、このインスリン抵抗性は肥大化脂肪組織と関連することが考えられた。

山梔子エキスは 3 週間連日経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの給食量に影響せず、飲水量を減少させた。また山梔子エキスは、高血糖値を減少させ、低インスリン値を増加したので、多飲や多尿といった糖尿病態マウスの典型的症状が消失されたと考えられる。また、山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群は投与 2 週目から、水対照群と比べて有意にインスリン遊離を促進した。このことから、山梔子エキスは 3 週間投与により膵臓の保護作用がある可能性が考えられた。しかし、山梔子エキス 500 と 1000 mg/kg 投与群は投与 1 週目から有意な血糖降下作用が認められた。この血糖降下作用の経時変化はインスリン分泌促進作用の経時変化より早かったことから、山梔子エキスの初期血糖降下作用はインスリン分泌促進を介さず、インスリン作用の増強やインスリン抵抗性の改善作用に帰因すると考えられた。この考察は STZ-糖尿病態マウスにおける腹腔内単回投与の結果と同様であった。

HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいて、山梔子エキス 1000 mg/kg は投与 2 週目から、水対照群と比べて有意に血清トリグリセリド値とコレステロール値を減少させた。また、山梔子エキス 1000 mg/kg は肝臓トリグリセリド値に対しても有意な減少作用を示したが、山梔子エキスは 500 mg/kg から肝臓コレステロール

値に対して、水対照群と比べて有意な低下作用を認めた。このことから、STZ-糖尿病態マウスと HFD+STZ-糖尿病態マウスのいずれにおいても、血清や肝臓コレステロール値に対する山梔子エキスの減少作用はトリグリセリド値に対する減少作用よりも強力であった。

II型糖尿病の患者数は爆発的に増加しているが、その背景には、生活習慣の欧米化による過食、脂肪摂取増加と活動量の低下、肥満などが大きく関与すると指摘されている。発症に関与する重要な環境因子として、食事エネルギー過剰摂取（とくに脂肪過剰摂取）や運動不足、肥満が上げられる。このような環境因子は、おもにインスリン抵抗性の増大と関連している。HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいてもインスリン抵抗性と肥大化脂肪組織との間の関連性が考えられた。脂肪組織は白色と褐色脂肪組織に分けられる。従来、白色脂肪組織は過剰なエネルギーを中性脂肪として蓄積し、栄養欠乏時にエネルギー源として放出している。褐色脂肪組織はエネルギーを消費する。近年、白色脂肪組織は、余剰エネルギーを中性脂肪として貯蔵する単なるエネルギー貯蔵臓器としてだけでなく、サイトカインと総称される生理活性物質を活発に産生、分泌する生体内で最大の内分泌臓器として色々な生命現象に関わることが明らかになってきた⁽⁶⁵⁾。白色脂肪組織は皮下と内臓脂肪組織に分けられ、過栄養状態で脂肪細胞は肥大と増殖の形態で中性脂肪を蓄積する。内臓脂肪は肥大化しやすい性質をもっている。メタボリックシンドローム型肥満の病因には、皮下脂肪組織より内臓脂肪組織が重要な働きをしているとされている。山梔子エキス 1000 mg/kg を3週間連続経口投与すると、HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下と内臓脂肪組織重量に影響しないが、内臓脂肪細胞の面積を有意に減少させた。以上のことから、山梔子エキスの糖尿病態パラメーター改善作用は、内臓脂肪細胞の肥大化抑制作用に強く関与することが明らかになった。

肥大化した内臓脂肪組織から放出される遊離脂肪酸やサイトカインは、他の末梢組織に直接作用することによりインスリン抵抗性や耐糖能異常、脂質代謝異常に関与する。サイトカインには善玉サイトカインとしてアディポネクチンやレプチンが、悪玉サイトカインとして TNF- α や遊離脂肪酸などが上げられる。肥大化脂肪細胞において認められるサイトカイン産生調節異常には、肥大化に伴う酸化ストレス増加や、小胞体ストレス、低酸素性ストレス、マクロファ-

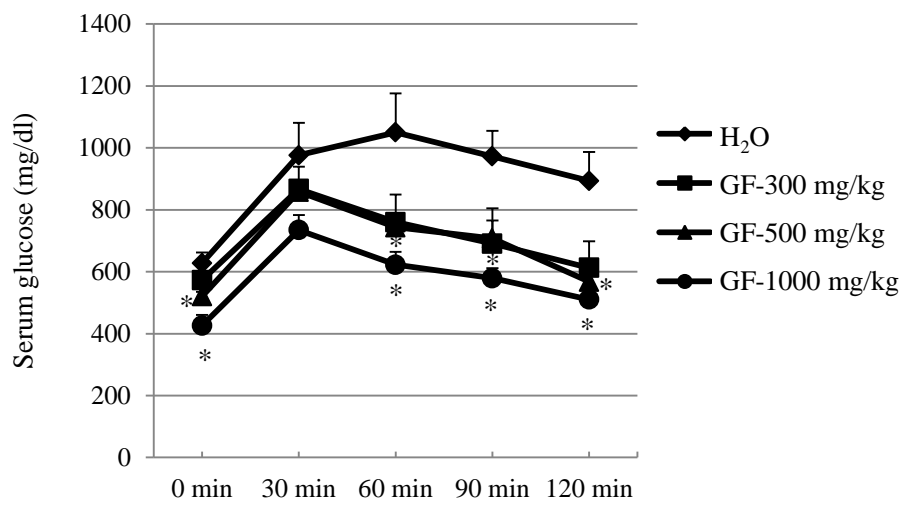
ジの浸潤の寄与が指摘されている⁽⁶⁶⁾。なんらかの刺激によって、生体の恒常性の乱れを引き起こす反応をストレスと呼ぶ。そしてストレスを引き起こす要因がストレッサーであり、ROS がストレッサーとなって、酸化反応と還元反応のバランスが崩れ、前者に傾いた状態になることを「酸化ストレス」と呼んでいる⁽⁶⁷⁾。ROS によって TNF- α や IL-6、単球走化性蛋白質 (MCP)-1 などの炎症惹起性の悪性サイトカインの発現は上昇し、レプチン抵抗性とアディポネクチンの産生抑制による、インスリン抵抗性を引き起こす⁽⁶⁶⁾。慢性高血糖は酸化ストレスを引き出すので、非肥満タイプ STZ-糖尿病態マウスのインスリン抵抗性の原因も酸化ストレスによるサイトカイン調節異常であると考えられた。

以上のように、山梔子エキスのインスリン抵抗性改善作用機序に山梔子によるサイトカインの調節機序が関与する可能性を考えた。そして、HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの血糖降下機序を解明するために、山梔子エキスによるインスリン抵抗性を引き起こすサイトカインに対する影響を次に検討した。

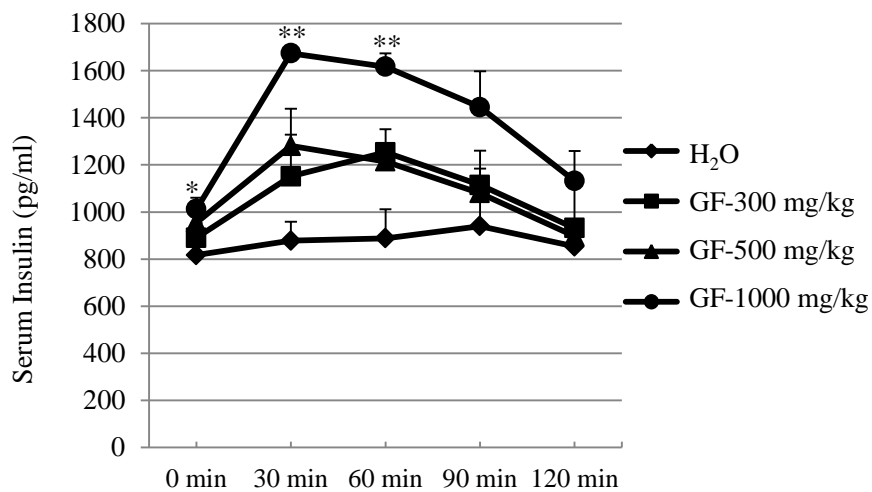
4.6. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの血糖降下機序

4.6.1. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による糖負荷に対する影響

HFD+STZ-糖尿病態マウスの耐糖能を検討するために、水あるいは山梔子エキス (300-1000 mg/kg) を3週間投与したHFD+STZ-糖尿病態マウスを一晩絶食し、1.5 g/kg グルコースを負荷してから経時的に採血して、血糖値 (**Figure 28 (a)**) と血清インスリン (**Figure 28 (b)**) 値の経時変化を測定した。



(a)



(b)

Figure 28. Effects of 3 week-treated GF or H₂O on serum glucose levels (a) and serum insulin levels (b) in HFD+STZ-diabetic mice after loading a bolus of glucose. After overnight fasting, a bolus of glucose (1.5 g/kg) was intraperitoneally injected into HFD+STZ-diabetic mice. Blood was collected sequentially from the neck vein at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 min. Values represent means \pm S.E.M. of 3-4 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from H₂O-treated control group.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの水対照群の血糖値は投与前の 628 mg/dl から、グルコース (1.5 g/kg) を負荷した 30 分後に 876mg/dl まで上昇し、60 分後に、1046 mg/dl に達した。以降の血糖値はプラトーを維持して、有意な血糖降下作用がなかった。山梔子エキス (300-1000 mg/kg) 投与群の血糖値はグルコース (1.5 g/kg) を負荷した 30 分後に、時間依存的に降下した (**Figure 28 (a)**)。山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群では、グルコース負荷された 30 分後に、血糖値が 715 mg/dl まで上がってから、すぐに下がり、120 分後には 490 mg/dl まで減少し、31% の血糖降下作用を示した。山梔子エキス 300 と 500 mg/kg 投与群でもグルコースを負荷してから、血糖値はほぼ投与前と同じレベルに下がった。一方、HFD+STZ-糖尿病態マウスの水対照群では、グルコース負荷された 30 分後の血清インスリン値に有意な変化が認められなかった。山梔子エキス 1000 mg/kg 投与群の糖負荷された 30 分後の血清インスリン値は高くなって、水対照群と比べて有意に増加した (**Figure 28 (b)**)。山梔子エキスは外来性のグルコースで負荷された HFD+STZ-糖尿病態マウスの血糖値コントロールを改善し、インスリン分泌を促進した。

4.6.2. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与によるHOMA-IR値に対する影響

HFD+STZ-糖尿病態マウスのインスリン抵抗性を示すHOMA-IR値は同週齢の正常マウスより有意に高かった (Table 5)。この高いHOMA-IR値に対して山梔子エキスの効果を検討した (Figure 29)。

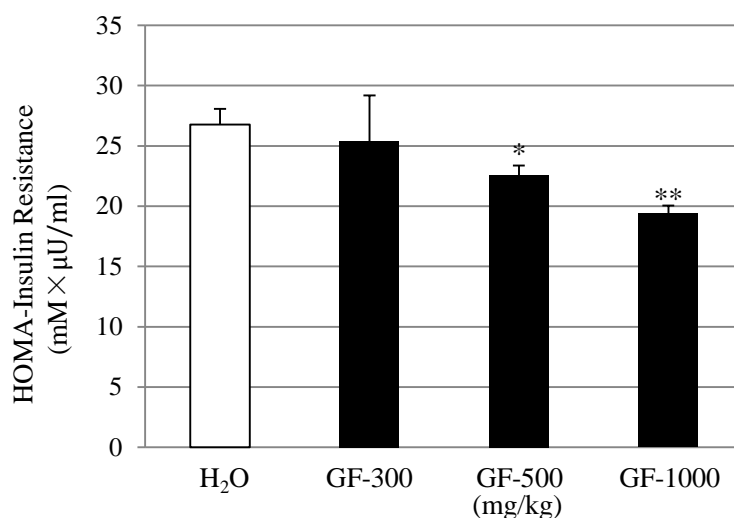


Figure 29. Effects of GF on HOMA-IR in HFD+STZ-diabetic mice. HOMA-IR was calculated from glucose (mg/dl) and insulin (μ U/ml) levels, using the following formula: $\text{HOMA} = \text{fasting glucose (mg/dl)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{U/ml}) / 405$. Values represent means \pm S.E.M. of 3-5 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from H₂O control group.

HFD+STZ-糖尿病態マウスのHOMA-IR値は、山梔子エキス濃度依存的に減少した。水対照群と比べて、山梔子エキス500と1000 mg/kgの投与量では有意にHFD+STZ-糖尿病態マウスのHOMA-IR値を18%と30%低下させた。山梔子エキスはSTZ-糖尿病態マウスと同様に、HFD+STZ-糖尿病態マウスのインスリン抵抗性を改善することを明らかにした。

4.6.3. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与によるインスリン負荷に対する影響

山梔子エキス 1000 mg/kg は糖負荷された後、有意に血糖降下作用とインスリン分泌促進作用を示した。そこで、1000 mg/kg 山梔子エキス 3 週間投与の条件を用いて、 0.63×10^5 、 0.63×10^6 、 0.63×10^7 pg/kg インスリン負荷された後の血糖降下作用を検討した (Figure 30)。 0.63×10^5 、 0.63×10^6 、 0.63×10^7 pg/kg インスリンを用量として選んだ理由は、山梔子エキス 1000 mg/kg 連続経口投与 3 週間後の HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清インスリン量が 0.63×10^5 pg/kg であったため、さらに、投与量依存的に 10 倍と 100 倍の高い投与量も一緒に負荷して、血糖値に与える影響を検討した。

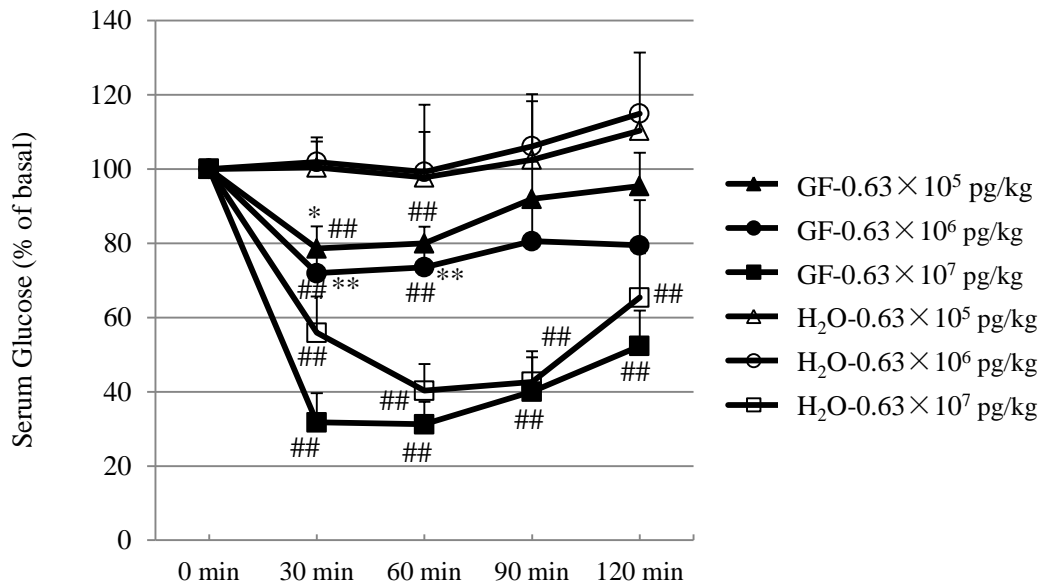


Figure 30. Effects of 3 week-treated GF or H₂O on serum glucose levels in HFD+STZ-diabetic mice after loading of the insulin under the different conditions of 1. 0.63×10^5 pg/ml (serum insulin level after 3 weeks treated with GF in HFD+STZ-diabetic mice); 2. 0.63×10^6 pg/ml (10 times-greater than serum insulin level after 3 weeks treated with GF in HFD+STZ-diabetic mice); 3. 0.63×10^7 pg/ml (100 times-greater than serum insulin level after 3 weeks treated with GF in HFD+STZ-diabetic mice). After loading of insulin, blood was collected sequentially from the neck vein at intervals of 0, 30, 60, 90 and 120 min. Values represent means \pm S.E.M. of 5 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from corresponding H₂O control group. ## $P < 0.01$: Significantly different from 0 min.

水対照群に 0.63×10^5 pg/kg と 10 倍 0.63×10^6 pg/kg インスリン負荷した後 120 分までの処置時間には、血糖値の有意な変化がなかった。ただ 0.63×10^7 pg/kg と高用量のインスリンを投与した群のみ、負荷された後 30 分から負荷前より有意な血糖降下作用が認められた。したがって、HFD+STZ-糖尿病態マウスではインスリン抵抗性が存在することが示唆された。

水対照群と違って、山梔子エキス投与群の HFD+STZ-糖尿病態マウスでは、インスリン負荷された 30 分後にインスリン濃度依存的に血糖降下作用が認められた。 0.63×10^5 pg/kg インスリン負荷された群では、血糖値は 22 % 減少し、水対照と比べても有意な血糖降下作用が認められた。10 倍と 100 倍高い用量のインスリン負荷された群では、さらに 29 %、68 % 強く血糖降下作用をが認められた。この血糖降下作用は処置後 120 分間維持された。山梔子エキス 1000 mg/kg、3 週間経口投与した HFD+STZ-糖尿病態マウスでは、インスリン抵抗性が改善した。

4.6.4. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による血清 TNF- α 値、レプチン値と遊離脂肪酸値に対する影響

TNF- α 、レプチンと遊離脂肪酸の分泌異常はインスリン抵抗性の発症に強く関連する因子であることが知られている。そこで、まず、HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける TNF- α 、レプチンと遊離脂肪酸の血清中の量的変動を同週齢正常マウスと比較した (Table 9)。

Table 9. The different characteristics between normal mice and HFD+STZ diabetic mice

	Normal	HFD+STZ
Serum TNF- α (pg/ml)	22.9 \pm 2.4	142.2 \pm 4.5 **
Serum leptin (ng/ml)	1.6 \pm 0.3	3.7 \pm 0.7 *
Serum FFA (nmol/ μ l)	0.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1 *

Table 9 showed the levels of serum TNF- α , leptin and FFA in HFD+STZ-diabetic and age-matched normal mice. Values represent means \pm S.E.M. of 3 data (normal mice) and 16 data (HFD+STZ-diabetic mice). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from normal mice.

HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清 TNF- α 、レプチンと遊離脂肪酸値は、正常マウスに比べ有意に増加した。血清 TNF- α 値は約 6.2 倍、レプチン値は約 2.3 倍、遊離脂肪酸値は約 2.3 倍上がった。HFD+STZ-糖尿病態マウスはサイトカイン分泌異常を示した。山梔子エキスによるインスリン抵抗性の改善作用はこれらのサイトカインの分泌改善に関与する可能性があると考えられた。そして、この異常な血清 TNF- α 、レプチンと遊離脂肪酸値に対する山梔子エキス 1000 mg/kg 投与量での3週間連続経口投与による効果を検討した (Figures 31, 32, 33)。

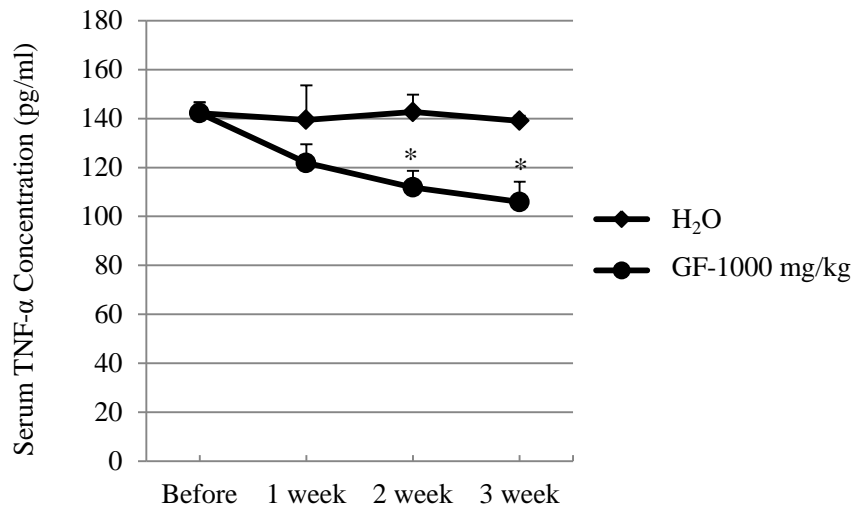


Figure 31. Effects of GF on serum TNF- α levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum TNF- α levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 4-6 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group.

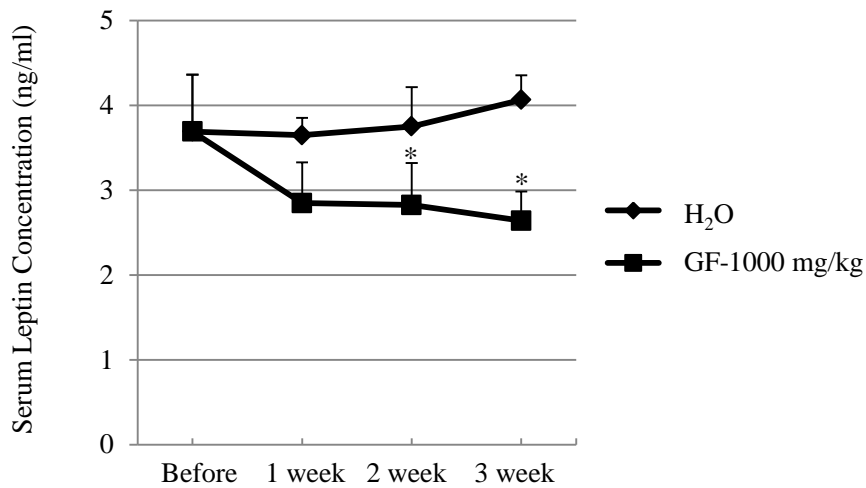


Figure 32. Effects of GF on serum leptin levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum leptin levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 5 data. **P* < 0.05: Significantly different from control H₂O group.

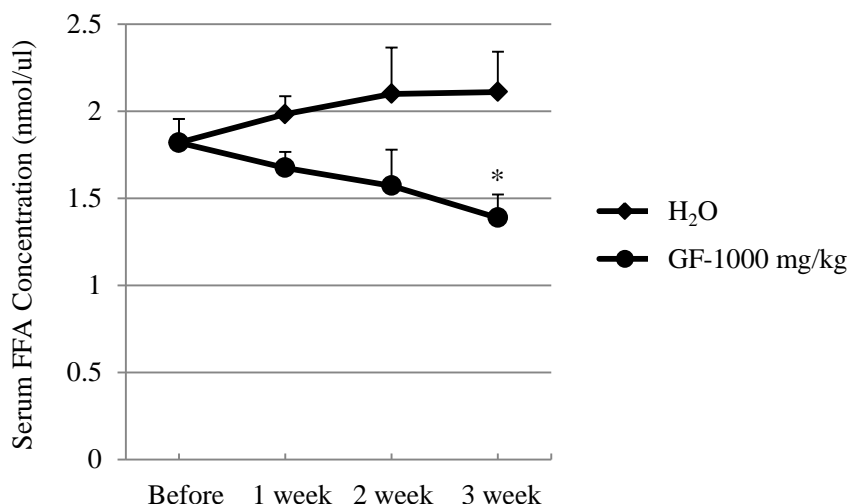


Figure 33. Effects of GF on serum FFA levels in HFD+STZ-diabetic mice. Serum FFA levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-5 data. **P* < 0.05: Significantly different from control H₂O group.

水あるいは山梔子エキス (1000 mg/kg) 3 週間連続経口投与した HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清 TNF- α 値を測定した (Figure 31)。水対照群の血清 TNF- α 値は水投与前のほとんど変化がなく、高いレベルを維持した。山梔子エキス投与群では投与 2 週目から、HFD+STZ-糖尿病態マウスの高血清 TNF- α 値を減少させ、水対照群と比べて、有意な降下作用が認められ、この降下作用は投与後 3 週間続いた。山梔子エキスは有意に HFD+STZ-糖尿病態マウスの高血清 TNF- α 値を減少させた。

高レプチン値はレプチン抵抗性のマーカーであり、インスリン抵抗性に伴って肥満型糖尿病患者によく見られる。HFD+STZ-糖尿病態マウスの高レプチン値

に対して、山梔子エキスの効果を検討した。水対照群の血清レプチン値は処置期間には高く維持されたが、山梔子エキス投与群は、水対照群と比べて、この高いレプチン値を有意に減少した (**Figure 32**)。

HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清遊離脂肪酸値は正常マウスよりも上昇し、この高い血清遊離脂肪酸値に対して、山梔子エキス 1000 mg/kg の投与量で3週間連続投与後の水対照群の血清遊離脂肪酸値を比較すると、有意な低下が認められた (**Figure 33**)。山梔子エキス (1000 mg/kg) の3週間連続投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの TNF- α 値、レプチン値と遊離脂肪酸値の分泌異常が改善した。山梔子による血清 TNF- α 値とレプチン値の変化は遊離脂肪酸値の変化より早くから経時的に生じた。山梔子エキスのインスリン抵抗性の改善による血糖降下作用は、血清 TNF- α 値とレプチン値の減少に強く関連があると示唆された。

4.6.5. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおける山梔子エキスの3週間経口投与による皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離された TNF- α 値、レプチン値と遊離脂肪酸値に対する影響

脂肪組織はサイトカインの分泌調節を介して、インスリン感受性や、脂質代謝の異常などを引き起こす。山梔子エキス (1000 mg/kg) 投与により血清 TNF- α 値やレプチン値、遊離脂肪酸値を減少させた。この減少原因を解析するために、水あるいは山梔子エキス (1000 mg/kg) 投与した HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下と内臓（精巣周り）の脂肪組織を摘出し、遊離された TNF- α 、レプチンと遊離脂肪酸値の量を測定した (Figures 34, 35, 36)。

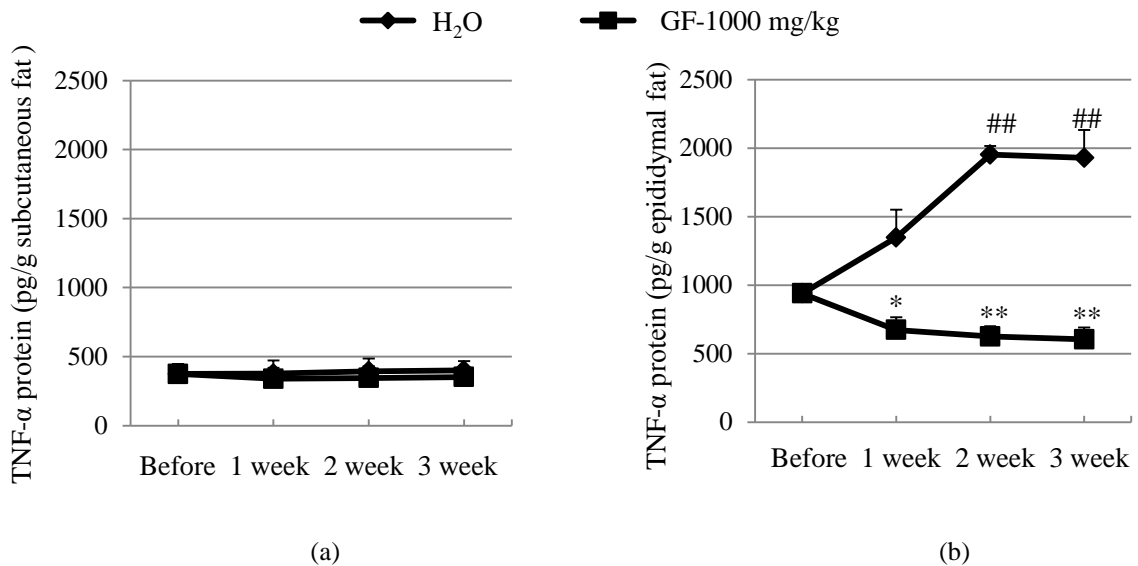


Figure 34. Effects of GF on TNF- α secretion from subcutaneous and epididymal adipose tissues in HFD+STZ-diabetic mice. TNF- α levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. a: TNF- α secretion from subcutaneous adipose tissue; b: TNF- α secretion from epididymal adipose tissue. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-7 data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: Significantly different from control H₂O group. ## $P < 0.01$: Significantly different from un-treatment.

水あるいは山梔子エキス (1000 mg/kg) の3週間連続経口投与は、HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下脂肪組織から遊離された TNF- α 量に有意な変化を示さなかった。一方、HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離

された TNF- α 値は、皮下脂肪組織より約 2.5 倍多かった。この内臓 (精巣周り) 脂肪組織から大量に遊離された TNF- α に対して、山梔子エキス 1 週間投与群の精巣周り脂肪組織 (1 g 当たり) 遊離された TNF- α 値は、水対照群の値と比べて約 1/2 と有意な減少作用が認められた。山梔子エキスの強い TNF- α 遊離抑制作用は投与 3 週間後まで続き、内臓 (精巣周り) 脂肪組織から遊離された TNF- α 値 604.2 ± 87.9 (pg/g) まで減少し、水対照群の 1929.4 ± 204.1 (pg/g) に対して約 1/3 に減少した。山梔子エキスは HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓 (精巣周り) 脂肪組織から遊離された TNF- α 値を減少させた。この減少作用が、山梔子エキス投与した HFD+STZ-糖尿病態マウスの血清 TNF- α 値が低くなった要因と考えられた。

HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離されたレプチン値に対する、山梔子エキス（1000 mg/kg）の影響を調べた（Figure 35）。

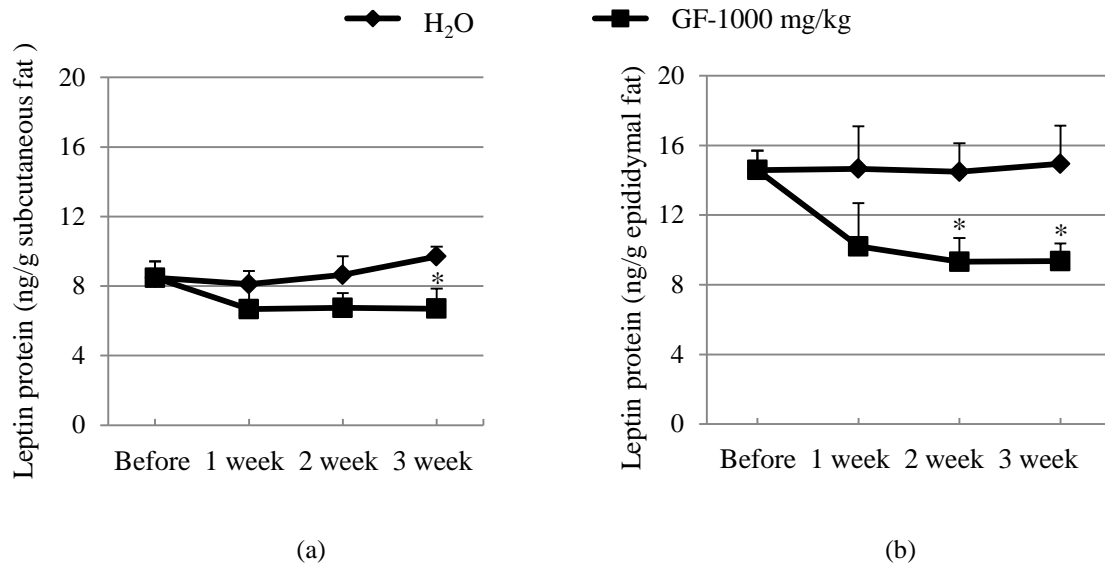


Figure 35. Effects of GF on leptin secretions from subcutaneous and epididymal adipose tissues in HFD+STZ-diabetic mice. Leptin levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. a: leptin secretion from subcutaneous adipose tissue; b: leptin secretion from epididymal adipose tissue. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3-5 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group. # $P < 0.05$: Significantly different from un-treatment.

水対照群の皮下脂肪組織から遊離されたレプチン値は処置時間により増加傾向を示した。山梔子エキス 3 週間経口投与により HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下脂肪組織から遊離されたレプチン値は水対照群と比べて、約 1.4 倍減少し、内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離されたレプチン値は皮下脂肪組織から遊離されたレプチン値より約 1.7 倍高くなった。山梔子エキス投与 1 週目から HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離されたレプチン値は減少傾向を示した。投与 2 週目からは有意な減少が認められた。水対照群と比べても有意な低下作用を示した。山梔子エキスのこの内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離されたレプチン値の減少作用は投与 3 週間まで維持して、水対照と比べて、約 40% 減少させた。

皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離された遊離脂肪酸値に対する山梔子エキスの効果を調べた(**Figure 36**)。

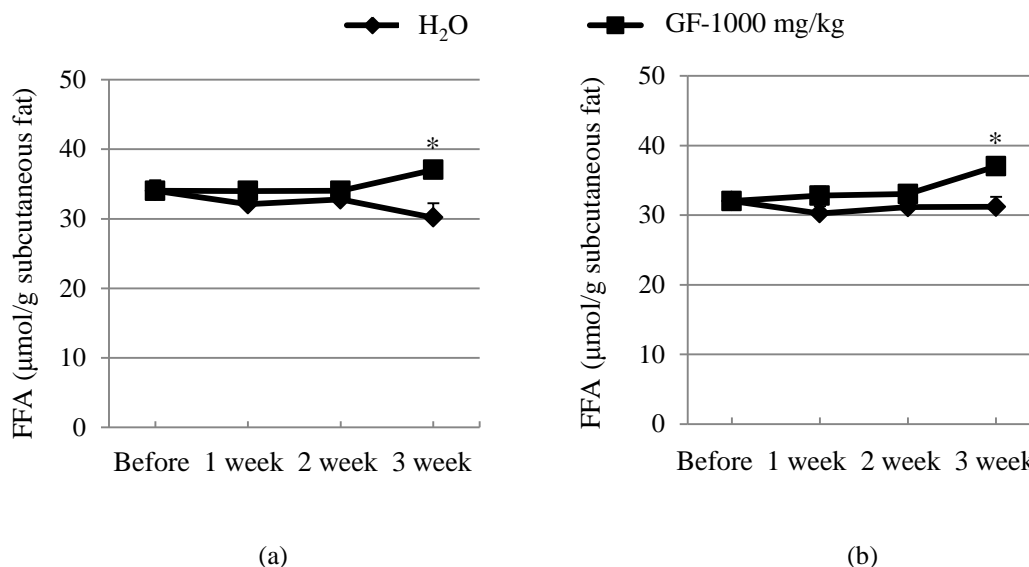


Figure 36. Effects of GF on FFA secretions from subcutaneous and epididymal adipose tissues in HFD+STZ-diabetic mice. FFA levels were measured before and 1, 2, 3 weeks after treated with H₂O or GF in HFD+STZ-diabetic mice. a: FFA secretion from subcutaneous adipose tissue; b: FFA secretion from epididymal adipose tissue. The values are expressed as means \pm S.E.M. of 3 data. * $P < 0.05$: Significantly different from control H₂O group. # $P < 0.05$: Significantly different from un-treatment.

Figure 36 で示したように、処置 3 週間では、水対照群の皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離された遊離脂肪酸値の有意な変化は認められなかった。水対照群と比べて、山梔子エキス 3 週間投与により、皮下と内臓（精巣周り）脂肪組織から遊離された遊離脂肪酸値は水対照群と比べて、両方とも有意に高くなった。山梔子エキスは脂肪組織から遊離脂肪酸の分泌を促進することが示唆された。しかし、血清の遊離脂肪酸値は山梔子エキス 3 週間投与により、有意に減少した (**Figure 33**)。これらの結果から、山梔子エキスは脂肪組織から遊離脂肪酸の遊離を促進し、末梢組織に遊離脂肪酸の酸化も亢進することにより、血清中遊離脂肪酸値を減少することが示唆された。この作用はレプチン抵抗性の改善に関与する可能性がある。

4.6.6. 考察

山梔子エキスは3週間連日経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの耐糖能異常とインスリン抵抗性を改善させた。この結果はSTZ-糖尿病態マウスにおける腹腔内単回投与の結果と同様であったことから、肥満型糖尿病態マウスにおいても、山梔子エキスはインスリン抵抗性を改善する作用をもつことが裏付けられた。

HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいて、血清 TNF- α 値およびレプチン値、遊離脂肪酸値は同週齢の正常マウスと比較して有意に高値を示した。TNF- α はインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の病態に深く関与する因子として注目されている⁽⁶⁸⁾。 *In vivo* および *In vitro* 実験から、TNF- α の慢性投与によってインスリン抵抗性が惹起されることが示されている。反対に肥満糖尿病モデルラットに対して TNF- α の阻害抗体を投与するとインスリン感受性が改善する⁽⁶⁹⁾。具体的に、TNF- α のインスリンシグナルに対する作用として、IRS-1 がセリンリン酸化されることで、チロシンリン酸化を阻害され、インスリン受容体情報伝達系を抑制する。また、TNF- α はインスリン受容体、IRS-1、GLUT4 の発現も抑制し、インスリン抵抗性を誘導すると報告されている⁽⁷⁰⁾。HFD+STZ-糖尿病態マウスに発現するインスリン抵抗性には、TNF- α 値の増加が関与する可能性が示唆された。山梔子エキス投与による HFD+STZ-糖尿病態マウスの血糖降下作用と内臓脂肪組織から遊離された TNF- α 減少作用は、投与1週目から同時に誘導された。この結果から、糖尿病態モデルにおいて山梔子エキスのインスリン抵抗性の改善機序は、内臓(精巣周り)脂肪細胞からの TNF- α 遊離の抑制作用により、インスリン作用が増強することが関与していることが示唆された。また、TNF- α は脂肪組織において遊離脂肪酸と糖の取り込みも抑制し、脂肪細胞の分化も抑制する結果、血中遊離脂肪酸や糖の濃度が高くなり、脂肪組織は肥大化する⁽⁷¹⁾。山梔子エキス投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓(精巣周り)脂肪細胞の大きさを低下させたことから、山梔子エキスは TNF- α の分泌を減少させる作用を介して、脂肪細胞の分化を促進して、HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓脂肪細胞の小型化を促進する可能性があると考えられた。膵臓では、TNF- α は interleukin (IL)-1 β の作用を促進することが知られている。IL-1 β は膵臓 β 細胞を直接傷害する。山梔子エキス長期投与によるインスリン分泌促進作用は、TNF- α

の減少作用を介することと考えられた。防風通聖散は、8週間の投与により、肥満状態の糖尿病態マウスの血中 TNF- α の降下作用があると報告された⁽³³⁾。この TNF- α の降下作用は一つ構成生薬として、山梔子は重要な役割を分担することと裏付けた。

高脂肪食を摂取した実験動物の血中レプチン量が著明に増加し、このレプチン抵抗性がインスリン抵抗性を導く引き金になっている可能性も報告されている。視床下部ではレプチン受容体を介した摂食抑制と、交感神経を介したエネルギー消費のバランスを制御することによる全身の脂肪蓄積を制御している。肥満状態では、脂肪組織で大量のレプチン産生をしているが、レプチン感受性は低下しており、レプチン抵抗性状態である。レプチン抵抗性状態が進行すると、末梢組織への中性脂肪蓄積が増加し、インスリン感受性も増加する。また、TNF- α もレプチンの分泌を促進し、視床下部に作用してレプチンの作用も鈍化させ、レプチン抵抗性を亢進する⁽⁷²⁾。山梔子エキスは3週間連日経口投与により、皮下脂肪組織重量や内臓脂肪組織重量に殆んど影響せず、内臓脂肪組織から遊離される TNF- α 値やレプチン値を有意に減少した。内臓脂肪組織から遊離される TNF- α 量の減少作用は山梔子エキス投与1週目から認められ、レプチン量の減少は山梔子エキス投与2週目からであり、レプチン量の減少は TNF- α 量の減少より遅れて発現された。山梔子エキスは、HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓脂肪細胞からの TNF- α 遊離抑制によるレプチン抵抗性を改善することが考えられた。レプチン抵抗性の改善により、脂肪組織分解を促進し、脂肪組織局部に遊離された遊離脂肪酸を増加させた。一方で、レプチンは摂食抑制作用と独立して末梢の脂肪組織、骨格筋、肝臓への作用も有する。レプチンは脂肪組織や骨格筋、肝臓に直接的に作用して、脂肪酸の酸化を促進し、中性脂肪蓄積を抑制する作用をもつ^(73,74)。そして、視床下部のレプチン抵抗性改善による脂肪組織分解の促進と、末梢組織での直接的な遊離脂肪酸酸化の促進を介して、血中遊離脂肪酸を減少させ、脂肪細胞の肥大化を抑制したと考えられた。山梔子エキスの HFD+STZ-糖尿病態マウスの肝臓や血清中脂質改善作用の一部は、レプチン抵抗性の改善を介すると考えられた。山梔子エキスは3週間連日経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの内臓脂肪細胞からの TNF- α 遊離抑制によりレプチン抵抗性を改善し、インスリン抵抗性を改善するが明らかになった。

第5章 結論

1. 防風通聖散は、糖尿病態マウスの高血糖値および低インスリン値と高血清トリグリセリド値、高血清コレステロール値を用量依存的に改善させた。他方、経口糖尿病治療薬 Glibenclamide も、腹腔内投与により高血糖値および低インスリン値、高コレステロール値を改善した。このことから、防風通聖散の血糖降下作用と脂質代謝改善作用が裏付けられた。
2. 防風通聖散を構成している 6 グループの構成生薬エキスの中で、発表剤や解毒剤、解熱剤、中和剤が防風通聖散と同様に糖尿病態マウスの血糖降下作用を現したが、瀉下剤や利尿剤は高血糖値に影響しなかった。防風通聖散の血糖降下作用機序にはインスリン遊離を直接的に促進する作用機序と、インスリン遊離に関与しない機序があることを明らかにした。
3. 防風通聖散の血糖降下作用と脂質改善作用に役割を担っている山梔子エキスは、糖尿病態マウスの高血糖値および高血清トリグリセリド値、高血清コレステロール値を改善した。山梔子エキスの単回腹腔投与ではインスリン遊離に効果を示さなかった。山梔子エキスの血糖降下作用は、主成分 geniposide の作用により裏付けられた。しかし、単回腹腔投与では geniposide は高血清トリグリセリド値と高血清コレステロール値に対して改善効果を示さなかった。
4. 山梔子エキスはインスリン抵抗性を改善することによって、糖尿病態マウス血糖降下作用や耐糖能異常改善作用を導いた。その作用機序に骨格筋の Akt 活性化と細胞膜での GLUT4 発現量の増加が含まれていた。
5. 山梔子エキスは、糖尿病態マウスにおける TNF- α 遊離やレプチン遊離の抑制作用を介して、インスリン抵抗性を改善すると結論できた。

第6章 引用文献

1. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 100 (2010)
2. Kusakabe T, Tanioka H, Ebihara K, Hirata M, Miyamoto L, Miyanaga F, Hige H, Aotani D, Fujisawa T, Masuzaki H, Hosoda K, Nakao K.
Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet. *Diabetologia*, 52, 675-683 (2009)
3. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 117 (2010)
4. 矢崎 義雄. 内科学, 朝倉書店, 1179-1785 (2013)
5. Ingle DJ. The production of experimental glycosuria in the rat. *Recent Progress in Hormone Research*, 2, 229-253 (1948)
6. Bonner-Weir S, Trent DF, Honey RN, Weir GC. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 30, 64-69 (1981)
7. Gerritsen GC, Blanks MC. Characterization of Chinese hamsters by metabolic balance, glucose tolerance and insulin secretion. *Diabetologia*, 10, 493-499 (1974)
8. Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, 26, 100-112 (1977)
9. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153, 1127-1128 (1966)
10. Craighead JE. The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Progress in Medical Virology*, 19, 161-214 (1975)
11. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 114 (2010)
12. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 131 (2010)
13. Rerup C, Tarding F. Streptozotocin- and alloxan-diabetes in mice. *European Journal of Pharmacology*, 7, 89-96 (1969)
14. Movassat J, Portha B. Beta-cell growth in the neonatal Goto-Kakisaki rat and regeneration after treatment with streptozotocin at birth. *Diabetologia*, 42,

1098-1106 (1999)

15. Gokhale MS, Shah DH, Hakim Z, Santani DD, Goyal RK. Effect of chronic treatment with amlodipine in non-insulin-dependent diabetic rats. *Pharmacological Research*, 37, 455-459 (1998)
16. Nakashima N, Kimura I, Kimura M, Matsuura H. Isolation of pseudoprototimosaponin AIII from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Natural Products*, 56, 345-350 (1993)
17. Pel éTounian A, Wang X, Rondu F, Lamouri A, Touboul E, Marc S, Dokhan R, Pfeiffer B, Manechez D, Renard P, Guardiola-Lemaître B, Godfroid JJ, P énicaud L, Ktorza A. Potent antihyperglycaemic property of a new imidazoline derivative S-22068 (PMS 847) in a rat model of NIDDM. *British Journal of Pharmacology*, 124, 1591-1596 (1998)
18. 陳 福君, 中島 登, 木村 正康, 木村 郁子. 桑白皮及び桑葉によるストレプトゾトシン糖尿病態マウスの絶食、摂食時における血糖下降効果. *和漢医薬会誌*, 6, 374-375 (1989)
19. Miura T, Toyada H, Miyake M, Ishihara E, Usami M, Tanigawa K. Hypoglycemic action of stigma of *Zea mays* L. in normal and diabetic mice. *Natural Medicines*, 50, 363-365 (1996)
20. 清野 裕他. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. *糖尿病*, 53, 450-467 (2010)
21. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MC, Ma RC, So WY, Chan JC, Lyssenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M. Variants in *KCNQ1* are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics*, 40, 1092-1097 (2008)
22. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, Ng DP,

- Holmkvist J, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Sandbaek A, Lauritzen T, Hansen T, Nurbaya S, Tsunoda T, Kubo M, Babazono T, Hirose H, Hayashi M, Iwamoto Y, Kashiwagi A, Kaku K, Kawamori R, Tai ES, Pedersen O, Kamatani N, Kadowaki T, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nature Genetics*, 40, 1098-1102 (2008)
23. 矢崎 義雄. 内科学. 朝倉書店, 1145-1147 (2013)
24. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 42-58 (2010)
25. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *Journal of Molecular Medicine*, 83, 429-439 (2005)
26. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 282, 974-976 (2002)
27. Whiteman EL, Cho H, Birnbaum MJ. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13, 444-451 (2002)
28. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology*, 7, 261-269 (1997)
29. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, 165-169 (2000)
30. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 176 (2010)
31. 日本薬剤師会. 漢方業務指針, 201 (1993)
32. 吉田俊秀. 肥満と防風通聖散. 薬局, 60, 3602-3606 (2009)
33. 森元 康夫, 阪田 美智子, 大野 晶子, 前河 智子, 田島 滋. フルクトース負荷ラットの体脂肪蓄積に対する防風通聖散の作用. *日薬理誌*, 117, 77-86 (2001)
34. Shimada T, Kudo T, Akase T, Aburada M. Preventive effects of Bofutsushosan on

- obesity and various metabolic disorders. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1362-1367 (2008)
35. 李 希賢. 梔子 (*Fructus Gardenia florida Linne*) の作用について. *日薬理誌* 41, 207-214 (1994)
 36. Miwa T. Study on *Gardenia florida* L. (*fructus gardeniae*) as a remedy for icterus. IV. On the effect of the active principle and extract of *fructus gardeniae* on the bile secretion of rabbits, blood bilirubin and peripheral lymph bilirubin of common bile-duct ligated rabbits. *Japanese Journal of Pharmacology*, 4, 69-81 (1954)
 37. 原田 正敏, 天明 直美, 油田 正樹, 遠藤 徹. 山梔子の薬理的研究 (第1報) *Geniposide* および *Genipin* の胆汁分泌, 胃液分泌, 胃運動に対する作用, ならびにその他の作用. *薬誌*, 94, 157-162 (1974)
 38. 前村 俊一, 大槻 慎一, 久田 孝光. *和漢医薬誌*, 4, 300 (1987)
 39. 桑野重昭. *現代東洋医*, 4 (1), 55 (1983)
 40. 八田 明, 宇田 克也, 佐藤 裕子. *和漢医薬誌*, 4, 302 (1987)
 41. Guo LX, Xia ZN, Gao X, Yin F, Liu JH. Glucagon-like Peptide 1 Receptor plays a Critical Role in Geniposide-Regulated Insulin Secretion in INS-1 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 237-241 (2012)
 42. Kojima K, Shimada T, Nagareda Y, Watanabe M, Ishizaki J, Sai Y, Miyamoto K, Aburada M. Preventive effects of geniposide on metabolic disease status in spontaneously obese type 2 diabetic mice and free fatty acid-treated Hep G2 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1613-1618 (2011)
 43. Wang GF, Wu SY, Xu W, Jin H, Zhu ZG, Li ZH, Tian YX, Zhang JJ, Rao JJ, Wu SG. Geniposide inhibits high glucose-induced cell adhesion through the NF-kappaB signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31, 953-962 (2010)
 44. Ma CJ, Nie AF, Zhang ZJ, Zhang ZG, Du L, Li XY, Ning G. Genipin stimulates glucose transport in C₂C₁₂ myotubes via an IRS-1 and calcium-dependent mechanism. *The Journal of Endocrinology*, 216, 353-362 (2013)
 45. Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, Porco JA Jr, Lowell BB. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and

- high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets. *Cell Metabolism*, 3, 417-427 (2006)
46. Kimura M, Waki I, Tanaka O, Nagai Y, Shibata S. Pharmacological sequential trials for the fraction of components with hypoglycemic activity in alloxan diabetic mice from ginseng radix. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 4, 402-409 (1981)
47. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509 (1957)
48. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-419 (1985)
49. Hansen PA, Gulve EA, Marshall BA, Gao J, Pessin JE, Holloszy JO, Mueckler M. Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the Glut4 glucose transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 1679-1684 (1995)
50. Dang NT, Mukai R, Yoshida K, Ashida H. D-Pinitol and *myo*-inositol stimulate translocation of glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1062-1067 (2010)
51. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 95, 2409-2415 (1995)
52. Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *Journal of Lipid Research*, 44, 1795-1801 (2003)
53. Yu Q, Yasuda M, Takahashi T, Nomura M, Hagino N, Kobayashi S. Effects of Bofutsushosan and Gardeniae Fructus on diabetic serum parameters in streptozotocin-induced diabetic mice. *Chinese Medicine*, 2, 130-137 (2011)
54. 矢崎 義雄. 内科学. 朝倉書店, 1169 (2013)
55. Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H, Kimura Y. Saponins from platycodi radix

- ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. *The Journal of Nutrition*, 132, 2241-2245 (2002)
56. Kwon DY, Kim YS, Ryu SY, Choi YH, Cha MR, Yang HJ, Park S. Platyconic acid, a saponin from *Platycodi radix*, improves glucose homeostasis by enhancing insulin sensitivity in vitro and in vivo. *European Journal of Nutrition*, 51, 529-540 (2012)
57. 糖尿病漢方薬治療創刊号 (2001)
58. Yu Q, Takahashi T, Nomura M, Yasuda M, Obatake-Ikeda K and Kobayashi S. Effects of single administered Bofutsushosan-Composed crude drugs on diabetic serum parameters in streptozotocin-induced diabetic mice. *Chinese Medicine*, 4, 24-31 (2013)
59. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *The Journal of Clinical Investigation*. 113, 1408-1418 (2004)
60. Yu Q, Takahashi T, Nomura M, Kobayashi S. Anti-Hyperglycemic Effect of Single Administered *Gardeniae Fructus* in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Improving Insulin Resistance and Enhancing Glucose Uptake in Skeletal Muscle. *Chinese Medicine*, 4, 157-165 (2013)
61. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2653-2658 (2006)
62. Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD, Niswender KD, Myers MG Jr, Rhodes CJ, Schwartz MW. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metabolism*, 3, 67-73 (2006)
63. Harach T, Pols TW, Nomura M, Maida A, Watanabe M, Auwerx J, Schoonjans K. TGR5 potentiates GLP-1 secretion in response to anionic exchange resins. *Scientific Reports*, 2, 430 (2012)
64. 門脇 孝. 糖尿病ナビゲーター. メディカルレビュー社, 204 (2010)
65. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic

- syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 892, 146-154 (1999)
66. 春日 雅人, 綿田 裕孝, 松本 道宏. 糖尿病の分子標的と治療薬事典. 羊土社, 76-78 (2013)
 67. 片山善章. 酸化ストレス. *生物試料分析*, 32, 245-246 (2009)
 68. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259, 87-91 (1993)
 69. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 4854-4858 (1994)
 70. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-336 (2002)
 71. Smith U, Hammarstedt A. Antagonistic effects of thiazolidinediones and cytokines in lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801, 377-380 (2010)
 72. Picardi PK, Caricilli AM, de Abreu LL, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. Modulation of hypothalamic PTP1B in the TNF- α -induced insulin and leptin resistance. *FEBS Letters*, 584, 3179-3184 (2010)
 73. Kakuma T, Sakata T. Leptin-induced regulation of fat metabolism and its accumulation. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 118, 334-339 (2001)
 74. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Müller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415, 339-343 (2001)

第7章 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始一貫して丁寧なご指導ご鞭撻を賜りました北陸大学大学院薬学研究科薬剤薬効学専攻 古林 伸二郎 教授に心より感謝と敬意の意を申し上げます。本論文執筆に際して、古林先生には、本研究の考え方についてのご指導や研究分野に限らない広い視野からのご意見を賜りました。古林先生のご指導なしにはこの学位論文が完成を見ることはなかったと思います。ここに慎んで感謝の意をもって厚く御礼申し上げます。

北陸大学大学院薬学研究科薬剤薬効学専攻 野村 政明 教授には、終始温かい貴重なご指導、ご助言を賜り、本論文執筆に際して大変参考となりました。学会発表時には数多くのご助言を戴きました。ここに心よりご厚情に深く感謝申し上げます。

北陸大学薬学部医療薬学講座薬理学分野 高橋 達雄 講師には、博士前期課程から、ご多忙ながら本論文の多くの部分の内容について有益なご助言、ご意見を戴きました。ここに深甚なる謝意を表します

北陸大学薬学部臨床薬学教育センター 佐藤 栄子 助手には、発表や要旨を書く時に丁寧なご助言を戴きました。ここに心より感謝の意を表します。

筆者が博士後期課程より研究室での3年間、共に協力し合い、苦労や困難を乗り越え、喜びを分かち合った薬学部医療薬学講座薬理学分野の学部生には深く感謝の意を表します。

皆様の益々のご活躍をお祈りするとともに、改めて深甚なる感謝の意を表します。