

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、古来から中国や日本で、体の熱をさまし、余分なエネルギーや毒素を外に出し病因を発散させる薬能があると言われている。防風通聖散は 18 種類の生薬から構成され、現在は高血圧・脂質異常症・肥満症・糖尿病などの肥満を伴う生活習慣病を改善する漢方方剤として用いられている。防風通聖散の構成生薬は、利尿剤や瀉下剤、発汗剤、解毒剤、解熱剤、中和剤に分類され、体の表面や内部に抗炎症作用を導き、更に利尿作用や瀉下作用、発汗作用などに役割を担っていると考えられている。しかし、防風通聖散の病態薬理学的な基礎研究はほとんどなされていないので、この作用に不明瞭な点が多い。本研究は、防風通聖散の糖尿病に対する効果を明らかにするために、実験的糖尿病態モデルマウスを作成して、防風通聖散およびその構成生薬の糖尿病改善作用機序を研究することを目的とした。

糖尿病は成因からインスリン絶対量が不足する I 型糖尿病および遺伝因子や環境因子が相互に関連する II 型糖尿病、疾患や薬物等によるその他の型の糖尿病、妊娠糖尿病などに分類される。II 型糖尿病が占める割合は糖尿病患者の約 95 % であり、その発症の特徴的病態には、インスリン抵抗性の増大とインスリン分泌の低下が挙げられる。アジア人と欧米人の II 型糖尿病患者を比較すると、アジア人ではインスリン分泌低下が特徴的であり、欧米人ではインスリン抵抗性の増大が特徴である。両者が種々の程度に重なり合い、インスリン作用不全に陥り、高血糖を導く。この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、耐糖能がさらに悪化されるという悪循環が形成される。

本研究では先ず、Streptozotocin (STZ) 単回投与によりインスリン分泌不全を主因とする STZ-糖尿病態マウスを作成して、防風通聖散および山梔子をはじめとした構成生薬の糖尿病態改善作用とその作用機序を解析した。STZ-糖尿病態モデルはインスリン分泌能力を有する非肥満型の II 型糖尿病モデルとして用いた。更に、II 型糖尿病患者は肥満を伴う場合が多いので、肥満型の II 型糖尿病態マウスを高脂肪食 (High-Fat Diet: HFD) と STZ 単回併用投与により作成した。この糖尿病態モデルを用いて山梔子の糖尿病態改善作用機序を検討した。

「実験方法」

1) 薬物調製

防風通聖散エキスはツムラから供与された。防風通聖散の構成生薬は 10 倍量の蒸留水で 1 時間熱水抽出した瀘液を凍結乾燥してエキス末を得た。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。Glibenclamide と Geniposide は和光純薬から購入した。

2) 糖尿病態マウスの作成と薬物投与方法

STZ-糖尿病態マウスは、ddY 系雄性マウス (4 週齢, Sankyo Labo Service) の尾静脈内に 150 mg/kg STZ (SIGMA) を単回投与して作成した。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て使用した。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) または 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) を腹腔内に単回投与し、6 時間後に採血した。血清を単離し、血清中の糖尿病の指標となる各種パラメーター量を測定した。

高脂肪食 STZ 誘発 (HFD+STZ)-糖尿病態マウスは、ddY 系雄性マウス (3 週齢) に高脂肪餌 (60 kcal % fat, Research Diets) を給餌し、5 週齢マウスの尾静脈内に 150 mg/kg STZ を単回投与して作成した。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使用した。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、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パラメーター量を測定した。

3) 血糖値はメディセーフ (TERUMO) を、血清インスリン値はマウスインスリン測定キット (MORINAGA) を、血清や肝臓トリグリセリド値は E-テストワコー (WAKO) を、血清や肝臓コレステロール値は E-テストワコー (WAKO) を、血清中の腫瘍壊死因子 (TNF)- α 値はマウス TNF- α 測定キット (R&D Systems) を、レプチン値はマウスレプチン測定キット (R&D Systems) を、遊離脂肪酸値は NEFA C-TEST キット (WAKO) を用いて測定した。

4) 糖耐性とインスリン抵抗性を測定するために、各生薬エキスを投与された糖尿病態モデルは12時間絶食した後に、グルコース (1.5 g/kg) または様々な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 Homeostasis model assessment-Insulin Resistance (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。

5) 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て、一部分は 2- 3 H]-Deoxy-D-Glucose および D- 14 C]-mannitol を含む Krebs-Henseleit buffer 中で 29°C、10分間インキュベートした後、ヒラメ筋に取り込まれた糖の放射活性を測定した。他の一部分のヒラメ筋の細胞膜画分および細胞質画分を抽出し、Western blotting で Glucose Transporter 4 (GLUT4, G4048, SIGMA) の量やセリンスレオニンキナーゼ Akt (9272, Cell Signaling Technology)、リン酸化 Akt (Ser 473, 9271, Cell Signaling Technology) の量を解析した。

6) 山梔子エキス (1000 mg/kg) 投与1および2, 3週間後の HFD+STZ-糖尿病態マウスの皮下と内臓 (精巣周り) 脂肪組織を摘出して、重量を測定後、無菌条件で脂肪組織を 25 – 50 mg に細切した。脂肪組織に 100 mg 組織当たり 1.0 ml の温めた Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4)、BSA (4 g/100 ml) と glucose (1 mg/ml) を投与して、37 °C、2時間振盪インキュベートした。インキュベート液を回収して、液中に遊離された TNF- α 値やレプチン値、遊離脂肪酸値を測定した。

「結果と考察」

I. STZ-糖尿病態マウスに対する防風通聖散および山梔子をはじめとする構成生薬の効果^(1, 2, 3)

1. 防風通聖散は経口投与により糖尿病態マウスに対して抗高血糖作用や脂肪代謝改善作用を示すことが報告されている。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、高コレステロール値、高トリグリセリド値を改善した。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、高トリグリセリド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⁽¹⁾。

2. 防風通聖散の構成生薬エキスを STZ-糖尿病態マウスに腹腔内単回投与することにより、高血糖に対する効果を調べた。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では、発表剤や解毒剤、解熱剤、中和剤に防風通聖散と同様な血糖降下作用が見られたが、瀉下剤や利尿剤は高血糖値に影響しなかった⁽²⁾。

3. 血糖降下作用を示した構成生薬エキスの血清インスリン値に対する効果を調べると、ほとんどの生薬エキスは血清インスリン値を増加させたが、解毒剤と中和剤に分類されている川芎と解熱剤に分類され

ている山梔子は血清インスリン値に有意な増加作用を認めなかった。この結果から、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、インスリン遊離を間接的に促進するかまたは関与しない機序がある可能性を見出した。山梔子は STZ-糖尿病態マウスにおいてインスリン遊離には直接的に関与しない機序により高血糖を改善すると考えられた⁽²⁾。

4. 山梔子の主要成分 Geniposide (10-100 mg/kg) は、山梔子エキスと同様に STZ-糖尿病態マウスの高血糖を改善したが、低インスリン値に影響しなかったことから、山梔子エキスの作用が成分レベルでも裏付けられた⁽¹⁾。

5. 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コレステロール値と高トリグリセリド値を有意に減少させた。山梔子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が、血中コレステロール低下作用の他に血中トリグリセリドも低下させたと考えられた^(1,2)。

6. STZ-糖尿病態マウスは同週齢の正常マウスと比較して、糖耐性やインスリン抵抗性、HOMA-IR 値を有意に増大した。山梔子エキスはこれらの増大した糖耐性とインスリン抵抗性、HOMA-IR 値を有意に減少させた。以上の結果から、山梔子エキスは糖尿病態におけるインスリンの抵抗性を改善することがわかった⁽³⁾。

7. STZ-糖尿病態マウスにおいて、ヒラメ筋への糖の取り込みが有意に抑制され、インスリンによる糖の取り込み促進作用も消失したことから、STZ-糖尿病態マウスはインスリン抵抗性を有することが裏付けられた。山梔子エキスは、糖尿病態マウスのヒラメ筋への糖の取り込みを有意に増加させ、インスリンの作用も増強した。さらに、山梔子エキスは、インスリン受容体情報伝達系においてヒラメ筋の Akt リン酸化と細胞膜画分の GLUT4 発現量を有意に増加させたことから、末梢組織に対するインスリンの作用を増加させることがわかった。以上から、山梔子エキスは STZ-糖尿病態マウスにおいて、インスリンの作用を増強することにより骨格筋への糖の取り込みを促進し、高血糖値を改善すると結論できた⁽³⁾。

II. 高脂肪食 STZ 誘発 (HFD+STZ)-糖尿病態マウスに対する山梔子の効果⁽⁴⁾

8. 肥満型の HFD+STZ-糖尿病態マウスは非肥満型の STZ-糖尿病態マウスと比較して、体重や血清インスリン値が増加し、HOMA-IR 値の増加を現したことから、肥満型 HFD+STZ-糖尿病態マウスは非肥満型 STZ-糖尿病態マウスよりインスリン抵抗性は高いことが示唆された。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、内臓 (精巣周囲) 脂肪組織重量が有意に増加していたことから、このインスリン抵抗性は肥大化脂肪組織と関連すると考えられた。しかし、肥満型糖尿病態マウスと非肥満型糖尿病態マウスの血清高トリグリセリド値と血清高コレステロール値にはほとんど違いが認められなかった。

9. 山梔子エキスは3週間連日経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの飲水量および体重、高血糖値、内臓脂肪細胞面積、血清や肝臓の高トリグリセリド値と高コレステロール値を減少し、低インスリン値を増加した。山梔子エキスは3週間投与により HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいてインスリン遊離を促進することが示唆された。このことから、山梔子エキスは長期投与により HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいて膵臓の保護作用があると考えられた。

10. 山梔子エキスは3週間連日経口投与により、HFD+STZ-糖尿病態マウスの糖耐性とインスリン抵抗性を改善して、HOMA-IR 値も減少させた。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た。

11. HFD+STZ-糖尿病態マウスにおいて、血清 TNF- α 値および血清レプチン値、血清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。内臓脂肪細胞から遊離した血清 TNF- α の増加はインスリン受容体情報伝達系の抑制と GLUT4 の発現の抑制を介して、インスリン抵抗性を誘導すると報告されている。また、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。このように 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 値およびレプチン値の増加が関与する可能性が示唆された。

12. 山梔子エキスは3週間連日経口投与により、血清 TNF- α 値と血清レプチン値、遊離脂肪酸値を有意に低下させた。血清 TNF- α 値と血清レプチン値が減少することにより、インスリン抵抗性が改善されることが示唆された。

13. 山梔子エキスの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ほとんど影響しなかったが、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。山梔子はレプチン値の減少を TNF- α 値の減少より遅れて発現させたことから、山梔子エキスは肥満型糖尿病態マウスの内臓脂肪細胞からの TNF- α 遊離を抑制し、この抑制がレプチン抵抗性を改善し、インスリン抵抗性を改善することが示唆された。

「結論」

防風通聖散は、STZ-糖尿病態において高血糖値や高コレステロール値と高トリグリセリド値、低インスリン値の改善作用を有し、それらの作用に山梔子エキスが重要な役割を果たしていた。山梔子エキスは糖尿病態におけるインスリン抵抗性を改善することによって、血糖降下作用や糖耐性改善作用を導いた。山梔子エキスの血糖降下作用は、インスリンによる骨格筋の Akt 活性化と細胞膜での GLUT4 発現量の増加が関連していた。糖尿病態における山梔子のインスリン抵抗性の改善作用機序に、内臓脂肪細胞からの TNF- α 遊離やレプチン遊離の抑制作用が関与していることが示唆された。

引用文献

1. Effects of Bofutsushosan and Gardeniae Fructus on Diabetic Serum Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice
Qing Yu, Mai Yasuda, Tatsuo Takahashi, Masaaki Nomura, Nobuyoshi Hagino, Shinjiro Kobayashi. Chinese Medicine, 2011, 2, 130-137.
2. Effects of Single Administered Bofutsushosan-Composed Crude Drugs on Diabetic Serum Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice
Qing Yu, Tatsuo Takahashi, Masaaki Nomura, Mai Yasuda, Kyoko Obatake-Ikeda, Shinjiro Kobayashi. Chinese Medicine, 2013, 4, 24-31.
3. Anti-Hyperglycemic Effect of Single Administered Gardeniae Fructus in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice by Improving Insulin Resistance and Enhancing Glucose Uptake in Skeletal Muscle
Qing Yu, Tatsuo Takahashi, Masaaki Nomura, Shinjiro Kobayashi. Chinese Medicine, 2013, 4, 157-165.
4. Mechanisms of Gardeniae Fructus for Anti-Hyperglycemic and Anti-Dyslipidemic Actions in High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Mice
Qing Yu, Tatsuo Takahashi, Masaaki Nomura, Shinjiro Kobayashi. (in preparation).