糖尿病態モデル及び肥満症モデルに対する防已黄耆湯及び防風通聖散の薬理作用機序

古林伸二郎[†]

Pharmacological Mechanisms of Boiogito and Bofutsushosan in Diabetes and Obesity Models

Shinjiro Kobayashi[†]*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University; Ho-3
Kanagawa-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1181, Japan.*

(Received July 9, 2017)

The antihyperglycemic activities of extracts of boiogito (BOT) and bofutsushosan (BTS) were investigated in streptozotocin-induced (STZ)-diabetic mice. BOT extract containing *Stephania tetrandra* S. MOORE root (stephania), has more potent antihyperglycemic activity than BOT extract containing sinomenium stem (sinomenium). Extracts of stephania and astragalus root (astragalus) exert combined effects in the antihyperglycemic and insulinotropic activities of BOT extract. Fangchinoline, but not tetrandrine, in stephania plays a role in its activity. Formononetin in astragalus potentiates the actions of fangchinoline. Tetrandrine has antiangiogenic effects on choroidal vessels in STZ-diabetic rats, which are associated with the inhibition of tumor necrosis factor (TNF)- α -induced nuclear factor (NF)- κ B activation. BTS extract has shown antihyperglycemic and insulinotropic activities whereas gardenia fruit (gardenia) extract in BTS has antihyperglycemic, but not insulinotropic, activity in the diabetic mice. Gardenia extract decreased the HOMA-IR level and increased insulin-stimulated 2-deoxyglucose (2-DG) uptake to skeletal muscle. The effects of gardenia extract on 2-DG uptake were associated with the upregulation of glucose transporter type 4 and Akt phosphorylation. Gardenia extract was also shown to have antihyperglycemic and insulinotropic actions in high-fat diet (HFD)-fed and STZ-diabetic mice. In addition, gardenia extract decreased the production of TNF- α and leptin, and increased the production of adiponectin in the visceral adipose tissues. In the early administration period, BTS extract increased mRNA expression levels of leptin, adiponectin, and UCP1 in brown adipose tissues in HFD-fed obese mice. With a longer duration of administration, BTS extract improved insulin resistance and subsequently reduced serum leptin and triglyceride levels in parallel with visceral adipose tissue volume and size.

Key words——boiogito; bofutsushosan; combined effect; streptozotocin-induced diabetes; high-fat diet

1. はじめに

筆者は1970年に富山大学薬学部に入學し、1973年に卒研生として薬品作用学講座(木村正康教授)に配属された。卒業後大学院修士課程及び日本学術振興会薬学奨励研究生として同講座で研究を続け、薬学博士を取得したが、その研究課題は漢方薬に関連したものではなかった。本格的な漢方薬研究は富山医科薬科大学助手時代に木村教授のお手伝いから始まり、慢性炎症モデルに対する漢方方剤の薬理学的研究の方法論を身に付けることができた。¹⁾ 1995

年には、縁あって北陸大学薬学部薬理学講座に助教授として赴任した。当時、北陸大学薬学部は東洋医薬学の教育研究を推進していたので、まず、streptozotocin (STZ)-糖尿病態モデルに対する防已黄耆湯の効果に関する教育研究から始めた。

2. STZ-糖尿病態マウスの血糖値に対する防已黄耆湯の抑制効果

防已黄耆湯は日本では防已と黄耆、蒼朮、生姜、大棗、甘草からなる方剤であり、中国では防已の代わりに粉防已が用いられている。粉防已は古くは日本薬局方に収載されていたが、現在は削除されている。まず、日本の防已黄耆湯エキスと中国の防已黄耆湯エキスを用いて、STZ-糖尿病態マウスの血糖値に対する効果を比較した。²⁾ 粉防已を含む防已黄耆湯エキスは、絶食下で6時間腹腔内投与により、用量依存的に血糖値を低下させた。防已を含む防已

北陸大学薬学部 (〒920-1181 石川県金沢市金川町ホ3番地)

現所属: †テイカ製薬株式会社研究所 (〒930-0982 富山市荒川1丁目3番27号)

e-mail: kobayashi-gakuendai@nifty.com

本総説は、平成28年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Antihyperglycemic Effects of BOT (Stephania; ●) Extract, BOT (Sinomenium; ▲) Extract, and Extracts of BOT (Stephania) without a Composed Individual Crude Drug (BOT-Stephania, BOT-Astragalus, BOT-Atractylodes, BOT-Jujube, BOT-Glycyrrhiza, BOT-Ginger; ■) (left), and Extracts of Astragalus (□), Stephania (○), and BOT (Stephania; ●) (right) in STZ-diabetic Mice

Blood glucose (BG) levels were measured before and 6 h after intraperitoneal administration of drugs. The decrease in BG (%) was calculated as $[BG \text{ (before drug treatment)} - BG \text{ (after drug treatment)}] / BG \text{ (before drug treatment)} - 85 \times 100$. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of data from 5–8 mice. Shaded columns represent ranges of S.E.M. in data from 7 or 8 mice in saline alone. * $p < 0.05$ versus BOT (Stephania) extract. Reproduced, with permission, from Liu *et al.*, 2000.²⁾

黄耆湯エキスは、粉防己を含むものと比較して血糖降下作用や *insulin* 分泌作用が有意に弱かった (Fig. 1).²⁾ 以上から、防己黄耆湯エキスは、防己を粉防己に変更することにより、より強力な血糖降下作用が得られることがわかった。そこで、粉防己を含む防己黄耆湯エキスの血糖降下作用を詳細に検討した。まず、構成生薬の複合作用を解明するために、防己黄耆湯エキスと防己黄耆湯の一味抜き方剤エキスの効果を比較した。粉防己抜き方剤エキスと黄耆抜き方剤エキスは、粉防己を含む防己黄耆湯エキスの作用を完全に消失させた。しかし、蒼朮抜き方剤エキスや生姜抜き方剤エキス、大棗抜き方剤エキス、甘草抜き方剤エキスは、粉防己を含む防己黄耆湯エキスと同程度の作用を維持していた (Fig. 1)。以上の結果は、粉防己を含む防己黄耆湯エキスは、STZ-糖尿病態の血糖降下作用において粉防己と黄耆間に複合作用を有することを示した。しかし、蒼朮や生姜、大棗、甘草はこの複合作用に関与しなかった。粉防己エキスと黄耆エキスを単独に作用させると、粉防己エキスは糖尿病態の高血糖を低下させたが、黄耆エキスは高血糖に影響しなかった

(Fig. 1)。そこで、粉防己と黄耆を防己黄耆湯中と同じ比率で混合して得たエキスの作用を検討すると、³⁾ 黄耆エキスは、単独作用を持たないが、粉防己エキスの単独作用を増強するという全く新しい事実を見い出すことができた [Fig. 2(A)]。この血糖降下作用における粉防己エキスと黄耆エキスの複合作用は *insulin* 分泌作用においてもみられたので [Fig. 2(B)]、黄耆エキスは粉防己エキスの *insulin* 分泌作用を増強して、糖尿病態の血糖値を低下させることを明らかにした。

粉防己の主要成分の1つである *fangchinoline* は粉防己エキスより強力な血糖降下作用を有したが、

古林伸二郎

1974 年富山大学大学院薬学研究科修士課程修了後、日本学術振興会薬学奨励研究生となり、1983 年薬学博士取得。米国ペンシルバニア大学医学部博士研究員、1986 年富山医科薬科大学薬学部助手、講師を経て、1995 年北陸大学薬学部助教授、2004 年同教授に至り、2017 年 3 月に定年退職した。1995 年和漢医薬学会奨励賞を契機に漢方薬研究を継続中。

Fig. 2. Antihyperglycemic (A) and Insulinotropic (B) Activity of Extracts of Astragalus, Stephania, and Stephania in Combination with Astragalus (Stephania + Astragalus) in STZ-diabetic Mice

Blood glucose (A) and blood immunoreactive insulin (B) levels were measured before and 6 h after intraperitoneal administration of extracts of astragalus, stephania (●), and stephania with astragalus (1 : 3) (■) to 14 h-fasted diabetic mice. Values represent mean $\pm$ S.E.M. of data from 6–14 (A) and 4–19 mice (B). Shaded columns represent ranges of S.E.M. in data from 7 mice in saline alone (A). C: control saline group without drug. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the control group without drug. †† $p < 0.01$ versus stephania extract alone. Reproduced, with permission, from Liu *et al.*, 2000.²⁾

Fig. 3. Effects of Fangchinoline, Tetrandrine, and Stephania Extract (A) and Effects of Astragalus Extract Combined with Fangchinoline (B) on Blood Glucose Levels in STZ-diabetic Mice

Blood glucose levels were measured before and 6 h after intraperitoneal administration of the drugs (A), and astragalus extract and 0.3 mg/kg fangchinoline or astragalus extract alone (B) in diabetic mice. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of data from 4–9 (A) and 6–15 mice (B). C: Fangchinoline (0.3 mg/kg) without astragalus extract. Shaded column represents S.E.M. in the saline group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the saline group (A) and * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus fangchinoline alone (B). Modified, with permission, from Tsutsumi *et al.*, 2003³⁾ and Ma *et al.*, 2007.⁴⁾

もう1つの主要成分 tetrandrine は全く効果を示さなかった [Fig. 3 (A)]. その他の成分として cycleanine や tetrandrine 2'-*N*- β -oxide, tetrandrine 2'-*N*- α -oxide, tetrandrine 2-*N*- β -oxide, fangchinoline 2'-*N*- α -oxide, 2'-*N*-norfangchinoline は血糖下降作用を有したが, cycleanorine や cyclanoline, stephenanthrine は作用を示さなかった (Scheme 1

and Table 1).⁴⁾ 黄耆成分 formononetin や calycosin (Scheme 2) が黄耆エキスと同様に単独作用を示さなかったが, fangchinoline と併用することにより, fangchinoline の血糖下降作用を有意に増強した [Figs. 3 (B) and 4]. Fangchinoline は insulin 分泌も促進し, formononetin は fangchinoline の作用を増強したことから, この粉防已と黄耆間の複合作用

Scheme 1. Chemical Structures of Alkaloids Isolated from Stephania Used in Experiments

Reproduced, with permission, from Tsutsumi *et al.*, 2003.³⁾

Table 1. Effects of Compounds Isolated from Stephania on Blood Glucose Levels in Diabetic Mice

Drug	n	Decrease in blood glucose
		(%)
Saline	13	10.9 ± 7.7
Tetrandrine	5	22.2 ± 11.3
TD-7	4	53.5 ± 15.5*
TD-11	4	59.0 ± 10.7**
TD-10	7	48.2 ± 7.2**
TD-13	4	7.5 ± 10.1
Cycleanorine	6	20.2 ± 11.8
Fangchinoline	7	52.7 ± 6.7**
TD-8	4	50.7 ± 14.5*
TD-28	5	40.3 ± 11.1*
Cycleanine	6	50.1 ± 9.0**
Cyclanoline	7	24.0 ± 8.8
Stephenanthrine	7	7.4 ± 15.4

The decrease (%) in blood glucose was calculated based on glucose levels before and after the administration of the test drug (1 mg/kg) or saline in 14 h-fasted diabetic mice. Values are expressed as mean ± S.E.M. of data from 3–13 animals. *n* represents number of data. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus the value of saline in the unpaired *t*-test. Reproduced, with permission, from Tsutsumi *et al.*, 2003.³⁾

を fangchinoline と formononetin の成分レベルでも裏付けることができた。⁴⁾ しかし、粉防已のもう 1 つの主要成分である tetrandrine は、fangchinoline と構造が類似しているが、血糖降下作用を示さなかった。

3. STZ-糖尿病態ラットの脈絡膜の新生血管増生に対する粉防已やその成分の抑制効果

糖尿病合併症の 1 つである糖尿病性網膜症の病因として、糖尿病態の網膜や脈絡膜組織中に蓄積する advanced glycation endproducts (AGEs) が注目されている。⁵⁾ 筆者らは STZ-糖尿病態ラットの脈絡膜組織において AGEs の 1 つである N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) が蓄積し、脈絡膜の新生血管を異常増生させることを抗 CML モノクローナル抗体 (6D12)⁶⁾ を用いて明らかにした (Fig. 5)。⁷⁾ STZ 投与 4 週間後 (糖尿病態初期) と 8 ヶ月後 (糖尿病態亢進期) のラットを用いて、糖尿病態経過による脈絡膜血管新生異常を比較すると、糖尿病態が進行するにつれて脈絡膜の新生血管が著しく増生した (Fig. 6)。この異常増生は、糖尿病態亢進

Scheme 2. Chemical Structures of Formononetin, Calycosin, Ononin, and Fangchinoline

Reproduced, with permission, from Ma *et al.*, 2007.⁴⁾

Fig. 4. Combined Effects of Formononetin with Fangchinoline (A) and Calycosin with Fangchinoline (B) on Blood Glucose Levels in Diabetic Mice

Blood glucose levels were measured before and 6 h after administration of formononetin and 0.3 mg/kg fangchinoline (●), formononetin alone (○), and saline (C; ○) (A), and calycosin and 0.3 mg/kg fangchinoline (●), calycosin alone (○), and saline (C; ○) (B) into 3 h-fasted diabetic mice. Values are expressed as mean ± S.E.M. of data from 6–15 mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the saline group without drug (C). Modified, with permission, from Ma *et al.*, 2007.⁴⁾

期ばかりでなく加齢ラットにおいてもみられた [Fig. 6(B)].⁸⁾ 糖尿病態亢進期や加齢期による血管新生異常が 6D12 により特異的に抑制されたこと [Figs. 6(C) and (D)] から、糖尿病態亢進期や加齢期の脈絡膜に蓄積した CML が新生血管を異常に増生することを明らかにした。同様な現象が加齢ラットの海馬の脈絡叢においてもみられた。CML が加齢ラットの脈絡叢に蓄積して、培養海馬の新生血管を異常増生した。CML による海馬の血管新生異常と認知症誘発との関連が注目されているので、眼底検査による網膜血管の観察が網膜症予防ばかりでなく認知症予防にもつながる可能性を推察できた。^{9,10)}

糖尿病態組織に蓄積した CML と血管新生因子の生成や活性との関連を検討した。糖尿病態初期ラットの培養脈絡膜組織は tumor necrosis factor (TNF)

- α の生成に促進傾向を示した。培養液に投与した外来性の CML は、糖尿病態初期の培養脈絡膜の TNF- α 生成を培養正常脈絡膜より強力に促進した [Fig. 7(A)].⁸⁾ さらに、加齢期の培養脈絡膜は、糖尿病態初期より著しく TNF- α 生成を促進した [Fig. 7(B)]. 次に、糖尿病態初期の培養脈絡膜は培養正常脈絡膜より vascular endothelial growth factor (VEGF) 生成を促進し、外来性の CML は糖尿病態初期脈絡膜組織の VEGF 生成を著しく増強した [Fig. 7(A)]. 加齢期の培養脈絡膜も VEGF 生成を促進したが、その生成量は、糖尿病初期に比べて少なかった [Fig. 7(B)]. また、外来性の CML は糖尿病態初期の培養脈絡膜の platelet derived growth factor (PDGF) -B 生成をわずかに増加したが、正常脈絡膜に対しては作用を示さなかった [Fig. 7(A)]. 加齢期の培養脈絡膜は、糖尿病態初

Fig. 5. Effects of Anti-*N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) Antibody on CML-Human Serum Albumin (HSA)-induced Increase in the Number of Vessel-like Structures (A) and Concentration-dependent Action of CML-HSA on Number of Vessel-like Structures (B) Budded from Cultured Rat Choroidal Explants

Explants were cultured in fibrin gel in the presence of 1% fetal bovine serum (FBS) (A; ○), 1% FBS with 1 μ g/mL CML-HSA (A; ●), and various concentrations of CML-HSA (B; ●) and 1% FBS with 1 μ g/mL CML-HSA and 3 μ g/mL anti-CML antibody (A; ■) for 6 d. The number of vessel-like structures in choroidal explants was counted on 0–6 d (A) and 6 d (B) in culture. Values represent mean $\pm$ S.E.M. of 12–14 data (A) and 6–10 data (B). C represents control value without CML-HSA (B). * p <0.05, ** p <0.01 versus control without CML-HSA on the corresponding days in culture. † p <0.01 versus the corresponding value with CML-HSA. Reproduced, with permission, from Kobayashi *et al.*, 2004.⁷⁾

Fig. 6. Neovascular Activity of Choroidal Explants in the Early Stage (A) and Advanced Stage (B) of STZ-diabetic Rats and Inhibitory Effects of Anti-CML Antibody on the Increase in the Number of Microvessels in the Early Stage (C) and Advanced Stage (D) in STZ-diabetic Rats

Choroidal explants from early-diabetic rats (A; ●) and age-matched young normal rats (A; ○) and advanced-diabetic rats (B; ●) and age-matched aged normal rats (B; ○) were cultured in fibrin gel with 5% FBS-DMEM for 2–8 d. Choroidal explants from early-diabetic rats (C) and advanced-diabetic rats (D) were cultured in fibrin gel with 5% FBS-DMEM in the presence (●) or absence (○) of anti-CML antibody (3 μ g/mL) for 2–8 or 2–6 d. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 8–15 data (A, B) and 10–30 data (C, D). * p <0.05, ** p <0.01 versus normal values (A, B) and values without antibody (C, D) on the corresponding day in culture. Modified, with permission, from Kobayashi *et al.*, 2004.⁸⁾

Fig. 7. TNF- α , VEGF, and PDGF-B Released from CML-HSA-treated Choroidal Explants of Early-diabetic and Age-matched Normal Rats (A) and aged Normal Rats (B)

Choroidal explants were cultured in fibrin gel with 1% FBS-DMEM in the presence or absence of CML-HSA (1 μ g/mL) (A, left) and with 5% FBS-DMEM (A, right) for 6 d. Levels of TNF- α , VEGF, and PDGF-B were measured in culture media during days 4–6 in culture (A) and in culture media during days 0–2, 2–4, and 4–6 in culture using ELISA kits (B). Values represent mean $\pm$ S.E.M. of 7–20 data (A) and 6–12 data (B). * P < 0.05, ** P < 0.01 versus the values in the diabetic and normal choroids without CML-HSA (A). † p < 0.05, †† p < 0.01 versus the value in the normal choroid (A). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the corresponding value in media without explants (day 0) (B). Modified, with permission, from Kobayashi *et al.*, 2004⁸⁾ and Kobayashi *et al.*, 2007.¹¹⁾

期と比較して PDGF-B 生成を著しく促進した [Fig. 7(B)].¹¹⁾ 以上から、糖尿病態期や加齢期の脈絡膜組織が CML を蓄積して、TNF- α や VEGF, PDGF-B の生成と作用を介して、新生血管を異常増生することを明らかにした。

粉防己エキスが、糖尿病態初期による培養脈絡膜の血管新生作用を同週齢の正常組織に比べて強力に抑制した。¹²⁾ Tetrandrine も、この糖尿病態による

脈絡膜の血管新生作用を正常組織より著しく抑制したので、粉防己の抗血管新生作用を少なくとも tetrandrine が担っていることを裏付けた。¹³⁾ Tetrandrine の構造類似化合物を用いて抗血管新生作用の構造活性相関を検討した。類似化合物 KS-1-4 と KS-1-1 はいずれも tetrandrine と同様に強力な抗血管新生作用を有したが、¹³⁾ KS-1-4 は、KS-1-1 とは異なり、正常マウスの脈絡膜の血管新生を抑制せ

Fig. 8. Time-dependent Inhibitory Effects of Tetrandrine, KS-1-1, and KS-1-4 on Choroidal Angiogenesis in STZ-diabetic (A) and Age-matched Normal Rats (B)

Choroidal explants were cultured with 5% FBS-DMEM in fibrin gel in the presence or absence (○) of KS-1-1 (■), KS-1-4 (▲), and tetrandrine (●) (1 μ M) for 8 d. Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of 11–16 data. * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the corresponding control without drug. Reproduced, with permission, from Kobayashi *et al.*, 1999.¹³⁾

ず、糖尿病態初期の脈絡膜の血管新生を選択的に抑制した (Fig. 8). 粉防己成分 cycleanine は血糖下降作用を有することを上記したが、抗血管新生作用がないことから、¹³⁾ tetrandrine の血管新生抑制作用機序は、cycleanine や fangchinoline の血糖下降作用機序と異なることを裏付けた。KS-1-4 や tetrandrine は、VEGF や PDGF-B による脈絡膜血管新生作用も特異的に抑制したが、KS-1-1 は、これらの血管新生作用を抑制しなかった。¹³⁾ CML は糖尿病態の脈絡膜において、TNF- α や PDGF-B, VEGF の生成を促進するので、KS-1-4 や tetrandrine は、CML やこれら血管新生因子に対する抗血管新生作用を介して、脈絡膜血管新生異常を抑制することを明らかにした。

TNF- α の血管新生作用に対する tetrandrine の抑制作用機序を検討した。tetrandrine は TNF- α による脈絡膜血管新生作用を特異的に抑制した。Tetrandrine の抗血管新生作用は、nuclear factor (NF)- κ B 阻害剤である ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC) の抗血管新生作用¹⁴⁾ と類似していた (Fig. 9)。したがって、tetrandrine は、TNF- α による脈絡膜の NF- κ B 活性化作用を抑制して抗血管新生作用を誘導することが考えられた。TNF- α は、脈絡膜細胞の細胞質内の I κ B α 量の減少とリン酸化 I κ B α 量の増加を導き、核内においては

NF- κ B の DNA 結合活性を促進した。¹⁵⁾ Tetrandrine は、TNF- α による I κ B α 量の減少とリン酸化 I κ B α 量の増加と TNF- α による NF- κ B の DNA 結合活性をそれぞれ特異的に抑制した。¹⁵⁾ さらに、TNF- α の血管新生作用は、抗 VEGF 抗体により抑制され、TNF- α は VEGF-A の mRNA 発現を促進したことから、TNF- α は、VEGF-A の産生を介して、脈絡膜血管新生を促進することを明らかにした。¹⁵⁾ 以上から、tetrandrine の抗血管新生作用機序は、TNF- α による一連の血管新生作用を抑制することで説明できた。

4. STZ-糖尿病態マウスの血清パラメータに対する防風通聖散の効果

漢方医学において、湿証を適応症とする方剤のうち、防己黄耆湯は虚証に有効であるが、防風通聖散は実証に有効であると言われている。防風通聖散は、山梔子と麻黄、甘草、大黄、蓮翹、芒硝、生姜、荆芥、桔梗、防風、川芎、当帰、芍薬、白朮、薄荷、黄芩、滑石、石膏の 18 生薬から構成されている。そこで、STZ-糖尿病態マウスにおける、防風通聖散エキスの血糖下降作用機序を防己黄耆湯エキスと比較した。その結果、防風通聖散エキスは、防己黄耆湯エキスと同様に、絶食下で腹腔内投与により、高血糖値を低下させ、insulin 分泌を促進した。この作用は、代表的血糖降下薬 glibenclamide

Fig. 9. Effects of Tetrandrine (A) and APDC (B) on the Increase in the Number of Microvessels Induced by TNF- α in Rat Choroidal Explants

Choroidal explants were cultured in the presence or absence of 10 ng/mL TNF- α with/without tetrandrine (1 μ M; A), or with/without APDC (0.3 μ M; B) for 8 d (a). The explants were cultured with tetrandrine (0, 0.1, and 1 μ M; A) or APDC (0, 0.1, and 0.3 μ M; B) in the presence (right) or absence (left) of 10 ng/mL TNF- α on day 6 of culture (b). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of data from at least 3 rat explants. $^{\#}p < 0.05$ versus the corresponding control without TNF- α and without tetrandrine (A). $^*p < 0.05$ versus TNF- α alone without tetrandrine (A). $^{**}p < 0.01$ versus the corresponding control without TNF- α and without APDC. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ versus TNF- α alone without APDC (B). Modified, with permission, from Kikuchi *et al.*, 2010.¹⁵⁾

Fig. 10. Effects of Bofutsushosan (BTS) Extract, Glibenclamide, Gardenia Extract, and Geniposide on Serum Glucose (A) and Serum Insulin (B) Levels in STZ-diabetic Mice

Serum glucose levels (A) and serum immunoreactive insulin levels (B) were measured before and 6 h after *i.p.* administration of BTS extract (●), Glibenclamide (▲), Gardenia extract (■), or Geniposide (◆) to 3 h-fasted diabetic mice. C; the water group without drug (○). Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of data from 5–25 mice. Modified, with permission, from Yu *et al.*, 2011.¹⁶⁾

Fig. 11. Effects of Gardenia Extract on HOMA-IR Values in STZ-diabetic Mice (A) and on 2-deoxyglucose (DG) Uptake by the Soleus Muscle in STZ-diabetic Mice (B)

HOMA-IR values were calculated by following formula: fasting glucose (mg/dL) × fasting insulin (μU/mL)/405 (A). Soleus muscles were incubated for 10 min in 2-DG solution with or without 10 nmol/mL insulin, and 2-DG uptake was normalized to tissue weight (B). Values represent mean ± S.E.M. of data from 4–22 (A) or 3 mice (B). ** $p < 0.01$ versus STZ-diabetic mice (A). * $p < 0.05$ versus STZ-diabetic mice (B). # $p < 0.05$ versus without insulin (B). Modified, with permission, from Yu *et al.*, 2013.¹⁸⁾

と類似していた (Fig. 10).¹⁶⁾ 防風通聖散の構成生薬の山梔子のエキスは、高血糖値を低下させたが、血中 insulin 分泌作用を示さなかった。山梔子の主要成分 geniposide も、血糖値を低下させたが、血中 insulin 値を増加しなかったことから、山梔子エキスの血糖降下作用が成分レベルでも裏付けられた (Fig. 10)。他方、防風通聖散エキスは、血中 triglyceride や cholesterol 値も低下させたが、glibenclamide はこれらに対して作用が弱いかほとんどみられなかったことから、糖尿病態における防風通聖散エキスの血糖降下作用機序は、血中 triglyceride や cholesterol の低下作用と直接関連していないと考えられた。¹⁶⁾ 山梔子エキスは、防風通聖散エキスと同様に血中 triglyceride 値と cholesterol 値を減少させた。しかし、geniposide は、血中 triglyceride 値や cholesterol 値を低下させなかったことから、山梔子エキスによるこれらの低下作用機序には、geniposide とは異なる山梔子成分が役割を担っている可能性が考えられた。¹⁶⁾ 山梔子以外では、麻黄や防風、荊芥、蓮翹、黄芩、石膏は単味で血糖下降作用と insulin 分泌作用を有し、芍薬と川芎は血糖下降作用のみを示した。¹⁷⁾ これらの構成生薬が、方剤の中で総合的に作用して、抗糖尿

病作用を導くと考えられるが、この作用を解明するために、更なる詳細な研究が必要である。

STZ-糖尿病態マウスは、insulin 抵抗性の指標である HOMA-IR 値を増大し、骨格筋の 2-deoxyglucose (DG) の取り込みに対する insulin 感受性を低下した (Fig. 11)。¹⁸⁾ 山梔子エキスは、この糖尿病態の HOMA-IR 値を有意に低下させ、骨格筋の 2-DG 取り込みを約 1.5 倍増加させた。さらに、2-DG 取り込みに対する insulin 感受性を正常マウスのレベルまで回復させた (Fig. 11)。山梔子エキスは、糖尿病態の骨格筋細胞膜画分の糖輸送担体 (Glut) 4 レベルを増加し、細胞質画分のリン酸化 Akt 値を増加させた。¹⁸⁾ 以上から、山梔子エキスの作用機序は、糖尿病態の骨格筋細胞における Akt リン酸化を介して細胞膜への Glut4 の移行を促進して、insulin 抵抗性を改善すると結論できた。

5. 高脂肪食摂取 STZ-糖尿病態マウスの血清パラメータに対する山梔子の効果

高脂肪食摂取 STZ-糖尿病態マウスは STZ-糖尿病態マウスよりも II 型糖尿病態モデルとして繁用されている。¹⁹⁾ この高脂肪食摂取糖尿病態マウスは、血中 TNF-α 量や leptin 量、遊離脂肪酸量をいずれも正常マウスと比較してそれぞれ 6 倍及び 2 倍、2 倍

Fig. 12. Effects of BTS Extract on Body Weight (A), Total White Adipose Tissue Wet Weight (B), and Individual Wet Weights of Retroperitoneal, Epididymal, Mesenteric, and Periretinal White Adipose Tissues (C) in Obese Mice at 9 Weeks of Age Orally Administered Various Drug Doses (0, 1.0, 1.5, and 2.0 g/kg) for 25 Days While Fed a HFD

ICR mice (4 weeks of age) were provided the HFD for 5 weeks *ad libitum*. Body weights were measured on days 0, 6, 12, 18, and 25 of administration. Body weight changes were calculated from day 0 before administration of BTS extract to day 25 (A). White adipose tissues were isolated from obese mice and wet weights measured (B, C). Values are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n=5-8$ mice). Differences between group means were evaluated by Tukey's or Scheffe's test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus control water group without BTS extract. Modified, with permission from Kobayashi *et al.*, 2017.²¹⁾

増加した。山梔子エキスは、経口投与により高脂肪食摂取糖尿病態マウスの高血糖値の低下と血中 insulin 値の増加を介して、insulin 抵抗性を低下させた。また、山梔子エキスは、血中 triglyceride 値と血中 cholesterol 値も減少させた。²⁰⁾ 山梔子エキスは、投与 2 週間後から血中 TNF- α 量や leptin 量を有意に低下させ、投与 3 週間では遊離脂肪酸量も有意に低下させ、血中 adiponectin 値を増加させた。さらに、山梔子エキスは、投与 1 週間後から白色内臓脂肪組織における TNF- α 生成を有意に低下し、投与 2 週間後から leptin 生成も低下させた。遊離脂肪酸生成と adiponectin 生成は投与 3 週間後に増加させた。以上の結果から、山梔子エキスは、高脂肪食摂取の糖尿病態マウスの内臓脂肪組織における TNF- α 生成を抑制して、insulin 抵抗性を改善することにより、高血糖を降下させると考えられた。²⁰⁾

漢方医学において防風通聖散は体質が実証の患者に、防已黄耆湯は虚証の患者に適用されているので、本稿では STZ-糖尿病態マウスを用いて、防風通聖散エキスと防已黄耆湯エキスの血糖降下作用機序を比較することにより、これらの作用機序と虚実の適応症との関連を考察した。防風通聖散エキスの血糖降下作用機序に山梔子エキスの作用が含まれ、その作用機序は TNF- α の作用の抑制であるのに対

し、防已黄耆湯エキスの作用機序には TNF- α の作用が関与しなかった。したがって、少なくとも STZ-糖尿病態動物を用いた本実験において、炎症性サイトカインである TNF- α の発現量の増減により実証と虚証の分類が仮定され、TNF- α 発現が多い実証には防風通聖散が、TNF- α 発現が少ない虚証には防已黄耆湯が奏効する可能性が推測された。

6. 高脂肪食摂取肥満モデルに対する防風通聖散の抗肥満効果

高脂肪食摂取肥満モデルマウスを用いて、防風通聖散エキスの抗肥満作用を検討した。防風通聖散エキスは、低脂肪食摂取正常マウスに体重減少効果を示さなかったが、高脂肪食摂取肥満マウスの体重を投与 5 日後から 25 日まで有意に低下させた (Fig. 12)。山梔子を除いた一味抜き方剤エキスは、体重減少作用を示さなかったことから、防風通聖散エキスの抗肥満作用に、山梔子が重要な役割を果たしていた。防風通聖散エキスは投与 25 日目で、白色皮下脂肪組織や白色内臓脂肪組織重量を有意に低下させた (Fig. 12)。²¹⁾ 防風通聖散エキスは、投与 5 日目では、白色内臓脂肪組織や褐色脂肪組織の重量に変化を与えず、白色内臓脂肪組織の uncoupling protein (UCP) 1 や UCP2, leptin, adiponectin の mRNA 発現も変化しなかった。しかし、褐色脂肪

Table 2. Effects of BTS Extract on mRNA Expression of Leptin, Adiponectin, UCP1, and UCP2 in Interscapular Brown Adipose Tissues and Epididymal White Adipose Tissues after 5-Day Administration

	BTS (−)	BTS (+)	<i>p</i> value
Interscapular brown adipose tissue			
Leptin	0.0264±0.0080	0.1182±0.0612	0.0004
Adiponectin	0.7679±0.2436	2.5412±2.1369	0.0250
UCP1	2.2519±0.9376	3.3746±0.6704	0.0100
UCP2	0.0717±0.0210	0.0833±0.0430	0.4781
Epididymal white adipose tissue			
Leptin	0.0512±0.0243	0.0390±0.0203	0.3756
Adiponectin	0.6115±0.5319	0.9395±0.4682	0.1839
UCP1	0.0015±0.0008	0.0020±0.0014	0.5207
UCP2	0.1560±0.0252	0.1777±0.0930	0.5347

Quantification of mRNA expression by real-time PCR was calculated relative to β -actin mRNA. Values are expressed as mean±S.D. ($n=4-9$). *p* values were calculated by Student's *t*-test. $p<0.05$, BTS group versus the control group without BTS. Reproduced, with permission, from Kobayashi *et al.*, 2017.²¹⁾

組織における UCP1 mRNA の発現は、白色脂肪組織と比較して 1500 倍増加した。防風通聖散エキスは、この UCP1 mRNA の発現をさらに 1.5 倍増加させた (Table 2)。さらに、防風通聖散エキスは leptin や adiponectin の mRNA 発現もそれぞれ 4.5 倍、3.3 倍増加させたが、UCP2 mRNA の発現は全く変化しなかった (Table 2)。防風通聖散エキスは、投与 14 日や 25 日目において、白色内臓脂肪細胞の大きさを有意に減少させ (Fig. 13)、投与 25 日目で血糖値と血中 insulin 値を低下させ、insulin 抵抗性も改善した (Fig. 14)。防風通聖散エキスは、さらに血中 leptin 値や triglyceride 値も低下させたが、血中 adiponectin 値や cholesterol 値に影響しなかった。²¹⁾ 以上から、防風通聖散エキスは、投与初期に褐色脂肪組織の UCP1 mRNA 発現を促進して、熱発生によるエネルギー消費を増加して、²²⁾

Fig. 13. Effects of BTS Extract (2.0 g/kg) on Visceral Epididymal Adipocyte Size Under Optical Microscopy (A) and Scanning Electron Microscopy at $\times 300$ Magnification (B) After 14-Day Administration and Epididymal Adipocyte Size under Optical Microscopy after 14- and 25-Day Administration (C)

Values are expressed as mean±S.D. ($n=1$ and 3, respectively). Differences between group means were evaluated by Student's *t*-test. * $p<0.05$ versus the control group without BTS extract. Reproduced, with permission, from Kobayashi *et al.*, 2017.²¹⁾

Fig. 14. Effects of BTS Extract on Serum Glucose (A), Serum Insulin (B), and HOMA-IR Values (C) in Obese Mice

HOMA-IR values were calculated as $[\text{serum glucose (mg/dL)} \times \text{serum insulin } (\mu\text{U/mL})] / 405$. BTS extract (0, 1.0, 1.5, and 2.0 g/kg) was administered orally to obese mice (9 weeks of age) fed the HFD for 25 d. Values are expressed as mean $\pm$ S.D. ($n=6$ mice). Differences between group means were evaluated by Tukey's or Scheffe's test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ versus control water group without BTS extract. Reproduced, with permission from Kobayashi *et al.*, 2017.²¹⁾

白色内臓脂肪細胞の大きさや重量を減少させると考えられた。さらに、防風通聖散エキスは、褐色脂肪組織の leptin の mRNA 発現も有意に促進したことから (Table 2), leptin は、摂食抑制作用と insulin 分泌抑制作用を介して、²³⁾ insulin 抵抗性を改善し、さらに、UCP1 の生成を増強すると考えられた。²¹⁾

防風通聖散エキスは、0.80% (w/w) geniposide 及び 2.77% (w/w) baicalin, 0.1% (w/w) sennoside A, 0.14% (w/w) total alkaloids, 0.71% (w/w) glycyrrhizic acid, 0.26% (w/w) paeoniflorin を含有している。Geniposide は glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 受容体の刺激薬であるので、²⁴⁾ GLP-1 と同様に、視床下部の adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 活性化を介して褐色脂肪組織の発熱反応を刺激すると報告されている。²⁵⁾ Geniposide は、さらに血中 triglyceride の分解²⁶⁾や中枢神経からの noradrenaline 遊離の刺激を介して褐色脂肪組織での UCP1 発現を促進する。²⁷⁾ 構成生薬の麻黄の成分 ephedrine は交感神経終末に作用して noradrenaline の遊離を促進し、褐色脂肪細胞の発熱反応や白色脂肪細胞での脂肪分解を促進する。また、甘草や蓮翹、荊芥は cyclic AMP-phosphodiesterase を阻害して cyclic AMP 系反応を刺激することにより、褐色脂肪組織の UCP1 を発現すると報告されている。^{28,29)} 今後、防風通聖散の

一味抜き方剤や単味生薬成分の作用を詳細に検討することにより、防風通聖散エキスの抗肥満作用の本体を明らかにする予定である。なお、Table 3 に英文の Glossaries を記載して、英文の理解に工夫を加えた。

謝辞 この研究成果は、主として北陸大学薬学部薬理研究室及び臨床薬理研究室で行ったものであり、共同研究者である北陸大学薬学部野村政明教授と高橋達雄准教授に厚くお礼を申し上げる。更なる共同研究者として、富山医科薬科大学薬学部木村正康名誉教授、木村郁子教授、富山大学薬学部恒枝宏史准教授、東海大学農学部永井竜児教授、Tulane University School of Medicine Prof. Nobuyoshi Hagino, 昭和大学薬学部鳥居塚和生教授、熊本大学医学部堀内正公教授、北陸大学薬学部劉園英教授、金沢医科大学医学部篠原治道教授、小林製薬株式会社荒井哲也氏に心より感謝する。また、本研究に協力して頂いた薬理学・臨床薬理研究室所属の大学院博士課程及び修士課程、学部の学生に感謝する。本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究 C、学術フロンティア構想、独立行政法人科学技術振興機構シーズ発掘試験、北陸大学特別研究助成などによる研究成果である。

Table 3. Glossaries

A		glycyrrhiza	Glycyrrhiza
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase	gypsum	Gypsum
angelica	Japanese Angelica Root	H	
APDC	ammonium pyrrolidine dithiocarbamate	HFD	high-fat diet
astragalus	Astragalus Root	HOMA-IR	homeostasis model assessment-insulin resistance
atractylodes	Atractylodes Lancea Rhizome	HSA	human serum albumin
B		J	
BG	blood glucose	jujube	Jujube
BOT	boiogito consisted of sinomenium (or stephania), astragalus, atractylodes, ginger, jujube and glycyrrhiza	K	
BOT-Astragalus	prescription consisted of stephania, atractylodes, ginger, jujube and glycyrrhiza	KS-1-4	6,7-dimethoxy-1-[4-[4-(6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoliny) methyl] phenoxy] benzyl]-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline
BOT-Atractylodes	prescription consisted of stephania, astragalus, ginger, jujube and glycyrrhiza	KS-1-1	6,7-dimethoxy-1-[4-[5-(6,7-dimethoxy-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoliny) methyl-2-methoxy] phenoxy] benzyl]-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline
BOT-Ginger	prescription consisted of stephania, astragalus, atractylodes, jujube and glycyrrhiza	M	
BOT-Glycyrrhiza	prescription consisted of stephania, astragalus, atractylodes, ginger and jujube	mentha	Mentha Herb
BOT-Jujube	prescription consisted of stephania, astragalus, atractylodes, ginger and glycyrrhiza	mirabilite	Sodium Sulfate Hydrate
BOT (Sinomenium)	boiogito consisted of sinomenium, astragalus, atractylodes, ginger, jujube and glycyrrhiza	N	
BOT (Stephania)	boiogito consisted of stephania, astragalus, atractylodes, ginger, jujube and glycyrrhiza	NF- κ B	nuclear factor κ B
BOT-Stephania	prescription consisted of astragalus, atractylodes, ginger, jujube, and glycyrrhiza	P	
BTS	bofutsushosan consisted of gardenia, ephedra, glycyrrhiza, rhubarb, forsythia, mirabilite, ginger, schizonepeta, platycodon, saposhnikovia, cnidium, angelica, peony, Atractylodes Rhizome, mentha, scutellaria, talcum and gypsum	PCR	polymerase chain reaction
C		PDGF	platelet derived growth factor
CML	N ^ε -(carboxymethyl) lysine	peony	Peony Root
cnidium	Cnidium Rhizome	platycodon	Platycodon Root
D		R	
DG	deoxyglucose	rhubarb	Rhubarb
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	S	
E		saposhnikovia	Saposhnikovia Root and Rhizome
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	schizonepeta	Schizonepeta Spike
ephedra	Ephedra Herb	scutellaria	Scutellaria Root
F		sinomenium	Sinomenium Stem and Rhizome
FBS	fetal bovine serum	stephania	<i>Stephania tetrandra</i> S. MOORE root
forsythia	Forsythia Fruit	STZ	streptozotocin
G		T	
gardenia	Gardenia Fruit	talcum	Aluminium Silicate Hydrate with Silicon Dioxide
ginger	Ginger	TNF	tumor necrosis factor
		U	
		UCP1	uncoupling protein1
		V	
		VEGF	vascular endothelial growth factor

The English names of crude drugs were quoted from The Japanese Pharmacopoeia, Seventeenth Edition.

利益相反 本稿の著者である古林伸二郎は、小林製薬株式会社から奨学（奨励）寄付金と防風通聖散エキスを試料を供与された。

REFERENCES

- 1) Kobayashi S., *J. Trad. Med.*, **13**, 18–26 (1996).
- 2) Liu Y. Y., Kobayashi S., Tsutsumi T., Kontani H., *J. Trad. Med.*, **17**, 253–260 (2000).
- 3) Tsutsumi T., Kobayashi S., Liu Y. Y., Kontani H., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 313–317 (2003).
- 4) Ma W., Nomura M., Takahashi-Nishioka T., Kobayashi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2079–2083 (2007).
- 5) Ishibashi T., Murata T., Hangai M., Nagai R., Horiuchi S., Lopez P. F., Hinton D. R., Ryan S. J., *Arch. Ophthalmol.*, **116**, 1629–1632 (1998).
- 6) Ikeda K., Higashi T., Sano H., Jinnouchi Y., Yoshida M., Araki T., Ueda S., Horiuchi S., *Biochemistry*, **35**, 8075–8083 (1996).
- 7) Kobayashi S., Shinohara H., Tsuneki H., Nagai R., Horiuchi S., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1382–1387 (2004).
- 8) Kobayashi S., Suzuki M., Tsuneki H., Nagai R., Horiuchi S., Hagino N., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1565–1571 (2004).
- 9) Hagino N., Kobayashi S., Tsutsumi T., Horiuchi S., Nagai R., Setalo G., Dettrich E., *Brain Res. Bull.*, **62**, 537–547 (2004).
- 10) Hagino N., Kobayashi S., “Mind in Aging,” Scientific Research Publishing, Irvine, 2017.
- 11) Kobayashi S., Nomura M., Nishioka T., Kikuchi M., Ishihara A., Nagai R., Hagino N., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 133–138 (2007).
- 12) Liang X.-C., Hagino N., Guo S.-S., Tsutsumi T., Kobayashi S., *Phytomedicine*, **9**, 377–384 (2002).
- 13) Kobayashi S., Kimura I., Fukuta M., Kontani H., Inaba K., Niwa M., Mita S., Kimura M., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 360–365 (1999).
- 14) Schreck R., Meier B., Männel D. N., Dröge W., Baeuerle P. A., *J. Exp. Med.*, **175**, 1181–1194 (1992).
- 15) Kikuchi M., Kamimura S., Nomura M., Takahashi T., Hagino N., Kobayashi S., *Chin. Med.*, **1**, 75–83 (2010).
- 16) Yu Q., Yasuda M., Takahashi T., Nomura M., Hagino N., Kobayashi S., *Chin. Med.*, **2**, 130–137 (2011).
- 17) Yu Q., Takahashi T., Nomura M., Yasuda M., Obatake I. K., Kobayashi S., *Chin. Med.*, **4**, 24–31 (2013).
- 18) Yu Q., Takahashi T., Nomura M., Kobayashi S., *Chin. Med.*, **4**, 157–165 (2013).
- 19) Kusakabe T., Tanioka H., Ebihara K., Hirata M., Miyamoto L., Miyana F., Hige H., Aotani D., Fujisawa T., Masuzaki H., Hosoda K., Nakao K., *Diabetologia*, **52**, 675–683 (2009).
- 20) Yu Q., Takahashi T., Nomura M., Matsuo Y. I., Kobayashi S., *Asian J. Trad. Med.*, **12**, 19–30 (2017).
- 21) Kobayashi S., Kawasaki Y., Takahashi T., Maeno H., Nomura M., *Chin. Med.*, **12**, 8 (2017).
- 22) Cannon B., Nedergaard J., *Physiol. Rev.*, **84**, 277–359 (2004).
- 23) Kieffer T. J., Heller R. S., Leech C. A., Holz G. G., Habener J. F., *Diabetes*, **46**, 1087–1093 (1997).
- 24) Liu J., Yin F., Zheng X., Jing J., Hu Y., *Neurochem. Int.*, **51**, 361–369 (2007).
- 25) Beiroa D., Imbernon M., Gallego R., Senra A., Herranz D., Villarroya F., Serrano M., Fernø J., Salvador J., Escalada J., Dieguez C., Lopez M., Frühbeck G., Nogueiras R., *Diabetes*, **63**, 3346–3358 (2014).
- 26) Sasaki T., Nakata R., Inoue H., Shimizu M., Inoue J., Sato R., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **306**, E1085–E1092 (2014).
- 27) Saltiel A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 535–537 (2000).
- 28) Yoshida T., Sakane N., Wakabayashi Y., Umekawa T., Kondo M., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **19**, 717–722 (1995).
- 29) Azushima K., Tamura K., Haku S., Wakui H., Kanaoka T., Ohsawa M., Uneda K., Kobayashi R., Ohki K., Dejima T., Maeda A., Hashimoto T., Oshikawa J., Kobayashi Y., Nomura K., Azushima C., Takeshita Y., Fujino R., Uchida K., Shibuya K., Ando D., Tokita Y., Fujikawa T., Toya Y., Umemura S., *Atherosclerosis*, **240**, 297–304 (2015).