

正常マウスの体重および体脂肪量に対する防風通聖散の作用

大野 晶子*, 阪田美智子, 森元 康夫, 田島 滋

カネボウ株式会社 漢方ヘルスケア研究所

Effects of Bofu-tsusho-san (Fang-Feng-Tong-Sheng-San) on body weight and fat content in normal mice

Akiko OHNO*, Michiko SAKATA, Yasuo MORIMOTO and Shigeru TAJIMA

Kampo & Healthcare Research Laboratories, Kanebo, Ltd.

(Received September 21, 2000. Accepted December 15, 2000.)

Abstract

The effects of Bofu-tsusho-san (BOF) on body weight and fat content were investigated in normal male and female ddY mice. Mice were fed ad libitum the experimental diet containing 1.5% or 4.5% (w/w) of BOF extract for 4 weeks. In both male and female mice, BOF suppressed the body weight gain and fat accumulation without affecting food intake. BOF also reduced triglyceride content in the liver, and increased mitochondrial cytochrome c oxidase activity, a functional index of thermogenesis, in the brown adipose tissue. These results suggest that BOF has a preventive effect against body fat accumulation by inhibiting triglyceride synthesis in the liver and by enhancing the thermogenesis in the brown adipose tissue.

Key words Bofu-tsusho-san (Fang-Feng-Tong-Sheng-San, 防風通聖散), brown adipose tissue, cytochrome c oxidase, ddY mice, obesity, triglyceride.

Abbreviations BOF, Bofu-tsusho-san (Fang-Feng-Tong-Sheng-San), 防風通聖散; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; IBAT, interscapular brown adipose tissue; MSG, monosodium glutamate; TC, total cholesterol; TCA, tricarboxylic acid; TG, triglyceride.

緒 言

近年、我が国においては食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴う運動不足などにより肥満が増加している。肥満は高脂血症、糖尿病、高血圧などいわゆる「生活習慣病」の原因と密接に関係するだけでなく、その増悪因子とも考えられている。そのため、肥満の治療および予防は現代医療の重要な課題であり、各方面から多大な関心が寄せられている。

ところで、漢方薬は複数の薬効を持つ生薬を組み合わせることで総合的に体の機能を調節すると考えられている。このことから、複数の症状を併発する生活習慣病に対して

も有用性が期待されている。中でも防風通聖散は肥満に対して用いられる代表的な処方であり、腹部に皮下脂肪が多く、便秘がちな人の諸症状に有効とされている。また動物モデル実験においても、防風通聖散は遺伝性肥満ラット¹⁾やmonosodium glutamate (MSG) 誘発肥満マウス²⁾およびラット³⁾において抗肥満作用を示すことが確認されている。しかし、正常動物においてどのような作用を示すかについてはほとんど検討されていない。そこで今回、防風通聖散の正常動物に及ぼす影響を調べるために正常 ddY 系マウスの体重および体脂肪量に対する作用を検討したところ、興味ある知見が得られたので報告する。

*〒534-0016 大阪府大阪市都島区友洲町 1-5-90
5-90 Tomobuchi-cho 1-chome, Miyakojima-ku, Osaka
534-0016, Japan

材料と方法

(1) **実験方法**: 6週齢の ddY 系雄性および雌性マウスを日本エスエルシーより購入し、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で1週間予備飼育した後、雌雄ともに1群9匹ずつ3群に分け使用した。飼料および水は自由摂取させた。

(2) **被検薬物**: 防風通聖散 (BOF) はカネボウ (株) 製医療用エキス粉末を用いた。BOF はエキス粉末含量が 1.5%, 4.5% (w/w) となるように普通粉末飼料 (CE-2; 日本クレア) に配合し、これを試験飼料として与えた。なお、各飼料間でカロリーに差はなかった。

(3) **実験方法**: 対照群には普通粉末飼料を、残り2群にはそれぞれ BOF 1.5%, 4.5% 配合粉末飼料を4週間自由摂取させた。摂餌量は飼料交換時に測定し、体重測定と採血は週1回行った。採血は非絶食状態においてエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より行い、血清を遠心分離後、各種血清パラメータを測定した。最終採血終了後、頸部動脈より放血致死せしめ、各脂肪組織および肝臓を摘出し、それらの重量を測定した。脂肪組織としては、下腹

部周囲皮下脂肪、生殖器 (精巣および子宮) 周囲白色脂肪、後腹膜白色脂肪および肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出した。なお、肝臓は -40°C で冷凍保存した後、肝臓脂質含量の測定に供した。また、肩甲骨間褐色脂肪組織は -40°C で冷凍保存した後、チトクロム c オキシダーゼ活性の測定に供した。

(4) **血清パラメータの測定**: 血清総コレステロール (TC) およびトリグリセライド (TG) 濃度は、それぞれコレステロール E-テストワコーおよびトリグリセライド E-テストワコー (いずれも和光純薬) を用いて毎週測定した。また、最終採血時には血糖値、血清インスリンおよびレプチン濃度を、それぞれグルコース B-テストワコー (和光純薬)、インスリン測定キットおよびレプチン測定キット (いずれも森永生科学研究所) を用いて測定した。

(5) **肝臓脂質含量の測定**: 肝臓中の脂質を Folch 法⁴⁾ により抽出した後、TC、TG およびリン脂質含量を測定した。TC および TG は前項と同じキットを用いて、リン脂質はリン脂質 B-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

(6) **褐色脂肪組織中のチトクロム c オキシダーゼ活性の**

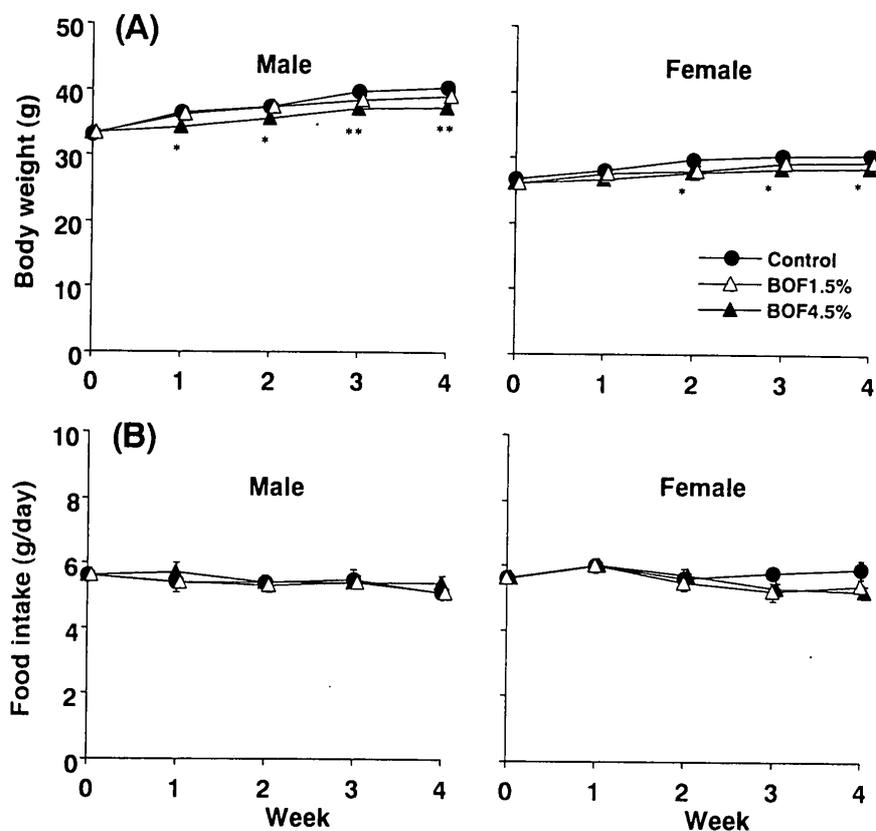


Fig. 1 Effects of Bofu-tsusho-san (BOF) on body weight (A) and food intake (B) in ddY mice. Mice were given an experimental diet containing 1.5% or 4.5% (w/w) of BOF for 4 weeks. The control groups were given a normal diet. Each point represents the mean \pm S.E. of 9 mice. Significant differences from the control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

測定：褐色脂肪組織を 0.25 M ショ糖-5 mM TES-水酸化カリウム緩衝液 (pH 7.2) でホモジネートし、適宜希釈した後、等量の 1% TritonX-100-50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で混合したものを粗酵素液とした。また、チトクロム c (Sigma; ウマ心筋由来) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、10 mM アスコルビン酸水溶液を加えて還元型チトクロム c 溶液とした。チトクロム c オキシゲナーゼ活性測定は、既報⁵⁾ に準じて行った。すなわち、還元型チトクロム c の 550 nm における吸光度の対数値を縦軸に、反応時間を横軸にプロットし、粗酵素液を添加後の吸光度の消失曲線の傾きから酵素活性を算出した。なお、褐色脂肪組織中の蛋白含量は Lowry 法⁶⁾ により測定した。

(7) 統計処理：結果は平均値±標準誤差で示した。対照群と BOF 投与群間の有意差は、一元配置分散分析を行った後に Dunnett 法により検定し、危険率が 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意差ありと判定した。

結 果

1. 体重および摂餌量

投与期間中の体重は、雌雄ともに BOF 投与群で用量依存的に増加が抑制され、特に 4.5% 投与群では雌雄ともに対照群と比較して有意な増加抑制が認められた (Fig. 1A)。しかし、摂餌量は雌雄ともに投与期間を通じて各群間で差は認められなかった (Fig. 1B)。なお、BOF 投与群では雌雄ともに下痢やその他の異常所見は認められなかった。

2. 血清パラメータ

投与期間中の血清 TC 濃度は雌雄ともに各群間で差は認められなかった (Fig. 2A)。一方、血清 TG 濃度は雌では各群間で差は認められなかったが、雄では BOF 4.5% 投与群で対照群と比較して有意な低下が認められた (Fig. 2B)。BOF 投与 4 週間後の血糖値は雌雄ともに各群間で差は認められなかったが、血清インスリンおよびレプチン濃度は雌雄ともに BOF 投与群で用量依存的に低下し、特に雄のレプチン濃度では対照群との間に有意差が認められた (Fig. 3)。

3. 肝臓脂質含量

BOF 投与 4 週間後の肝臓重量ならびに肝臓中の TC およびリン脂質含量は雌雄ともに各群間で差はなかった。一方、肝臓中 TG 含量は雌雄ともに BOF 投与群で用

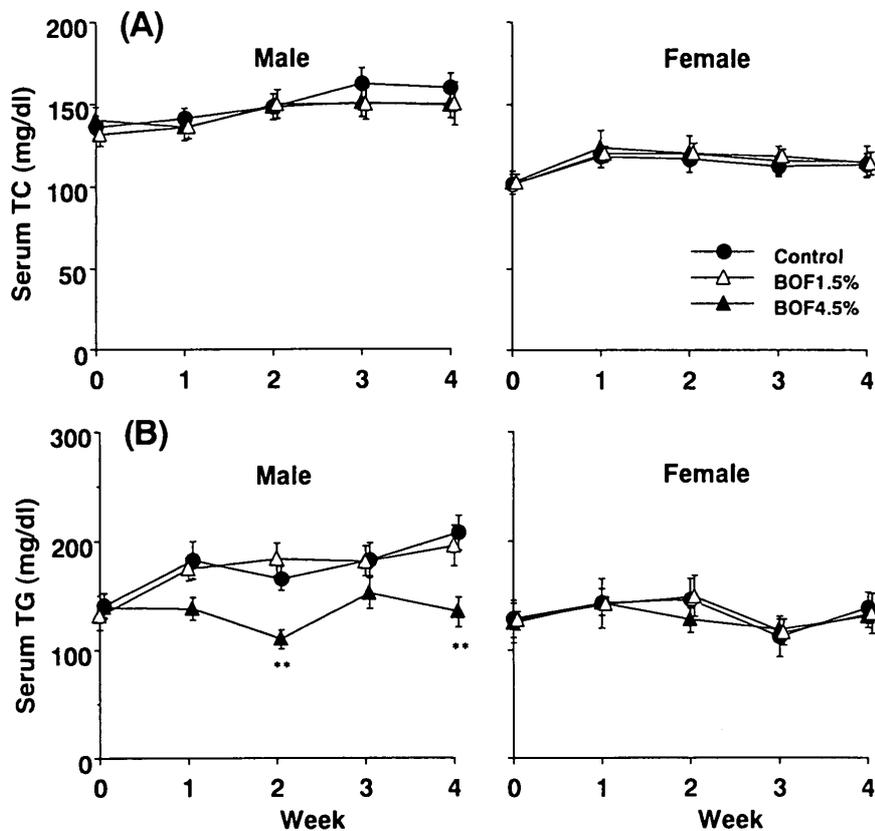


Fig. 2 Effects of Bofu-tsusho-san (BOF) on serum total cholesterol (A) and triglyceride (B) levels in ddY mice. Mice were given an experimental diet containing 1.5% or 4.5% (w/w) of BOF for 4 weeks. The control groups were given a normal diet. Each point represents the mean±S.E. of 9 mice. Significant differences from the control; ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

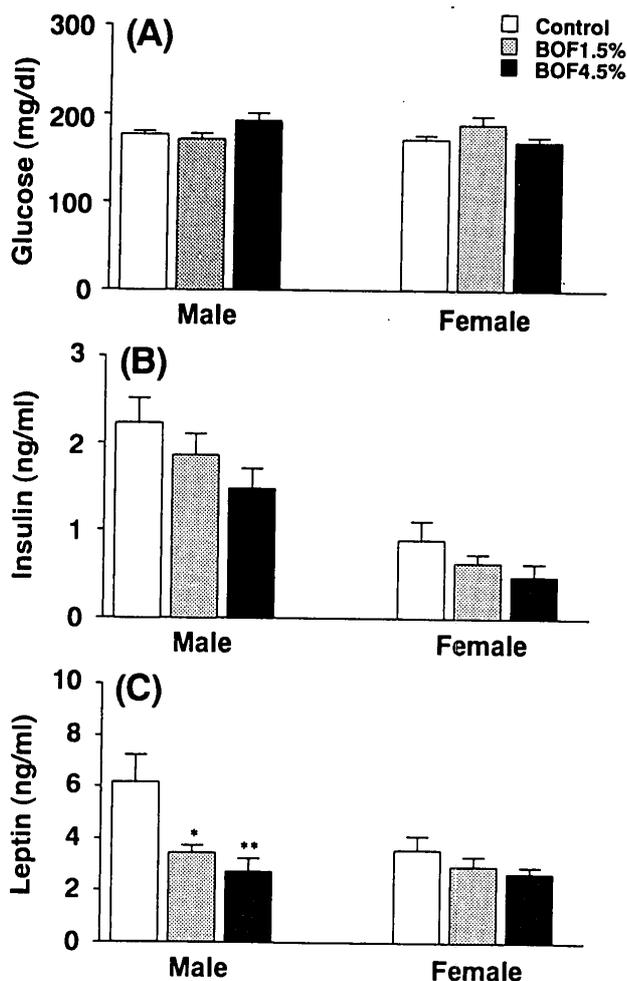


Fig. 3 Serum glucose (A), insulin (B) and leptin (C) levels in ddY mice given an experimental diet containing Bofu-tsusho-san (BOF) for 4 weeks. Each column represents the mean±S.E. of 9 mice. Significant differences from the control ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

量依存的に減少し、雄では対照群との間に有意差が認められた (Table I)。

4. 白色脂肪組織重量

下腹部周囲皮下脂肪、生殖器周囲および後腹膜の白色脂肪組織重量は、いずれも雌雄ともに BOF 投与群では用量依存的かつ有意に減少した (Fig. 4)。

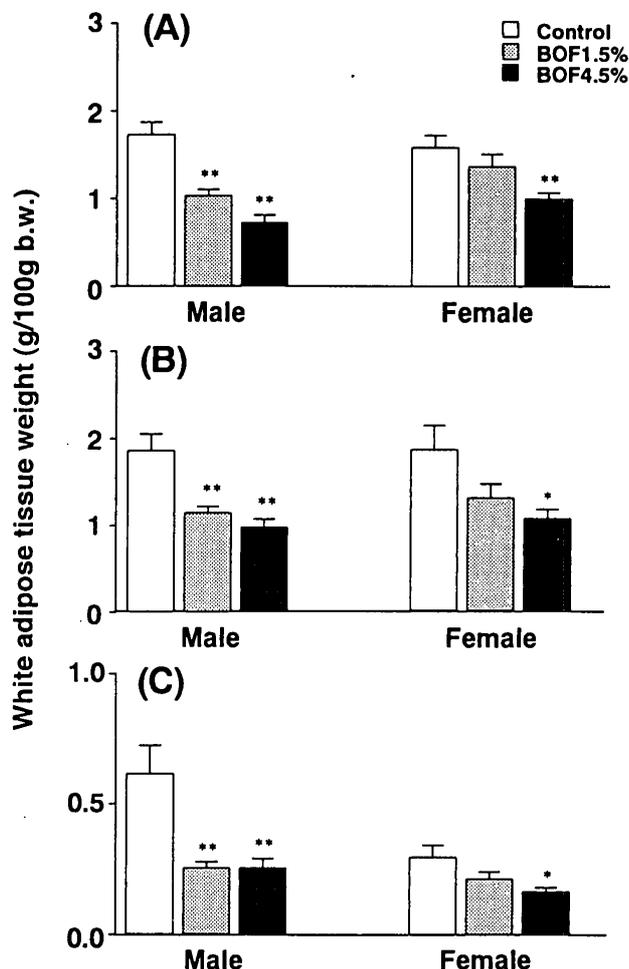


Fig. 4 Subcutaneous (A), perigenital (B) and retroperitoneal (C) white adipose tissue weight in ddY mice given an experimental diet containing Bofu-tsusho-san (BOF) for 4 weeks. Each column represents the mean±S.E. of 9 mice. Significant differences from the control ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

Table I Liver weight and lipid contents of ddY mice given an experimental diet containing Bofu-tsusho-san (BOF) for 4 weeks.

	Liver weight (g/100g b.w.)	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)	Phospholipids (mg/g liver)
Male				
Control	5.1±0.1	2.8±0.1	6.3±0.5	18.3±0.4
BOF 1.5%	5.5±0.3	2.8±0.1	4.4±0.6*	18.6±0.3
BOF 4.5%	5.4±0.2	2.7±0.1	3.4±0.4**	17.9±0.2
Female				
Control	5.2±0.2	2.7±0.1	6.9±1.2	17.5±0.2
BOF 1.5%	5.4±0.1	3.0±0.2	5.8±0.7	17.8±0.2
BOF 4.5%	5.4±0.1	2.8±0.1	4.4±0.5	17.5±0.2

Significant differences from the control ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

Table II Cytochrome c oxidase activity in the interscapular brown adipose tissue (IBAT) of ddY mice given an experimental diet containing Bofu-tsusho-san (BOF) for 4 weeks.

	IBAT weight (g/100g b.w.)	Cytochrome c oxidase activity	
		(μ mol/min/g protein)	(μ mol/min/g IBAT)
Male			
Control	0.37 \pm 0.02	6.6 \pm 0.4	438 \pm 45
BOF 1.5%	0.32 \pm 0.02	7.2 \pm 0.5	527 \pm 52
BOF 4.5%	0.27 \pm 0.01*	8.4 \pm 0.5*	619 \pm 50
Female			
Control	0.30 \pm 0.01	6.2 \pm 0.5	544 \pm 50
BOF 1.5%	0.29 \pm 0.01	6.9 \pm 0.4	605 \pm 32
BOF 4.5%	0.30 \pm 0.01	7.2 \pm 0.4	657 \pm 47

Significant differences from the control ; * p <0.05 (Dunnett's test)

5. 褐色脂肪組織中のチトクロムcオキシダーゼ活性

BOF 投与群の褐色脂肪組織重量は、雄では4.5% 投与群で有意に減少したが、雌では変化がなかった。一方、褐色脂肪組織中のチトクロムcオキシダーゼ活性は、BOF 投与群では雌雄ともに比活性、全活性のいずれもが用量依存的に上昇したが、特に雄の4.5% 投与群では比活性の有意な上昇が認められた (Table II)。

考 察

今回の検討で、BOF は正常 ddY 系マウスの雌雄いずれにおいても、摂餌量に影響を与えることなく体重増加を抑制し、体脂肪量を減少させた。また、BOF は構成生薬に瀉下作用を有する大黄を含むが、BOF 投与群において投与期間中に下痢などは認められなかった。これらのことから、BOF 投与による体重増加の抑制および体脂肪量の減少は、摂餌量の減少や下痢に伴う栄養吸収障害などに起因するものではないと考えられた。

BOF 投与群では雌雄ともに血清インスリン濃度の低下が認められたが、血糖値には変化はなかった。このことは、BOF 投与によって少量のインスリンでも血糖値が正常に維持されていることを示している。この機序としては、体脂肪量が減少したことで末梢でのインスリン感受性が亢進したことが考えられるが、この点に関しては今後さらに詳細な検討を要する。なお、インスリンは肝臓での TG 合成を促進することが知られている⁷⁾。BOF 投与群では雌雄ともに肝臓中の TG 含量が減少したが、これは BOF 投与によって血中インスリン濃度が低下したため、肝臓での TG 合成が抑制されたことによる可能性が考えられる。

脂肪細胞での TG 分解は、生体内では交感神経終末から遊離したノルエピネフリンが細胞表面のアドレナリン

β 3 受容体に結合して細胞内の cAMP を増加させ、ホルモン感受性リパーゼを活性化して起こると考えられている^{8,9)}。一方、インスリンは脂肪細胞ではホルモン感受性リパーゼ活性を低下させて TG 分解を抑制することが知られている^{8,9)}したがって、BOF 投与群では血中インスリン濃度の低下によって脂肪細胞での TG 分解が亢進し、このことが体脂肪量の減少に一部寄与している可能性が考えられる。

褐色脂肪細胞は、余剰エネルギーを TG の形で貯蔵する白色脂肪細胞とは異なり、TG が分解されて生じた脂肪酸をミトコンドリアで β 酸化させ、TCA 回路、電子伝達系を経て熱を産生する機能を有している。今回の検討では、褐色脂肪組織での熱産生能の指標として電子伝達系酵素であるチトクロムcオキシダーゼ活性を測定した。その結果、雌雄ともに BOF 投与群ではチトクロムcオキシダーゼ活性の上昇が認められた。Yoshida らは MSG 誘発肥満マウスおよび対照動物である正常 ICR マウスにおいて、BOF が褐色脂肪組織のチトクロムcオキシダーゼ活性を上昇させ、熱産生能を亢進させて抗肥満作用を示すことを報告している²⁾。今回の結果から、BOF は正常 ddY 系マウスにおいても、同様に褐色脂肪組織での熱産生能を亢進すると考えられる。

このような BOF の熱産生亢進作用には、構成生薬である麻黄に含まれるエフェドリンの関与が考えられる。褐色脂肪組織での熱産生機構はアドレナリン β 3 受容体を介しており、交感神経の活動が高まることで亢進することが知られているが、エフェドリンは交感神経終末からのノルエピネフリン遊離を促進し、褐色脂肪組織での熱産生能を亢進する¹⁰⁾。また、その作用は cAMP 分解酵素のホスホジエステラーゼを阻害するカフェインによって相乗的に増強されることが報告されている¹⁰⁾。Yoshida らは BOF がカフェインに匹敵するホスホジエステラー

ゼ阻害作用を有し²⁾、それには構成生薬である荊芥、連翹および甘草¹¹⁻¹³⁾によるホスホジエステラーゼ阻害作用の寄与が考えられることを報告している。これらのことから、BOFを投与すると複数の構成生薬が協調的に作用して交感神経の活動を高め、脂肪細胞でのTG分解および褐色脂肪組織での熱産生能が亢進すると考えられる。

以上のように、正常 ddY 系雄性および雌性マウスに BOF を 4 週間混餌投与することにより、雌雄ともに体重増加が抑制され、体脂肪量が減少した。その際、肝臓中 TG 含量の減少および褐色脂肪組織中のチトクロム c オキシダーゼ活性の上昇が認められたことから、BOF は肝臓での TG 合成を抑制するとともに、脂肪組織での TG 分解および褐色脂肪組織での熱産生能を亢進することで体脂肪量を減少させたと推察される。なお、今回の結果を雄と雌と比較すると、BOF による体脂肪量の減少や、体脂肪量と正相関するとされる血清レプチン濃度の低下は雄の方に強く現われた。また、血清 TG 濃度の低下も雄のみに認められた。このように雄と雌とで BOF の反応性に違いが生じた原因については現時点では不明であるが、BOF による肝臓 TG 含量の減少や、チトクロム c オキシダーゼ活性の上昇の程度が、いずれも雌よりも雄の方が強かったことが反映していると考えられる。

References

- 1) Takakura, S., Fushimi, M., Kawamura, I., Manda, T., Yoneda, K. and Okuhara, M. : Anti-obesity effect of Bofutsushosan, a Chinese traditional medicine, in genetically obese Zucker rats. *Jpn Pharmacol Ther.* **25**, 1321-1324, 1997.
- 2) Yoshida, T., Sakane, N., Wakabayashi, Y., Umekawa, T. and Kondo, M. : Thermogenic, anti-obesity effects of bofu-tsusho-san in MSG-obese mice. *Int. J. Obes.* **19**, 717-722, 1995.
- 3) Morimoto, Y., Sakata, M., Ono, A., Maegawa, T., Masuda, H., Nagano, M. and Fukunishi, K. : Effects of Bofu-tsusho-san on monosodium glutamate-induced obesity in rats. *J. Trad. Med.* **15**, 400-401, 1998.
- 4) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509, 1957.
- 5) Yonetani, T. and Ray, G. S. : Studies on cytochrome oxidase : Kinetics of the aerobic oxidation of ferrocyclochrome c by cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **240**, 3392-3398, 1965.
- 6) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 7) Assimakopoulos-Jeannet, F., Karakash, C., le Marchant, Y. and Jeanrenaud, B. : Effect of insulin on hepatic lipogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 1002-1003, 1977.
- 8) Belfrange, P., Fredrikson, G., Nilsson, N. O. and Stralfors, P. : Regulation of adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int. J. Obes.* **5**, 635-641, 1981.
- 9) Carey, G. B. : Mechanisms regulating adipocyte lipolysis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **441**, 157-170, 1998.
- 10) Dulloo, A. G., Seydoux, J. and Girardier, L. : Peripheral mechanisms of thermogenesis induced by ephedrine and caffeine in brown adipose tissue. *Int. J. Obes.* **15**, 317-326, 1991.
- 11) Kusano, A., Nikaido, T., Kuge, T., Ohmoto, T., Delle Monache, G., Botta, B., Botta, M. and Saitoh, T. : Inhibition of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids from licorice roots and 4-arylcoumarins. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 930-933, 1991.
- 12) Nikaido, T., Ohmoto, T., Kinoshita, T., Sankawa, U., Nishibe, S. and Hisada, S. : Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by lignans. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3586-3592, 1981.
- 13) Sankawa, U. : The enzyme inhibitory effect of medical plants. *Pharmacia* **17**, 387-391, 1981.