

八味地黄丸のインスリン非依存型糖尿病モデルマウスに 対するインスリン抵抗性改善効果

古屋優里子*, 川喜多卓也, 田島 滋

鐘紡(株)漢方ヘルスケア研究所

Effect of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) on insulin resistance in non-insulin dependent diabetes mellitus model mice

Yuriko FURUYA*, Takuya KAWAKITA, Shigeru TAJIMA

Kampo (Traditional Japanese Medicine) & Healthcare Research Laboratories, Kanebo. Ltd.

(Received January 8, 1999. Accepted May 6, 1999.)

Abstract

We examined the effect of Hachimi-jio-gan (HMG), a Kampo medicine, on KK-A^y mice which were recognized as a non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) animal model. Hyperglycemia and the high level of plasma triglyceride and free fatty acid were ameliorated significantly by administration of 0.5 or 2 % HMG included in powdery diet without reduction of body weight and plasma leptin level, an obesity indicator. However, HMG did not induce the decrease of plasma glucose level in normal mice. HMG also suppressed hyperinsulinemia in KK-A^y mice. In the insulin tolerance test, the resistance to insulin *in vivo* was reduced by treatment with HMG.

HMG is used to improve several disorders associated with diabetes in clinical. The present study suggested that HMG ameliorated hyperglycemia and hyperinsulinemia due to the reduction of insulin resistance.

Key words Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan, 八味地黄丸), non-insulin dependent diabetes mellitus, KK-A^y mouse, hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance.

Abbreviations ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay ; FFA, free fatty acid ; HMG (Ba-Wei-Di-Huang-Wan), Hachimi-jio-gan, 八味地黄丸 ; NIDDM, non-insulin dependent diabetes mellitus ; TC, total cholesterol ; TG, triglyceride.

緒 言

八味地黄丸(HMG)は、多尿、頻尿等の排尿異常あるいは老化による諸機能の低下など、いわゆる腎虚に対する処方としてよく知られている。また、口渴、しびれおよび多尿等の糖尿病に随伴する諸症状の改善を目的としても広く臨床応用されている。過去の報告ではHMGが、アロキサンあるいはサイプロヘプタジン誘発糖尿病モデル動物や老齢動物の耐糖能を改善することが示され

ている。^{1,4)}インスリン非依存型糖尿病(non-insulin dependent diabetes mellitus(以下NIDDMと略す))は先進国で発症頻度の高い代謝異常疾患で、アテローム動脈硬化、高血圧、心血管異常や腎不全などの疾患の主要な原因にもなっている。NIDDMは膵臓でのインスリン分泌機能の低下の他に、肝臓、骨格筋および脂肪細胞などインスリン標的組織におけるインスリン感受性の低下すなわちインスリン抵抗性が主な原因と考えられている。⁵⁾このうち前者は大部分が遺伝的要因によるが、後者は肥満などから誘導される二次的な因子が原因とされて

*〒534-8666 大阪府大阪市都島区友渕町1丁目5-90
5-90, Tomobuchi-cho 1-chome, Miyakojima-ku, Osaka
534-8666, Japan

いる。

KK-A^y マウスは、インスリン抵抗性を示すが正常血糖値である KK マウスに、過食による肥満を誘導する A^y 遺伝子を導入することにより、肥満を伴う高血糖、高脂質血症およびインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症などを示す^{6,7)}。これらのヒト NIDDM 患者と類似した症状を呈するため、各種の糖尿病治療薬の評価に用いられている遺伝性 NIDDM モデルの 1 つである^{8,9)}。

本研究では、KK-A^y マウスに対し HMG を経口投与し、HMG の NIDDM 型に対する効果とその作用メカニズムについて検討を行った。

材料と方法

(1) 実験動物：4 週齢の雌性 KK-A^y/Ta Jcl マウス（以下 KK-A^y マウスと略す）は日本クレアより購入した。正常群として 4 週齢の雌性 C57BL/6CrSlc マウス（以下 C57BL/6）を日本 SLC より購入した。温度 23±2℃、湿度 55±2%、午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の条件下で個別飼育を行い、1 週間の予備飼育後実験に供した。これらの動物は自由に摂食摂水させた。体重は週毎に測定を行った。

(2) 薬物：八味地黄丸 (HMG) は鐘紡 (株) 社製エキスをを用いた。すなわち、8 種類の生薬、地黄 (5)、山茱萸 (3)、山薬 (3)、沢瀉 (3)、茯苓 (3)、牡丹皮 (3)、桂皮 (1)、附子 (1) を () 内に示した重量比で混合し、10 倍量の水を加え、100℃で 1 時間抽出した後、乾燥エキス粉末とした (収率：22%)。

このエキス粉末を粉末飼料 (日本クレア CE-2) に対し重量比で 0.5 および 2% となるように混合し、5 週齢時より混餌投与を開始した。摂餌量の測定から算出した HMG 投与量は各々約 0.5 および 2 g/kg mice body weight に相当したが、対照群と比較して摂餌量の変化は全く認められない用量範囲であった。なお対照群 KK-A^y マウスおよび正常群 C57BL/6 マウスには 5 週齢時より粉末飼料のみを与えた。

(3) 血糖、血漿中脂質関連因子およびインスリンの測定：マウス眼底静脈叢より採血を行い遠心分離後、血漿を得た。血糖はグルコース-B テストワコー、トリグリセライド (TG) はトリグリセリド-G テストワコー、総コレステロール (TC) はコレステロール-E テストワコー、遊離脂肪酸 (FFA) は NEFA-C テストワコー (各キット：和光純薬) により測定を行った。

インスリンおよびレプチンは ELISA キット (インスリン：和光純薬、レプチン：森永) により測定を行った。血糖およびインスリンは HMG 投与前、2 週間投与およ

び 4 週間投与の血漿試料について測定を行い、TG、TC、FFA およびレプチンについては 4 週間投与の試料について測定を行った。

(4) インスリン負荷試験：HMG を 4 週間投与した KK-A^y マウスに対し、インスリン負荷試験を行った。20 時間絶食後、眼底静脈叢より採血を行いこれをテスト前試料とした。0.5 U/kg のインスリン (SIGMA) を腹腔内投与し、0.5、1 および 2 時間後にそれぞれ眼底静脈叢より採血を行い、血漿試料を得た。試料中の血糖値は上記方法により測定した。

(5) 統計学的処理：それぞれの測定結果は、その平均値±標準誤差 (S.E.) で表した。二群間の比較は t 検定を行い、多群間の比較には一元配置分散分析後、Dunnett 法により検定を行った。

結 果

1. 高血糖および高脂質血症改善効果

KK-A^y マウスは 5 週齢より 0.5 および 2% HMG を混餌投与して、2 および 4 週間後に血漿を採取して測定を行った。対照群 KK-A^y マウスでは 5 週齢においても既に C57BL/6 マウスに対して有意な血糖値の上昇を認め、加齢と共にその値は更に上昇した。HMG 2 週間混餌投与では血糖値に有意差は認められなかったが、4 週間投与では、HMG は 0.5 および 2% 投与群において共に KK-A^y の血糖値が有意に低下した (Fig. 1)。

一方、C57BL/6 マウスに 2% HMG の 4 週間投与を

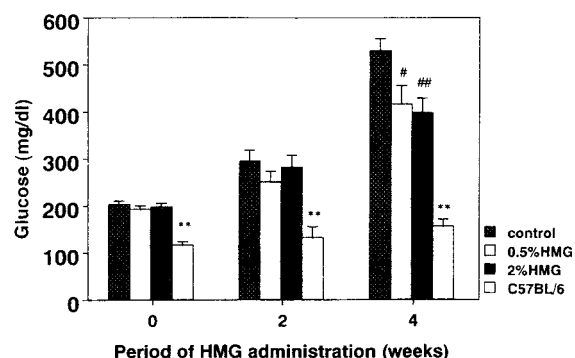


Fig. 1 Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on plasma glucose level in KK-A^y mice
HMG was administered as dietary admixture (0.5%, 2%) for 2 or 4 weeks. Plasma glucose in nonfasting state was measured by a commercial kit. The values were expressed as means±S.E.
n=9 (control, 0.5% HMG, 2% HMG), n=10 (C57BL/6 mice)
##: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$ vs. control (by Dunnett's test)
*: $p < 0.01$ vs. control (by Student's *t*-test)

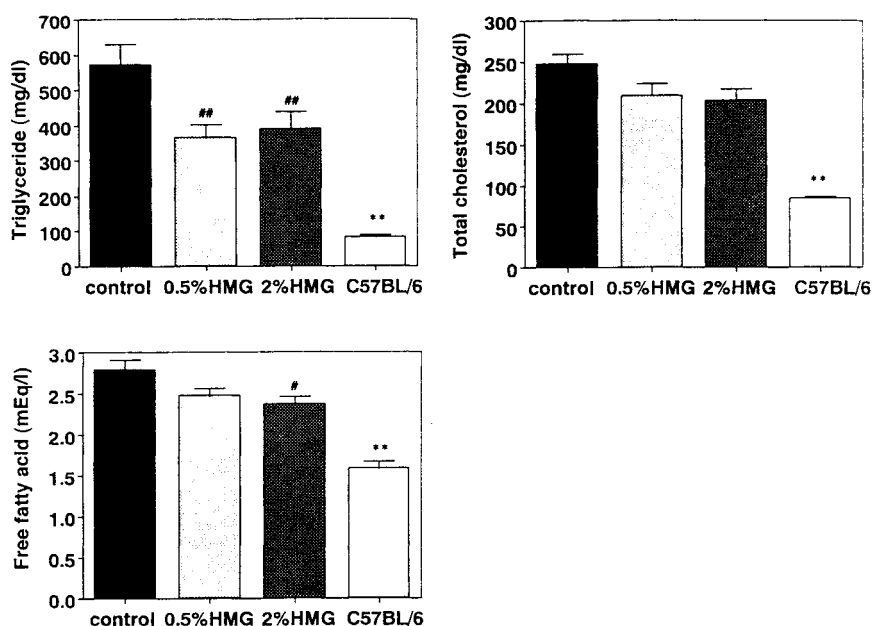


Fig. 2 Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on some plasma lipid biological factors in KK-A^y mice

HMG was administered as dietary admixture (0.5 %, 2 %) for 2 or 4 weeks. Plasma triglyceride, total cholesterol and free fatty acid in nonfasting state were measured by each commercial kit. The values were expressed as means $\pm$ S.E.

n=9 (control, 0.5 % HMG, 2 % HMG), n=10 (C57BL/6 mice)

##; $p < 0.01$, #; $p < 0.05$ vs. control (by Dunnett's test)

** ; $p < 0.01$ vs. control (by Student's *t*-test)

行った場合、血糖値の低下は認められなかった (data not shown)。

HMG 4週間投与後の血漿試料中の TC, TG および FFA 値を測定した (Fig. 2)。KK-A^y マウスの TG 値は C57BL/6 マウスに比べ5倍以上, TC 値は3倍以上, FFA 値は1.5倍高い値を示した。TG 値は0.5%および2% HMG 投与群で有意に低下した。しかし TC 値は HMG 投与によりわずかに低下傾向を示したのみであった。一方, FFA 値は2% HMG 投与により有意に低下し, 0.5% 投与群でも低下傾向を示した。

2. 肥満に対する影響

KK-A^y マウスは A^y 遺伝子の導入による過食性肥満により, 高血糖などの糖尿病の病態が加速される。そこで HMG 投与による体重への影響を検討したが, 2および4週間の薬剤投与による体重の減少は認められず (Table I), 摂餌量にも変化は認められなかった (data not shown)。

更に, 肥満とその発現が関連していることが報告されている血中レプチン値についても測定した。KK-A^y マウスでは C57BL/6 マウスに比べ, 著しく高い値を示し

Table I Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on body weight in KK-A^y mice

body weight (g)	Period of HMG administration (weeks)		
	0	2	4
control	22.4 $\pm$ 0.34	35.8 $\pm$ 0.52	41.1 $\pm$ 0.59
0.5 % HMG	21.9 $\pm$ 0.26	35.8 $\pm$ 0.57	40.3 $\pm$ 0.91
2 % HMG	22.3 $\pm$ 0.17	35.2 $\pm$ 0.40	40.3 $\pm$ 0.44

HMG was administered as dietary admixture (0.5 %, 2 %) for 2 or 4 weeks. The values were expressed as means $\pm$ S.E. n=9 (control, 0.5 % HMG, 2 % HMG). There was no significant difference.

たが, HMG 投与による変化は認められなかった (Fig. 3)。従って, HMG の高血糖などの低下作用は, 肥満に対する影響によるものではないと考えられた。

3. インスリン抵抗性改善効果

血中インスリン濃度は, 5週齢において C57BL/6 マウスと比して異常な高値を示しており, 加齢に伴いその濃度は増加した。HMG の2週間投与では各群間に差は認められなかったが, 4週間投与では2% 投与群において血漿中インスリン濃度が有意に低下した (Fig. 4)。HMG

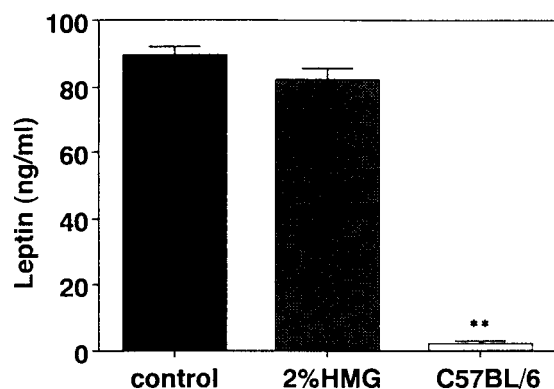


Fig. 3 Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on plasma leptin in KK-A^y mice

HMG was administered as dietary admixture (2 %) for 4 weeks. Plasma leptin in nonfasting state was measured by an ELISA kit. The values were expressed as means $\pm$ S.E. n=9 (control, 2 % HMG), n=6 (C57BL/6 mice)

** ; $p < 0.01$ vs. control (by Student's *t*-test)

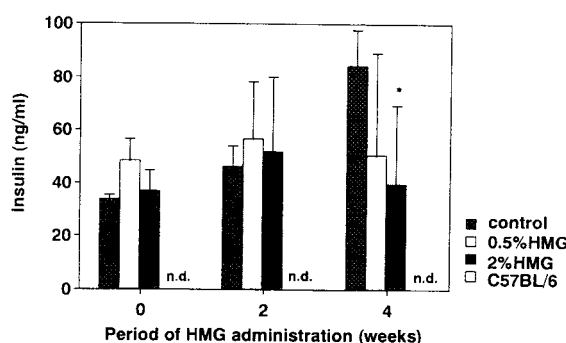


Fig. 4 Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on plasma insulin level in KK-A^y mouse

HMG was administered as dietary admixture (0.5 %, 2 %) for 2 or 4 weeks. Plasma insulin in nonfasting state was measured by an ELISA kit. The values were expressed as means $\pm$ S.E.

n=9 (control, 0.5 % HMG, 2 % HMG), n=10 (C57BL/6 mice), n.d. : not detected (< 1 ng/ml), * ; $p < 0.05$ vs. control (by Dunnett's test)

が高血糖および高インスリン血症を改善するメカニズムについて検討を行うため、インスリン負荷試験を行った。インスリン 0.5 U/kg を腹腔内投与した際に、対照群の KK-A^y マウスは血糖値が低下せず、インスリン抵抗性を示した (Fig. 5)。しかし、HMG 投与群では同濃度のインスリン負荷に対して血糖値が有意に低下しており、これは HMG 投与により、インスリン抵抗性が改善され、

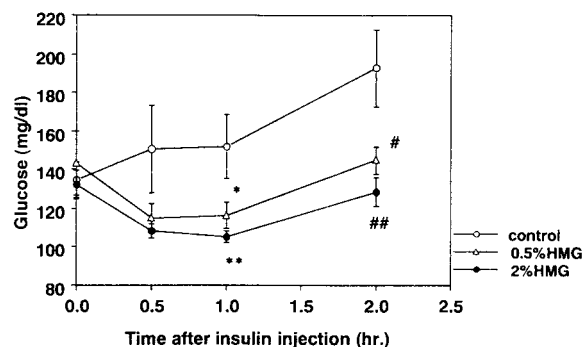


Fig. 5 Effect of Hachimi-jio-gan (HMG) on insulin tolerance test in KK-A^y mice

HMG was administered as dietary admixture (0.5 %, 2 %) for 4 weeks. Then, the mice were intraperitoneally injected with 0.5 U/kg insulin. The plasma was obtained at 0.5 hr, 1 hr and 2 hr after injection. Each plasma glucose was measured by a commercial kit. The values were expressed as means $\pm$ S.E.

n=9 (control, 0.5 % HMG, 2 % HMG)

** , ## ; $p < 0.01$, # , * ; $p < 0.05$ vs. control (by Dunnett's test)

インスリン刺激の際の組織の糖取り込みの促進あるいは肝臓における糖放出が抑制されていることを示すものである。HMG はインスリン抵抗性を改善することにより KK-A^y マウスの高血糖および高インスリン血症を改善することが示された (Fig. 5)。

考 察

我が国の糖尿病患者の大多数を占める NIDDM の高血糖および高インスリン血症に対して HMG がどのような影響を及ぼしているかを検討するため、NIDDM のモデル動物である KK-A^y マウスに対し、HMG を混餌投与し、血糖や脂質関連因子への影響を検討した。その結果、HMG が KK-A^y マウスの高血糖を有意に改善し、血漿中の脂質関連因子をも低下させることが示された。しかし、HMG はマウスの体重や摂餌量に影響を与えなかった。また、*ob* 遺伝子により脂肪細胞から産生されるレプチンは、肥満とその発現が相関していることが報告されているが摂食量にも相関性があり、飢餓状態では血中のレプチン値は著しく低下することが報告されている^{10,11)}。HMG 投与によるレプチンの低下は認められないことから、HMG による血糖低下は KK-A^y マウスの過食を抑えるためではないと考えられた。一方、正常マウスに HMG を 4 週間投与しても血糖値および体重に全く影響を与えなかった。HMG は既存の血糖降下薬とは本質的に作用メカニズムが異なると考えられた。血漿中のインスリン濃度を測定すると 2 % HMG 投与群に

において有意な低下が認められ、外因性インスリンに対する感受性を検討したところ、対照群のKK-A^yマウスに比して、HMG投与群では感受性が有意に改善されていた。以上の結果から、HMGはインスリン抵抗性の改善により高血糖および高インスリン血症を改善すると考えられた。TG値の低下もインスリン抵抗性改善により血中インスリン濃度が著しく低下したため、もしくは直接的にTGの合成をHMGが抑制したためと考えられた。

永吉ら⁴⁾はアロキササン糖尿病ウサギで絶食時血糖値が低いものではHMGが糖負荷時の血糖上昇を抑制することを報告しており、HMGはインスリン分泌能力がある程度残存しているときに有効であることが示唆される。また後藤ら³⁾はサイプロヘプタジン糖尿病マウスでインスリンレベルを変化させずに、すなわちインスリンの分泌能力に影響を与えずにHMGが耐糖能を改善することを報告している。これらの実験系においてもHMGの作用が高血糖などによるインスリン抵抗性を改善する作用を有することが示唆される。

ところで、インスリン抵抗性を誘導する原因には、インスリン刺激時における糖の取り込み異常やインスリンのシグナル伝達不良などが考えられており、KK-A^yマウスにもいくつかその特徴が認められる。^{12, 13)}インスリン抵抗性を導く因子の1つであるとされているFFAは最近の報告でインスリン刺激により誘導されたglucose transporter 4 (GLUT4)¹⁴⁾を介した糖の取り込みを阻害し、肝臓の糖放出を促進させることが報告されており、¹⁵⁾このためインスリン感受性を低下させることが示された。¹⁶⁾KK-A^yマウスは元来GLUT4の発現が低く、¹⁷⁾過剰に産生されるFFAによってさらにインスリン刺激時の糖取り込みが抑制されていると考えられる。HMGは血漿中のFFAを有意に低下し、それに伴って高血糖も抑えられたと考えられる。しかしながら今回のわずかなFFAの低下が、高インスリン血症改善に伴うTG減少の結果なのか、組織のインスリン抵抗性改善に関する現象なのか、単純にTGの合成抑制の結果なのかは現時点では不明である。

既存のインスリン抵抗性改善薬としてはチアゾリジン誘導体が知られているが、¹⁸⁾これらを肥満動物に投与した場合も体重に変化は認められず、血漿中のレプチンにも差は認められなかった。¹⁹⁾これらのインスリン抵抗性改善の作用メカニズムの検討では脂肪細胞のTNF- α 、PPAR γ 、GLUT4の発現など分子レベルで調べられているが、^{17, 19, 20)}今後、HMGの作用メカニズムについても分子レベルで検討すればチアゾリジン誘導体との違いが明確になると考えられる。

本研究により、HMGはNIDDM動物モデルであるKK-A^yマウスにおいてインスリン抵抗性の改善により高血糖および高インスリン血症を有意に改善させることが示された。HMGは糖尿病合併症に対し用いられているが、今回の結果は、高血糖および高インスリン血症に対しても直接改善作用を現すことを示唆しており、臨床応用の有用性を支持するものと考ええる。

References

- 1) Haranaka, R., *et al.*: Studies of Ba wei-wan (Hachimi jio gan): Part I. Lipid and carbohydrate metabolism in aged rats and mice. *Proc. Symp. Wakan Yaku* **15**, 15-20, 1982.
- 2) Goto, M., Hayashi, M., Todoroki, T., Seyama, Y. and Yamashita, S.: Effects of traditional Chinese medicines (Dai-saiko-to, Sho-saiko-to and Hachimi-jio gan) on spontaneously diabetic rat (WBN/Kob) with experimentally induced lipid and mineral disorders. *Folia pharmacol. japon.* **100**, 353-358, 1992.
- 3) Goto, M., Inoue, T., Seyama, Y., Yamashita, S., Inoue, O. and Yumioka, E.: Jikkenteki tounyoubyo oyobi jikkenteki koushikes-syo ni taisuru kampo hozai no kouka. (実験的糖尿病および実験的高脂血症に対する漢方方剤 (大柴胡湯, 八味地黄丸, 白虎加人參湯) の効果) *Folia pharmacol. japon.* **93**, 179-186, 1989.
- 4) Nagayoshi, S., Nishiura, T. and Hagiwara, Y.: Effect of Hachimi-jio-to on the alloxan diabetes. *Nihon Toyo-igaku kaishi* **17**, 236-239, 1966.
- 5) Taylor, I.S., Accili, D. and Imai, Y.: Insulin resistance or insulin deficiency. *Diabetes* **43**, 735-740, 1994.
- 6) Iwatsuka, H., Shino, A. and Suzuoki, Z.: General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol. japon.* **17** (1), 23-25, 1970.
- 7) Matsuo, T., Iwatsuka, H. and Suzuoki, Z.: Metabolic disturbance of KK mice in overt diabetes. *Endocrinol. japon.* **18** (6), 501-506, 1971.
- 8) Ikeda, H., *et al.*: Effects of Pioglitazone on glucose and lipid metabolism in normal and insulin resistance animals. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **40** (1), 156-162, 1990.
- 9) Fujiwara, T., Yoshioka, S. & T., Ushiyama, I. and Horokoshi, H.: Characterization of new oral antidiabetic agent CS-045. *Diabetes* **37**, 1549-1558, 1988.
- 10) Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, M.J.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432, 1994.
- 11) Girard, J.: Is leptin the link between obesity and insulin resistance? *Diabetes & Metabolism* **23**, 16-24, 1997.
- 12) Matsuzaki, T., Yamazaki, R., Hashimoto, S. and Yokokura, T.: Antidiabetic effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-A^y mice. *Endocrine J.* **44** (3), 357-365, 1997.
- 13) Hofmann, C., *et al.*: Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *The Endocrine Society* **134**, 264-279, 1994.
- 14) Min-Ling Liu, E., *et al.*: Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11346-11350, 1993.
- 15) Boden, G., Chen, X., Ruiz, J., White, V.J. and Rosetti, L.: Mecha-

- nisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J. Clin. Invest.* **93**, 2438-2446, 1994.
- 16) Roden, M., Price, B.T., Perseghin, G., Petersen, F.K., Rothman, L. D. and Cline, W.G. : Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in human. *J. Clin. Invest.* **97** (No.12), 2859-2865, 1996.
- 17) Hofmann, C., Lorenz, K. and Colca, R.J. : Glucose transport deficiency in diabetic animals is corrected by treatment with the oral antihyperglycemic agent pioglitazone. *Endocrinology* **129** (No.4), 1915-1925, 1991.
- 18) Matsuda, F. : Insurinteikouseikaizen-yaku. (インスリン抵抗性改善薬) *Chiryogaku* **30** (5), 549-553, 1996.
- 19) Murase, K., Odaka, H., Suzuki, M., Tayuki, N. and Ikeda, H. : Pioglitazone time-dependently reduces tumor necrosis factor- α level in muscle and improves metabolic abnormalities in Wistar fatty rats. *Diabetologia* **41**, 257-264, 1998.
- 20) Mukherjee, R., *et al.* : Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* **386**, 407-410, 1997.