



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第1647号
学位記番号	第330号
氏名	高 勝莉
授与年月日	平成 30年 3月 26日
学位論文の題名	生薬・漢方薬成分のグルコーストランスポーターに対する作用
論文審査担当者	主査： 樋口 恒彦 副査： 牧野 利明, 湯浅 博昭, 尾関 哲也

名古屋市立大学学位論文

生薬・漢方薬成分のグルコース
トランスポーターに対する作用

平成 29 年度 (2018 年 3 月)

所属	生薬学分野
氏名	高 勝莉

- ① 本論文は、2018年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 樋口 恒彦 教授

副査 湯浅 博昭 教授

尾関 哲也 教授

牧野 利明 教授

- ② 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次に報文を基礎とするものである。

1. Shengli Gao, Hirotaka Kushida, Toshiaki Makino :

Ginsenosides, ingredients of the root of *Panax ginseng*, are not substrates but inhibitors of sodium-glucose transporter 1
Journal of Natural Medicines, 70(1) 131-139, 2017

2. Shengli Gao, Hideo Satsu, Toshiaki Makino

Inhibitory effect of Bofutsushosan (Fang feng tong sheng san) on glucose transporter 5 function *in vitro*
Journal of Natural Medicines, doi:10.1007/s11418-018-1183-0

- ③ 本論文の基礎となる研究は、牧野 利明 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

Effects of crude drugs and Japanese traditional Kampo medicine ingredients on glucose transporters

Shengli Gao

Department of Pharmacognosy Graduate School of Pharmaceutical Sciences,

Nagoya City University

3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 4678603 Japan

TEL&FAX: +81 52 836 3416

本論文では、以下の略号を使用した。

DMEM, Dulbecco's Modified Eagles medium

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

FBS, fetal bovine serum

GLUT, glucose transporter

HBSS, Hanks' balanced salt solution

HPLC, high-performance liquid chromatography

IC₅₀, the half maximal inhibitory concentration

MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

ORF, open reading frame

PBS, phosphate buffered saline

PCR, polymerase chain reaction

PI3K/Akt, phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B

SGLT, sodium dependent glucose transporter

目 次

第一部 ニンジン成分 ginsenoside 類の SGLT1 に対する作用	
序論	1
第一節 ヒト SGLT1 のクローニングと機能の確認	5
第二節 ニンジン熱水抽出物の SGLT1 阻害作用	6
第三節 Ginsenoside 類の SGLT1 阻害作用	7
第四節 Compound K と ginsenoside F ₂ の細胞内への輸送に関する SGLT1 の関与	9
考察	11
結論	14
第二部 防風通聖散エキスの GLUT5 に対する作用	
序論	15
本論	16
考察	20
結論	22
実験方法	23
謝辞	31
参考文献	32

第一部 ニンジン成分 ginsenoside 類の SGLT1 に対する作用

序論

現在は、欧米における補完代替医療ブームを受け、薬用植物を原料とした機能性食品（ダイエタリーサプリメント）の利用が世界中で増大している。そのような中、アメリカの食品医薬局では、一定の生理活性のある植物由来の素材については、現代医学的に臨床試験を行い効能が認められたものについては、有効成分が明らかになっていない場合でも植物由来医薬品（botanical drug）として認可する方針をとり、多くの植物素材の臨床試験が進められている。しかし、実際に認可されるまでのハードルは高く、臨床的な有用性だけでなく、天然由来がゆえ素材のバラツキを補正し、品質を保持するための指標成分の設定と、その生理活性と毒性に関するデータならびに体内動態を明らかにすることが求められている。

漢方薬は、3世紀頃の中国医学を起源として、日本で独自に発展をとげた日本の伝統医学である漢方医学の診断のもとで使用する医薬品である。その原料は天然素材からなる生薬であるが、アメリカとは異なり、日本ではすでに漢方薬は医薬品として認可され、その品質を保持するための基礎的なデータは備えられている。しかし、指標成分の体内動態に関するデータはまだ不足しており、漢方薬の利用を世界規模で拡大するときの足かせとなっている。

本研究では、もっとも著名な生薬のひとつであるニンジンを取り上げ、その指標成分の体内動態に関する研究を行うこととした。

ニンジンは、ウコギ科オタネニンジン *Panax ginseng* の根を基原として、第十七改正日本薬局方に記載されている生薬である¹⁾。漢方医学においては、ニンジンの薬味薬証は、温甘、中薬学では補脾薬に分類され、薬能は大補元氣、補脾益肺、益氣生津、安神、扶正祛邪である²⁾。人参は、六君子湯や補中益氣湯、十全大補湯などの漢方方剤に配合されるだけでなく、日本の民間薬としても汎用されており、滋養強壯、疲労回復、体力回復、風邪の予防、クオリティーオブライフの改善、記憶能力改善など、様々な作用が知られている。また、近年では糖尿病に対する作用も注目されている^{3,4)}。現在の糖尿病の治療では、食事療法や運動療法などの生活改善を基本とするほか、薬物療法としてはインスリン分泌促進剤、インスリン抵抗性改善剤、糖の吸収や排泄の調整剤（ α -グリコシダーゼ阻害剤と SGLT2 阻害剤）とインスリン注射剤があるが、食後の糖の吸収を緩やかにするなど、その予防や改善を謳った機能性食品も市販されている。

日本薬局方では、ニンジンの指標成分として protopanaxadiol 系トリテルペノイドサポニンである ginsenoside Rb₁ と、protopanaxatriol 系トリテルペノイドサポニンである ginsenoside Rg₁ を規定している (Fig. 1、Fig. 2)。両者は化学構造式の中に、指標性の高いトリテルペノイドからなるアグリコンと水溶性の高い glucose 部を含む配糖体と呼ばれる化学構造をしている。そのような配糖体は、消化管上皮細胞膜の脂質二重層を透過しにくいとされ、大腸に生息している腸内細菌が持つ β グルコシダーゼによりそれらの糖部が加水分解された後に、アグリコンとして血液中に現れると考えられていた⁵⁾。1990年代の研究では、ラットに ginsenoside Rb₁ を経口投与したときに、血液中に現れる ginsenoside Rb₁ 由来の化合物は、その腸内細菌による代謝物の一つである compound K と呼ばれる化合物であった (Fig. 1、2)^{6,7)}。Ginsenoside Rb₁ は、アグリコンである protopanaxadiol の 3 位と 20 位の水酸基にグルコースが 2 分子ずつ結合している配糖体であるが、compound K はそのうちの 3 位のグルコース 2 分子と 20 位のグルコース 1 分子を失い、protopanaxadiol の 20 位の水酸基にグルコース 1 分子が配糖化している配糖体である。したがって、配糖体でもその化学構造によっては消化管上皮を透過して血液中に出現することが明らかになっていた。

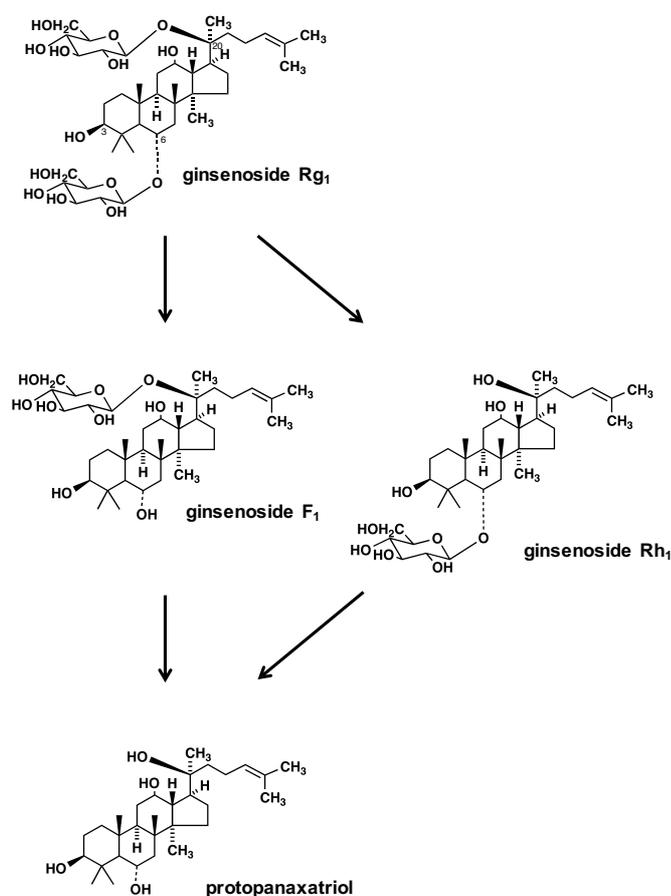


Fig. 1 Protopanaxatriol 系 ginsenoside 類の化学構造式と腸内細菌による予想代謝経路

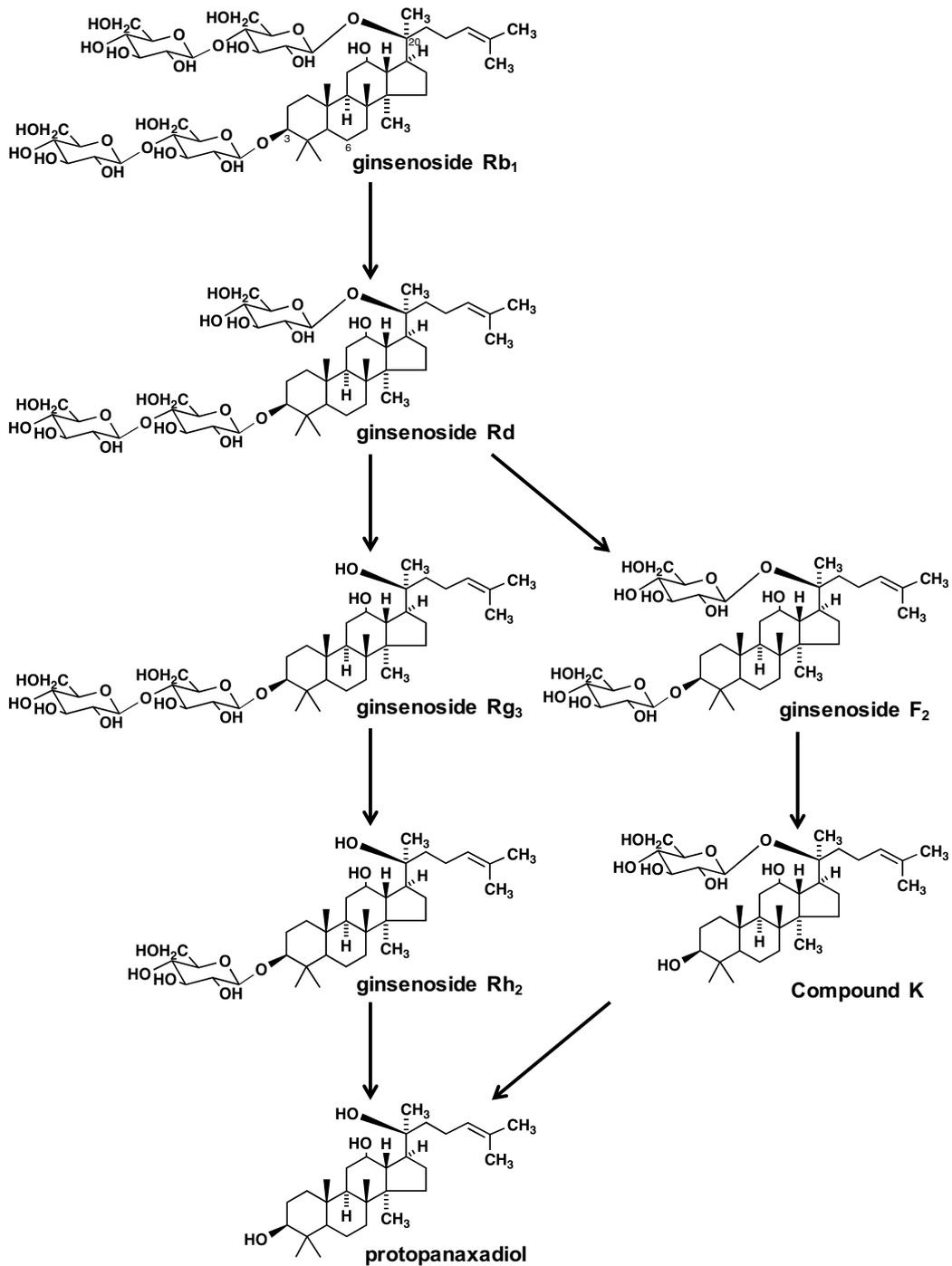


Fig. 2 Protopanaxadiol 系 ginsenoside 類の化学構造式と腸内細菌による予想代謝経路

その後 2000 年代に入って、血液中の化合物を検出するための分析機器の進歩により、ニンジン含有成分の体内動態研究が発展してきた。Compound K は、ニンジンエキスを摂取したヒトの血清中でも検出されたものの、その血中濃度の個体差は非常に大きいものであり⁸⁾、決してメジャーな代謝物ではなくその他の ginsenoside 類も十分に血液中から検出されることが報告されている⁹⁾。さらに、ニンジン構成生薬として含む大建中湯

をヒトが摂取したときのニンジン由来化合物の血中濃度推移では、compound K は血液中からは検出されておらず、ginsenoside Rb₁を主に、ginsenoside Rg₁をわずかに検出されている¹⁰⁾。オタネニンジンと同属植物であるサンシチニンジン (*Panax notoginseng*) の根のエキスをラットに投与した時、compound K の血中濃度は、ginsenoside Rb₁の血中濃度の 10 分の 1 程度であった¹¹⁾。以上のことから、compound K は血液中に存在する protopanaxadiol 系 ginsenoside 類の主代謝物とは言えず、ginsenoside Rb₁は腸内細菌による代謝を経ることなくそのままの分子形態で吸収されるほか、さまざまな腸内細菌代謝物として吸収されることが明らかになってきた。

ヒト結腸上皮細胞由来の株化細胞である Caco-2 細胞は、薬物の消化管吸収に関する研究に汎用されている細胞であるが、これを用いた ginsenoside 類の消化管吸収メカニズムに関する研究も 2000 年代に大きく発展した。Ginsenoside Rb₁および Rg₁の Caco-2 細胞への取り込み量は、4°Cの時と比較して 37°Cで有意に増加したものの、それらの培養液中の濃度に対して直線的に増加したことから、受動拡散により細胞内へ移行することが示唆されている^{12,13)}。しかし、ginsenoside Rg₁の caco-2 細胞への取り込み量は、細胞をアドレナリンで処理することにより細胞内への取り込みが増加し、ラットに ginsenoside Rg₁をアドレナリンと同時に経口投与するとその血中濃度が有意に増加したことから、β₃アドレナリンレセプターによって誘導される何らかのトランスポーターを介して吸収される可能性も示唆されている¹⁴⁾。Ginsenoside Rg₁の caco-2 細胞への取り込み量は、培地中にグルコースと共存させることにより低下し、培地中のナトリウムを除いた時、および sodium dependent glucose transporter (SGLT) 非選択的阻害剤である phlorizin との共存させたときでも低下したことから、SGLT を介して輸送されることが予想されている¹⁵⁾。ラットに ginsenoside Rg₁をグルコースとともに経口投与することにより、その血中濃度の抑制されたことも、その予想を指示している¹⁵⁾。

また、もし ginsenoside 類が SGLT を介して消化管から吸収されるならば、本来の機質である食事由来のグルコースの吸収と競合することになるため、ニンジンが食後の血糖値の増大を抑制する可能性が期待される。事実、ニンジンには糖尿病に対する有用性が明らかになっていることから^{3,4)}、ニンジンの作用機序として SGLT に対する阻害作用が関与している可能性が推定される。

以上の背景をふまえ、著者は SGLT のうち主に消化管に発現している SGLT1 をターゲットとした ginsenoside 類の作用に関する検討を行った。

本 論

第一節 ヒト SGLT1 のクローニングと機能の確認

本研究を開始するにあたり、ヒト小腸 cDNA ライブラリーより、SGLT1 をコードする cDNA のクローニングを行った。市販されているヒト小腸 cDNA ライブラリーから、SGLT1 の open reading frame (ORF) の前後の配列を特異的に認識するプライマーを用いて PCR を行い、さらにその増幅産物に対して、前後に制限酵素 EcoRI と XbaI の制限酵素サイトを含むプライマーを用いて PCR を再度行うことで、前後に制限酵素サイトを含む SGLT1 の ORF を合成した。

その DNA 鎖を、哺乳類細胞用発現ベクターの pCI-neo に組み込み、SGLT1 発現ベクターを調製した。

このベクターをリポフェクション法によりヒト腎臓由来細胞である HEK293 細胞に導入し、SGLT1 の基質として知られる methylglucose¹⁶⁾ を glucose 不含有 Hanks' balanced salt solution (HBSS) に溶解したもので 10 分間作用させたとき、遺伝子を導入していない細胞と比較して、SGLT1 を導入した細胞内へ methylglucose の移行量は顕著に増大し、それは SGLT 阻害剤である phlorizin により有意に抑制された (Fig. 3)。このことから、今回クローニングした SGLT1 は機能的に発現していることが明らかとなった。

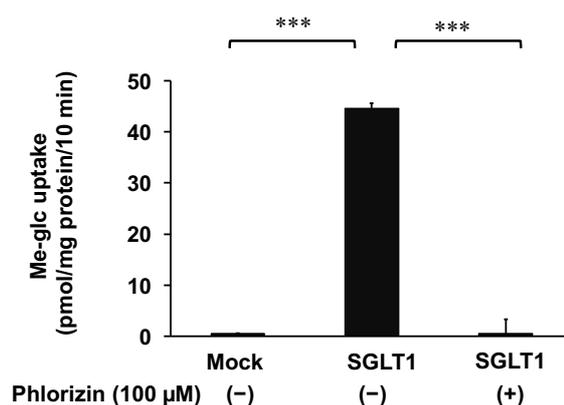


Fig. 3 SGLT1 ベクターを HEK293 細胞に一過的に発現させたときの methylglucose の取り込み

HEK293 細胞に pCI-neo ベクターに SGLT1 をクローニングしたものまたは空ベクター (mock) をリポフェクション法により導入し、500 nM の [¹⁴C] methylglucose (Me-Glc) または 100 μM の phlorizin で 10 分間処理した時の細胞内の放射能により Me-Glc 量を測定した。データは mean ± S.E. (n = 3) で表記した。***P < 0.001 vs mock 群および phlorizin 群 (Dunnett の多重検定)。

第二節 ニンジン熱水抽出物の SGLT1 阻害作用

まず初めに、ニンジンの糖尿病に対する有用性³⁾の作用機序として、SGLT1 に対する阻害活性を持つかどうかを検討した。ニンジン 18 g を沸騰水で 30 分間煎じることにより、エキス 7.1 g を得た。ニンジン熱水抽出物は、濃度依存的に SGLT1 の機能を阻害し、その 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 0.85 mg/ml であった (Fig. 4A)。次に、熱水抽出物をメタノール中で超音波処理することによりメタノール可溶部 (4.7 g) を得て、水に懸濁させ、ヘキサン、水飽和ブタノールで順に分配し、ヘキサン画分 (5.2 mg)、ブタノール画分 (0.20 g) および水画分 (4.4 g) に分画し、それぞれの分画物の元の熱水抽出物 1 mg/ml に相当する濃度で SGLT1 阻害活性を測定した。その結果、ブタノール画分と水画分に有意な SGLT1 阻害活性が認められた (Fig. 4B)。

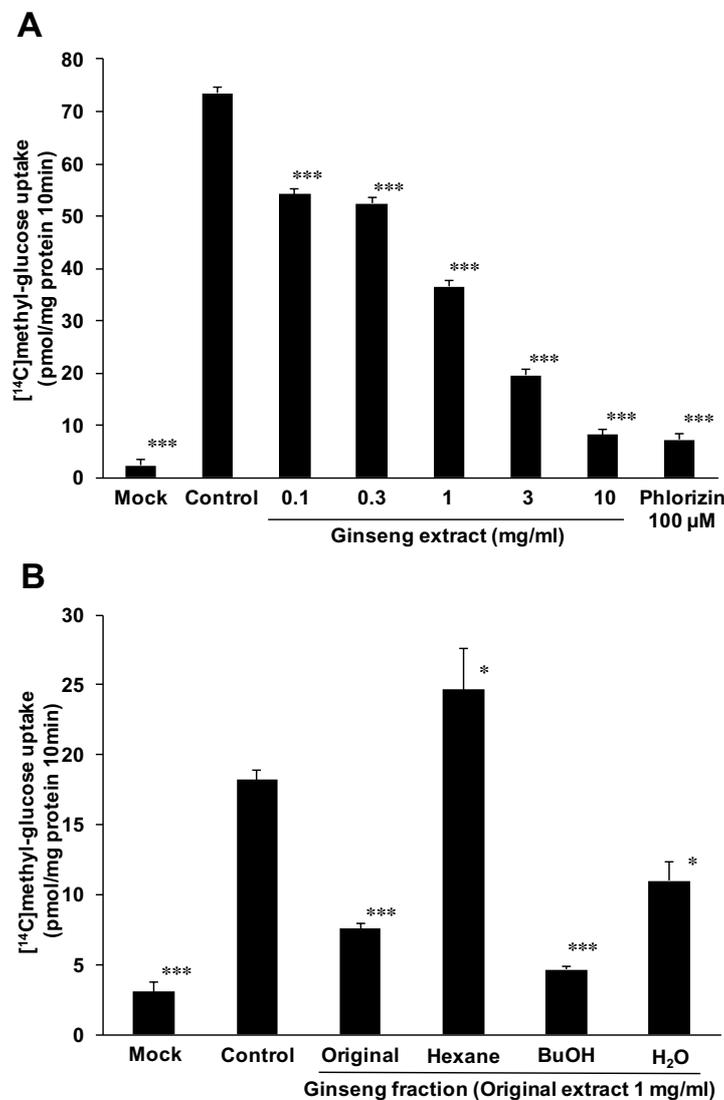


Fig. 4 ニンジン熱水抽出物およびその分画物の SGLT1 阻害作用

SGLT1 を一過的に発現させた HEK293 細胞に、ニンジン熱水抽出物 (A) およびその分画物の元のエキス 1 mg/mL に相当する濃度 (B) で含む緩衝液とともに、と [¹⁴C] methylglucose (Me-Glc、500 nM) を 10 分間作用させた。その後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた Me-Glc 量を測定した。データは mean ± S.E. (n = 3) で表記した。*P < 0.05、***P < 0.01 vs control 群 (Dunnett の多重検定)。

第三節 Ginsenoside 類の SGLT1 阻害作用

ニンジン熱水抽出物ブタノール画分には、ginsenoside 類を含むことが予想されたため、標準品を用いて HPLC で分析したところ、ニンジン熱水抽出物ブタノール画分には、ginsenoside Rb₁ (9.9 w/w%), Rd (3.5 w/w%), F₂ (0.5 w/w%), compound K (1.0 w/w%), Rg₁ (8.1 w/w%), F₁ (1.1 w/w%), Rh₁ (4.7 w/w%) を含むことが明らかとなり、protopanaxadiol, protopanaxatriol, ginsenoside Rg₃ と ginsenoside Rh₂ は検出されなかった。

Ginsenoside 類に SGLT1 阻害活性があることが予想されたため、ニンジン熱水抽出物に含まれていたか否かにかかわらず、ニンジンの指標成分である ginsenoside Rb₁ および Rg₁ と、それらの腸内細菌代謝物である ginsenoside Rb₁, Rd, Rg₃, F₂, Rh₂, compound K (以上は protopanaxadiol 系)、ginsenoside Rg₁, F₁, Rh₁ (以上は protopanaxatriol 系) と、それらのアグリコンである protopanaxatriol と protopanaxadiol (Fig. 1、2) の SGLT1 阻害活性を評価した。その結果を、Fig. 5 に示す。

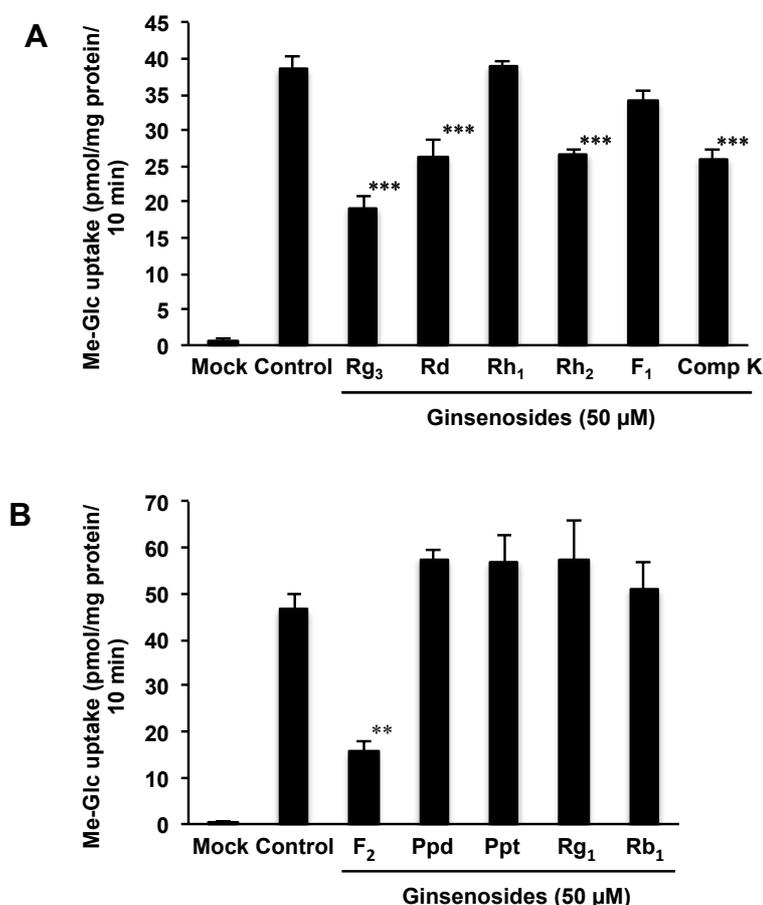


Fig. 5 各種 ginsenoside 類の SGLT1 阻害作用

SGLT1を一過的に発現させたHEK293細胞に、ginsenoside類を50 μMの濃度で含む緩衝液とともに、と [¹⁴C]methylglucose (Me-Glc、500 nM)を10分間作用させた。その後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれたMe-Glc量を測定した。データは mean ± S.E. (n = 3) で表記した。各種 ginsenoside 類は、その記号で示した。Comp K, compound K; Ppd, protopanaxadiol; Ppt, protopanaxatriol. **P < 0.01, ***P < 0.01 vs control 群 (Dunnett の多重検定)。

その結果、protopanaxadiol 系 ginsenoside 類に属する ginsenoside Rg₃、Rd、Rh₂、F₂ と compound K に有意な阻害活性を認め、ニンジンに多く含まれる ginsenoside Rb₁ と Rg₁、protopanaxatriol 系ギンセノシド類である ginsenoside F₁ と Rh₁、およびそれらのアグリコンである protopanaxadiol と protopanaxatriol には活性が認められなかった。

50 μM の濃度で有意な SGLT1 阻害活性が認められた protopanaxatriol 系 ginsenoside 類について、その濃度依存性を検討した。その結果、5つの化合物いずれも濃度依存的に有意な SGLT1 阻害活性を示した。その中で、ginsenoside F₂ に最も強い阻害活性を認め、IC₅₀ は 23 μM であった。次いで、compound K と ginsenoside Rh₂ の IC₅₀ は 73 μM と 0.11 mM であったが、ginsenoside Rd と Rg₃ の作用は 100 μM 以上の濃度でプラトーになってしまい、IC₅₀ が算出できなかった。

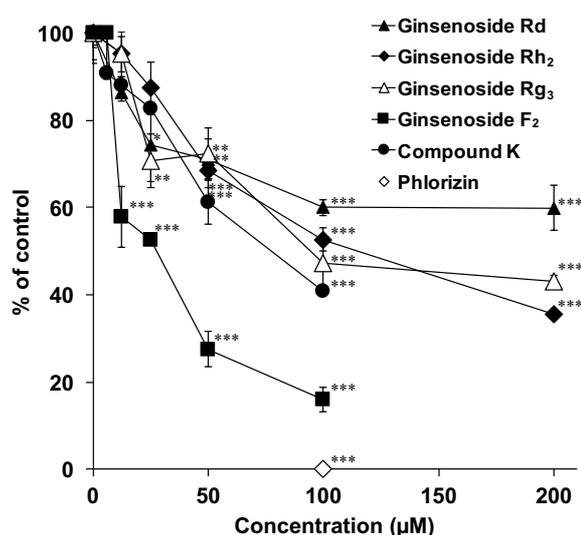


Fig. 6 各種ギンセノシド類の SGLT1 阻害作用

SGLT1 を一過的に発現させた HEK293 細胞に、ギンセノシド類を 50 μM の濃度で含む緩衝液とともに、と [¹⁴C]メチルグルコース (Me-Glc, 500 nM) を 10 分間作用させた。その後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた Me-Glc 量を測定した。データは mean ± S.E. (n = 3) で表記した。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.01 vs control 群 (Dunnett の多重検定)。

これらの ginsenoside 類化合物がもつ SGLT1 阻害作用が、細胞毒性では無いことを確認するために、MTT 法により細胞毒性を検討した。その結果、compound K は、200 μM 以上で有意な細胞毒性が認められたものの、Fig. 6 で使用した濃度においてはすべての ginsenoside 類において有意な細胞毒性は認められなかった (data not shown)。

第四節 Compound K と ginsenoside F₂ の細胞内への輸送に関する SGLT1 の関与

前節において、もっとも高い SGLT1 との親和性が認められた compound K と ginsenoside F₂が、グルコースランスポーターを介して細胞内へ輸送される可能性について検討した。

まず、消化管上皮細胞モデルとして汎用されるヒト結腸上皮細胞由来 Caco-2 細胞に対する compound K と ginsenoside F₂の取り込みにおける glucose の競合について、また、トランスポーターを介する能動輸送であることの確認のために、4°C環境下と 37°C環境下での取り込み量の差について、検討した。Compound K、ginsenoside F₂いずれにおいても、15 分間の Caco-2 細胞への取り込み量は、glucose-free HBSS における量と比較して、glucose を添加することで有意に増加したが、それは 4°C環境下では有意に減少した (Fig. 7A、B)。

次に、SGLT1 を一過性に発現させた HEK293 細胞に対して、compound K、ginsenoside F₂をそれぞれ含む glucose-free HBSS で 30 分間インキュベートした後、細胞内に取りこまれた compound K と ginsenoside F₂の量を LC/MS/MS で測定した。その際、培地中に SGLT1 阻害剤である phlorizin (100 μM) を作用させた。その結果、compound K および ginsenoside F₂の輸送は、mock 細胞および SGLT1 を導入した細胞の間で差が認められず、phloridin と同時に作用させても差が認められなかった (Fig. 7C-E)。

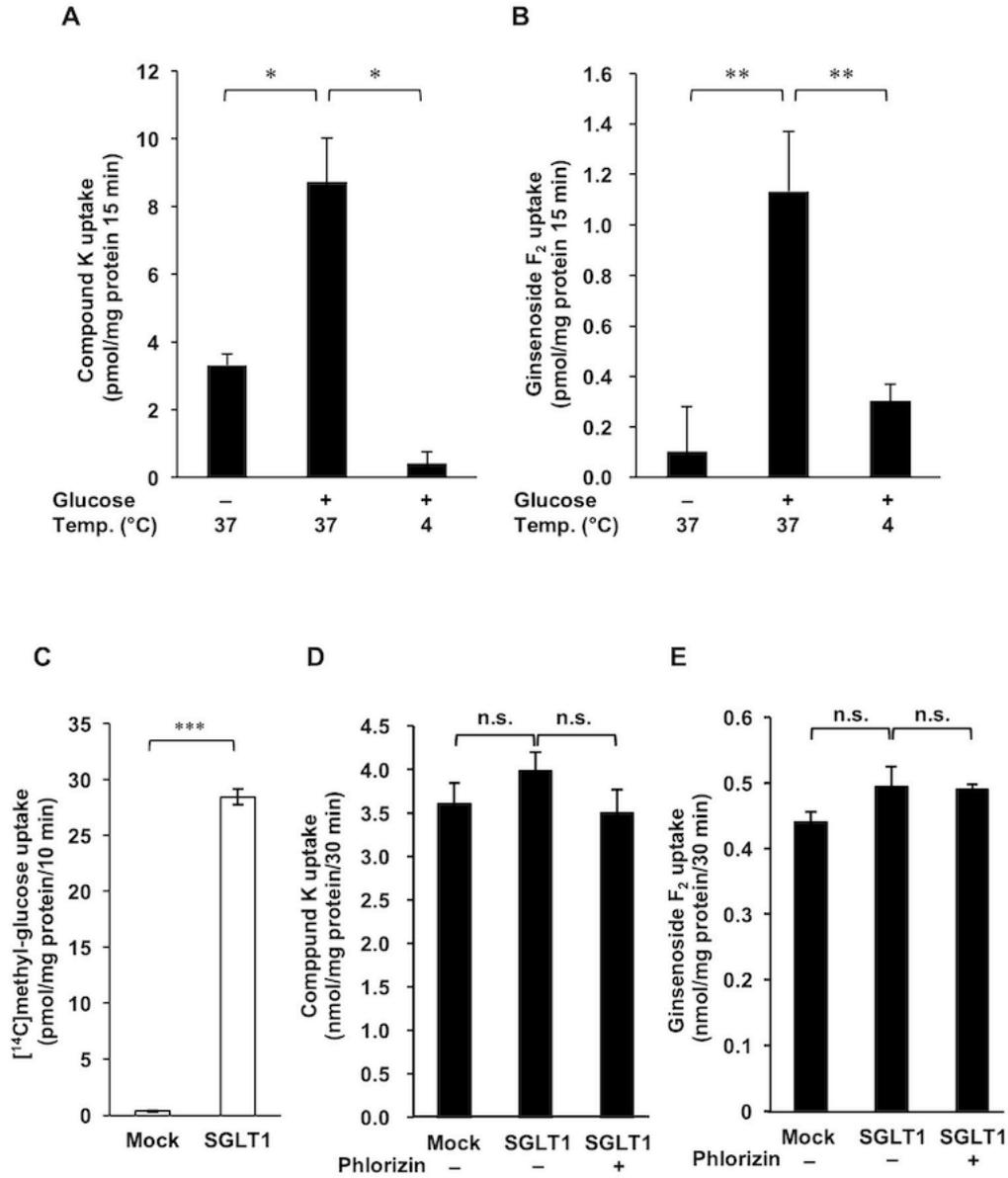


Fig. 7 Compound K と ginsenoside F₂ の取り込みに対する低温環境、グルコースの影響

37°Cまたは4°C環境下、glucose含有/非含有HBSSに溶解させた compound K と ginsenoside F₂ を Caco-2 細胞に 15 分間取り込ませた時の、取り込まれた化合物量 (A, B)。SGLT1 一過性発現細胞における 10 分間の [¹⁴C]methylglucose (Me-Glc, 500 nM, C)、30 分間の compound K (10 μM, D) または ginsenoside F₂ (10 μM, E) の取り込み量。D, E では、SGLT1 阻害剤として、100 μM の phlorizin を同時に作用させた。データは mean ± S.E. (n = 3-4) で表記した。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.01 vs control 群 (Dunnet の多重検定 (A, B, D, E) または Student の t 検定(C))。n.s., not significant.

考 察

ニンジンに含まれている ginsenoside 類には、ダンマラン骨格の 6 位に水酸基があるか否かで、ginsenoside Rb₁ を代表とする protopanaxadiol 系と、ginsenoside Rg₁ を代表とする protopanaxatriol 系に大別される。それらは、経口投与した際には、腸内に生息する腸内細菌によって糖部が順次、加水分解されることから、消化管管腔内に ginsenoside Rb₁、Rg₁ 以外にも、さまざまな代謝物が存在することになる。Ginsenoside Rb₁ が腸内細菌によって代謝された時の各種 protopanaxadiol 系 ginsenoside 類は、その糖部の構造によって強弱はあるものの、ginsenoside Rb₁ とアグリコンである protopanaxadiol を除き、有意に SGLT1 阻害作用を示した。一方、ginsenoside Rg₁ から腸内細菌によって代謝される各種 protopanaxatriol 系 ginsenoside 類には、SGLT1 に対する阻害作用はいずれも認められなかった。消化管吸収試験において消化管上皮モデルとして汎用される caco-2 細胞への ginsenoside Rg₁ の取り込み量は、培地中に glucose と共存させることにより低下し、培地中のナトリウムを除いた時、およびぐるっコーストランスポーターの非選択的阻害剤である phlorizin との共存させたときでも低下したことから、SGLT を介して輸送されることが予想され、またラットの実験では、ginsenoside Rg₁ はグルコーストランスポーターで輸送されることが推測されていたが¹⁵⁾、ginsenoside Rg₁ の SGLT1 に対する親和性は低く、SGLT1 は ginsenoside Rg₁ を基質として認識していないことが予想された。消化管上皮細胞には、グルコースを輸送するトランスポーターとしてナトリウム非依存性グルコーストランスポーター (GLUT) 2 も発現しており、ginsenoside Rg₁ は SGLT1 以外のグルコーストランスポーターにより消化管から吸収される可能性が示唆された。

また、ginsenoside 類が SGLT1 を阻害するためには、少なくとも 1 分子の glucose がダンマラン骨格の 3 位または 20 位の水酸基に結合していることが必須ではあるが、ダンマラン骨格の 6 位の水酸基に結合した glucose は、SGLT1 に対する親和性を妨害することが示唆された。

一方、protopanaxadiol の 3 位と 20 位の水酸基に glucose が 2 分子ずつ結合している ginsenoside Rb₁ は 400 μM の高濃度を作用させても有意な SGLT1 阻害活性を示さず (data not shown)、20 位の水酸基に結合した glucose が 1 分子離れた ginsenoside Rd では、200 μM の濃度で SGLT1 機能を 59.9% まで有意に減少させたが、IC₅₀ を算出することは出来ないほどの弱い作用であり、さらに glucose が離れた ginsenoside Rg₃ とともに、100 μM 以上の濃度ではその強さは頭打ちとなり、部分アンタゴニストとして作用していると考えられた。Ginsenoside Rg₃ では、IC₅₀ 値が 100 μM 以上の値であったのに対して、protopanaxadiol の 3 位、20 位の水酸基にそれぞれ 1 分子ずつ glucose が配

糖化した ginsenoside Rh₂、compound K では、IC₅₀ 値がそれぞれ 0.11 μM、73 μM であったのに対して、3 位と 20 位の水酸基の両方に glucose が 1 分子ずつ配糖化した ginsenoside F₂ では 23.0 μM であった。このことから、protopanaxadiol の 3 位と 20 位の水酸基に結合している glucose が SGLT1 阻害作用にそれぞれ寄与していると考えられた。

Yang らは、ニンジン蒸して乾燥させたコウジンのエキスをを用いた *in vitro* 代謝実験を行い、ginsenoside Rb₁ の代謝は、主には Rb₁→Rd→F₂→compound K と進行し、ginsenoside Rg₃ および Rh₂ はマイナーな代謝産物であることを明らかにし、また、マウスにコウジンエキスを経口投与した時に、血液中から ginsenoside F₂ と compound K を検出したものの、その他の ginsenoside 類を検出できなかったことを報告している¹⁷⁾。このことから、ニンジンを経口投与したときには、ginsenoside Rb₁ は消化管内では腸内細菌により ginsenoside F₂ と compound K に代謝されて存在し、何らかの機序により消化管から吸収され、血液中へ移行することが推測される。本研究により ginsenoside F₂ と compound K がその他の ginsenoside 類と比較して強く SGLT1 を阻害したことから、人参を摂取したときには、腸内細菌により ginsenoside Rb₁ から生成した両化合物が、消化管上皮細胞管腔側に発現する SGLT1 を介して消化管管腔内から血液中へ移行する可能性が推測された。

SGLT1 を介する methylglucose の細胞内への輸送を強く阻害した compound K と ginsenoside F₂ は、それ自身が SGLT1 を介して細胞内へ移行する可能性が推測されたため、消化管吸収試験のモデルとして汎用される Caco-2 細胞に対する compound K と ginsenoside F₂ の取り込み実験を行った。Compound K と ginsenoside F₂ の細胞内への取り込みは 4°C 条件下では有意に減少したことから、それらは能動的に細胞外から細胞内へ輸送されることが推測された。Caco-2 細胞には、SGLT1 の他に、ナトリウム非依存性グルコーストランスポーターである GLUT1、GLUT2、GLUT3 が発現していることが知られている¹⁸⁾。このことから compound K および ginsenoside F₂ は、これらのグルコーストランスポーターで輸送されている可能性が考えられた。しかし、Caco-2 細胞における ginsenoside Rg₁ と Rb₁ の取り込みは、低温環境下で減弱するものの、速度論的な解析から受動拡散であることが予想されており¹⁹⁾、その理由として低温環境下では細胞膜の柔軟性が低下することが示唆されている²⁰⁾。実際、SGLT1 を一過的に発現させた HEK293 細胞内における compound K と ginsenoside F₂ の輸送は、mock 細胞と比較して有意な差が認められず、また phlorizin でも抑制されなかった。このことから、compound K と ginsenoside F₂ は有意に SGLT1 の機能を阻害するものの、それら自身は SGLT1 の基質としては輸送されないことが強く示唆された。しかも、compound K

と ginsenoside F₂ の輸送は、競合阻害されるという予想に反して glucose との共存により有意に増大した。この結果は、compound K と ginsenoside F₂ は SGLT1 以外のグルコーストランスポーターにより輸送されたのではなく、glucose が細胞における単なるエネルギー源と利用された結果、取り込み量が増大した可能性が十分に考えられた。以上のことから、compound K と ginsenoside F₂ が何らかのトランスポーターによって能動的に輸送される可能性について本研究では明らかにすることが出来ず、今後の研究が求められる。

ニンジンには糖尿病に対する有用性がメタアナリシスにより明らかになっている^{3,4)}。健常人を用いた試験において、glucose を負荷したときの食後血糖値の上昇は、蒸したニンジンを乾燥させたコウジンのエキスと同時に glucose を負荷することにより有意に減少し、とくにその作用は ginsenoside 類を多く含むオタネニンジンの細根から調製したエキスで顕著であったことが報告されている³⁾。Compound K は、高脂肪食で飼育したストレプトゾシン処理 II 型糖尿病モデルラットにおいて、phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) 経路を介してインスリン感受性を改善することによって血糖降下作用を示す²¹⁾。マウスに compound K を経口投与あるいは caco-2 細胞に compound K を作用させることにより、SGLT1 の mRNA 発現レベルが刺激され、グルコースの細胞内への取り込みが増加する²²⁾。本研究での compound K の IC₅₀ は 74 μM であり、この濃度は caco-2 細胞で SGLT1 誘導作用が認められた濃度²³⁾と比較して約 70 倍高い。ニンジン熱水抽出物の SGLT1 に対する IC₅₀ は 0.85 mg/ml であり、この濃度は、ニンジン 500 g から得られる熱水抽出物を 1 ml の水に溶解した時の濃度に相当し、ヒトが実際にニンジンを使用する場合と比較して著しく高く、臨床に外挿できる作用とは言えない。以上のことから、今回明らかになったニンジン熱水抽出物および ginsenoside 類の SGLT1 阻害作用は、ニンジンの糖尿病に対する有用性に寄与する可能性は極めて低いものと予想された。

結 論

- 人参に含まれている ginsenoside 類のうち、protopanaxadiol 系に属するものの多くに SGLT1 阻害活性が認められ、とくに ginsenoside F₂ と compound K に強い阻害活性が認められた。一方、protopanaxatriol 系に属する ginsenoside 類およびそれらのアグリコンには SGLT1 阻害活性は認められなかった。
- Protopanaxadiol 系 ginsenoside 類で SGLT1 阻害活性を示すためには、20 位の水酸基に結合した glucose が重要な役割を果たしていた。
- Ginsenoside F₂ は compound K は、SGLT1 を阻害するものの、その基質にはなっておらず、その輸送メカニズムについては本研究では明らかに出来なかった。

第二部 防風通聖散エキスの GLUT5 に対する作用

序 論

防風通聖散は、金代の医師、劉完素（1120～1200）によりまとめられた『黄帝素問宣明論方』を出典とする漢方薬である²³⁾。現代の日本での防風通聖散を用いた製剤は、トウキ 1.2 g、シャクヤク 1.2 g、センキュウ 1.2 g、サンシシ 1.2 g、レンギョウ 1.2 g、ハッカ 1.2 g、ショウキョウ 0.3 g、ケイガイ 1.2 g、ボウフウ 1.2 g、マオウ 1.2 g、ダイオウ 1.5 g、ボウショウ 1.5 g、ビャクジュツ 2.0 g、キキョウ 2.0 g、オウゴン 2.0 g、カンゾウ 2.0 g、セッコウ 2.0 g、カッセキ 3.0 g から得られる熱水抽出エキスを 1 日処方量とし、高血圧や肥満に伴う動悸・肩こり・のぼせ・むくみ・便秘、蓄膿症（副鼻腔炎）、湿疹・皮膚炎、ふきでもの（にきび）、肥満症の効能を持つ²⁴⁾。これまでの報告では、防風通聖散エキスは実験動物における高脂肪食や糖尿病による肥満を改善しており^{25,26)}、臨床試験では肥満やメタボリックシンドロームに対する有効性を示している^{27,28)}。

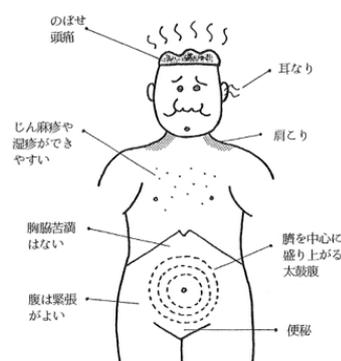


Fig. 8 防風通聖散の腹証²³⁾

ところで、肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームに関連する病因のひとつに、過度のフルクトース摂取が指摘されている^{29,30)}。フルクトースはコーンシロップやそれを原料とする果糖ブドウ糖液糖に多く含まれ、それを原料とする清涼飲料水や炭酸飲料の飲用が体重増加および肥満と関連している³¹⁾。フルクトースは小腸上皮に発現しているグルコーストランスポーター5 (GLUT5) を介して吸収され、GLUT5 はフルクトースに曝されることによってさらにその発現・活性が亢進し、過剰なフルクトースの摂取によってその吸収効率まで増加してしまうという悪循環が生じることから、フルクトースの吸収と糖尿病や肥満症の発症やフルクトース誘発性高血圧症の発症との関連が指摘されている (Fig. 9)^{32,33)}。従って、GLUT5 機能の抑制は、メタボリックシンドロームを治療するための創薬の標的の 1 つと言える。実際、小腸上皮モデル細胞である caco-2 細胞において、天然由来化合物であるノビレチンとエピカテキンが、GLUT5 の機能を抑制することが報告された³⁴⁾。近年の報告³⁵⁾では、GLUT5 は乳がん細胞で過剰発現し、フルクトースをエネルギー源として多く吸収し、がん細胞の増殖に関わることが明らかになっていることから、GLUT5 阻害剤は糖尿病や肥満症などの生活習慣病だけでなく、がんの予防・改善する基盤医

薬品の情報に役立つ期待ができると考えられる。

以上の背景をふまえ、著者は防風通聖散の GLUT5 の機能に対する作用と、その有効性に寄与する生薬、活性成分の単離を目的とした研究を行った。

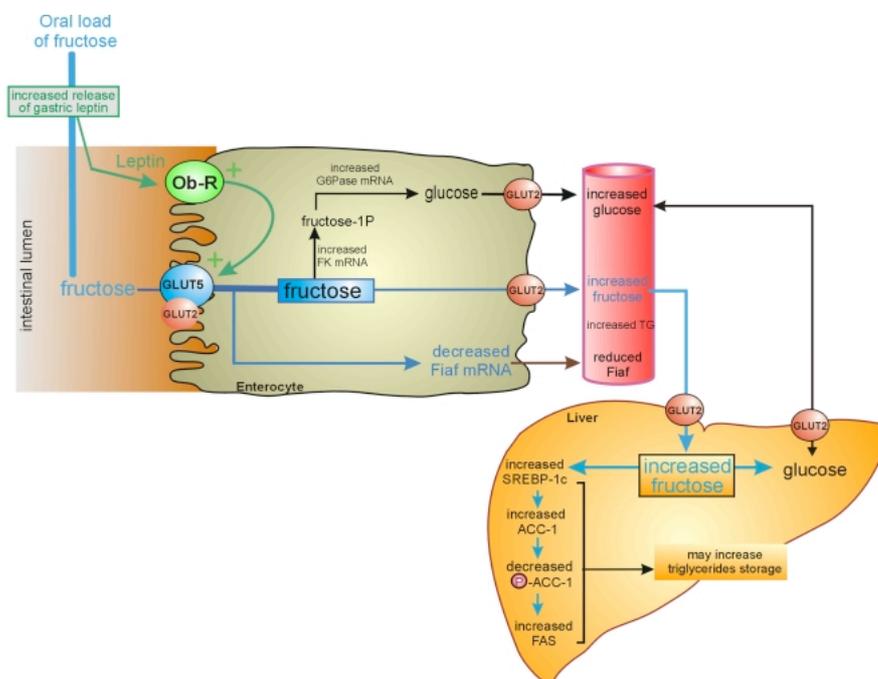


Fig. 9 消化管内のフルクトースの輸送とそれによる肥満症発症のメカニズム³⁶⁾

本 論

前橋工科大学工学部生物工学科食品生理機能工学研究室の薩 秀夫 准教授が開発した CHO-K1 細胞にヒト GLUT5 を安定発現させた細胞を使用し、 $[^{14}\text{C}]$ fructose の取り込みに対する防風通聖散エキスの作用を評価した。その結果、防風通聖散エキスは濃度依存的に GLUT5 の機能を抑制し、1 mg/ml の濃度で、コントロールに対して 52% のフルクトース取り込み量となった (Fig. 10)。防風通聖散エキス 1 mg/ml は、細胞毒性を示さなかった (data not shown)。

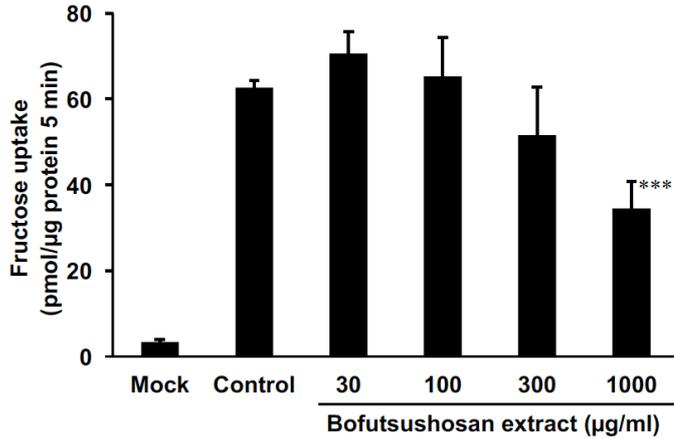


Fig. 10 防風通聖散熱水抽出エキスの GLUT5 に対する阻害効果。

GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞へ、各濃度の防風通聖散熱水抽出エキスと [¹⁴C] fructose (4 μM) を 5 分間作用させた後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた fructose 量を測定した。データは、平均 ± S.E. (n = 3) で表記した。*** p < 0.001 vs control 群 (Dunnet の多重検定)。

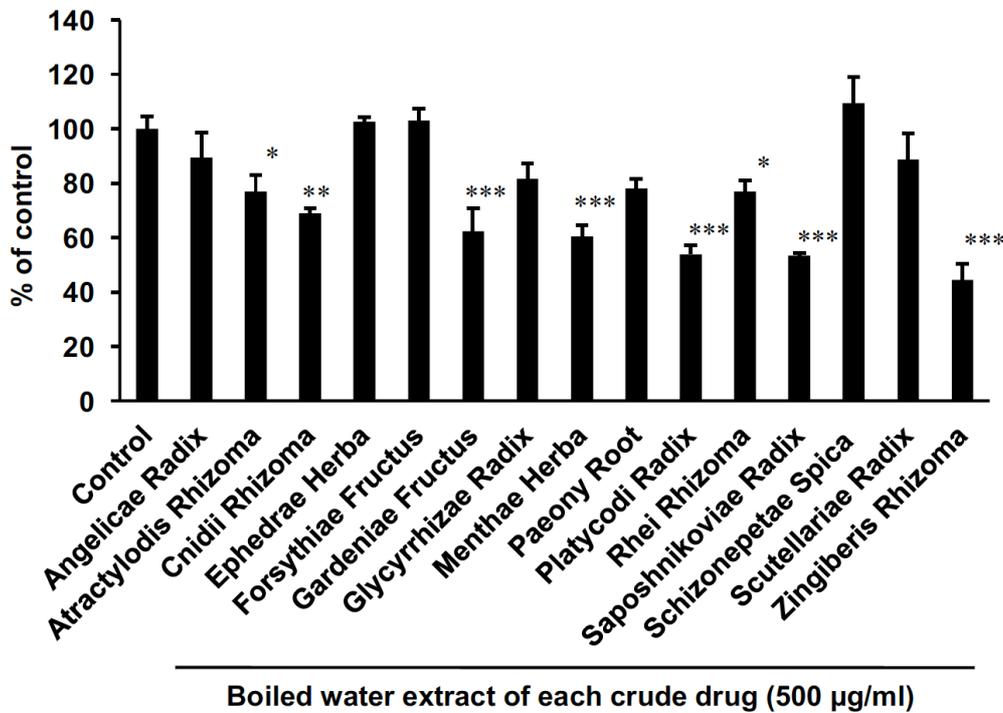


Fig. 11 防風通聖散の各構成生薬熱水抽出エキスの GLUT5 に対する阻害効果

GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞に、各生薬熱水抽出物 (500 μg/ml) と [¹⁴C] fructose (4 μM) と 5 分間作用させた後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた fructose 量を測定した。データは平均 ± S.E. (n = 3) で表記した。*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001 vs control 群 (Dunnet の多重検定)。

次に防風通聖散の各構成生薬の熱水抽出エキス(500 μg/ml)の GLUT5 の阻害作用を検討した。その結果、コントロール群に対して、ビャクジュツ (Atractylodis Rhizoma)、センキュウ (Cnidii Rhizoma)、サンシシ (Gardeniae Fructus)、ハッカ (Menthae Herba)、キキョウ (Platycodi Radix)、ダイオウ (Rhei Rhizoma)、ポ

ウフウ (Saposhnikoviae Rhizoma)、ショウキョウ (Zingiberis Rhizoma) の各エキスに、有意に GLUT5 阻害活性を示した (Fig. 11)。

これらのうち、比較的強い阻害作用が認められたボウフウ、ハッカ、キキョウ、ショウキョウ、サンシシの 5 種の生薬の各エキスについて、GLUT5 に対する阻害活性の濃度依存性を検討した。その結果、各エキスにおいて濃度依存的な GLUT5 阻害活性が認められた (Fig. 12)。ボウフウ、ショウキョウ、キキョウの各エキスにおいて IC_{50} を算出することが出来、それぞれ、119、314、475 $\mu\text{g/ml}$ であった。なお、Fig. 12 で示されている各生薬の濃度において、有意な細胞毒性は認められなかった。

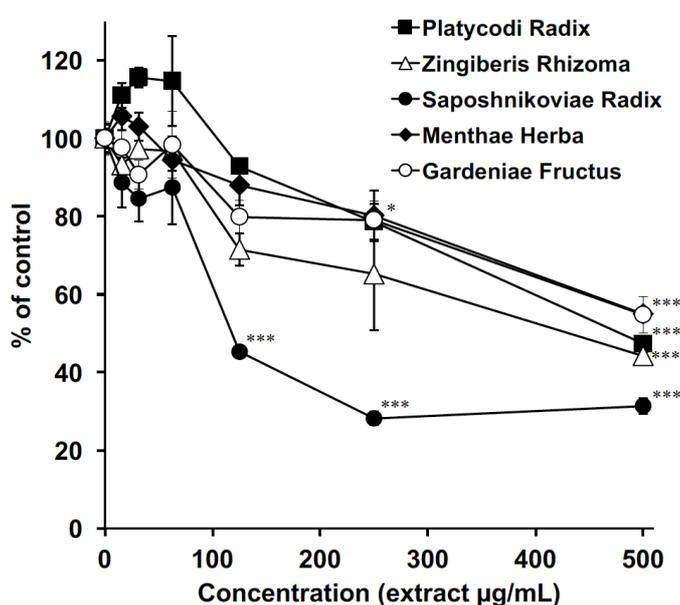


Fig. 12 各生薬エキスの GLUT5 阻害作用

GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞に、各生薬エキス (防風 Saposhnikoviae Radix、生姜 Zingiberis Rhizoma、桔梗 Platycodi Radix、薄荷 Menthae Herba、山梔子 Gardeniae Fructus) と $[^{14}\text{C}]$ fructose (4 μM) を 5 分間作用させた後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた fructose 量を測定した。データは $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ($n = 3$) で表記した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs control 群 (Dunnett の多重検定)。

最も強い阻害活性が認められたボウフウエキスから、活性を担う有効成分の探索を行ったが、活性が各分画物に分散してしまい、単一化合物による活性成分の単離が出来なかった。そこで、その次に強い活性が認められたショウキョウについて検討することとした。

日本薬局方におけるショウキョウの指標成分である 6-gingerol と、加熱処理後に乾燥させたカンキョウの指標成分である 6-shogaol の GLUT5 に対する阻害活性を評価した。その結果、6-gingerol は GLUT5 を濃度依存的に阻害し、その IC_{50} は 39 μM

であったのに対して、6-shogaol は 50 μM 以下の濃度では有意な阻害活性を示さず、100 μM の濃度でようやくコントロール群に対して有意に 64%の阻害活性を示した (Fig. 13)。

本研究で使用したショウキョウエキス中の 6-gingerol、6-shogaol の含量を HPLC で定量したところ、それぞれ 0.34 (w/w) %と 0.0037 (w/w) %であった。

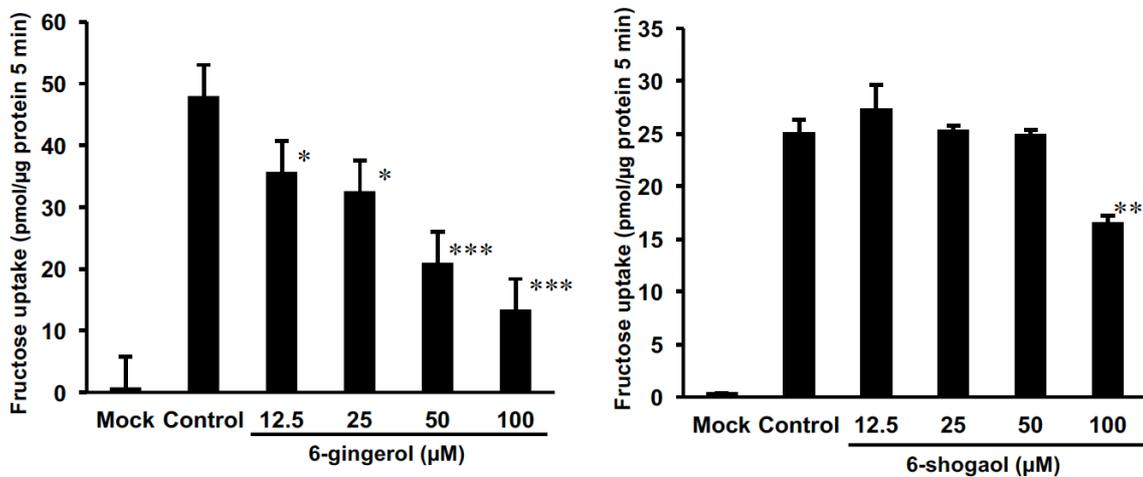


Fig. 13 6-gingerol および 6-shogaol の GLUT5 に対する阻害効果

GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞に、6-gingerol 及び 6-shogaol (各濃度) と [^{14}C]fructose (4 μM) を 5 分間作用させた後の細胞内の放射能により、細胞内に取りこまれた fructose 量を測定した。データは平均 \pm S.E. ($n = 3$) で表記した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ vs control 群 (Dunnet の多重検定)。

考 察

防風通聖散熱水抽出エキスは、1 mg/ml の濃度で有意に GLUT5 を阻害した。防風通聖散エキスのヒト常用量は、1 日 3 回とした時の 1 回投与量は 2.7 g である。ヒトがコップ 1 杯の水 (200 ml) で防風通聖散エキスを 1 回投与量を摂取するとき、その濃度は 14 mg/ml となり、これは GLUT5 阻害活性が見られた濃度の約 14 倍である。従って、ヒトが防風通聖散熱水抽出エキスを服用し、それが消化管内液で希釈されたとしても、GLUT5 をヒト腸管内で阻害する可能性が十分にあると言え、防風通聖散のメタボリックシンドロームに対する有効性²⁵⁻²⁸⁾の作用機序の 1 つとして、GLUT5 に対する阻害作用が関与している可能性が十分に考えられた。

次に、防風通聖散エキスの GLUT5 阻害活性を担う生薬の探索を行った。防風通聖散を構成する 18 品目の生薬のうち、鉱物由来の 3 品目は、有機化合物をほとんど含まないことから、それ以外の 15 品目の植物由来生薬の GLUT5 阻害活性を評価した。その結果、特にボウフウとショウキョウの各熱水抽出エキスに強い活性を認めた。

その後、ボウフウの熱水抽出エキスから活性を担う単一化合物の同定を試みたが、活性成分は親水性の高い化合物を含む画分に移行し、単一化合物を単離できなかった。そこで、次に GLUT5 阻害活性の強かったショウキョウの熱水抽出エキスからの活性成分の単離を検討した。6-gingerol と 6-shogaol は、ショウキョウ、カンキョウに含まれる辛味成分であり、日本薬局方で品質評価のための指標成分として規定され、また、市販もされている。そこで、これらの化合物の標品を購入し、GLUT5 阻害活性を評価したところ、6-gingerol は、濃度依存的に有意に GLUT5 を有意に阻害し、その IC₅₀ 値は 39 μM であった一方で、6-shogaol は 100 μM でコントロールに対して 64% の有意な阻害活性を示したものの、その活性は 6-gingerol よりも弱いものであった。6-shogaol は 6-gingerol を加熱した時の脱水反応により生じる化合物である。それらの構造式の比較から、6-gingerol の GLUT5 阻害活性は、β-ヒドロキシカルボニル部分にある水酸基が重要な役割を果たしていることが推測された (Fig. 14)。また、本実験においてショウキョウエキスの IC₅₀ は 314 μg/mL であったが、ショウキョウエキス中の

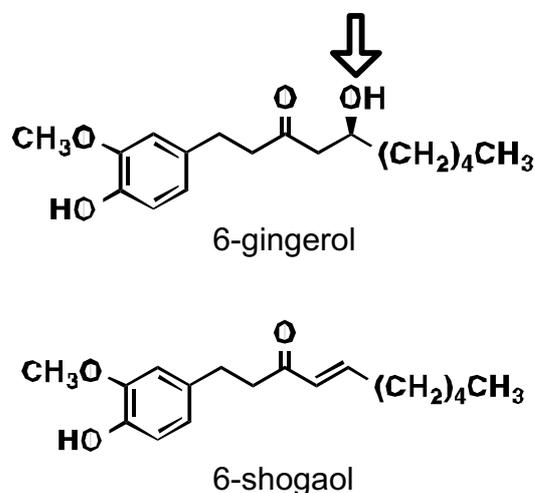


Fig. 14 6-gingerol と 6-shogaol の構造式の比較

6-gingerol の含量を定量した結果、ショウキョウエキス IC₅₀ に相当する濃度では、1.1 µg/ml = 3.6 µM の 6-gingerol を含有していることと算出された。6-gingerol の IC₅₀ は 39 µM であることから、6-gingerol は、ショウキョウエキスの活性の約 9%を担っていると推定された。

カモミール（キク科 *Matricaria recutita* の花）の 60%エタノール抽出物は、0.5 mg/ml の濃度では、*Xenopus* 卵母細胞に発現させた GLUT5 に対して阻害活性を示したことが報告されている³⁷⁾。カモミールは、フラボノイドに属するいくつかのタイプの化合物を含有している³⁸⁾。フラボノイドの一種である epicatechin gallate と nobiletin は、caco-2 細胞へのフルクトース取り込みを濃度依存的に有意に阻害し、それぞれの IC₅₀ は 20 µM および 10 µM であった³⁶⁾。6-gingerol はフラボノイドとは大きく異なる化学構造を有するが、6-gingerol の GLUT5 に対する IC₅₀ は、nobiletin のエピカテキンガレートの IC₅₀ と同程度であり、天然物には GLUT5 の機能を阻害する作用を持つ成分が多く存在していることが示唆された。

ショウキョウは、ショウガ科ショウガ *Zingiber officinale* の根茎であり、野菜や香辛料として幅広く消費されている食品でもある。今後、本研究を応用したショウガからのメタボリックシンドロームをターゲットとした機能性食品の開発が期待される。

結 論

- 防風通聖散熱水抽出エキスは濃度依存的に GLUT5 を阻害し、その力価はヒトが臨床で使用するときの投与量でも消化管内でフルクトース吸収を阻害するのに十分であった。このことから、防風通聖散がメタボリックシンドロームに対する有用性を示す作用機序のひとつとして、フルクトース吸収阻害作用に関与することが示唆された。
- 防風通聖散を構成する 15 種類の植物由来生薬のうち、ショウキョウ、ボウフウ、キキョウ、ハッカ、サンシシの各エキスに、GLUT5 の阻害活性が認められた。
- ショウキョウに含まれる 6-gingerol が GLUT5 に濃度依存的に阻害し、ショウキョウエキスの阻害活性のうち約 9% を担っていた。
-

実験方法

第一部

試薬類

Ginsenoside Rg₁ と Rb₁ は、和光純薬（大阪）より、compound K は、ChromaDex (Irvine, CA) より、ginsenoside Rd、Rg₃、Rh₁、Rh₂、F₁、F₂、protopanaxadiol、protopanaxatriol は、四川省维克寄生物科技有限公司(成都、中国)より購入した。Methyl α -D-glucopyranoside, [glucose-¹⁴C(U)] ([¹⁴C]methyl-glucose)は、Selcia (Hopkinton, MA) より購入した。Phlorizin は、東京化成（東京）より購入した。

ニンジン熱水抽出物の調製と ginsenoside 類の定量

日本薬局方ニンジン (Lot # 9K11M) を大晃生薬（名古屋）より購入した。ニンジン (19 g) を 380 ml の水で 30 分間沸騰させ、ろ過後、ろ液を凍結乾燥することにより 7.1 g のニンジン熱水抽出物 (エキス) を得た。そのエキスを 200 ml のメタノール内で 30 分間処理し、3,000 rpm、15 分遠心することで、可溶部 (4.7 g) と不溶部 (2.4 g) を得た。メタノール可溶部を、水に懸濁し、ヘキサンで 3 回分液することにより、ヘキサン画分 (5.2 mg) を得た。続けて、水層を水飽和ブタノールで 3 回分液することにより、ブタノール画分 (0.20 g) と水画分 (4.4 g) を得た。

ブタノール画分 (30 μ g) または各 ginsenoside 標準品 (5 nmol) をそれぞれ以下の条件の HPLC で分析し、ブタノール画分に含まれる各 ginsenoside 類の含量を各標準品のピーク面積を用いた一点検量線法により定量した：システム、SCL-10A_{VP} (島津製作所、京都)；カラム、TSKgel ODS 80_{TS} (4.6 \times 250 mm) (東ソー、東京)；移動相、H₂O/CH₃CN、80:20—80:20 (0—5 分)、80:20—75:25 (5—12 分)、75:25—58:42 (12—29 分)、58:42—40:60 (29—40 分)、40:60—20:80 (40—45 分)、20:80—0:100 (45—50 分)、直線勾配、1.0 ml/分；検出、UV 203 nm；カラム温度、25°C；溶出時間、ginsenoside Rg₁ (21.7 min)、ginsenoside Rb₁ (31.8 min)、ginsenoside Rh₁ (33.0 min)、ginsenoside Rd (35.3 min)、ginsenoside F₁ (35.4 min)、ginsenoside F₂ (41.2 min)、compound K (48.8 min)。

ヒト SGLT1 のクローニング

hSGLT1 の mRNA 配列 (DDBJ/EBI/GenBank アクセション番号 AH005284) にあるマルチクローニングサイト前後の配列を認識するプライマー、ACGCTGCCACCATGGACAGTAG(SGLT1-primer #1)と CCCTTCAACACCACAGGACGA(SGLT1-primer #2-rev) を設計し、ヒト小腸 cDNA ライブラリー (Clontech、Mountain View、CA) を鋳型にして、DNA ポリメラーゼとして KOD Neo plus (東洋紡、大阪) を使用して、40 サイクルの PCR を行った。

得られた PCR 産物を鋳型として、制限酵素 EcoRI、XbaI 認識配列を含むプライマー、GACGAATTCACGCTGCCACCATGGACAG (SGLT1-primer #EcoRI)、CGATCTAGA GTCCAGCCATGGTAAATCTACAGC (SGLT1-primer #XbaI-rev) を用いて再度 PCR を行い、hSGLT1 のマルチクローニングサイトの両端に制限酵素サイトを含む DNA 断片 (2.1 kDa) を得た。

この DNA 断片と哺乳類発現ベクターである pCI-neo (Promega、Madison、WI) を、制限酵素 EcoRI および XbaI (東洋紡) とともに 37°C、一晩インキュベート後、Ligation Kit Mighty Mix (タカラバイオ、東京) を用いて、16°C で 2 時間インキュベートすることにより、ベクターに hSGLT1 を組み込んだ。

この反応液を、コンピテントセル (E. coli, JM109) に加え、氷上で 10 分間静置した後、42°C で 90 秒のヒートショックを与え、すぐに 2 分間氷冷した。その後、SOB 培地 500 μ L を加えて 37°C で 30 分インキュベートした。50 μ g/ml カルベニシリン (和光純薬、大阪) を含む LB 寒天培地へ、コンピテントセルを塗布し、37°C で一晩、培養した。

ベクターへの導入の確認のため、ベクター特異的なプライマーを用いたコロニーダイレクト PCR を、AmpliTaq Glod Master Mix (Life Technologies、Carlsbad、CA) を用いて行い、目的のサイズのバンドが得られたコロニーを、さらに LB 培地に移して、37°C で一晩、振盪培養した。得られた大腸菌からグリセロールストックを調製し、一部の大腸菌からプラスミドを NucleoBond Xtra Midi キット (タカラ) を用いて抽出した。

このプラスミドについて、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Life Technologies、Carlsbad、CA) を用い、ベクター特異的なプライマー (TAATACGACTC ACTATAGG、T7)、ATTAACCCTCACTAAAGGG、T3) あるいはインサート特異的な

内部プライマー (GTGACAATGCCAGAGTACCT、SGLT1-middle#1 ; AATCCCAATCAG AAGTCCTA、SGLT1-middle#2-rev) を用いた 25 サイクルの PCR を行った。鋳型プラスミドの量は 150~300 ng 相当量とした。

反応後、未反応の蛍光ダイターミネーターの除去のため、EtOH 沈殿を行ってサンプルを精製した。精製したサンプルは Hi-Di Formamide (Life Technologies) 20 μ l に溶解して 96 well に移し替えた。95°C で 2 min heat shock を与え、4°C で 5 分以上冷却した後、ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) にセットし、プロトコールに従って解析した。

遺伝子配列の確認後、このベクターを hSGLT1-pCI-neo として利用した。

SGLT1 阻害実験

HEK293 細胞を底面積 75 cm² の培養フラスコを使用して、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培地には 10% fetal bovine serum (FBS、Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA)、100 units/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin (ナカライテスク、京都) を含む Dulbecco's Modified Eagles medium (高 glucose、DMEM、ナカライテスク) を使用した。細胞が 7-8 割コンフルエントに達したところで 0.02% EDTA-4Na 含有 PBS (pH 7.2、0.15 M) ならびに 0.05% trypsin (Sigma) を用いて剥離することにより継代を行った。

24 穴プレートに 100 μ g/ml の poly-L-lysine (Sigma) 200 μ l をの各 well に添加し、1 時間室温で放置したのち、滅菌水で洗浄して、コーティングプレートを作成した。このプレートに 1.5 \times 10⁵ 個/well で HEK293 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で一晩培養した。細胞の接着を確認し、無抗生質培地 400 μ l/well を交換し、1 well あたり hSGLT1-pCI-neo または mock の pCI-neo 1 μ g を含む Opti-MEM (Life Technologies) 50 μ l、Hilly Max (同仁化学、熊本) 3 μ l を添加して 48 時間培養し、一過性 hSGLT1 導入細胞を作製した。

細胞培養液を吸引除去したのち、glucose-free HBSS (138 mM NaCl、5.0 mM KCl、2.0 mM CaCl₂、1.4 mM MgSO₄、1.0 mM NaH₂PO₄、12 mM NaHCO₃、pH 7.3) を 250 μ l/well 加え、37°C、5% CO₂ 条件下、10 分間インキュベートすることにより安定化させた。培地を吸引除去後、各濃度のサンプルと、500 nM [¹⁴C]methyl-glucose を含む glucose-free HBSS を 0.22 μ l ずつ加え、37°C で 10 分間インキュベートした。細胞を 1 ml の氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (0.15 M、pH 7.2、PBS) で 3 回洗浄後、各 well

に 100 μ l の EtOH を静かに加え、10 分間室温で静置して細胞内容物を溶出させた。さらにミリ Q を各 well に 100 μ l 加えたあと、4 ml のクリアゾル I (ナカライ) が入った液体シンチレーションカウンター用バイアルに移し、放射能を測定し、細胞内に取りこまれた [14 C]methyl-glucose を液体シンチレーションカウンターで測定した。各 well に残った細胞は、1N NaOH を 150 μ l 加えて一晩室温でインキュベートすることにより溶解し、1N HCl 150 μ l で中和した後、その 10 μ l から BCATM Protein Assay kit (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) を使用してタンパク質濃度を測定した。細胞内への methyl-glucose の取り込み量は、細胞のタンパク質量で補正して算出した。阻害率は以下の式により算出し、50%阻害濃度 (IC₅₀) は、50%を挟む 3 点の濃度とその時の阻害率から対数式による近似曲線を作成して算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{サンプル添加細胞への取り込み量} - \text{Mck細胞への取り込み量}}{\text{サンプル無添加細胞への取り込み量} - \text{Mck細胞への取り込み量}} \right) \times 100$$

MTT 法による細胞毒性の確認

Poly-L-lysine でコーティングした 96 well プレートに HEK293 細胞を 5×10^4 cells/well となるように播種し、インキュベーターで一晩培養した。培地を吸引除去し、サンプルを含む glucose-free HBSS を 50 μ l/well 添加して、37°C で 10 分間インキュベートした。その後培地を吸引除去し、0.5 mg/ml MTT (Sigma) 含有培地を 100 μ l/well 加えてインキュベーターで 4 時間培養した。その後 10%ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を 100 μ l/well 加え、一晩 37°C でインキュベートすることにより細胞内のホルマザンを溶解した。その後、570 nm の吸光度を測定し、細胞を播いていない well における吸光度をバックグラウンド、サンプル処理していない well における吸光度を 100% として、細胞生存率を評価した。

Ginsenoside F₂ と compound K の取り込み実験

Poly-L-lysine でコーティングした 24 well プレートに、ヒト小腸上皮細胞モデルとして caco-2 細胞 (大日本製薬、京都) を 1.5×10^5 個/well で播種した。また前述した方法で、一過性 hSGLT1 導入細胞を調製した。SGLT1 阻害実験で使用した [14 C]methyl-glucose の代わりに、ginsenoside F₂ (10 μ M)、compound K (10 μ M)、phlorizin (100 μ M)、glucose (5.6 mM) のいずれかを含む glucose-free HBSS を加え、

37°Cまたは4°Cで15または30分間インキュベートした。細胞を1 mlの氷冷PBSで3回洗浄後、各wellに100 µlのEtOHを静かに加え、10分間室温で静置して細胞内容物を溶出させた。さらに0.1 µMのアトロバスタチン（内部標準として使用、LKT Laboratories、St. Paul、MN、USA）水溶液を各wellに100 µL加え、回収し、以下の条件によるLC/MS/MSで分析した：システム、Waters Quattro Premier XE（Milford、MA、USA）；カラム、Inertsil ODS-3（2.1 x 100 mm、3 µm、GLサイエンス、東京）；移動相、0.1% AcOH in H₂O / 0.1% AcOH in acetonitrile、42/58—42/58（0—1分）、42/58—94/6（1—2分）、94/6—94/6（2—3.2分）、94/6—42/58（3.2—3.3分）、48/58—48/58（3.3—9分）、直線勾配、200 µl/min；検出、ESI(+)-MRM、compound K（645.59→203.1 m/z、cone 90 V、collision 35 V、4.1分）、ginsenoside F₂（807.8→627.5 m/z、cone 90 V、collision 35 V、2.8分）、atorvastatin（559.4→250.1 m/z、cone 50 V、collision 50 V、3.6 min）。Atorvastatinに対するcompound Kまたはginsenoside F₂とのピーク面積の割合から、compound K（3.2 nM—2 µM）またはginsenoside F₂（16 nM—2 µM）の濃度範囲において $r^2 > 0.98$ の精度で検量線を作り、濃度を算出した。各wellに残った細胞は、前述した方法でタンパク質濃度を測定した。細胞内へのginsenoside F₂とcompound Kの取り込み量は、細胞内タンパク質量で補正して算出した。

統計処理

統計処理は、多群の検定には一元配置分散分析後Dunnettの多重比較 t 検定を、独立に群の検定にはStudentの t 検定を採用した。危険率5%未満を統計学的に有意とした。

第二部

試薬類

6-gingerolは松浦薬業（名古屋）より、6-shogaolは和光純薬（大阪）より購入した。¹⁴C-fructoseはEckert & Ziegler（Valencia、CA、USA）より購入した。防風通聖散の各構成生薬はTable 1に示した購入元より購入した。

防風通聖散熱水抽出物（エキス）の調製

本研究では、Table 1 に示した日本薬局方に適合する生薬を使用した。1日量の防風通聖散（計 28 g）を 560 ml の水で 30 分間沸騰させ、ろ過後、ろ液を凍結乾燥させることにより、防風通聖散エキスを 8.2 g 得た（収率 29%）。また、その各構成生薬単味のエキスは、生薬 5 g を 100 ml の水で 30 分間沸騰させ、同様に調製した。そのときの収率を Table 1 に示す。各エキスは 100 mg/ml の濃度で水に懸濁し、-20°C で冷凍保存した。

Table 1 防風通聖散の構成生薬とそのエキス収率

生薬名	漢名	防風通聖散 1 日あたりの配合量	購入元 ^{a)}	ロット番号	収率 (%) ^{b)}
トウキ	当帰	1.2 g	大晃	0H09M	40
ビャクジュツ	白朮	2.0 g	大晃	0AJ0510	29
センキュウ	川芎	1.2 g	大晃	9I29M	22
マオウ	麻黄	1.5 g	大晃	0I15M	16
レンギョウ	連翹	1.2 g	ツムラ	19038951	14
サンシシ	山梔子	1.2 g	大晃	9I11M	32
カンゾウ	甘草	2.0 g	大晃	9L21M	24
セッコウ	石膏	2.0 g	大晃	0I02M	-
カッセキ	滑石	3.0 g	大晃	2F23M	-
ハッカ	薄荷	1.2 g	大晃	2F23M	34
ボウショウ	芒硝	1.5 g	ナカライ	M7P8998	-
シャクヤク	芍薬	1.2 g	大晃	1I26M	38
キキョウ	桔梗	2.0 g	大晃	3G09M	44
ダイオウ	大黄	1.5 g	大晃	1F23	31
ボウフウ	防風	1.5 g	大晃	2A25	21
ケイガイ	荊芥	1.5 g	ツムラ	27042881	12
オウゴン	黄芩	2.0 g	大晃	0J08M	42
ショウキョウ	生姜	0.3 g	大晃	25021331	13

^{a)} 「大晃」は大晃生薬（名古屋）で、「ツムラ」は（株）ツムラ（東京）である。

^{b)} 収率（%）は、得られたエキスの重量の元の生薬重量に対する比率である。

防風通聖散エキス（50 mg）をメタノール（1 ml）に懸濁させて 30 分間超音波で処理した後、15,000 rpm、10 分遠心し、上清（30 μ l）を以下の条件の HPLC で分析した：システム、SCL-10A_{VP}；カラム、TSK-GEL ODS-80_{TS}；移動相、0.05M AcOH-AcONH₄ 緩衝液（pH 3.6）/ CH₃CN、90:10—45:55（0—40 分）、直線勾配、1.0 ml/分；カラム温度、40°C；検出、UV 200~400 nm。そのクロマトグラムを以

下に示す。

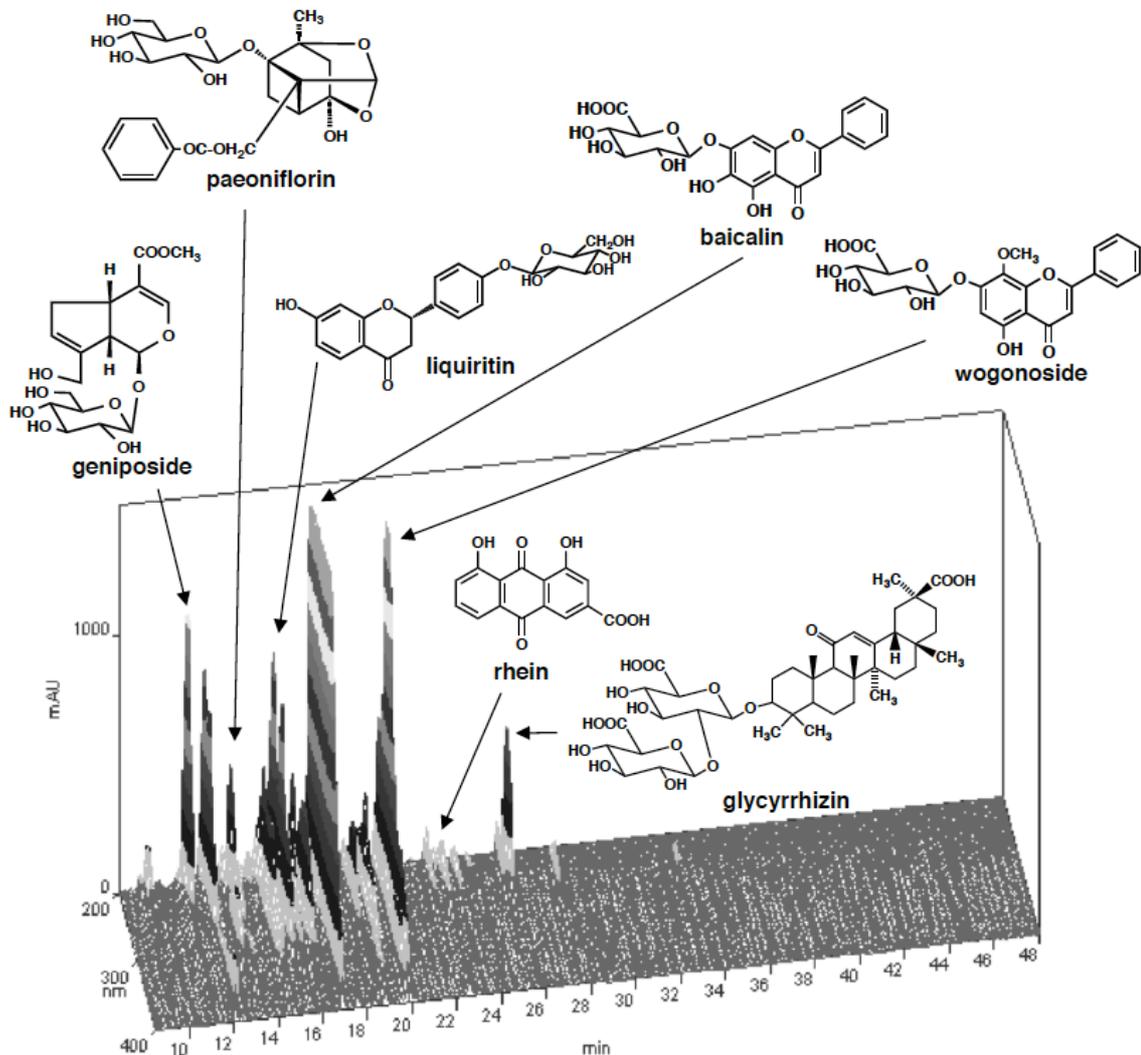


Fig. 15 本研究で使用した防風通聖散エキスのフィンガープリント
 代表的なピークは、同じ条件で分析した標品との溶出時間とUVスペクトルより同定した。

GLUT5 阻害実験

CHO-K1 細胞と GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞 (CHO-GLUT5 細胞) は、前橋工科大学工学部生物工学科食品生理機能工学研究室の薩 秀夫 准教授より提供されたものを用いた。細胞は底面積 75 cm² の培養フラスコを使用し、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培地は、CHO-K1 細胞では 10 g/l の F-12 (Sigma)、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin (ナカライ)、10% FBS を含む DMEM を、CHO-GLUT5 細胞では、10 g/l の F-12 (Sigma)、2 g/l の G418 (ナカライ)、1.18 g/l の NaHCO₃、10% FBS を含む DMEM を使用した。

Poly-L-lysine でコーティングした 24 穴プレートに、これらの細胞を 2×10^5 個/well で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で一晩培養した。培地を吸引除去後、glucose-free HBSS (pH 7.3) を 250 μl /well 加え、 37°C で 10 分間インキュベートすることにより安定化させた。培地を吸引除去後、各濃度の防風通聖散または各生薬エキス、6-gingerol (松浦薬業、名古屋)、6-shogaol (和光純薬) と、 $4 \mu\text{M}$ の [^{14}C]fructose (Eckert & Ziegler, Valencia, CA, USA) を含む glucose-free HBSS を 0.22 ml/well 加え、 37°C で 5 分間インキュベートした。細胞を 1 ml の氷冷 PBS で 3 回洗浄後、各 well に 100 μl の EtOH を静かに加え、10 分間室温で静置して細胞内容物を溶出させた。さらにミリ Q 水を各 well に 100 μl 加えたあと、4 ml のクリアゾル I が入った液体シンチレーションカウンター用バイアルに移し、放射能を測定し、細胞内に取りこまれた [^{14}C]fructose を測定した。各 well に残った細胞は、1N NaOH を 150 μl 加えて一晩室温でインキュベートすることにより溶解し、1N HCl 150 μl で中和した後、その 10 μl からタンパク質濃度を測定した。細胞内への fructose の取り込み量は、細胞のタンパク質量で補正して算出した。阻害率および IC_{50} は、第一部と同様の方法で算出した。

6-gingerol と 6-shogaol の定量

生姜熱水抽出エキス中に 6-gingerol と 6-shogaol の含量を、以下の条件の HPLC により測定した：システム、SCL-10A_{VP}；カラム、Inertsil ODS-3 (4.6 × 250 mm、GLサイエンス)；移動相、65%メタノール、1.0 ml/分；カラム温度、 40°C ；検出、UV 210 nm；溶出時間、6-gingerol (11.7 分)、6-shogaol (28.0 分)。6-gingerol (10.0—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および 6-shogaol (0.20—2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の濃度範囲での濃度とピーク面積との相関に関する最小二乗法による近似直線 ($r^2 > 0.999$) より、ショウキョウエキス (10 mg/ml) 中の各化合物量をピーク面積から定量した。

統計処理

第一部と同様に行った。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、GLUT5 安定発現系 CHO-K1 細胞を分与いただきました、前橋工科大学工学部生物工学科食品生理機能工学研究室の薩 秀夫 准教授に深甚たる感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、幾多の御助言、御指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科薬物動態制御学分野 井上 勝央 准教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、幾多の有益な御助言、御指導を賜りました本学大学院薬学研究科生薬学分野 寺坂 和祥 講師、石内 勘一郎 助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、RI 施設での実験をサポート頂きました RI 管理室の皆様 に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、様々な御助言、御討論、ご協力をして頂きました本学大学院薬学研究科生薬学分野の皆様 に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、幾多の御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野 水上 元 名誉教授（現高知県立牧野植物園園長）に深甚たる感謝の意を表します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、終始詳細な御助言、御指導をして頂きました本学大学院薬学研究科生薬学分野 牧野 利明 教授に心底より感謝致します。

参考文献

- 1) 一般財団法人医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団編 (2016) 第十七改正日本薬局方. じほう, 東京.
- 2) 神戸中医学研究会編 (2011) 中医臨床のための中薬学. 東洋学術出版社, 東京.
- 3) De Souza LR, Jenkins AL, Sievenpiper JL, Jovanovski E, Rahelic D, and Vuksan V (2011) Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) root fractions: differential effects on postprandial glycemia in healthy individuals. *J Ethnopharmacol* 137:245250.
- 4) Shishtar, E, Sievenpiper, JL, Djedovic, V, Cozma, AI, Ha, V, Jayalath, VH, Jenkins, DJ, Meija, SB, de Souza, RJ, Jovanovski, E, Vuksan, V (2014) The effect of ginseng (the genus *panax*) on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *PLOS One* 9: e107391.
- 5) 田代眞一 (2000) 漢方薬の正しい使い方～漢方薬の薬理作用. *Pharma Medica* 18: 1317, 2000.
- 6) Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M, and Kobashi K (1998) Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb₁ from *Panax ginseng*. *J Pharm Pharmacol* 50:11551160.
- 7) Akao T, Kanaoka M, and Kobashi K (1998) Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb₁ by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration—measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* 21:245249.
- 8) Lee J, Lee E, Kim D, Yoo J, and Koh B (2009) Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration. *J Ethnopharmacol* 122:143148.
- 9) Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M, and Schubert-Zsilavec M (2003) Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. *Drug Metab Dispos* 31:10651071.
- 10) Munekage M, Kitagawa H, Ichikawa K, Watanabe J, Aoki K, Kono T, and Hanazaki K (2011) Pharmacokinetics of daikenchuto, a traditional Japanese medicine (kampo) after single oral administration to healthy Japanese volunteers. *Drug Metab Dispos* 39:17841788.
- 11) Liu H, Yang J, Du F, Gao X, Ma X, Huang Y, Xu F, Niu W, Wang F, Mao Y, Sun Y, Lu T, Liu C, Zhang B, and Li C (2009) Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of *Panax notoginseng* extract to rats. *Drug Metab Dispos* 37:22902298.
- 12) Han M and Fang XL (2006) Difference in oral absorption of ginsenoside Rg₁ between in vitro and in vivo models. *Acta Pharmacol Sin* 27:499505.
- 13) Han M, Sha X, Wu Y, and Fang X (2006) Oral absorption of ginsenoside Rb₁ using in vitro and in vivo models. *Planta Med* 72:398404.
- 14) Xiong J, Sun M, Guo J, Huang L, Wang S, Meng B, and Ping Q (2009) Enhancement by adrenaline of ginsenoside Rg₁ transport in Caco-2 cells and oral

-
- absorption in rats. *J Pharm Pharmacol* 61:347352.
- 15) Xiong J, Sun M, Guo J, Huang L, Wang S, Meng B, and Ping Q (2009) Active absorption of ginsenoside Rg₁ *in vitro* and *in vivo*: the role of sodium-dependent glucose co-transporter 1. *J Pharm Pharmacol* 61:381386.
 - 16) Hummel CS, Lu C, Loo DD, Hirayama BA, Voss AA, and Wright EM (2011) Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C1421.
 - 17) Yang Z, Wang JR, Niu T, Gao S, Yin T, You M, Jiang ZH, and Hu M (2012) Inhibition of P-glycoprotein leads to improved oral bioavailability of compound K, an anticancer metabolite of red ginseng extract produced by gut microflora. *Drug Metab Dispos* 40:15381544.
 - 18) Chang TC, Huang SF, Yang TC, Chan FN, Lin HC, Chang WL. (2007) Effect of ginsenosides on glucose uptake in human Caco-2 cells is mediated through altered Na⁺/glucose cotransporter 1 expression. *J Agric Food Chem* 55:1993-1998.
 - 19) Han, M, Fang, XL (2006) Difference in oral absorption of ginsenoside Rg₁ between *in vitro* and *in vivo* models. *Acta Pharmacol Sin* 27: 499505.
 - 20) Brunet, JL, Maresca, M, Fantini, J, Belzunces, LP (2004) Human intestinal absorption of imidacloprid with Caco-2 cells as enterocyte model. *Toxicol Appl Pharmacol* 194: 19.
 - 21) Jiang, S, Ren, D, Li, J, Yuan, G, Li, H, Xu, G, Han, X, Du, P, An, L (2014) Effects of compound K on hyperglycemia and insulin resistance in rats with type 2 diabetes mellitus. *Fitoterapia* 95: 5864.
 - 22) Wang, CW, Su, SC, Huang, SF, Huang, YC, Chan, FN, Kuo, YH, Hung, MW, Lin, HC, Chang, WL, Chang, TC (2015) An essential role of cAMP response element binding protein in ginsenoside Rg1-mediated inhibition of Na⁺/glucose cotransporter 1 gene expression. *Mol Pharmacol* 88: 10721083.
 - 23) 高山宏世 (2013) 腹証図解 漢方常用処方解説. 泰晋堂, 東京
 - 24) 合田幸弘, 袴塚高志 (2013) 新一般用漢方の手引き. じほう, 東京.
 - 25) Lin, CH, Kuo, YH, Shih, CC (2014) Effects of bofu-tsusho-san on diabetes and hyperlipidemia associated with AMP-activated protein kinase and glucose transporter 4 in high-fat-fed mice. *Int J Mol Sci* 15:2002220044.
 - 26) Qian, W, Hasegawa, J, Tsuno, S, Endo, Y, Matsuda, A, Miura, N. (2014) Effects of kampo formulas on the progression of hypercholesterolemia and Fatty liver induced by high-cholesterol diet in rats. *Yonago Acta Med* 57: 147158.
 - 27) Azushima, K, Tamura, K, Wakui, H, Maeda, A, Ohsawa, M, Uneda, K, Kobayashi, R, Kanaoka, T, Dejima, T, Fujikawa, T, Yamashita, A, Toya, Y, Umemura, S (2013) Bofu-tsu-shosan, an oriental herbal medicine, exerts a combinatorial favorable metabolic modulation including antihypertensive effect on a mouse model of human metabolic disorders with visceral obesity. *PLoS One* 8: e75560.
 - 28) Park, J, Bose, S, Hong, SW, Lee, DK, Yoo, JW, Lim, CY, Lee, M, Kim, H (2014) Impact of GNB3-C825T, ADRB3-Trp64Arg, UCP2-3'UTR 45 bp del/ins, and

-
- PPAR γ -Pro12Ala polymorphisms on Bofutsushosan response in obese subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Food* 17: 558570.
- 29) Bray, GA. (2007) How bad is fructose? *Am J Clin Nutr* 86: 895896.
- 30) Tappy, L, Mittendorfer, B (2012) Fructose toxicity: is the science ready for public health actions? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15: 357361.
- 31) Hu, FB, Malik, VS (2010) Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav* 100: 4754.
- 32) Douard, V, Ferraris, RP (2008) Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E227237.
- 33) Barone, S, Fussell, SL, Singh, AK, Lucas, F, Xu, J, Kim, C, Wu, X, Yu, Y, Amlal, H, Seidler, U, Zuo, J, Soleimani, M (2009) Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem* 284: 50565066.
- 34) Satsu, H, Awara, S, Unno, T, Shimizu, M (2018) Suppressive effect of nobiletin and epicatechin gallate on fructose uptake in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. doi: 10.1080/09168451.09162017.01387515.
- 35) Godoy, A, Ulloa, V, Rodríguez, F, Reinicke, K, Yañez, AJ, García Mde, L, Medina, RA, Carrasco, M, Barberis, S, Castro, T, Martínez, F, Koch, X, Vera, JC, Poblete, MT, Figueroa, CD, Peruzzo, B, Pérez, F, Nualart, F (2006) Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1–6 and GLUT9 in human cancer: Ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol* 207: 614–627.
- 36) Sakar, Y, Nazaret, C, Lettéron, P, Ait Omar, A, Avenati, M, Viollet, B, Ducroc, R, Bado, A (2009) Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents. *PLoS One* 4:e7935.
- 37) Villa-Rodriguez, JA, Aydin, E, Gauer, JS, Pyner, A, Williamson, G, Kerimi, A (2018) Green and chamomile teas, but not acarbose, attenuate glucose and fructose transport via inhibition of GLUT2 and GLUT5. *Mol Nutr Food Res* 61: doi: 10.1002/mnfr.201700566.
- 38) McKay, DL, Blumberg, JB (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res* 20: 519530.