

# 高脂肪食飼育ラットの脂質代謝におよぼす フォルスコリンの影響

辻原 命子・谷由美子

## Effects of Forskolin on Lipid Metabolism in Rats Fed High Fat Diet

Nobuko TSUJIHARA and Yumiko TANI

### 緒 言

フォルスコリンはネパール、インド地方に自生するシソ科の植物 *Coleus forskohlii* の芋より抽出した物質である。この芋は古代ヒンズー医学書に心臓病、呼吸器系疾患、腹痛、排尿痛および不眠、ひきつけなどの中枢神経系疾患などに効果があると記されており<sup>1)</sup>古くから生薬として利用されてきた。

最近、その作用機構が研究され、膜酵素であるアデニル酸シクラーゼの活性化に関与していることが明らかになった。<sup>2),3),4)</sup>すなわち、アデニル酸シクラーゼの活性化によって cAMP の合成が促進され、ホルモン感受性リパーゼが活性化されることによって脂肪の分解が亢進され、肥満の抑制効果が期待される。肥満は成人病の主なリスクファクターであり、その抑制効果は意義深いことである。そこで本研究では、成熟ラットを高脂肪食で2週間飼育後、*Coleus forskohlii* の芋のアセトン抽出物を1週間経口投与して脂質代謝への影響を検討した。

一方、食事療法および運動療法の補助療法として高度肥満者に有用性が認められているマジンドール [化学名 (±)-5-(p-chlorophenyl)-2,5-dihydro-3H-imidazo-[2,1- $\alpha$ ]isoindol-5-ol] が化学薬剤として市販されている。これは食欲中枢へ直接作用<sup>5),6)</sup>し、摂食抑制作用<sup>7)</sup>および消化吸収抑制作用<sup>8)</sup>によって摂取エネルギーを減少させるもので、フォルスコリンと作用機序が相違しているが比較するため同様に検討した。

### 方 法

#### 1. 動物飼育法

8週齢(体重240~260g)のWistar系雄ラット(日本エスエルシー(株))30匹を用い、これを対照区(C区)、フォルスコリン含有アセトン抽出物(以下フォルスコリンと略記)区、マジンドール区の3区に分け、さらにフォルスコリン区をフォルスコリン経口投与区(F区)とフォルスコリン pair-fed 区(FC区)に分け、マジンドール区を腹腔内注射区(M区)とマジンドール pair-fed 区(MC区)に分け、それぞれ6匹ずつとした。ラットは購入後5日間固形飼料(CE-2, (株)日本クレア製)で予備飼育した後、Table 1に示す組成の飼料をそれぞれ投与し、3週間自由摂取で飼育した。ただしフォルスコリン pair-fed 区はフォルスコリン経口投与区との、マジンドール pair-fed 区はマジンドール腹腔内注射区の各々1週間分ずつ飼料摂取量を平均して1日摂取量を求めこれを投与した。そして飼育3週目にF区には飼料中にアセトン

Table 1 Composition of high fat diet.

Ingredient	(%)
Corn starch <sup>1</sup>	48
Casein <sup>2</sup>	24
Lard <sup>3</sup>	21
Cellulose <sup>4</sup>	2
Mineral mixture <sup>5</sup>	4
Vitamin mixture <sup>6</sup>	1

<sup>1,2,4</sup> Japan Clea, Co., Tokyo.

<sup>3</sup> Yoneyama Reagent Industries, Co., Ltd., Osaka.

<sup>5</sup> This was identical with Harper's mixture. (Ref. 18) Oriental Yeast, Co., Tokyo.

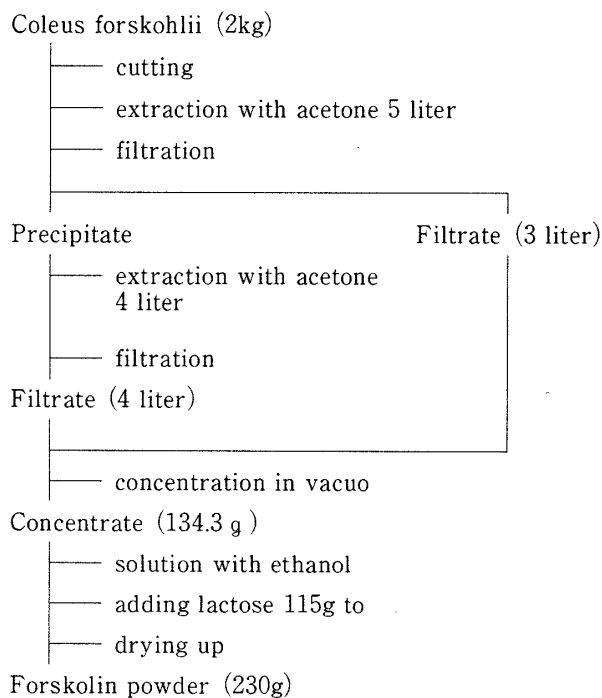
<sup>6</sup> Oriental Yeast, Co., Tokyo. (Ref. 19)

抽出物1.25 g / 匹 / 日 (フォルスコリン10mg含有) を混入して経口投与し, M区にはマジンドール (サンド薬品株) 6錠 (マジンドール 3 mg含有) を磨碎した後0.1N-HCl 8 mlに溶かし 1 N-NaOH 0.69mlで pH 5.0に調整し, 純水で10mlに定容した後, これより 1 mlを (マジンドール 300  $\mu$ g / 匹 / 日) を腹腔内注射した. マジンドール pair-fed 区には生理食塩水 1 mlを腹腔内注射した. なおF区の飼料はアセトン抽出物添加量だけコーンスターチ量を減じて調整した. 飼育は個別ケージで行い, 飲水は水道水を自由に摂取させ, 室温 $22 \pm 1$  °C, 相対湿度 $55 \pm 2$  %, 自然採光下の空調動物室内で行った. 一方飼育期間中は週 2 回体重を測定し, 飼料摂取量は毎日の残量を投与量より差し引いて算出した. 飼育終了日に10時間絶食させエーテル麻醉下で解剖採血し, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 心臓および腹腔内脂肪 (腎臓, 睪丸周囲および壁側脂肪) を摘出して重量を測定し, 血清尿素窒素, 血糖, 総コレステロール (以下 T-chol と略記), HDL -コレステロール (以下 HDL-chol と略記), 中性脂肪 (以下 TG と略記), 2-Thiobarbituric Acid Value (以下 TBA 価と略記), 遊離脂肪酸 (以下 NEFA と略記) を測定し, 肝臓脂質は総脂質 (以下 TL と略記), T-chol, TG, TBA 価を測定した.

## 2. フォルスコリン粉末の調製

*Coleus forskohlii* の根を粉碎し, この粉末 2 kgを秤り, 5 lのアセトンを用いてフォルスコリンを抽出し, ヌッチェで濾過して一次抽出液を得, 残渣を再びアセトン 4 lで抽出し, それを濾過して二次抽出液を得た. これらの抽出液を合わせ, 減圧下で溶媒を留去し, タール状になった濃縮物をエタノールに溶解し, これに乳糖を加え, 再び溶媒を留去し乾

Table 2 Preparation of forskolin powder.



燥させると橙褐色のしっとりしたフォルスコリン粉末が得られた。この粉末中フォルスコリン含有率は0.8%であった。抽出方法は Table 2 に示した。

### 3. 血清成分の分析

尿素窒素は和光純薬工業(株)のキット試薬尿素窒素Bテストワコー (ウレアーゼ・インドフェノール法) を用いた。血糖は和光純薬工業(株)のキット試薬グルコースCIIテストワコー (ムタローゼ・GOD法) を使用した。T-chol および HDL-chol は和光純薬工業(株)のキット試薬、総コレステロールEテストワコー (コレステロールオキシダーゼ・DAOS法) と HDL-コレステロールワコー (ヘパリン・マンガン結合沈でん法) を用いた。TG は日本商事(株)のネスコートTGキット (L-グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ・酵素法), TBA 価は八木式蛍光法<sup>9)</sup> で測定した。NEFA は和光純薬工業(株)の NEFA C テストワコー (ACS・ACOS法) を用いて測定した。

### 4. 肝臓脂質成分の分析

肝組織 1 g を用い、クロロホルム・メタノール (v/v 2 : 1) 混液で磨砕抽出した後、定容し試料溶液とした。肝 TL は重量法で、肝 T-chol は Zak-Henly 法<sup>10)</sup> で、肝 TG は和光純薬工業(株)のキット試薬 TG-テストワコー (アセチルアセトン比色法) を用いて測定した。肝 TBA 価は真杉<sup>11)</sup>らの方法により測定した。

### 5. 統計処理

データは Student の *t*-test を用いて群間の有意差 ( $p < 0.05$ ) 検定を行った。

## 結 果

### 1. 試料摂取量, 体重増加率および腹腔内脂肪体重比率の比較

飼料摂取量, 体重増加率および腹腔内脂肪体重比率は Table 3 に示してある。飼料摂取量は飼育開始後 2 週間は対照区に比し M 区で増加傾向がみられたが, 薬剤投与 1 週間平均では F 区, M 区ともに対照区より減少した。体重増加率および腹腔内脂肪も F 区, M 区ともに対照区に比較して小さく減量の効果が認められた。

Table 3 Effects of forskolin on body weight gain, food intake and abdominal adipose tissue in rats fed high fat diet.

Groups	Body weight <sup>1)</sup> gain (%)	Food intake <sup>2)</sup> (g/day)	Abdominal adipose <sup>3)</sup> tissue (%)	
Control	126±2	15.6±0.4	3.1±0.2	
Forskolin	Pair-fed	119±2	11.5±0	2.3±0.2
	Oral administration (10mg/rat)	117±1 <sup>a</sup>	11.2±0.3 <sup>a</sup>	2.6±0.1 <sup>a</sup>
Mazindol	Pair-fed	119±2	15.3±0	2.2±0.2
	i. p. dose (300 µg/rat)	119±1 <sup>a</sup>	14.7±0.3 <sup>a</sup>	2.4±0.1 <sup>a</sup>

Values are means±SE for six rats.

<sup>1)</sup> Expressed as % of the initial body weight.

<sup>2)</sup> Average food intake of the experimental period (one week).

<sup>3)</sup> Ratio to the final body weight.

<sup>a</sup> Significantly different at  $p < 0.05$  against control group as determined by Student's *t*-test.

## 2. 血清成分の比較

血清成分の測定値については Table 4 に示してある。尿素窒素においては F 区, M 区ともに各々の pair-fed 区に比較して増加した。血糖は F 区が対照区, FC 区に比較して減少したが, 逆に M 区では対照区より増加した。血清脂質については F 区では FC 区に比較して HDL-chol, TBA 価, NEFA が増加し, TG は対照区, FC 区よりも減少した。M 区は対照区より HDL-chol, TG, TBA 価, NEFA のいずれも減少し, MC 区に較べて HDL-chol は増加し, TBA 価は減少した。F 区は T-chol 以外の血清成分について FC 区と差が認められ, フォルスコリンの特異的な脂質代謝への関与が推測される。

## 3. 肝臓脂質成分の比較

肝臓脂質成分の測定値は Table 5 に示してある。F 区の肝臓 TL, T-chol, TG はいずれに

Table 4 Effects of forskolin on serum components in rats fed high fat diet.

Groups	Urea N (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Serum lipids				
			Total cholesterol (mg/dl)	HDL cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	TBA value (nmol/ml)	NEFA (mEq/l)
Control	14.2±0.3	124±4	63.8±3.8	47.1±1.6	39.3±2.3	5.8±0.1	1.13±0.06
Pair-fed	11.7±0.4	163±2	58.0±2.1	36.3±0.9	20.5±1.6	4.8±0.1	0.70±0.04
Forskolin Oral administration (10mg/rat)	15.0±0.5 <sup>b</sup>	101±4 <sup>a,b</sup>	60.6±1.9	42.8±1.6 <sup>b</sup>	14.5±1.1 <sup>a,b</sup>	5.6±0.1 <sup>b</sup>	1.17±0.09 <sup>b</sup>
Pair-fed	13.4±0.3	143±3	54.0±1.3	35.2±1.1	27.6±4.6	5.5±0.2	0.82±0.06
Mazindol i. p. dose (300 µg/rat)	14.9±0.2 <sup>c</sup>	146±3 <sup>a</sup>	60.1±2.8	39.4±1.1 <sup>a,c</sup>	31.8±1.9 <sup>a</sup>	3.8±0.1 <sup>a,c</sup>	0.79±0.07 <sup>a</sup>

Values are means±SE for six rats.

<sup>a</sup> Significantly different at p<0.05 against control group as determined by Student's t-test.

<sup>b</sup> Significantly different at p<0.05 against forskolin pair-fed group as determined by Student's t-test.

<sup>c</sup> Significantly different at p<0.05 against mazindol pair-fed group as determined by Student's t-test.

Table 5 Effects of forskolin on liver lipids in rats fed high fat diet.

Groups	Liver lipids			
	Total lipids (g/100g)	Cholesterol (g/100g)	Triglyceride (g/100g)	TBA value (nmol/g)
Control	7.5±0.4	0.47±0.04	4.4±0.4	87.2±0.7
Pair-fed	4.9±0.1	0.36±0.01	2.5±0.2	67.8±0.3
Forskolin Oral administration (10mg/rat)	3.8±0.3 <sup>a,b</sup>	0.31±0.01 <sup>a,b</sup>	1.6±0 <sup>a,b</sup>	81.7±0.9 <sup>a,b</sup>
Pair-fed	6.2±0.6	0.45±0.03	3.0±0.4	68.3±1.1
Mazindol i. p. dose (300 µg/rat)	5.4±0.2 <sup>a</sup>	0.51±0.02	2.9±0.2 <sup>a</sup>	67.3±0.7 <sup>a</sup>

Values are means±SE for six rats.

<sup>a</sup> Significantly different at p<0.05 against control group as determined by Student's t-test.

<sup>b</sup> Significantly different at p<0.05 against forskolin pair-fed group as determined by Student's t-test.

においても対照区, FC区に比較して減少した. 一方TBA値は対照区に較べて減少したがFC区より増加した. M区はTL, TG, TBA値において対照区に較べて減少したがMC区とは差がなかった. 肝臓脂質成分については, 明らかにフォルスコリンにより改善効果が認められた. TBA値については, 血清と同様に肝臓脂質成分もF区でFC区より増加しており検討が必要である.

## 考 察

フォルスコリンはシソ科植物 *Coleus forskohlii* から抽出されたジテルペンの誘導体で分子式は  $C_{22}H_{34}O_7$  (Mw 410) である. 1981年に Metzger<sup>2)</sup>らはラット肝臓の膜分画のアデニル酸シクラーゼが直接フォルスコリンによって活性化され, ATPよりcAMPの合成が促進されることを報告している. そしてcAMPはcAMP依存性プロテインキナーゼを活性化することによってホルモン感受性リパーゼを活性型に変換し, 脂肪およびグリコーゲンの分解促進に参与する. cAMPを増加する活性化因子として従来よりグルカゴン, 副腎皮質刺激ホルモン, 甲状腺刺激ホルモン, 甲状腺ホルモン, 成長ホルモン, エピネフリン, ノルエピネフリンなどが知られている. フォルスコリンは, これらの活性化因子と比べ微量で強力な効果を示し,<sup>1)</sup>さらに活性化因子と同時添加することにより効果が増幅することが認められている.<sup>3)</sup>またその効果の程度は, 大脳, 小脳, 心臓, 肝臓でとくに大きく, しかもホルモンと異なり効果の持続性も高く,<sup>12)</sup>アデニル酸シクラーゼに直接作用するといわれている.<sup>2)</sup>そこで本研究において, フォルスコリン投与による脂肪の蓄積抑制効果および脂質代謝への影響を検討した. 血清成分についてはF区は対照区に比べて血糖とTGが低下したが, FC区に比べて尿素N, HDL-chol, TBA値, NEFAが上昇し, 血糖とTGは低下した. 尿素Nの増加はたん白質の異化亢進が促進され, フォルスコリンにも抗インスリンホルモンと同様の作用が考えられる. TGの低下とNEFAの上昇はフォルスコリンによるcAMPの増加, ホルモン感受性リパーゼの活性亢進が誘導されたものと思われる. フォルスコリンはラットやヒトの脂肪細胞に作用してcAMPを著しく増加させ, 細胞よりグリセロールや遊離脂肪酸の放出を亢進することが報告され,<sup>3), 4)</sup>またこれらの作用はグルカゴン, エピネフリン, 副腎皮質刺激ホルモンなど脂肪分解性のホルモンによって相乗作用をうけ, また可逆的であるとその特性が示されている.<sup>3)</sup>血糖の低下については, フォルスコリンによるcAMPの増加が解糖系の亢進より脂肪分解の方に優先的に作用したことが推測された. 血液性状からみるとF区は血糖が低下し, NEFAが上昇して空腹状態を示しているにもかかわらず飼料摂取量が対照区より減少しているのは, フォルスコリンは交感神経に直接作用しないが,<sup>13)</sup>交感神経が興奮した時と同様の代謝系になっているため, 食欲が抑制されたものと思われる. FC区は血糖が高く, NEFAが低下しているのと比較して興味深い. 肝組織のTL, T-chol, TGともF区は対照区, FC区の両群に比較して低下した. 以上より, F区は体重増加率および腹腔内脂肪の減少による減量の効果のみでなく, FC区に比較しても血清TGの低下, HDL-chol, NEFAの上昇および肝臓脂質の改善が認められ, フォルスコリンの特異的な脂質代謝への関与が推察された. TBA値のみ血清, 肝臓ともFC区より上昇しており, 検討する必要がある.

一方マジンドールは食事療法および運動療法の補助療法として高度肥満症に対して有用性が認められ, 食欲抑制剤としてすでに市販されている. この作用機序は食欲中枢への直接作用,<sup>5), 6)</sup>および神経終末におけるノルアドレナリン,<sup>14)</sup>ドーパミン,<sup>15)</sup>セロトニン<sup>16)</sup>を介した機序によって摂食抑制作用<sup>7), 17)</sup>を示すことが知られている.

本研究でもマジンドール300  $\mu\text{g}$  /匹/日を1週間腹腔内注射した区の平均飼料摂取量は対照区に比べて低下し、従って体重増加率および腹腔内脂肪体重比も低下した。血清成分は対照区に比較して血糖は上昇し、HDL-chol, TG, TBA 値, NEFA が低下し、M区と飼料摂取量を同量にしたMC区と差がみられたのは、尿素NとHDL-cholの上昇およびTBA値の低下であった。すなわち他の成分の変動は摂食抑制による体重増加率および腹腔内脂肪体重比の低下が影響していると考えられ、マジンドールに特異的な作用とは思われない。M区はMC区に比べて尿素Nの上昇がみられたが、永井<sup>17)</sup>らもマジンドール投与によって血中尿素の増加およびアミノ酸分解酵素と糖新生系酵素の活性亢進を認めており、これよりマジンドールはたん白質異化作用を促進すると推測している。これはF区と同様の結果であり、フォルスコリンは酵素活性に影響するのに対してマジンドールは食欲中枢へ作用して摂食抑制するようにその作用機序は異なるがたん白質の代謝系に類似性がみられて興味深い。肝臓脂質は対照区に比べてM区でTL, TG, TBA値が低下したが、MC区と比べて差がなかった。またF区と相違してM区では対照区より血糖値が上昇し、NEFAは低下しており食欲を抑制する血液性状がみられた。これより食欲抑制機構がフォルスコリンとマジンドールでは相違していることが明らかである。以上、F区、M区、とも体重増加率、腹腔内脂肪体重比が対照区より低下したが、F区は体重の増加抑制に伴う脂質代謝改善に加えて、フォルスコリンに特異的な作用が推測され興味深い。しかし、今回実験に用いたフォルスコリンはアセトン抽出物であり、フォルスコリン含有率0.8%と少なく、フォルスコリン以外のアセトン抽出物の脂質代謝への影響についても検討をする必要がある。

## 要 約

*Coleus forskohlii* から抽出されたフォルスコリンは、アデニル酸シクラーゼ活性を亢進して脂肪の分解およびグリコーゲンの分解促進に働くことが知られている。そこで今回フォルスコリン含有アセトン抽出物投与による脂質代謝への影響を減量のための食欲抑制剤として市販されているマジンドールの作用機序と比較し検討した。

実験は8週齢のWistar系雄ラットを用い、対照区、フォルスコリン区、マジンドール区の3区に分け、さらにフォルスコリン区を経口投与区(F区、フォルスコリン10mg/匹/日)とフォルスコリン pair-fed区(FC区)に分け、マジンドール区を腹腔内注射区(M区、マジンドール300  $\mu\text{g}$  /匹/日)とマジンドール pair-fed区(MC区)に分けて3週間高脂肪食で飼育し、薬剤投与は最後の週に1週間行った。飼育終了後血清および肝臓脂質成分について測定し検討した。F区、M区とも対照区に比べて試験期1週間の平均飼料摂取量、体重増加率、腹腔内脂肪体重比率は低下した。F区はFC区に比べて血清尿素N, HDL-chol, NEFAが上昇し、血糖, TGおよび肝臓のTL, T-chol, TGは低下した。M区はMC区に比べて血清尿素N, HDL-cholは上昇し、TBA値は低下した。肝臓のTL, TG, TBA値は対照区より低下したがMC区との差はなかった。

最後に、フォルスコリンを提供していただきました松平天然物研究所に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 佐野護：蛋白質・核酸・酵素, **28**, 943 (1983)
- 2) Metzger, H. and Lindner, E.: *Drug Research*, **31**, 1248 (1981)
- 3) Ren-jye Ho and Oi-Huang Shi: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **107**, 157 (1982)

- 4) Burns, T. W., Langley, P. E., Terry, B. E., Beylund, D. B. and Forte, L. R.: *Life Sci.*, **31**, 815 (1982)
- 5) Minami, T., Oomura, Y., Sugimori, M. and Hynes, M.: *Brain Res. Bull.*, **15**, 29 (1985)
- 6) Sikder, S. K., Oomura, Y. and Inokuchi, A.: *Brain Res. Bull.*, **15**, 33 (1985)
- 7) 藤本一眞, 坂田利家, 荒瀬高一, 筒井浩一郎, 福嶋正孝: 日薬理誌, **83**, 425 (1984)
- 8) 白石武昌: 日薬理誌, **83**, 159 (1984)
- 9) 八木國夫: ビタミン, **49**, 403 (1975)
- 10) 上田英雄: 臨床検査法, 398, 杏林書院 (1959)
- 11) 真杉文紀, 中村哲也: ビタミン, **51**, 21 (1977)
- 12) Darflar, E. J., Mahan, C. C., Koachman, A. M. and Inse, P. A.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 11901 (1982)
- 13) Lindner, E., Dohadwalla, A. N., Bhattacharva, B. K.: *Drug Research*, **28**, 284 (1978)
- 14) Engstrom, R. G., Kelly, L. A. and Gogerty, J. H.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **214**, 308 (1975)
- 15) Heikkila, R. E.: *Life Sci.*, **28**, 1867 (1981)
- 16) Shimizu, N., Take, S., Hori, T. and Oomura, Y.: *Physiol. Behav.*, **49**, 131 (1984)
- 17) 永井克也, 森勉, 大倉実, 辻本久敏, 中川八郎: 日薬理誌, **83**, 133 (1984)
- 18) Harper, A. E.: *J. Nutr.*, **68**, 405 (1959)
- 19) Oriental Yeast Company Technical report, 43 (1969)

### Summary

Forskolin, an isolate of the root of *Coleus forskohlii*, is known to activate adenylatecyclase and stimulate lipolysis. The present study was conducted to investigate the effects of forskolin on lipid metabolism in rats fed high fat diet as compared with an anorectic drug, mazindol.

Thirty Wistar strain male adult rats (240–260g) were divided into control, orally administered 10mg/rat/day forskolin, forskolin pair-fed, intra peritoneally dosed 300  $\mu$ g/rat/day mazindol, and mazindol pair-fed groups. The rats were fed high fat diet for three weeks and dosed with the drugs in the final week.

Administration of forskolin or mazindol reduced food intake, body weight gain and ratio of adipose tissue to body weight as compared with the control group. Compared with the pair-feeding, oral administration of forskolin increased the serum urea nitrogen, HDL-cholesterol and free fatty acids but decreased the blood sugar and the serum triglyceride and the liver total lipids, triglyceride and cholesterol.

On mazindol, intra peritoneally dosed group showed higher serum urea nitrogen and HDL-cholesterol and lower serum TBA value than the pair-fed group. The liver total lipids, triglyceride and TBA values were not significantly different between the two groups but lower than the control group. The above results suggest that forskolin improves the lipid metabolism of rats not only through body weight reduction but also through some other specific effects.