

卵巣摘出ラットの脂肪蓄積に及ぼすコレウスフォルスコリの影響

韓 立坤,^{*,a} 森本千恵,^b 蔚 榮海,^c 奥田拓道^aEffects of *Coleus forskohlii* on Fat Storage in Ovariectomized RatsLi-Kun HAN,^{*,a} Chie MORIMOTO,^b Rong-Hai YU,^c and Hiromichi OKUDA^a

Department of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto,^a 3-1-100 Tsukide, Kumamoto 862-8502, Japan, Second Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, Ehime University,^b Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime 719-0295, Japan, and College of Agronomy, Jilin Agricultural University,^c Changchun City 130118, China

(Received February 7, 2005; Accepted February 24, 2005)

The antiobesity effects of *Coleus forskohlii* were investigated in ovariectomized (ovx) rats. Eight-week-old female Wistar rats were assigned to four groups: a sham-operated group fed the control diet (MF, sham-m); an ovx-m group fed the control diet; a sham-operated group fed the control diet containing 50 g/kg of *Coleus forskohlii* extract (sham-c); and an ovx-c group fed the control diet containing 50 g/kg of *Coleus forskohlii* extract. The body weight, adipose tissues, and cell diameter were investigated in ovx rats after *Coleus forskohlii* extract treatment. Administration of *Coleus forskohlii* extracts reduced body weight, food intake, and fat accumulation in ovx rats. Our results suggest that *Coleus forskohlii* may be useful in the treatment of obesity.

Key words—*Coleus forskohlii*; ovariectomized rats; basal lipolysis; cell diameter

はじめに

閉経後の女性が肥満になり易いことはよく知られている。¹⁾ 肥満とは皮下や内臓の周りにある脂肪組織の脂肪細胞に過剰の脂肪が蓄積した病態のことである。脂肪細胞内の脂肪はリパーゼの作用で分解され、生じたグリセロールや脂肪酸は肝臓や筋肉で代謝される。この脂肪の分解を促進するのが交感神経の末端から分泌されるノルアドレナリンや副腎髄質から分泌されるアドレナリン、脳下垂体前葉から分泌される ACTH 等のホルモンである。一方、脂肪合成を促進するのはインスリンやリポ蛋白リパーゼである。最近、山口ら²⁾は卵巣ホルモン分泌の高い発情前期から発情期にかけては脂肪細胞におけるノルアドレナリンによる脂肪分解が高く、また卵巣ホルモン分泌の低い発情後期から発情間期にかけては脂肪細胞から分泌されるリポ蛋白リパーゼ活性が高く、さらにリポ蛋白リパーゼとインスリン分泌とが正の相関を示し、脂肪合成が促進していることを報

告した。さらに卵巣を摘出したラットにおいては、脂肪細胞の脂肪合成が高まり脂肪分解が低下していることを報告した。したがって、更年期や排卵後のように卵巣ホルモン分泌が低下した状態ではノルアドレナリンの感受性が低下して脂肪細胞での脂肪分解が低下する一方、リポ蛋白リパーゼ活性の促進やインスリン分泌の増加により脂肪合成が高まり肥満に陥り易くなると考えられる。よってこのような肥満傾向を阻止するには脂肪合成を低下させ脂肪分解を高めればよいことになる。

コレウス (*Coleus forskohlii*) はネパール、インド地方に自生するシソ科の植物で、古代ヒンズー医学書に心臓病、腹痛及び不眠、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、古くから生薬として使われてきた。³⁾ また、コレウスに含まれるフォルスコリンには脂肪分解促進作用が認められている。⁴⁾ そこで筆者らは卵巣摘出によって肥満を呈したラットにおけるコレウスの作用について検討したので報告する。

実験の部

1. 動物 8 週齢の Wistar 系雌性ラット (日本

^a熊本県立大学環境共生学部食健康環境学科, ^b愛媛大学医学部医化学第二, ^c吉林農業大学農学院
e-mail: hanlikun@hotmail.com

クレア)を購入し、1週間の予備飼育ののち、卵巣摘出手術を行い実験に供した。1群7匹の計4群に分け、2群は腹部より卵巣を摘出し、2群は偽手術を施した。卵巣摘出後3日間の観察飼育ののち、卵巣摘出の2群は飼育用粉末飼料MF投与群(Ovx-m)及びコレウス5%投与群(Ovx-c)に分けた。偽手術群においても、卵巣摘出群と同様に、飼育用粉末飼料MF投与群(Sham-m)及びコレウス5%投与群(Sham-c)とに分けた。なお、飼育は室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間毎の明暗サイクル(明期:7:00am—7:00pm)の環境で行い、飼料並びに水は自由摂取とした。飼料摂取量は毎週1回測定し、その都度飼料を交換した。体重は3日毎に測定した。実験終了日にラットをネンブタール麻酔下で屠殺し、直ちに子宮傍脂肪組織を摘出し、組織重量を測定した。なお、本実験は愛媛大学医学部制定の動物実験指針に基づく動物実験管理委員会の承認の基に行われた。

2. 検体及び飼料の作成 コレウス粉末は三邦株式会社及び大蔵製薬株式会社ヘルスウェイ事業部より提供された。コレウス粉末には約1%のフォルスコリンが含まれている。成分はTable 1に示した。コレウス添加飼料は飼育用粉末飼料MFに5%コレウス粉末(0.05%フォルスコリン含有)を加えて作成した。

3. コレウス摂取卵巣摘出ラットの脂肪細胞における脂肪分解に及ぼすノルエピネフリン及びインス

リンの影響 摘出した子宮傍脂肪組織を Rodbell の方法⁵⁾に準じてコラゲナーゼ処理し脂肪細胞を単離した。50 μl の脂肪細胞に2.5%牛血清アルブミンを含むHanks緩衝液225 μl 及びノルエピネフリン溶液25 μl を添加し、 37°C で1時間反応させ、Zapfの方法⁶⁾を用いて遊離した脂肪酸を測定した。また、ノルエピネフリン存在下でインスリンを加えてインスリンの影響を検討した。

4. 脂肪細胞の直径の測定 子宮傍脂肪組織に2%オスミウム酸を含む50 mM コリジン-HCl 緩衝液(pH 7.4)を加え、 37°C で72時間以上放置したのち、ナイロン製分子篩(250 μm)上、純水で洗浄し、画像解析装置(日立H-500, Hitachi Ltd.)を用いて細胞直径を測定した。

5. 統計処理 得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計処理にはSuper ANOVAソフト(Abacus Concepts, Berkeley, CA)を用い、分散分析を行ったのち、Bonferroni/Dunn (All means)検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的有意とした。

結 果

1. 卵巣摘出ラットの摂取エネルギーに及ぼす影響 Table 2に示すように、Sham-m群に比べてOvx-m群の摂取平均エネルギーは有意に増加した。Ovx-m群に比べてOvx-c群では有意な低値を示した。一方、Sham-m群に比べてSham-c群は低値を示したが、有意な差は認められなかった。

2. 卵巣摘出ラットの体重変化及び子宮傍脂肪組織重量に及ぼす影響 Figure 1に飼育期間中のラットの体重変化を示した。卵巣を摘出するとSham-m群に比べてOvx-m群の体重は有意に増加した。飼料にコレウス粉末を5%添加したOvx-c群では、Ovx-m群に比べて有意な体重低下が認められた。一方、Sham-m群に比べてSham-c群では体重の低下傾向がみられた。

子宮傍脂肪組織重量については、Fig. 2に示すよ

Table 1. Chemical Composition of Coleus forskohlii Extract

Component	Content (%)
Water	2.4
Total fat	7.1
Total protein	4.4
Carbohydrate	75.5
Ash	10.6
Forskolin	1.0

Table 2. Intake of Energy and Forskolin

	Sham-m	Ovx-m	Sham-c	Ovx-c
Energy intake (kJ/week/rat)	1687.9 \pm 15.9 ^a	1979.4 \pm 21.2 ^b	1536.1 \pm 14.1 ^a	1765.7 \pm 33.8 ^a
Forskolin intake (mg/day/kg)			170.8 \pm 2.56	175.9 \pm 4.36

Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

うに、ラットの卵巣を摘出すると脂肪組織重量は有意に増加し肥満を示した。卵巣摘除したラットに5%コレウス粉末添加食を与えると脂肪組織重量は有意に減少した。Sham群においてもコレウスの投与によって脂肪組織重量の減少傾向がみられた。

3. 脂肪細胞における脂肪分解に及ぼす影響

卵巣摘出手術を施したラットにおいて、ノルエピネフリン非存在下での脂肪細胞における脂肪分解、すなわち basal lipolysis を比較したところ、Ovx-m群

における遊離脂肪酸量に比べてOvx-c群の遊離脂肪酸量は約50%低かった。またノルエピネフリンによる脂肪分解促進作用は、有意な差は認められなかったが、Ovx-m群に比べてOvx-c群で低値を示した。さらにノルエピネフリンの脂肪分解促進に対するインスリンの抑制作用は、Ovx-c群に比べてOvx-m群で高値を示した (Table 3)。

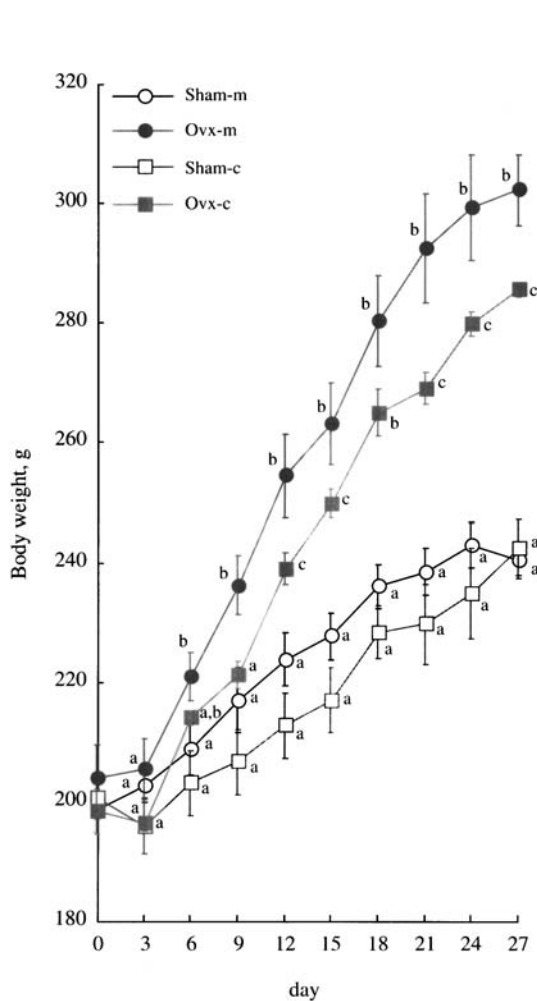


Fig. 1. Effect of *Coleus forskohlii* on Body Weight in Ovariectomized Rats
Values are means±S.E. in each group. ○: Sham-m, ●: Ovx-m, □: Sham-c, ■: Ovx-c. Those not sharing a letter differ, $p<0.05$.

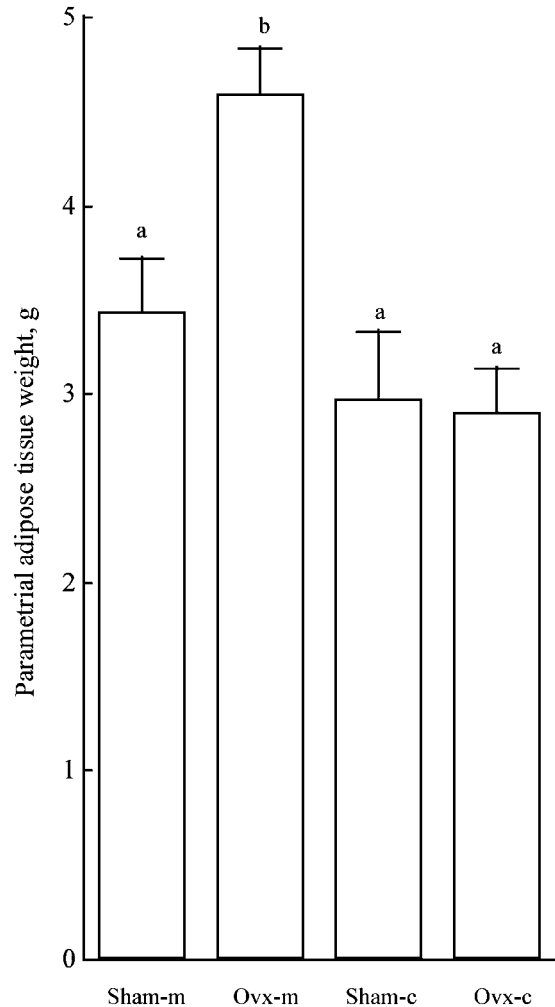


Fig. 2. Effect of *Coleus forskohlii* on Parametrial Adipose Tissue Weight in Ovariectomized Rats
Values are means±S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p<0.05$.

Table 3. Basal Lipolysis, Norepinephrine-Induced Lipolysis and Effects of Insulin in Fat Cells Isolated from Ovariectomized Rats

	Basal lipolysis (FFA μ Eq/ 10^6 cells/h)	Norepinephrine-induced lipolysis (FFA μ Eq/ 10^6 cells/h)	Effects of insulin (FFA μ Eq/ 10^6 cells/h)
Ovx-m	0.275±0.101 ^a	2.076±0.322 ^a	0.911±0.159 ^a
Ovx-c	0.128±0.046 ^a	1.348±0.509 ^a	0.416±0.161 ^b

Those not sharing a letter differ, $p<0.05$.

4. 脂肪細胞の直径の変化に及ぼす影響

Figure 3 に示すように、Sham-m 群に比べて Ovx-m 群では脂肪細胞の直径は有意に拡大した。Ovx-m 群に比べて Ovx-c 群では脂肪細胞の直径は有意な低値を示した。Sham 群においてはコレウスの投与効果はみられなかった。

考 察

卵巣摘出手術を施したラットを閉経後の女性に対するモデル動物として用いたところ、偽手術を施したラットに比べて体重増加の亢進が認められた (Fig. 1)。これは、閉経後の女性は肥満に陥り易い傾向があるということとよく一致している。この現象は、閉経後に卵巣ホルモンであるエストロゲンの分泌が著しく減少するために脂肪合成系の酵素であるリポ蛋白質リパーゼ活性が増加する一方で、脂肪分解が減少することに由来すると推察できる。さらに

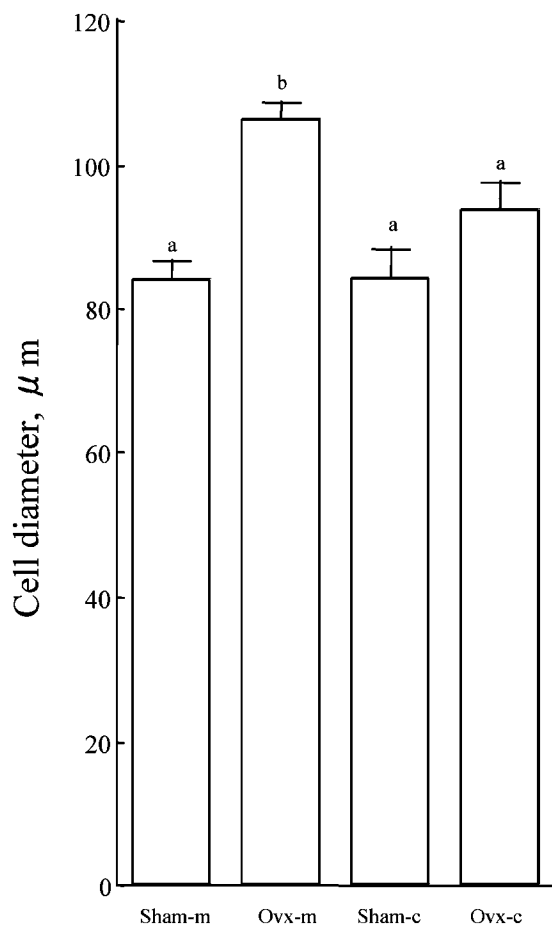


Fig. 3. Effect of *Coleus forskohlii* on Cell Diameter in Ovariectomized Rats

Values are means \pm S.E. in each group. Those not sharing a letter differ, $p < 0.05$.

山口らの報告²⁾では、雌ラットにおいてエストロゲンの分泌が低い発情間期ではリポ蛋白質リパーゼ活性とインスリン分泌が正の相関を示しており、インスリンも脂肪合成を促進するホルモンであることから、卵巣摘出ラットにおける体重の著しい増加は、エストロゲンの減少とともに脂肪合成が高まり肥満を引き起こした可能性を示唆している。コレウスには、脂肪細胞における脂肪分解を促進させる作用を持つフォルスコリンが含まれている。脂肪細胞における脂肪分解は、カテコールアミンなどの脂肪分解促進ホルモンが脂肪細胞膜の β -アドレナリンレセプターに結合し、G 蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し cyclic AMP を増加させ、それによってホルモン感性リパーゼをリン酸化し、活性化することによって引き起こされるといわれている。^{7,8)} フォルスコリンは、この脂肪分解のカスケードの中でアデニル酸シクラーゼを活性化し脂肪分解促進作用を示すことが知られている。⁴⁾ 一方、われわれはフォルスコリンが脂肪細胞中のホルモン感性リパーゼと脂肪滴との結合を促進することによって脂肪分解を促進することを見出している。⁹⁾ したがって、このフォルスコリンを含むコレウスを投与することによって脂肪細胞における脂肪分解が促進され、肥満を予防することが期待される。Figure 1 に示すように、コレウス投与群ではコントロール群に比べて体重増加の抑制が認められた。さらに、Fig. 2 に示すように生殖器周囲の脂肪組織重量はコレウス投与群でその増加が有意に抑制されている。これらの脂肪組織の脂肪細胞直径を比較してみると Sham-m 群に比べて Ovx-m 群で増加し、また Ovx-m 群に対して Ovx-c 群で有意に減少していた (Fig. 3)。したがって、コレウス投与群における脂肪組織重量増加の抑制は、脂肪細胞数の増加ではなく脂肪細胞サイズの拡大を抑制するためと推測される。肥満とは、脂肪組織に脂肪が過剰に蓄積することであるから、体重増加及び脂肪組織重量が抑制されたことから、肥満が抑制されたといえる。

一方、脂肪細胞における脂肪分解作用は、basal lipolysis 及びノルエピネフリンによる脂肪分解作用のいずれにおいても Ovx-m 群に比べて Ovx-c 群で有意差は認められないものの低値を示した (Table 3)。これらの現象は、コレウスに含まれるフォルスコリンが脂肪細胞に作用して、既にホルモン感性リ

パーゼと脂肪滴との接触を高め脂肪分解が起こっているため、さらなる脂肪分解の促進が認められなかったと推測される。

これらの結果より、卵巣摘出ラットにおいて、コレウスを投与することによって脂肪の蓄積が抑制され、肥満を予防することが可能であることが示唆された。またインドではコレウスを栽培し食用する地域もあるそうである。³⁾今回、コレウス粉末を用いてその機能性を検討したが、今後コレウスに含まれる有効成分であるフォルスコリンの卵巣摘出ラットにおける経口投与効果についてさらに検討を行いたい。

REFERENCES

- 1) Nishida Y., Otani N., Takano Y., Kato H., Watanabe K., Ichikawa T., Suzuki I., *Jpn. J. Nutr. Diet.*, **59**(Suppl. 5), 312 (2001).
- 2) Yamaguchi M., Katoh S., Morimoto C., Sakayama K., Shiosaka T., Masuno H., Okuda H., *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, 610-617 (2002).
- 3) Sano M., *Protein Nucleic Acid and Enzyme*, **28**, 943-950 (1983).
- 4) Burns T. W., Langley P. E., Terry B. E., Bylund D. B., Forte L. R., *Life Sci.*, **31**, 815-821 (1982).
- 5) Rodbell M., *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380 (1964).
- 6) Zapf J., Schoenle E., Waldvogel M., Sand M., Foresch E. R., *Eur. J. Biochem.*, **133**, 605-609 (1981).
- 7) Kuo J. F., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1349-1355 (1969).
- 8) Huttunen J.K., Aquino A. A., Steinberg D., *Biochim. Biophys. Acta*, **224**, 295-298 (1970).
- 9) Morimoto C., Kameda K., Tsujita T., Okuda H., *J. Lipids Res.*, **42**, 120-127 (2001).