

フリーラジカル消去作用と老化促進モデルマウス(SAM-P/8)の脳内神経伝達物質に及ぼす当帰芍薬散(TJ-23)の影響について

山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所医学薬学研究部
平松 緑 小松 真紀子
宮崎医科大学精神医学教室
植田 勇人

はじめに

当帰芍薬散はアセチルコリンの合成酵素であるコリントランスフェラーゼの活性およびニコチンアセチルコリンの受容体結合を増加させることが知られている¹⁾。この作用に注目して十束、川勝²⁾や工藤、杉浦³⁾は、老年痴呆に当帰芍薬散が有効であることを見いだした。最近アルツハイマー病にフリーラジカルが関係すること⁴⁾、およびアルツハイマー病の剖検脳においてセロトニン量が低下していること⁵⁾が知られている。

今回は、当帰芍薬散のフリーラジカル消去作用を電子スピン共鳴法を用いて検討し、さらに老化促進モデルマウスの線条体の神経伝達物質に及ぼす当帰芍薬散の影響について検索をした。

I 実験方法

1. 実験動物

雄性老化促進モデルマウス(SAM-P/8)の3か月齢を使用した。動物は室温23度、湿度55%、12時間明暗サイクル(7:00-19:00を明期)のもとに飼育した。

2. 当帰芍薬散

当帰芍薬散は株式会社ツムラより供与されたエキス原末を使用した。フリーラジカルの消去作用

の測定には、当帰芍薬散を水に溶解した。SAM-P/8への投与については4g/lの濃度に懸濁した当帰芍薬散を摂水瓶に入れ、3か月間自由に経口投与した。

3. フリーラジカルの測定

1) スーパーオキシド

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により発生するスーパーオキシドを電子スピン共鳴法を用いて測定した⁷⁾。

2) ヒドロキシルラジカル

鉄-過酸化水素によるフェントン反応から生じるヒドロキシルラジカルを電子スピン共鳴法を用いて測定した⁷⁾。

3) 脂溶性ラジカル

1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカルをエタノールに溶解し、電子スピン共鳴法を用いて測定した⁷⁾。

4) カーボンセンターラジカル

マウス大脳皮質のホモジェネートに鉄とアスコルビン酸を加えて発生するカーボンセンターラジカルを電子スピン共鳴法を用いて測定した⁷⁾。

5) チオバルビツール酸反応物質の測定

マウス大脳皮質のホモジェネートに鉄とアスコルビン酸を加えて生成するチオバルビツール酸反応物質(TBARS)を蛍光光度計により測定した⁷⁾。

6) モノアミンとそれらの代謝産物ならびにアミノ酸の測定

マウスを頸椎脱臼したのち脳を摘出し、線条体を取り出した。組織に100倍量の0.1N過塩素酸ナトリウムを加え、ホモジェナイズした。ついでホモジェネートを遠心濾過フィルターにとり、12,000回転で15分遠心濾過した。得られた濾過液を分析試料とし、ニューロケム(エムシーメディ

カル株式会社, 東京)を用いてモノアミンとそれらの代謝産物ならびにアミノ酸を分析した。

II 実験結果

1. フリーラジカル消去作用

当帰芍薬散はスーパーオキシド (1.58×10^{15} spins/ml), ヒドロキシルラジカル (1.24×10^{15} spins/ml) および DPPH ラジカル (0.45×10^{15} spins/ml) を 0.01~10 mg/ml の濃度範囲において濃度依存性に消去した (図 1)。

また、自動酸化によるカーボンセンターラジカルならびに TBARS 生成を 0.01~10 mg/ml の濃度範囲において濃度依存性に消去した (図 2)。

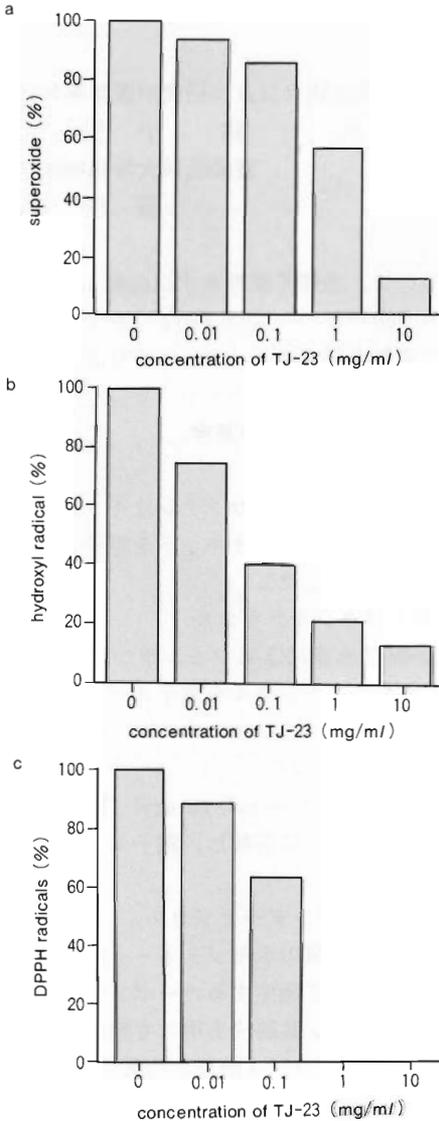


図 1 スーパーオキシド(a), ヒドロキシルラジカル(b)ならびに 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル(c)に対する当帰芍薬散の消去作用

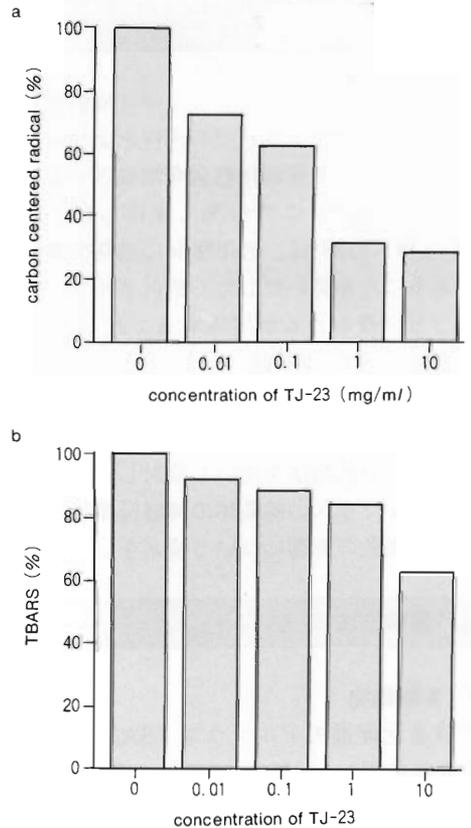


図 2 自動酸化により生成するカーボンセンターラジカル(a)ならびにチオバルビツール酸反応物質 (TBARS)(b)に対する当帰芍薬散の効果

2. モノアミンおよびそれらの代謝産物、ならびにアミノ酸への作用

当帰芍薬散はSAM-P/8の線条体におけるドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリンおよびその代謝産物のメトキシヒドロキシフェニールグリコール量には影響を与えなかったが、セロトニンの代謝産物の5-ヒドロキシフェニール酢酸とドーパミンの代謝産物であるジヒドロキシフェニール酢酸ならびにホモバニリン酸を減少させた(図3)。

また当帰芍薬散はグルタミン酸、グルタミンおよびグリシン量を減少させたが、タウリン、 γ -アミノ酪酸およびアラニンには影響を与えなかった(図4)。

III 考 察

今回は当帰芍薬散にヒドロキシルラジカル、スーパーオキッドならびに脂溶性ラジカルの消去作用のあること、および過酸化脂質生成抑制作用

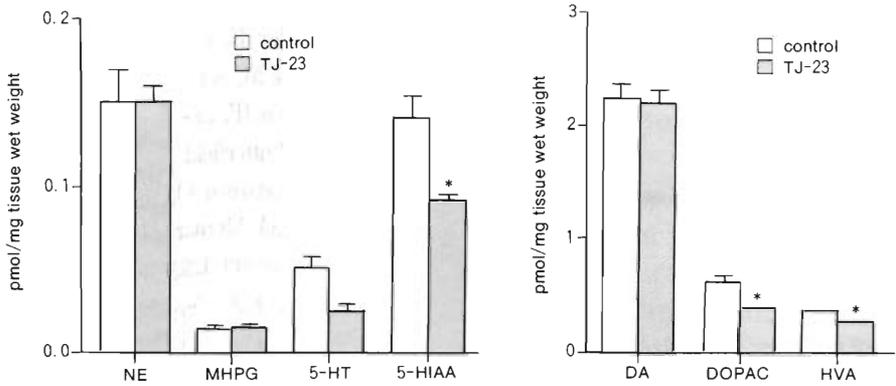


図3 マウス線条体のモノアミンおよび代謝産物に対する当帰芍薬散の効果
* $p < 0.05$ 対照との比較。
NE: ノルエピネフリン; MHPG: メトキシヒドロキシフェニールグリコール; 5-HT: セロトニン; 5-HIAA: 5-ヒドロキシインドール酢酸; DA: ドーパミン; DOPAC: ジヒドロキシフェニール酢酸; HVA: ホモバニリン酸

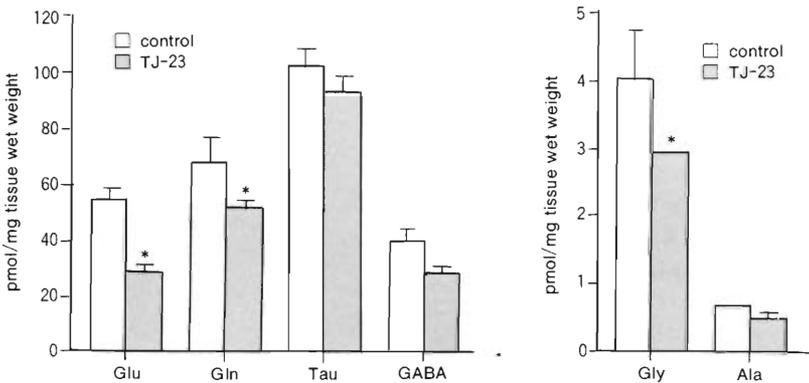


図4 マウス線条体のアミノ酸に対する当帰芍薬散の効果
* $p < 0.05$ 対照との比較。
Glu: グルタミン酸; Gln: グルタミン; Tau: タウリン; GABA: γ -アミノ酪酸; Gly: グリシン; Ala: アラニン

のあることを見いだした。アルツハイマー病の剖検脳において、カタラーゼ活性およびスーパーオキシドジスムターゼ活性の増加⁹⁾、大脳皮質のチトクローム酸化酵素活性の低下⁹⁾、過酸化脂質の増加⁹⁾が認められている。また酸化蛋白質の増加¹⁰⁾も報告されている。これらの成績はアルツハイマー病の脳には酸化ストレスにより生じるフリーラジカルが大いに関係していることを示唆している。また、アルツハイマー病の剖検脳においてセロトニンの低下とアセチルコリントランスフェラーゼ活性の低下が認められている⁹⁾。

さきに当帰芍薬散にはアセチルコリントランスフェラーゼ活性の上昇作用が見いだされている。また今回当帰芍薬散はSAM-P/8の線条体においてドーパミンとセロトニンの代謝回転を低下させることが認められた。

細胞外の過剰なグルタミン酸は excitotoxicity を生じさせることが知られており、アルツハイマー病にも関係していることが示唆されている¹¹⁾。この知見より当帰芍薬散にグルタミン酸とグルタミン量を減少させる作用が見いだされたことは非常に興味深い。

以上の諸知見と今回得られたわれわれの実験成績から当帰芍薬散は老人性痴呆に有効な治療薬であることが期待される。

文 献

- 萩野信義, 坂本秀一, 鳥居塚和生, 当帰芍薬散 (TJ-23) の老齡ラットの脳内アセチルコリン系神経細胞とその受容体への作用. 和漢医薬学会誌 1990 ; 7 : 340-341
- Hagino N, Koyama T. Stimulation of nicotine acetylcholine receptor synthesis in the brain by Toki-shakuyaku-san (TJ-23). In : Hosoya E and Yamamura Y, eds. Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO MEDICINES. Tokyo : Excerpta Medica, 1988 ; 144-149
- 十束支朗, 川勝 忍. 老年痴呆に対する漢方療法の経験. 現代東洋医学 1991 ; 12 : 315-317
- 工藤千秋, 杉浦和朗. 老年痴呆に当帰芍薬散. 医薬ジャーナル 1992 ; 28 : 35-38
- Frolich L, Riederer P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Arzheim.-Forsch./Drug Res.* 1995 ; 45 : 443-446
- Palmer AM, Francis PT, Benton JS, Sims NR, Mann DMA, Nlary D, Snowden JS, Bowen DM. Presynaptic serotonergic dysfunction in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1987 ; 48 : 8-15
- Yoneda T, Hiramatsu M, Sakamoto M, Togasaki K, Komatsu M, Yamaguchi K. Antioxidant effects of " β catechin". *Biochem Mol Biol Int* 1995 ; 35 : 995-1008
- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 1995 ; 45 : 1594-1601
- Mutisya EM, Bowling AB, Beal MF. Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1994 ; 63 : 2179-2184
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbata SP, Wu JF, Carney JM, Lovell M, Markesbery WR, Butterfield DA. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995 ; 65 : 2146-2156
- Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, Bummr P, Wang Y, Pedigo NW, Butterfield DA. β -Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes : implications for Alzheimer's disease. *Ageing* 1995 ; 6 : 1875-1879