

## 当帰芍薬散(TJ-23)の老齡ラットにおける脳内神経伝達物質と脂質過酸化物質、並びにスーパーオキシドジスムターゼ活性への影響について

植田 勇人<sup>1) 2)</sup>、小松真紀子<sup>1)</sup>、平松 緑<sup>1)</sup>

- 1) 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  
2) 宮崎医科大学精神科

UEDA, Y.<sup>1), 2)</sup>, KOMATSU, M.<sup>1)</sup> AND HIRAMATSU, M.<sup>1)</sup>

- 1) Division of Medical Science, Institute for Life Support  
Technology, Yamagata Technopolis Foundation,  
683 Kurumanomae, Numagi, Yamagata 990, Japan,  
2) Department of Psychiatry, Miyazaki Medical College,  
Kihara 5200, Kiyotake-cho, Miyazaki, 889-16, Japan

### The effect of TOKI-SHAKUYAKU-SAN (TJ-23) on the contents of neurotransmitters, thiobarbituric acid reactive substances and superoxide dismutase activity in the brain of aged rat

#### ABSTRACT

We evaluated the effect of TOKI-SHAKUYAKU-SAN (TJ-23; TSUMURA Co. Ltd., Tokyo, Japan) on the contents of neurotransmitters, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and superoxide dismutase activity in the cortex, hippocampus and striatum of the aged rat brain. The contents of the metabolites of monoamines and glutamate were decreased by 4 weeks-oral administration of TJ-23. Superoxide dismutase activity of mitochondrial fraction was increased by the administration. It also diminished TBARS formation. These data suggest that TJ-23 has an antioxidant effect and would have a prophylactic effect against aging and other neurological diseases associated with free radical.

#### はじめに

当帰芍薬散(TJ-23)は、シャクヤク、ソウジュツ、タクシャ、ブクリョウ、センキュウ、トウキといった6種類の生薬の抽出液から構成され、すでに臨床上その有用性が広く認められている漢方薬である。さらに近年TJ-23は、抗痴呆候補薬としての位置づけが示唆されており、その機序の一つとして中枢性コリン作動性神経の賦活作用が報じられている[1,2,14]。また一方で生体内でのフリーラジカルと抗酸化系との不均衡も、老化における神経細胞障害の大きな原因の一つと考えられ[3,4,9,11,12]、すでに小柴胡湯合桂枝加芍薬湯(TJ-960)などある種の漢方薬にはラジカル消去作用が存在することが報告されていること[5,6,7,8]から、生体内でのフリーラジカルと抗酸化系との不均衡を是正し、神経細胞障害への予防効果が期待されている。既に我々はTJ-23のフリーラジカル消去作用と過酸化脂質抑制作用を報告し[15]、抗痴呆候補薬として注目されるTJ-23の生理活性を新たに指摘している。今回我々は24カ月齢の老齡ラットに4週間TJ-23投与を行ない、脳内神経伝達物質と脳内脂質過酸化物質並びにスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)活性をコントロール群と比較検討したので報告する。

#### 実験方法

1. 実験動物；24カ月齢の雄性Wistar rat12匹、体重550gのものを使用した。TJ-23は株式会社ツムラから提供され、臨床投与量7.5gをラット体重に換算した一日量55-75mgを6匹のラットに投与し、その他の6匹には水道水を投与した。

4週間の投与後、脳組織を摘出した。左脳の大脳皮質、線条体、海馬を、モノアミン、アミノ酸測定のためとし、右の各脳部位をそれぞれthiobarbituric acid reactive substances (TBARS)、SOD活性

の測定に供した。

2. モノアミン、アミノ酸測定条件；摘出された脳組織に100倍(w/v)量の0.1M ピロ亜硫酸ナトリウムを加え水中でホモジナイズした。ついでホモジネート400 $\mu$ lのsampleを0.45 $\mu$ lの水系遠心濾過フィルターに取り、0 $^{\circ}$ C、12,000rpmで15分間遠心濾過し、100 $\mu$ lの濾過液に含まれるモノアミンとアミノ酸の含量をNeurochemにて測定した。モノアミン測定に使った移動層はリン酸/クエン酸Bufferで、12種類の印加電圧を使用し酸化電流を計測した。リン酸Bufferによるアミノ酸測定にはOPA反応を用いたプレカラム誘導法を使用し4種類の電圧を印加し、酸化電流計測を行なった。Fig.1Aは、90pmolのモノアミン標準物質と37.5pmolのアミノ酸標準物質を含むelution patternを示し、Fig.1BのsampleとFig.1Aのpeak area比からsample中のモノアミン、アミノ酸含有量を計測した。

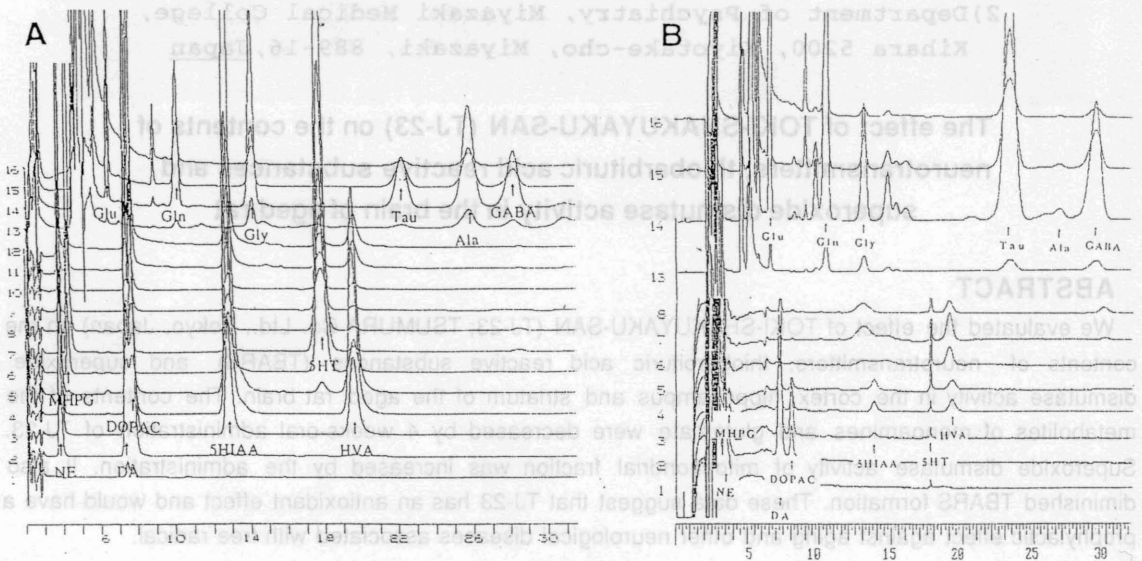


Figure 1

Chromatograms of external standard mixture showing resolution of coeluting compounds (Fig.1A; 90 pmol for monoamines and their metabolites and 37.5 pmol for amino acids on column) and 100  $\mu$ l of brain homogenates (Fig. 1B; 50  $\mu$ l for monoamines and their metabolites and 50  $\mu$ l for amino acids on column)

3. TBARS測定；過酸化脂質の分解に伴う二次的生成物MDAの定量を行なうことで脂質過酸化の程度を推定する方法であるTBARS法は大川[12]らの方法に従った。

4. Mn-SOD活性測定；右脳大脳皮質、海馬、線条体各脳部位を0.1Mリン酸Bufferにてホモゲナイズし、Mn-SODを含むミトコンドリア分画を抽出した。SOD活性はESR spectrometerを用いて測定し、Lowly法[10]で蛋白定量を行ない補正した。

## 結果

1. モノアミン；大脳皮質、海馬、線条体におけるモノアミンとその代謝産物においては、TJ-23投与群でドーパミンの代謝産物DOPAC、HVAとセロトニンの代謝産物5 HIAAの低下が認められた。一方、ドーパミンやセロトニン及びノルアドレナリンとその代謝産物への影響は少ないことが認められた(see Fig. 2)。

アミノ酸；大脳皮質、海馬、線条体におけるアミノ酸においてはTJ-23投与群で、各脳部位のグルタミン酸が低下していた。しかし、その他のアミノ酸含有量への影響は少ないことが認められた(see Fig. 3)。

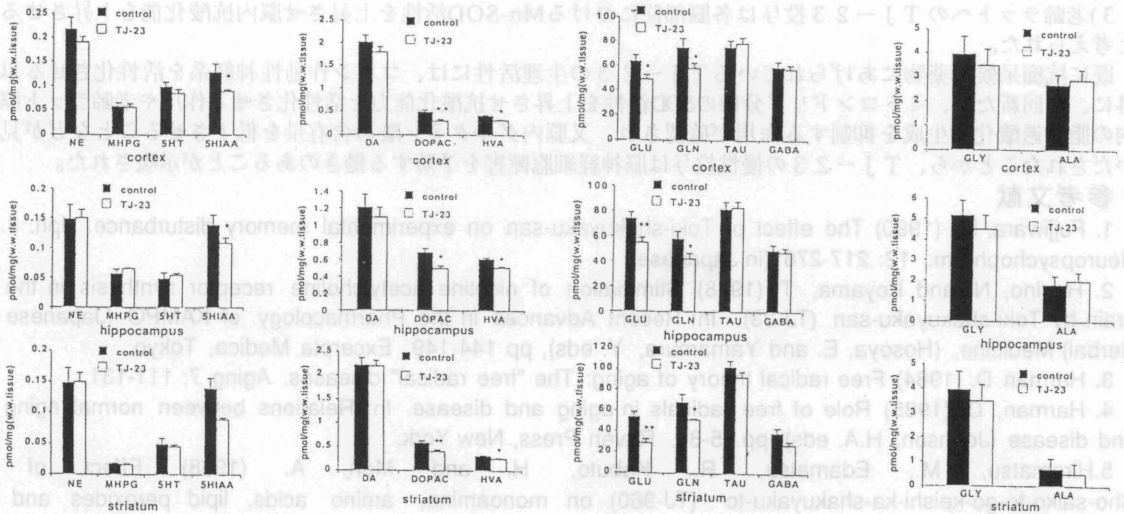


Figure 2 The contents of monoamines and their metabolites in the corresponding brain area of the aged rat. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M (n=6 of each group) \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control (Mann-Whitney U-test)

Figure 3 The contents of amino acids in the corresponding brain area of the aged rat. The values represent the mean  $\pm$  S.E.M (n=6 of each group) \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control (Mann-Whitney U-test)

2. TBARS ; TJ-23を4週間投与した結果、TBARS値は大脳皮質、海馬、線条体各脳部位で低値を示した (see Fig. 4).

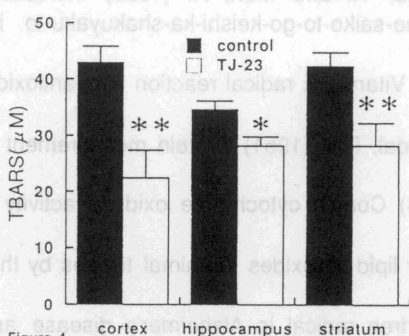


Figure 4 Each values are mean  $\pm$  S.E.M. (n=6 of each group) \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control (Mann-Whitney U-test)

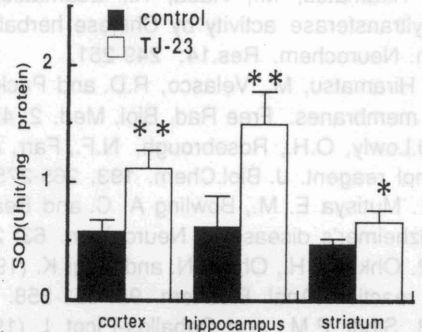


Figure 5 Each values are mean  $\pm$  S.E.M. (n=6 of each group) \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs control (Mann-Whitney U-test)

3. SOD活性; mg proteinあたりのSOD活性を縦軸に表示した。T J-23を4週間投与した群では、SOD活性は各脳部位において上昇することが認められた (see Figure 5).

考察

T J-23の老齢ラットへの慢性投与実験からその実験結果を以下の3点に要約することができる。

1) 老齢ラットへのT J-23投与はドーパミン及びセロトニンの代謝を抑制し、グルタミン酸の含有量を低下させるなど、脳内の神経伝達物質含有量に影響を与えた。

TJ-23はコリン作動性神経系の賦活に基づく健忘、見当識障害等の痴呆中核症状の改善ばかりでなく、モノアミン代謝への影響を介し痴呆周辺症状改善効果への関与も指摘された。

2)老齡ラットへのTJ-23投与は大脳皮質、海馬並びに線条体での脂質の過酸化を抑制した。

3)老齡ラットへのTJ-23投与は各脳部位におけるMn-SOD活性を上昇させ脳内抗酸化能を上昇させると考えられた。

既に抗痴呆候補薬物にあげられているTJ-23の生理活性には、コリン作動性神経系を活性化させる以外に、今回新たに、ミトコンドリア分画のSOD活性を上昇させ抗酸化能力を活性化させる作用や老齡ラット脳内の脂質過酸化生成を抑制する作用が確認され、又脳内グルタミン酸の含有量を低下させることなどが見いだされたことから、TJ-23の慢性投与は脳神経細胞障害を予防する働きのあることが示唆された。

#### 参考文献

1. Fujiwara, M. (1990) The effect of Toki-shakuyaku-san on experimental memory disturbance. *Jpn. J. Neuropsychopharm.* 12: 217-278 (in Japanese)
2. Hagino, N. and Koyama, T. (1988) Stimulation of nicotine acetylcholine receptor synthesis in the brain by Toki-shakuyaku-san (TJ-23). In: *Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) Medicine*, (Hosoya, E. and Yamamura, Y. eds), pp 144-149. Excerpta Medica, Tokyo.
3. Harman D. (1984) Free radical theory of aging: The "free radical" diseases. *Aging* 7: 111-131.
4. Harman, D. (1985) Role of free radicals in aging and disease. In: *Relations between normal aging and disease* (Johnson, H.A. eds), pp.45-84. Raven Press, New York.
5. Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kabuto, H. and Mori, A. (1988) Effect of Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-960) on monoamine, amino acids, lipid peroxides and superoxide dismutase in brains of aged rats. In: *Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) Medicine*, (Hosoya, E. and Yamamura, Y. eds), pp. 128-135. Excerpta Medica, Tokyo.
6. Hiramatsu, M., Edamatsu, R., Kohno, M. and Mori, A. (1988) Scavenging of free radicals by Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to (TJ-960), In: *Recent Advances in the Pharmacology of KAMPO (Japanese Herbal) Medicine*, (Hosoya, E. and Yamamura, Y. eds), pp 120-127. Excerpta Medica, Tokyo.
7. Hiramatsu M., Edamatsu R., Ohyama H. and Mori A. (1992) Effect of Japanese herbal medicine, Sho-saiko-to-go-keishi-kashakuyaku-to (TJ-960) on aging. *Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications* 535-552.
8. Hiramatsu, M., Haba, K., Edamatsu, R., Hamada, H. and Mori, A. (1989) Increased choline acetyltransferase activity by Chinese herbal medicine Sho-saiko-to-go-keishi-ka-shakuyaku-to in aged rat brain. *Neurochem. Res.*14: 249-251.
9. Hiramatsu, M., Velasco, R.D. and Packer, L. (1990) Vitamin E radical reaction with antioxidants in rat liver membranes. *Free Rad. Biol. Med.* 2: 459-564.
10. Lowly, O.H., Rosebrough, N.F., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
11. Mutisya E. M., Bowling A. C. and Beal M. F. (1994) Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 63: 2179-2184.
12. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
13. Sinet P.M. and Ceballos-Picot I. (1992) Role of free radical in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Free Radicals in the Brains* 91-98.
14. Takakura, K., Fujiwara, M. and Shitara, N. (1990) The effect of Toki-shakuyaku-san on the learning and memory disturbance of rat: study of the pharmacological therapy of dementia, 41-46.
15. Ueda, Y., Komatsu, M. and Hiramatsu, M. (1995) Free radical scavenging activity of the Japanese herbal medicine, Toki-shakuyaku-san. *Neurosciences*, 21: 75-79.