

当帰芍薬散 (TJ-23) のラジカル消去作用について

植田 勇人^{1),2)}、小松真紀子¹⁾、平松 緑¹⁾

(1)山形県テクノポリス生物ラジカル研究所 医学薬学部門、2)宮崎医科大学精神科)

UEDA, Y1),2), KOMATSU, M.1) AND HIRAMATSU, M.1)

(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)

FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF TOKI-SHAKUYAKU-SAN (TJ-23)

We evaluated the free radical scavenging activity of Japanese herbal medicine, Toki-Shakuyaku-San (TJ-23; TSUMURA Co. Ltd., Tokyo, Japan), using with electronspin resonance (ESR) spectrometry. TJ-23 scavenged hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$), superoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH) dose-dependently. It also diminished carbon centered radicals ($\cdot\text{C}$) generated by oxygen stress in the rat cortex homogenate and inhibited thiobarbituric acid-reactive substances (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、センキユウ、トウキといった6種類の生薬から構成され、すでに临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、抗痴呆薬としての位置づけが示唆され、その機序の一つとして中枢内アセチルコリン系神経の賦活作用を介すると報じられた[6]。既に小柴胡湯合桂枝加芍薬湯などある種の漢方薬は、フリーラジカル消去作用を有し、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るフリーラジカルと抗酸化系との不均衡[1]を是正すると報告されている[2]。そこで今回我々は抗痴呆薬として期待されつつあるTJ-23のラジカル消去作用の検討を行なった。

実験方法

当帰芍薬散はツムラ (株式会社、東京) より供されたもの (TJ-23)を使用した。蒸留水にて10, 1, 0.1, 0.01, 0 (control) mg/ml濃度のTJ-23の懸濁液を作成し、各濃度に於けるラジカル消去作用と過酸化脂質生成に対する影響を検討した。

(1) 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals (DPPH)の測定: エタノールを溶媒として30 μM DPPHを作成し、その100 μl に各濃度のTJ-23を100 μl 加え、10秒間攪拌後、試料を偏平セル (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)に取りESR spectrometerを用い、以下の条件で測定した。室温、field 335.0 \pm 10mT, field modulation width 0.25 mT, receiver gain 10 \times 100, time constant 0.1 sec, sweep time 2 min.

(2) Superoxide radical ($\text{O}_2\cdot^-$)の測定: 2mM hypoxanthine 50 μl および 5.5 mM

diethylenetriaminepentaacetic acid(DETAPAC) 35 μ lを試験管にとり、これに各濃度のTJ-23を50 μ l加えた後、5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide(DMPO) 15 μ lおよび0.326unit/ml xanthine oxidase(XOD) 50 μ lを加え、10秒間攪拌後、試料を偏平セルに取りESR spectrometerを用いて以下の条件で測定した。室温、field 335.0 \pm 10mT, field modulation width 0.1 mT, receiver gain 4 \times 100, time constant 0.1 sec, sweep time 2min。

(3) Hydroxyl radical (\cdot OH)の測定: 1mMの硫酸第一鉄-DETAPAC溶液75 μ lをあらかじめ試験管にとり、これに各濃度のTJ-23を50 μ lと0.92M DMPO 20 μ lおよび1mM過酸化水素75 μ l添加後、10秒間攪拌し、試料を偏平セルに取りESR spectrometerを用いて以下の条件で測定した。室温、field 335.0 \pm 10mT, field modulation width 0.1 mT, receiver gain 4 \times 100, time constant 0.1 sec, sweep time 2min。

(4) Carbon centered radical (\cdot C)の測定: 10倍量(w/v)の生理食塩水で作成したddYマウスのbrain homogenate 0.1mlに40 μ lの2mM FeCl₂並びに20 μ lの2mM ascorbic acidと各濃度のTJ-23を50 μ lそれぞれ加え攪拌後37 $^{\circ}$ C、15min incubationしたのち、20 μ lのDMPO(DAIICHI PURE CHEMICALS Co. Ltd., Tokyo, Japan)を加え10秒間攪拌後、試料を偏平セルに取りESR spectrometerを用いて以下の条件で測定した。室温、field 335.0 \pm 10mT, field modulation width 0.1 mT, receiver gain 4 \times 100, time constant 0.1 sec, sweep time 2min。

(5) Thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)の測定[4]: 10倍量(w/v)の生理食塩水で作成したddYマウスのbrain homogenate 0.1mlに8.1% sodium dodecylsulfateを2ml, 20% acetate buffer(pH 3.5)を1.5ml, 1%のsodium thiobarbituric acidを1.5 ml, 蒸留水0.6mlを加え100 $^{\circ}$ C、60minのincubationを行なった後、蒸留水1ml, n-butanolとpyridineとの混液(15:1, v/v)を加え、0 $^{\circ}$ C、3,000rpm, 15 minにて遠沈処理後、過酸化脂質の分解に伴う二次生成物としてのマロンジアルデヒド様反応生成物の蛍光度(EX: 515nm, EM: 553nm)を測定した。

実験結果

(1) DPPH: 1mg/mlのTJ-23はDPPHラジカルのシグナル(0.45 \times 10¹⁵spins/ml)を完全に消去した(Fig. 1)。

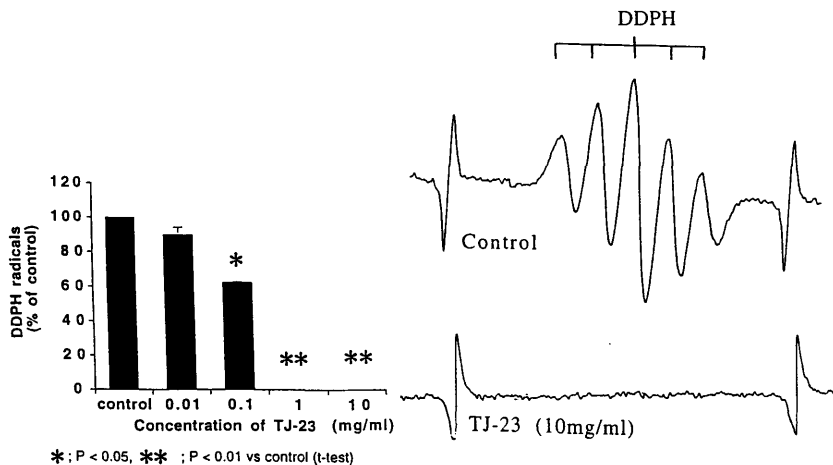


Fig. 1 Effect of TJ-23 on DPPH radicals and the ESR spectra of DPPH after addition of TJ-23 (10mg/ml)

(2) O₂⁻: TJ-23はヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生するO₂⁻のシグナル(1.58 \times 10¹⁵spins/ml)を濃度依存的に消去した(Fig. 2)。

(3) \cdot OH: Fenton試薬により発生する \cdot OHのシグナル(1.24 \times 10¹⁵spins/ml)を濃度依存的に消去した(Fig. 3)。

(4) Carbon centered radical: 脳homogenate中でアスコルビン酸-塩化第一鉄から誘導されるCarbon centered radicalを濃度依存的に消去した(Fig. 4)。

(5)TBARS:TJ-23はTBARSの発生を濃度依存性に抑制した(Fig. 5)。

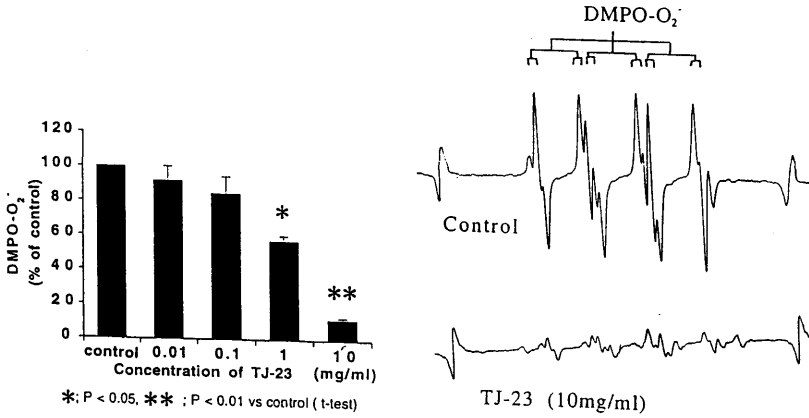


Fig. 2 Effect of TJ-23 on DMPO-O₂· spin adducts and the ESR spectra of O₂· as spin adducts of DMPO after addition of TJ-23 (10 mg/ml)

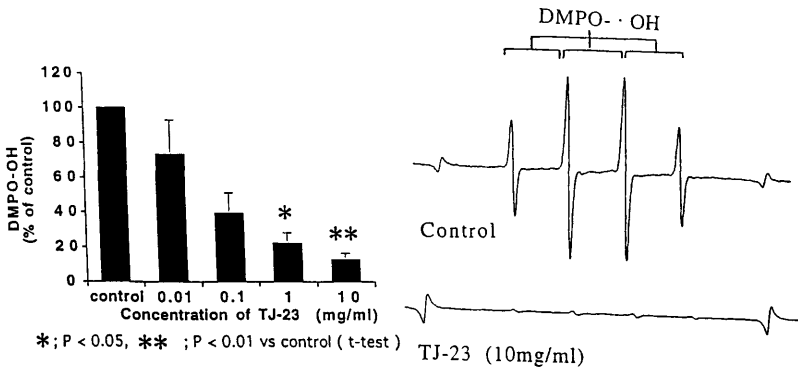


Fig. 3 Effect of TJ-23 on DMPO-OH spin adducts and the ESR spectra of ·OH as spin adducts of DMPO after addition of TJ-23 (10 mg/ml)

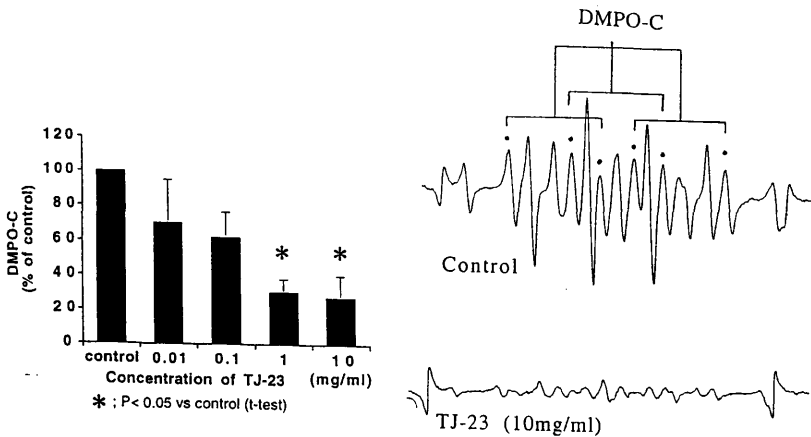


Fig. 4 Effect of TJ-23 on DMPO-C spin adducts and the ESR spectra of ·C as spin adducts of DMPO after addition of TJ-23 (10 mg/ml)

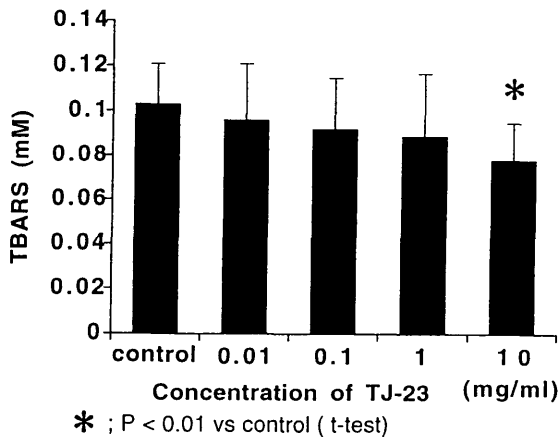


Fig. 5 Effect of TJ-23 on lipid peroxides (as thiobarbituric acid reactive substances: TBARS)

考察

今回の実験より、TJ-23は脂溶性のDPPHラジカル、並びに活性酸素種の O_2^- や $\cdot OH$ などの水溶性のラジカルを濃度依存的に消去することが明かとなった。生体内においては、フリーラジカルとビタミンC、ビタミンE及びsuperoxide dismutase(SOD)等の抗酸化剤との間に不均衡が生じると、フリーラジカルが細胞膜の不飽和脂肪酸から水素を引き抜き、膜構造に過酸化が生じる結果、生体内において様々な障害が起こると考えられている[6]。既に、アルツハイマー病では大脳皮質のミトコンドリアにおける電子伝達系のチトクロームオキシダーゼ活性の低下[3]やSOD活性の増加[5]が明らかにされており、フリーラジカルの関与が指摘されている。

TBARSの生成即ち、脂質の過酸化を抑制することが確認されたTJ-23はこのようなフリーラジカルに起因する疾患の予防につながると期待される。冒頭に述べたTJ-23の抗痴呆薬としての位置付けに、アセチルコリン系神経の賦活作用ばかりでなく、フリーラジカル消去作用も関与していることが示唆された。

参考文献

1. Harman D. (1984) Free radical theory of aging: The "free radical" diseases. Aging 7: 111-131.
2. 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.
3. 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.
4. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358.
5. 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
6. Yoshida M., et al. (1990) Effects of Toki-shakuyaku-san(TJ-23) on the brain cholinergic system in rats. Oxford Clinical Communication 58-59.