

芳香性生薬の活性酸素生成抑制作用

戸田 静男,*^{a)}大西 基代,^{a)}木村 通郎^{b)}^{a)}関西鍼灸短期大学生化学教室, ^{b)}関西鍼灸短期大学解剖学教室

Inhibitory effects of aromatic herbs on generation of active oxygen

Shizuo TODA,*^{a)} Motoyo OHNISHI^{a)} and Michio KIMURA^{b)}^{a)}Department of Biochemistry, Kansai Shinkyu Medical College^{b)}Department of Anatomy, Kansai Shinkyu Medical College

(Received January 21, 1991. Accepted April 23, 1991.)

Abstract

We investigated whether the aromatic herbs (Aurantii Pericarpium, Caryophylli Flos, Cinnamomi Cortex, Foeniculi Fructus and Zedoariae Rhizoma) have the inhibitory effects on the generation of active oxygen. Cinnamomi Cortex, Caryophylli Flos and Foeniculi Fructus were found to have potent inhibitory effects on the generation of both superoxide and hydroxyl radical. However, it was shown that Aurantii Pericarpium and Zedoariae Rhizoma have the little inhibitory-effects on the generations of such active oxygens.

Key words Aurantii Pericarpium, Caryophylli Flos, Cinnamomi Cortex, Foeniculi Fructus, Zedoariae Rhizoma, hydroxyl radical, superoxide.

Abbreviations ESR, electron spin resonance; DMPO, 5, 5-dimethyl-1-pyrro-line-*N*-oxide; SOD, superoxide dismutase; XOD, xanthine oxidase.

緒 言

フリーラジカルの1つである活性酸素 (superoxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide など) が炎症, 虚血後の再灌流による細胞障害, 老化, 発癌, 糖尿病, 白内障, パラコート中毒, 光過敏症など種々の疾患に関与しているといわれている。活性酸素は, 脂質, アミノ酸, タンパク質などの生体成分に障害を起こすことで, このような疾患を惹起するとされている。特に, 赤血球のような生体膜障害は, 活性酸素の細胞膜脂質過酸化によるといわれている。¹⁾ ラジカルの電子を捕捉して脂質過酸化抑制作用のある天然物由来の化合物として, α -トコフェロール,²⁾ アスコルビン酸,³⁾ カロチノイド,⁴⁾ フラボノイド⁵⁾ などが見出されている。

われわれは⁶⁾ 先に, 茴香 (Foeniculi Fructus), 莪朮 (Zedoariae Rhizoma), 桂皮 (Cinnamomi Cor-

tex), 丁字 (Caryophylli Flos), 橙皮 (Aurantii Pericarpium) などのような芳香性生薬にリノール酸空気酸化抑制作用のあることを報告した。そこで今回は, これら芳香性生薬について superoxide, hydroxyl radical に対する抑制作用を検討したところ, 新たな知見を得たので報告する。

材料と方法

(1) 試薬: 塩化第2鉄, 塩化銅, 過酸化水素, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), nitroblue tetrazolium (NBT), xanthine は, いずれも和光純薬製を用いた。3-hydroxyanthranilic acid は東京化成製を用いた。5, 5-dimethyl-1-pyrro-line-*N*-oxide (DMPO) は Aldrich 社製を用いた。Superoxide dismutase (SOD; EC 1, 15, 1, 1, 牛赤血球製) と xanthine oxidase (XOD; EC 1, 2, 3, 2, バターミルク製, Grade I) は, Sigma 社製を用いた。これら及

*〒590-04 大阪府泉南郡熊取町小垣内990
Ogaito 990, Kumatori-cho, Sen-nan-gun, Osaka
590-04, Japan

Table I Aromatic herbs investigated on generation of active oxygen.

Herb name	Plant name	Location of Production
茴香 (Foeniculi Fructus)	<i>Foeniculum vulgare</i> MILLER	China
莪朮 (Zedoariae Rhizoma)	<i>Curcuma zedoaria</i> ROSCOE	China
桂皮 (Cinnamomi Cortex)	<i>Cinnamomum cassia</i> BLUME	China
丁香 (Caryophylli Flos)	<i>Syzygium aromaticum</i> MERRILL et PERRY	Indonesia
橙皮 (Aurantii Pericarpium)	<i>Citrus aurantium</i> L. or <i>Citrus aurantium</i> L. var <i>daidai</i> MAKINO	Japan

びその他の試薬は、いずれも特級品を用いた。

(2) 生薬水性エキスの作製：生薬は、市場品を購入した。その学名、産地を Table I に示した。各生薬（茴香、莪朮、桂皮、丁香、橙皮）5 g を 500 ml の水で熱水抽出し、水性エキスを得て以下の実験に供した。これらの生薬水性エキスの収率は、茴香：6.4%，莪朮：4.7%，桂皮：4.9%，丁香：12.6%，橙皮：20.9% であった。

(3) Superoxide 生成抑制作用：今成ら⁷⁾の xanthine-XOD 法を用いて検討した。すなわち、0.05 M carbonate buffer (pH 10.2) 2.4 ml に 3 mM xanthine 溶液、3 mM EDTA 溶液、0.75 mM NBT 溶液、各生薬水性エキス溶液または superoxide の scavenger 酵素である SOD をそれぞれ 0.1 ml 加え、25℃、10 分インキュベートした。その後、XOD (0.2 U/ml) 溶液 0.1 ml を加え、さらに 25℃、20 分インキュベートした後、塩化銅溶液 0.1 ml を加えて、反応を停止させ、560 nm における吸光度を測定した。そして、水性エキスまたは SOD を添加していない反応溶液を対照として吸光度を比較検討し、superoxide 生成の抑制率とした。各生薬エキスの添加最終濃度は、0.01, 0.10, 1.00 mg/ml, SOD の添加最終濃度は 0.01, 0.10, 1.00 U/ml とした。

(4) Hydroxyl radical 生成抑制作用：岩橋ら^{8,9)}の ESR (electron spin resonance) スピントラップ法を応用して検討した。ラジカル生成標準溶液 (345 μ l) は、0.22 M carbonate buffer (pH 7.4) にて 0.22 M 3-hydroxyanthranilic acid, 87 mM 5, 5-dimethyl-1-pyrro-line-N-oxide (DMPO), 2.9 mM 過酸化水素、14 μ M 塩化第 2 鉄に調製したものを用いた。反応は、過酸化水素を加えることで開始した。反応は、室温 (25℃) で行なった。各生薬エキスの添加濃度は、0.01, 0.10, 1.00 mg/ml とし、反応開始直前に添加した。ESR スペクトルは、FE2XG-ESR 分光計 (日本電子製、東京) を用いて、マイクロ波 5 mW, modulation amplitude を 0.1 mT, time constant を 1 秒、掃引磁場を 10 mT, 掃引時間を 4 分として測定した。標準物質には、MnO を

用いた。磁場の較正は、MnO の 3, 4 本目のシグナル間隔 ($\Delta H_{3-4}=8.69$ mT) とした。

結 果

1. Superoxide 生成抑制作用

Fig. 1 のように、茴香、桂皮、丁香は添加濃度に依存して superoxide の生成を抑制した。各生薬の superoxide 生成抑制率 (平均値 $\pm$ 標準偏差) は、添加濃度 1 mg/ml で茴香：78.74 $\pm$ 2.23%，桂皮：74.25 $\pm$ 1.33%，丁香：71.85 $\pm$ 1.14%，橙皮：10.16 $\pm$ 1.56%，莪朮：3.78 $\pm$ 0.60% であり、添加濃度 0.1 mg/ml で茴香：25.56 $\pm$ 3.15%，桂皮：43.72 $\pm$ 2.63%，丁香：34.96 $\pm$ 0.59%，橙皮：13.55 $\pm$ 0.56%，莪朮：4.68 $\pm$ 1.96% であり、添加濃度 0.01 mg/ml で茴香：9.56 $\pm$ 0.74%，桂皮：10.69 $\pm$ 2.84%，丁香：2.99 $\pm$ 1.92%，橙皮：8.27 $\pm$ 0.43%，莪朮：6.57 $\pm$ 1.41% であった。

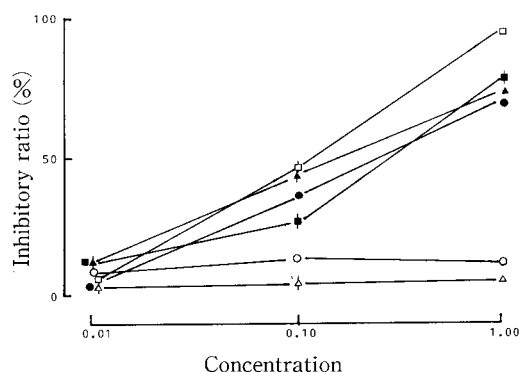


Fig. 1 Inhibitory effects of aromatic herbs on superoxide anion generation by xanthine-xanthine oxidase system.

● (Caryophylli Flos : mg/ml), ▲ (Cinnamomi Cortex : mg/ml), ■ (Foeniculi Fructus : mg/ml) ○ (Aurantii Pericarpium : mg/ml), △ (Zedoariae Rhizoma : mg/ml), □ (SOD : U/ml). Values are shown mean $\pm$ S.E. from 4 experiments.

SOD の superoxide 生成抑制率は、添加濃度 1 U/ml では $96.51 \pm 0.59\%$ 、0.1 U/ml では $45.41 \pm 2.09\%$ 、0.01 U/ml では $6.38 \pm 1.41\%$ であった。

2. Hydroxyl radical 生成抑制作用

Fig. 2-4 に示した生薬無添加のラジカル標準溶液は、Iwahashi らによって確認されている DMPO と hydroxyl radical とのスピンアダクト ($a_H=1.50$ mT, $a_N=1.50$ mT) である。各生薬添加濃度 1 mg/ml (Fig. 2), 0.1 mg/ml (Fig. 3), 0.01 mg/ml (Fig. 4) における ESR スペクトルの結果を、Fig. 2-4 に示す。桂皮、丁字、茴香では、標準反応液で認められた DMPO-OH ラジカル由来のシグナルの出現が、濃度依存的に著明でなかった。莪朮、橙皮添加では、いずれの濃度においても顕著でなかった。

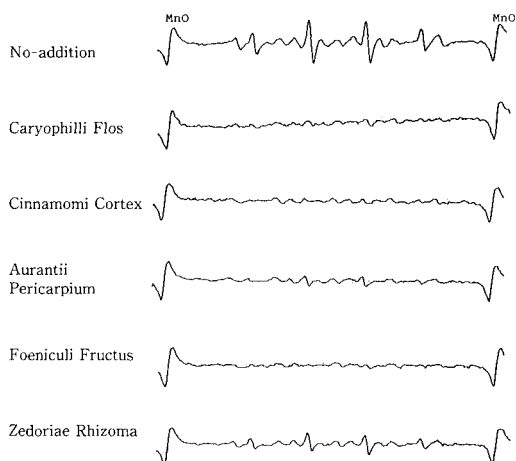


Fig. 2 ESR spectra obtained reaction mixture containing water-extract of aromatic herbs at 1 mg/ml.

考 察

以上の結果より桂皮、丁字、茴香には superoxide 及び hydroxyl radical 生成抑制作用が強いこと、橙皮、莪朮にはこれらの作用は弱いことが認められた。

芳香性生薬には精油成分の多く含まれていることが、確認されている。今回、superoxide 及び hydroxyl radical 生成抑制作用の認められた桂皮の精油成分 cinnamaldehyde、丁字の精油成分 eugenol、茴香の精油成分 limonene などに脂質過酸化抑制作用のあることが、知られている。¹⁰⁾ 脂質過酸化が、

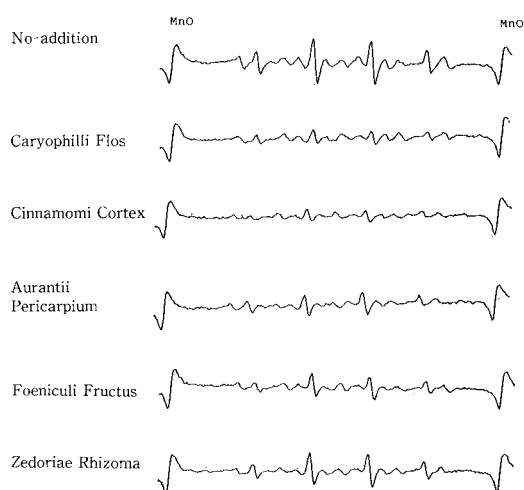


Fig. 3 ESR spectra obtained reaction mixture containing water-extract of aromatic herbs at 0.1 mg/ml.

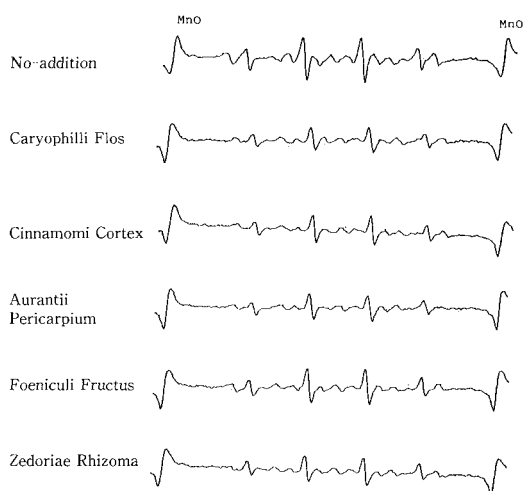


Fig. 4 ESR spectra obtained reaction mixture containing water-extract of aromatic herbs at 0.01 mg/ml.

superoxide や hydroxyl radical のような活性酸素によってもたらされることから、桂皮や丁字の superoxide や hydroxyl radical 生成抑制作用によるものではないかと、思われる。また、このような芳香性生薬には、タンニンが多く含有されている。タンニンの多くには活性酸素除去作用¹¹⁻¹³⁾や脂質過酸化抑制作用¹⁴⁾のあることから、今回のわれわれの結果は芳香性生薬のタンニンによる作用である可能性が考えられる。今後、これら芳香性生薬の含有成

分と活性酸素生成抑制作用の関連性について検討して行きたい。

結 論

芳香性生薬の活性酸素 (superoxide, hydroxyl radical) 生成抑制作用について検討した。桂皮、丁香、茴香には superoxide 及び hydroxyl radical 生成抑制作用の強いことが、認められた。橙皮、莪朮にはこれらの作用は弱かった。

謝 辞

本研究に御助言、御指導を賜った本学川俣順一先生、菅田良仁先生に深謝致します。また、ESR の御指導を賜った和歌山県立医科大学化学教室城戸亮先生に深謝致します。

文 献

- 1) 神宮政男：活性酸素と組織障害。疾患。臨床免疫 **21**, 224-239, 1989.
- 2) 二木悦雄：ビタミン E の抗酸化作用に関する反応論的研究。ビタミン **63**, 529-549, 1989.
- 3) Niki, E., Komura, E., Takahashi, M., Urano, S., Ito, E. and Terao, K. : Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J. Biol. Med.* **263**, 19809-19814, 1988.
- 4) Burton, G. W. : Antioxidant action of carotenoids. *J. Nutr.* **119**, 109-111, 1989.
- 5) Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. : Studies of inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radicals scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1919-1921, 1989.
- 6) 戸田静男, 谷澤久之, 有地 滋, 滝野吉雄：生薬メタノールエキスのリノール酸空酸化抑制作用。薬学雑誌 **104**, 394-397, 1984.
- 7) 今成登志男, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善藏：Superoxide dismutase 活性測定法の改良。医学のあゆみ **101**, 496-497, 1977.
- 8) Iwahashi, H., Ishii, T., Sugata, R. and Kido, R. : The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 242-247, 1990.
- 9) Iwahashi, H., Ishii, T., Sugata, R. and Kido, R. : Superoxide dismutase enhances the formation of hydroxyl radicals in the reaction of 3-hydroxyanthranilic acid with molecular oxygen. *Biochem. J.* **251**, 893-899, 1988.
- 10) 太田静行：油脂食品の劣化とその防止。幸書房, 東京, pp. 127-134, 1979.
- 11) 藤岡幸司, 王 国柱, 横澤隆子, 大浦彦吉, 野中源一郎, 西岡五夫：タンニン含有生薬のヒドロキシラジカル scavenger 作用。第 7 回和漢医薬学会大会要旨集, p.86. 1990.
- 12) 波多野力, 森 昭胤, 藤田勇三郎, 安原多恵子, 吉田隆志, 奥田拓男：薬用植物中のタンニンのラジカル除去作用 —スーパーオキシドアニオンに対する作用とその機構—。和漢医薬学会誌 **6**, 412-413, 1989.
- 13) Yoshida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Fujita, Y. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of autooxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1919-1921, 1989.
- 14) Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, H. and Arichi, S. : Studies on the activities of tannins and related compounds from medical plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1625-1631, 1983.