

活性酸素によるレシチンリポソーム過酸化に
対する芳香性生薬の抑制作用戸田 静男,*^{a)}大西 基代,^{a)}木村 通郎,^{a)}戸田 知子^{b)}^{a)}関西鍼灸短期大学, ^{b)}龍宝堂製薬Inhibitory effects of aromatic herbs on peroxidation of
lecithin-liposome by active oxygenShizuo TODA,*^{a)} Motoyo OHNISHI,^{a)} Michio KIMURA,^{a)} Tomoko TODA^{b)}^{a)}Kansai Shinkyu Medical College, ^{b)}Ryuhoudo Pharmaceutical Co.

(Received October 16, 1992. Accepted February 16, 1993.)

Abstract

It was found that the aromatic herbs (Aurantii Pericarpium, Caryophylli Flos, Cinnamomi Cortex, Foeniculi Fructus) have inhibitory effects on the peroxidations of lecithin-liposomes by active oxygens, hydroxyl radical and superoxide anion, derived from hydrogen peroxide-Fe²⁺ system and xanthine-xanthine oxidase system. These effects were similar to and stronger than those of catalase, mannitol, superoxide dismutase or dl- α -tocopherol as a scavenger or an antioxidant.

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

Abbreviations ADP, adenosine-5'-diphosphate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt; FeCl₃, ferric chloride; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; TBA, thiobarbituric acid; XOD, xanthine oxidase.

緒 言

フリーラジカルの一つである活性酸素 (hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen, superoxide anion) による脂質過酸化によって、炎症、虚血後の再灌流による細胞障害、光過敏症など種々の疾患の起ることが、認められている¹⁾。これに対して、 α -トコフェロール、アスコルビン酸²⁾ および茴香 (Foeniculi Fructus)、桂皮 (Cinnamomi Cortex)、丁香 (Caryophylli Flos)、橙皮 (Aurantii Pericarpium) などの芳香性生薬³⁾ に脂質過酸化抑制作用のあることが、認められている。また、われわれは、*in vitro* で過酸化水素による赤血球膜脂質過酸化に対し、桂皮、丁香、茴香のよう

な芳香性生薬に抑制作用のあることを見出している⁴⁾。

そこで、芳香性生薬がhydroxyl radicalやsuperoxide anionのような活性酸素による細胞膜障害に対して抑制作用を有するか否かを検討するため、人工生体膜モデルの一つであるレシチンリポソームの、過酸化水素-Fe²⁺系およびキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (xanthine oxidase: XOD) 系によって発生する活性酸素による、過酸化反応を用いて検討した。

材料と方法

(1) 試薬：茴香、莢述、桂皮、丁香、橙皮の各水性エキスは、各生薬 10 g を 100 ml の蒸留水で半量

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

になるまで煎じ、その煎液を凍結乾燥し作製された。これらに用いられた生薬は、高砂薬業より購入された日本薬局方に準じた市場品である。これらエキスの収率は、茴香：6.2%，莪朮：4.5%，桂皮：4.7%，丁香：11.6%，橙皮：18.5%であった。塩化第二鉄（ferric chloride； FeCl_3 ），過酸化水素，キサンチン，チオバルビツール酸（TBA），dl- α -トコフェロール，マンニトール，硫酸第一鉄アンモニウム，レシチン（卵黄製）は、いずれも和光純薬製を用いた。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt；EDTA）は同仁化学研究所製，catalase（EC 1.11.1.6，牛肝臓製），superoxide dismutase（SOD；EC 1.15.1.1，牛赤血球製），XOD（EC 1.2.3.2，バターミルク製，Grade I）はSigma社製を用いた。adenosine-5'-diphosphate monopotassium salt（ADP）はオリエンタル酵母工業製を用いた。これらおよびその他の試薬は、いずれも特級品であった。

レシチンの構成脂肪酸は、Stoffel⁵⁾らの方法で確認した。その結果、アラキドン酸，オレイン酸，ステアリン酸，パルミチン酸，リノール酸，リノレン酸が構成脂肪酸であった。

レシチンの平均分子量は、常法によりレシチンを灰化しその含有量から算出したところ1933.7であった。

(2) レシチンリポソームの調製：レシチンリポソームの作製は、常法に従い以下のようにして行なった⁶⁾。100 mmolのレシチンをクロロホルム5 mlで溶解し、ナス型フラスコで溶媒を留去してレシチンの薄膜を作製した。そこに、10 mlの50 mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.4）を添加し、窒素ガス通気中5分間超音波処理によりレシチンリポソーム懸濁液を得た。

(3) 過酸化水素- Fe^{2+} 系のレシチンリポソーム過酸化反応に対する各生薬エキスの抑制作用：戸田らの方法⁷⁾を応用して、最終濃度が2.5 mMレシチンリポソーム，2.5 mM過酸化水素，2.5 mM硫酸第一鉄アンモニウムと各種濃度の生薬エキス，catalase，マンニトール，dl- α -トコフェロールなど添加の50 mM Tris-HCl（pH 7.4）による反応溶液1.0 mlを37℃，1時間インキュベートした。その後，トリクロロ酢酸1.0 mlを加え，3000 rpm，10分間遠心した。その上清1.0 mlに0.67% TBA溶液2.5 mlを加え，100℃，1時間加熱した。加熱後，直ちに冷却し，n-ブタノール：ピリジン（15：1）混液を加えて攪拌し，3000 rpm，15分間

遠心した。遠心後，上清の530 nmでの吸光度を測定した。TBA反応生成物をマロンジアルデヒド（MDA）として，それを定量した。また，過酸化反応に対する各検体の抑制率は，式(A)で算出した。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{無添加群のMDA量} - \text{検体添加群のMDA量}}{\text{無添加群のMDA量}} \times 100 \text{ (A)}$$

(4) キサンチン-XOD系のレシチンリポソーム過酸化反応に対する各生薬エキスの抑制作用：TienとAustの方法⁸⁾を応用して，最終濃度が1 mMレシチンリポソーム，0.33 mMキサンチン，1.7 mM ADP-0.1 mM FeCl_3 ，0.11 mM EDTA 0.1 mM FeCl_3 ，0.1 U/ml XODを含み各種濃度の検体である各生薬エキス，SOD，dl- α -トコフェロールなど添加の50 mM Tris-HCl（pH 7.4）緩衝液による反応溶液1.0 mlを37℃，10分間インキュベートした。その後，反応溶液を冷却し，BuegeとAustの方法⁸⁾で反応生成物をMDAとして測定した。すなわち，1.0 mlの反応溶液に2.0 mlのTBA試薬（最終濃度が0.37% TBA，15% トリクロロ酢酸，0.04% butylated hydroxy toluene，2% エタノール）を加え混合し，100℃，15分間加熱した。加熱後，直ちに冷却し，3000 rpm，10分間遠心した。遠心後，上清の535 nmでの吸光度を測定した。MDA量は，分子吸光係数 1.56×10^5 から算出した。また，過酸化反応に対する各検体の抑制率は，式(A)で算出した。

(5) 統計学的処理：すべての実験結果は平均値±標準誤差であらわし，有意差検定にはStudent's *t*-testを用いた。

結 果

1. 過酸化水素- Fe^{2+} 系のレシチンリポソーム過酸化反応に対する各生薬エキスの抑制作用

Table Iに示すように，いずれの生薬エキスの最終濃度 $2.50 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ のMDA量は無添加群のMDA量 $25.363 \pm 2.215 \text{ nmol/ml}$ よりも有意に低値であり，それらの抑制率は高値であった。

さらに，丁香，桂皮および茴香の各エキスの最終濃度 $2.5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ のMDA量は，いずれも無添加群よりも有意に低値であり，抑制率はいずれも高値であった。

また，橙皮エキスの最終濃度 $2.5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ におけるMDA量は，無添加群よりも有意に低値であり，抑制率は高値であった。しかし，最終濃度2.5

Table I Inhibitory effects of aromatic herbs-extracts on peroxidation of lecithin-liposome by hydrogen peroxide-Fe²⁺ system and xanthine-XOD system.

Sample	Concentration	Peroxidation of lecithin-liposome by hydrogen peroxide-Fe ²⁺ system		Peroxidation of lecithin-liposome by xanthine-XOD system	
		MDA(nmol/ml)	Inhibitory ratio(%)	MDA(nmol/ml)	Inhibitory ratio(%)
Aurantii Pericarpium	2.5×10 ² μg/ml	13.064±0.497 ^{a)}	48.491±1.959	0.091±0.009 ^{a)}	63.354±3.490
	2.5×10	11.613±1.617 ^{a)}	53.704±5.793	0.149±0.022 ^{a)}	39.511±8.118
	2.5	22.500±2.117 ^{b)}	9.604±0.561	0.263±0.025 ^{b)}	1.807±0.130
Caryophylli Flos	2.5×10 ² μg/ml	0 ^{a)}	100	0.023±0.007 ^{a)}	90.861±2.925
	2.5×10	0 ^{a)}	100	0.036±0.007 ^{a)}	85.743±2.702
	2.5	0.968±0.228 ^{a)}	96.184±0.899	0.061±0.003 ^{a)}	75.492±1.210
Cinnamomi Cortex	2.5×10 ² μg/ml	1.452±0.228 ^{a)}	94.276±0.899	0.034±0.001 ^{a)}	86.546±3.835
	2.5×10	5.040±0.133 ^{a)}	80.128±0.528	0.062±0.003 ^{a)}	74.799±1.114
	2.5	9.960±0.697 ^{a)}	60.732±2.749	0.156±0.003 ^{a)}	37.552±1.044
Foeniculi Fructus	2.5×10 ² μg/ml	1.452±0.342 ^{a)}	99.277±1.348	0.180±0.012 ^{a)}	27.912±4.832
	2.5×10	3.427±0.349 ^{a)}	86.487±1.377	0.229±0.019 ^{b)}	3.512±0.743
	2.5	6.250±0.447 ^{a)}	75.357±1.763	0.220±0.017 ^{b)}	8.166±1.185
Zedoariae Rhizoma	2.5×10 ² μg/ml	13.428±1.332 ^{a)}	47.073±5.256	0.154±0.008 ^{a)}	38.255±3.114
	2.5×10	21.572±1.143 ^{b)}	13.150±0.518	0.195±0.027 ^{b)}	21.586±1.072
	2.5	22.260±1.027 ^{b)}	9.911±0.299	0.215±0.014 ^{b)}	10.709±2.461
Catalase	2.5×10 ² mU/ml	3.266±0.682 ^{a)}	87.123±6.631		
	2.5×10	7.420±0.807 ^{a)}	70.747±3.180		
	2.5	22.178±1.910 ^{b)}	11.573±1.358		
Mannitol	2.5×10 ² μM	16.774±1.157 ^{a)}	33.864±4.563		
	2.5×10	17.420±0.807 ^{a)}	24.114±1.966		
	2.5	22.016±2.201 ^{b)}	12.210±0.940		
SOD	2.5×10 ² mU/ml			0.001±0.001 ^{a)}	98.795±1.205
	2.5×10			0.018±0.003 ^{a)}	92.972±1.477
	2.5			0.028±0.002 ^{a)}	88.655±0.869
dl-α-Tocopherol	2.5×10 ² μM	0.146±0.026 ^{a)}	99.683±0.318	0.001±0.001 ^{a)}	98.795±1.205
	2.5×10	0.323±0.014 ^{a)}	98.722±0.509	0.010±0.003 ^{a)}	96.185±1.406
	2.5	2.984±0.334 ^{a)}	88.236±5.295	0.015±0.003 ^{a)}	94.277±1.113
None		25.363±2.215		0.249±0.025	

Each value represents the mean±S.E. from 4 experiments. Significant difference from the none-group, ^{a)}p<0.01, ^{b)}N.S.

μg/ml の MDA 量は無添加群と有意差はなく、抑制率も低値であった。

莢述エキスの最終濃度 2.5×10, 2.5 μg/ml の MDA 量はいずれも無添加群と有意差はなく、抑制率も低値であった。

一方、dl-α-トコフェロールは 2.5×10², 2.5×10, 2.5 μM のいずれの最終濃度でも MDA 値が無添加群よりも有意に低値であり、抑制率はいずれも高値であった。しかし、マンニトールでは 2.5×10², 2.5×10 μM および catalase では 2.5×10², 2.5×10 mU/ml の最終濃度群の MDA 量が無添加群よりも低値であったが、それ未満の最終濃度のマンニトール (2.5 μM) および catalase (2.5 mU/ml) での MDA 値は、無添加群と比較して有意差がなかった。また、マンニトールの抑制率は、いずれの最終濃度においても低かった。一方、catalase の抑制率は、最終濃度 2.5×10² mU/ml で 87.123±6.631%, 2.5×10 mU/ml で 70.747±3.180

% であったが、2.5 mU/ml では 11.573±1.358% と低値であった。

2. キサンチン-XOD 系のレシチンリポソーム過酸化反応に対する各生薬エキスの抑制作用

Table I に示すように、いずれの生薬エキスの最終濃度 2.5×10² μg/ml の MDA 量は無添加群の MDA 量 0.249±0.025 nmol/ml よりも有意に低値であった。それらの抑制率は、桂皮、丁字、橙皮では高値であったが、茴香では 27.912±4.832%, 莢述では 38.255±3.114% と低値であった。

また、桂皮および丁字エキスの最終濃度 2.5×10, 2.5 μg/ml の MDA 量はいずれも無添加群よりも有意に低値であり、それらの抑制率は桂皮の最終濃度 2.5 μg/ml を除いては高値であった。

また、橙皮エキスの最終濃度 2.5×10 μg/ml の MDA 量は無添加群よりも有意に低値であったが、その抑制率は 39.511±8.118% と低値であった。

しかし、最終濃度 2.5 μg/ml の MDA 量は無添

加群と有意差がなく、抑制率も低値であった。

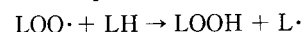
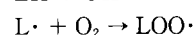
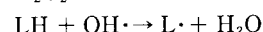
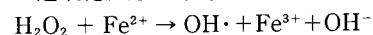
また、茴香と莪述の最終濃度 2.5×10 , $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の MDA 量は無添加群と有意差がなく、抑制率も低値であった。

一方、dl- α -トコフェロール、SOD はいずれの最終濃度でも MDA 量が無添加群よりも低値であり、これらの抑制率はいずれの最終濃度でも高値であった。

考 察

われわれは、桂皮、丁字、茴香に hydroxyl radical および superoxide anion 生成抑制作用が強く、橙皮、莪述にはこれらの作用の弱いことを認めている⁹⁾。

過酸化水素- Fe^{2+} 系では、以下のような反応で hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) が発生し、それによってレシチンのようなリン脂質を構成する不飽和脂肪酸の過酸化反応が考えられている。

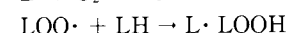
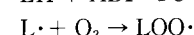
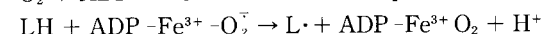
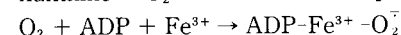
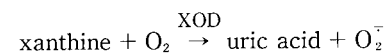


LH : unsaturated fatty acid

LOOH : fatty acid hydroperoxide

今回の結果でも桂皮、丁字、茴香に過酸化水素の scavenger である catalase, hydroxyl radical の scavenger であるマンニトール、抗酸化剤である dl- α -トコフェロールに匹敵するほどの脂質過酸化抑制作用が認められたが、この結果はこれらの生薬の hydroxyl radical 生成抑制作用によるものであろう。これらの生薬ほどでもないが、橙皮にもこの効果があったのは別の作用によるものと思われる。

キサンチン-XOD 系は、Tien と Aust らによれば以下のような反応で superoxide anion (O_2^-) を発生し、それによるレシチンのようなリン脂質を構成する不飽和脂肪酸の過酸化反応が考えられている⁶⁾。



LH : unsaturated fatty acid

LOOH : fatty acid hydroperoxide

今回の結果でも桂皮と丁字に superoxide anion

の scavenger である SOD と抗酸化剤である dl- α -トコフェロールに匹敵するほどの脂質過酸化抑制作用が認められたが、この結果はこれらの生薬の superoxide anion 生成抑制作用によるものであろう。橙皮にも弱い作用が認められたことは、別の作用によるものであろう。また、superoxide anion 生成抑制作用の認められている茴香には、脂質過酸化抑制作用は認められなかった。これは、xanthine-XOD 系で生成する superoxide anion によるレシチンリポソーム脂質過酸化反応系では、茴香成分が必ずしも抑制的に作用しないことを示唆している。このことは、この反応系が連鎖反応であることによるとと思われる。

莪述にはいずれの作用も認められなかったことは、これには hydroxyl radical や superoxide anion 生成抑制作用のないことによるものであろう。

以上の結果において、生薬エキスの濃度は $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、マンニトールと dl- α -トコフェロールの濃度は μM 、カタラーゼと SOD の濃度は mU/ml としたのでこれらの結果が必ずしも関連しないが、参照値として対比させてみた。

リノール酸空気酸化試験法で、桂皮、丁字、茴香、橙皮に脂質過酸化抑制作用のあることが認められており³⁾、*in vitro* で過酸化水素による赤血球膜脂質過酸化に対し桂皮、丁字、茴香に抑制作用のあることを認めている⁴⁾が、今回の結果もこのようなことと関連があると思われる。これらの生薬が今回のような連鎖反応系である脂質過酸化反応において抑制作用のあったことは、hydroxyl radical や superoxide anion のような活性酸素生成に対する抑制作用によるものなのか、レシチン過酸化に対する抑制作用によるものなのか明確でないが、反応のいずれかの段階を抑制しているものと思われる。すなわち、桂皮、丁字のような芳香性生薬には、hydroxyl radical や superoxide anion のような活性酸素による生体膜障害（いわゆる酸素ストレス）に対して抑制作用のあることが、今回の結果より示唆されたと思われる。

結 論

桂皮や丁字のような芳香性生薬には、過酸化水素- Fe^{2+} 系またはキサンチン-XOD 系で生成される活性酸素によるレシチンリポソーム過酸化に対し抑制作用のあることが認められた。

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) Tanizawa, H., Sazuka, Y., Komatsu, A., Toda, S. and Takino, Y. : A new efficacy test of antioxidants based on air-oxidation of linoleic acid. *Chem. Pharm Bull.* **31**, 4139-4143, 1983.
- 3) 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気酸化抑制作用，薬誌 **104**，394-397，1984.
- 4) Toda, S., Ohnishi, M. and Kimura, M. : Inhibitory effects of aromatic herbs on peroxidation of linoleic acid induced by hemoglobin and hydrogen peroxide, and peroxidation of erythrocytes induced by hydrogen peroxide. *J. Ethnopharmac.* in press.
- 5) Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, Jr, E.H. : Analysis of long chain fatty acid by gas-liquid chromatography. *Analyt. Chem.* **31**, 307-308, 1959.
- 6) Tien, M. and Aust, S.D. : In Lipid peroxidation in biology and medicine. (Ed. Yagi, K.) pp23-29, 1982.
- 7) 戸田静男，木村道郎，大西基代，戸田知子：駆瘀血剤のリン脂質，リポ蛋白過酸化に対する作用，和漢医薬学会誌 **8**，318-319，1991.
- 8) Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 302-310, 1978.
- 9) 戸田静男，大西基代，木村通郎：芳香性生薬の活性酸素生成抑制作用，和漢医薬学会誌 **8**，55-58，1991.