

活性酸素によるレシチン過酸化に対する桂枝茯苓丸構成生薬の抑制作用

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Inhibition of active oxygen-induced lecithin peroxidation
by constituent herbs of Keishi-bukuryo-gan (Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan)Shizuo TODA,*^{a)} Motoyo OHNISHI,^{a)} Michio KIMURA,^{a)} Tomoko TODA^{b)}^{a)}Kansai Shinkyu Medical College, ^{b)}Ryuhoudo Pharmaceutical Co.

(Received March 11, 1993. Accepted June 14, 1993.)

Abstract

We have investigated the inhibitory effects of Oriental medicines on lipid peroxidation. Keishi-bukuryo-gan (Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan) inhibited lecithin peroxidation induced by active oxygen. Among the constituent herbs of Keishi-bukuryo-gan, Keishi and Shakuyaku, were found to be more effective than constituents for the inhibition of lecithin peroxidation, and these inhibitory effects were comparable to that of dl- α -tocopherol.

Key words Botampi (*Paeonia suffruticosa* ANDREWS), Bukuryo (*Poria cocos* WOLF), Keishi (*Cinnamomum cassia* BLUME), Keishi-bukuryo-gan (Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan), Syakuyaku (*Paeonia lactiflora* PALLAS), Tonin (*Prunus persica* BATSCH), lecithin-peroxidation.

Abbreviations MDA, malondialdehyde; TBA, thiobarbituric acid.

緒 言

われわれは、人工細胞膜モデルの一つであるレシチンリポソームの活性酸素 (hydroxyl radical: OH[•], superoxide anion: O₂^{•-}) による過酸化に対して、駆瘀血剤である桂枝茯苓丸が抑制作用のあることを認めた¹⁾。また、桂枝茯苓丸には、マウス赤血球に過酸化水素を添加することによる赤血球膜の脂質過酸化および溶血現象²⁾そしてヘモグロビンと過酸化水素によるレシチン過酸化³⁾に対して抑制作用のあることが認められている。これらは、いずれも *in vitro* での結果であるが、*in vivo* での作用としては、微小循環改善作用⁴⁾のあることも認められている。このような諸作用が桂枝茯苓丸の駆瘀血作用の一つであり、慢性肝炎⁵⁾や婦人科疾患⁶⁾に対する有効性につながるものと思われる。

以上のようなことをふまえて、今回の報告では桂枝茯苓丸の構成生薬の内、どの生薬に活性酸素による脂質過酸化抑制作用があるのかを検討した。

材料と方法

(1) 試薬：桂枝茯苓丸エキスは、桂皮 (Keihi), *Cinnamomum cassia* BLUME 3g, 芍薬 (Syakuyaku), *Paeonia lactiflora* PALLAS 3g, 桃仁 (Tonin), *Prunus persica* BATSCH 3g, 茯苓 (Bukuryo), *Poria Cocos* WOLF 3g, 牡丹皮 (Botampi), *Paeonia suffruticosa* ANDREWS 3g を 500 ml の蒸留水で半量になるまで煎じ、その煎液を凍結乾燥し作製された。また、これら構成生薬の各水性エキスは、各生薬 10 g を 100 ml の蒸留水で半量になるまで煎じ、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、桂枝茯苓丸エキスが 9 %, 桂皮: 4.7 %, 芍薬: 3.5 %, 桃仁: 5.3 %, 茯苓: 3.0 %, 牡丹皮: 2.6 % であった。

それぞれのエキスの最終濃度は、0.1, 0.01, 0.001 w/v % になるように調製した。また、抗酸化剤で

*〒 590-04 大阪府泉南郡熊取町若葉2-11-1
2-11-1 Wakaba, Kumatori, Sen-nan, Osaka 590-04,
Japan

ある dl- α -トコフェロールは最終濃度が 0.1, 0.01, 0.001 mM になるように調製した。過酸化水素, チオバルビツール酸 (TBA), dl- α -トコフェロール, ヘモグロビン (牛血製), レシチン (卵黄製) は, 和光純薬製を用いた。

今回用いられたレシチンの構成脂肪酸は, Stof-fel らの方法⁷⁾ で検討したところ, パルミチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, リノレン酸であった。レシチンの平均分子量は, 常法より灰化してリンの含有量 (リンの含有率は 3.1 % であった) から算出したところ, 772.7 であった。⁸⁾

(2) 試験法: 最終濃度が 12.5 mM レシチン 10 mM 過酸化水素, 10 mM ヘモグロビンを含む反応懸濁溶液 (50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.0) 1.0 ml に各濃度の桂枝茯苓丸, 各構成生薬エキスをまたは dl- α -トコフェロールを添加し, 37 °C, 1 時間インキュベートした。その後, 10 % トリクロロ酢酸溶液 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 °C, 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, 上清について TBA 反応物質の 532 nm での吸光度を測

定した。なお, TBA 反応物質を malondialdehyde (MDA) とし, MDA の濃度を分子吸光係数 1.56×10^6 として定量した。そして, 無添加時でのその量を測定したところ 129.3 ± 2.9 nmol/ml であった。また, 過酸化反応に対する各検体の抑制率は, 以下の式で算出した。

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

すべての実験結果は, 平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ S.E.) で表わした。

結 果

Table I に示すように桂枝茯苓丸及びその構成生薬エキスが 0.001 % 添加での抑制率は, 桂枝茯苓丸: 1.6 ± 0.2 %, 桂皮: 80.8 ± 2.1 %, 芍薬: 61.1 ± 3.4 %, 桃仁: 45.9 ± 2.7 %, 茯苓: 40.3 ± 1.0 %, 牡丹皮: 48.8 ± 6.9 % であった。また, dl- α -トコフェロールは 0.001 mM で 35.2 ± 2.1 % であった。このように, 0.001 % 添加時では, 桂皮, 芍薬のみに 50 % 以上の抑制率が認められた。これらは, いずれも添加濃度依存的に抑制率が上昇した。

Table I Inhibition by Keishi-bukuryo-gan and its constituent herbs of lecithin peroxidation induced by hemoglobin and hydrogen peroxide.

	Inhibition (%) at concentration (w/v %, mM)		
	0.001	0.01	0.1
Botampi	48.8 ± 6.9	73.9 ± 4.2	91.9 ± 0.9
Bukuryo	40.3 ± 1.0	47.8 ± 6.6	71.4 ± 1.9
Keihi	80.8 ± 2.1	90.2 ± 0.5	95.9 ± 1.2
Shakuyaku	61.1 ± 3.4	75.4 ± 3.3	90.8 ± 0.8
Tonin	45.9 ± 2.7	57.5 ± 2.1	63.4 ± 4.5
Keishi-bukuryo-gan	1.6 ± 0.2	18.7 ± 0.2	87.5 ± 3.1
DL- α -Tocopherol	35.2 ± 2.1	96.9 ± 0.6	96.9 ± 0.8

Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 4 experiments.

Concentration of dl- α -tocopherol is shown in mM while % is used for others.

MDA at no-addition of sample is 129.3 ± 2.9 nmol/ml.

考 察

以上のように, 桂枝茯苓丸及びその構成生薬に, 生体鉄化合物のうち最も高比率で存在しているヘモグロビンと過酸化水素によるレシチン過酸化を抑制

する作用のあることが認められ, 特に桂皮, 芍薬では低濃度でも作用が強かった。特に, 桂皮は 0.01, 0.1% 添加濃度では抑制率が 90 % 以上で, dl- α -トコフェロールの 0.01, 0.1 mM の抑制率と同程度であった。

ヘモグロビンに含まれている Fe^{2+} と過酸化水素

によって, hydroxyl radical ($\text{OH}^\cdot$) が生成される。 $\text{OH}^\cdot$ はリン脂質を構成する不飽和脂肪酸を過酸化することで, リン脂質の過酸化物が生成される。

桂枝茯苓丸や抑制作用の強かった桂皮や芍薬が上記の反応のどの段階を抑制するのかは不明である。この中で, 桂皮には $\text{OH}^\cdot$ 生成抑制作用のあることが electron spin resonance スピントラップ法⁹⁾ で認められている。また, 桂皮や芍薬中にはタンニンが含まれていることから, それらのタンニンと Fe^{2+} との結合により, 金属不活性物となることも考えられる。

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の検討から, 桂皮に抑制作用のあることが認められている。¹⁰⁾ また, 戸田らはリノール酸試験法で桂皮, 芍薬, 牡丹皮にリノール酸過酸化物生成抑制作用のあることを認めている。¹¹⁾ このことは, これらの生薬にレシチン構成不飽和脂肪酸過酸化物生成抑制作用のあることを示唆している。

桂枝茯苓丸は駆瘀血剤の一種である。瘀血証とは, 毛細血管床における微小循環障害であるとされている。¹²⁾ これには, 赤血球変形能の低下が関与している。血球膜脂質過酸化による MDA により, 赤血球変形能が低下するといわれている。¹³⁾

以上のようなことから, 桂枝茯苓丸の駆瘀血作用の一つとして, 活性酸素によるレシチンのようなリン脂質過酸化抑制作用によることが示唆されるが, これはこの構成生薬中, 特に桂皮, 芍薬によると思われる。

結 論

桂枝茯苓丸の構成生薬 (特に桂皮と芍薬) にはヘモグロビンと過酸化水素によるレシチン過酸化を抑制する作用のあることが認められた。この作用は, 抗酸化剤である dl- α -トコフェロールと同程度であった。

文 献

1) Toda, S., Ohnishi, M. and Kimura, M.: Inhibitory

effects of Keishi-bukuryo-gan and Tokaku-joki-to on peroxidation of lecithin-liposome by active oxygen. *J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU* 9, 131-136, 1992.

- 2) Toda, S., Ohnishi, M. and Kimura, M.: Actions of Chinese herbal medicines KEISHIBUKURYO-GAN and TOUKAKUZYOKU-TO on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes by hydrogen peroxide. *J. Ethnopharmac.* 27, 221-225, 1987.
- 3) 戸田 静男, 木村 通郎, 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.
- 4) Itoh, T., Terasawa, K., Morimoto, Y., Tosa, H. and Hiyama, Y.: Effects of Keishi-bukuryo-gan on microcirculation of bulbar conjunctiva in normal subjects. *J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU* 5, 206-210, 1988.
- 5) 市田 文弘, 宮際 幹: 慢性肝炎の漢方薬治療, 現代東洋医学臨時増刊号 “難病, 難症の漢方治療第 4 集”, 67-69, 1991.
- 6) 石丸 忠之, 牛丸 敬祥, 秦 知紀: 月経困難症に対するツムラ桂枝茯苓丸の使用経験について, 産科と婦人科 46, 128-131, 1979.
- 7) 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.
- 8) 太田 次郎, 室伏 擴, 室伏 きみ子 訳: 基礎生化学の実験法 (R.R. Alexander., J.M. Griffiths and M.L. Wilkinson: Basic Biochemical Methods), pp.111-113, 1986.
- 9) Toda, S., Ohnishi, M. and Kimura, M.: Inhibitory effects of aromatic herbs on generation of active oxygen. *J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU* 8, 55-58, 1991.
- 10) Toda, S., Ohnishi, M., Kimura, M. and Toda, T.: Inhibition of active oxygen-induced lecithin peroxidation by aromatic herbs. *J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU* 10, 68-72, 1993.
- 11) Toda, S., Tanizawa, H., Arichi, S. and Takino, Y.: Inhibitory effects of methanol extracts of crude drugs on the air oxidation of linoleic acid. *YAKUGAKU ZASSHI* 104, 394-397, 1984.
- 12) Terasawa, K., Toriizuka, K., Tosa, H., Ueno, M., Hayashi, T. and Shimizu, M.: Rheological studies on “Oketsu” syndrome I. The blood viscosity and diagnostic criteria. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* 3, 98-104, 1986.
- 13) Plafferott, C., Meiseiman, H.J. and Hochstein, P.: The effects malondialdehyde on erythrocyte deformability, *Blood* 59, 12-15, 1982.