原 著

ESRスピントラッピング法による隔物灸の
基礎的研究

菅 田 良 仁* 大 西 基 代 東 家 一 雄

戸 田 静 男 黒 岩 共 一 木 村 通 郎

要旨 隔物灸は、その傷病に応じて用いる隔物が異なる。このことから、隔物灸では隔物による温熱刺激緩和効果だけでなく、用いた隔物の含有成分による薬理作用も重要な決め手となっていることがうかがわれる。その薬理作用のうち、特にラジカルスカベンジャー作用の有無について、電子スピン共鳴(ESR)スピントラッピング法により研究したので報告する。

隔物としては、生姜と大蒜を用いた。ハイドロキシラジカル(OH・)生成反応液に生姜と大蒜の各エキスを添加したところ、OH・由来のシグナルが観察されなかった。これは、隔物のエキ스가、ラジカルスカベンジャー作用を持っているか、あるいはラジカル生成反応の阻害効果を持っているかどちらかであることを示している。生姜や大蒜を用いた隔物灸では、これらのラジカルに対する作用により治療効果を得ている可能性が示唆された。

I 序 文

「灸」とは辞書¹⁾によると、『からだの一部にもぐさをすえ、それを焼いた熱の力で病気をなおす治療法』とある。しかしながら、施灸の生体におよぼす刺激には、その「熱の力」だけでなく、用いた材料(艾や隔物など)による薬理作用も考えられている。「熱の力」つまり温熱刺激については、菅田ら^{2,3)}が透熱灸および隔物灸の生体内におよぼす温度変化を測定している。また薬理作用については、戸田⁴⁾が艾のエキスを薄層クロマトグラフィとガスクロマトグラフィを用いて分析している。

このような多くの可能性を秘めた「灸」であるが、今回その中でも特にバリエーションの多い隔物灸に注目した。隔物灸は、その傷病に応じて用いる隔物が異なる。例えば、関節の酸痛には生姜が、打撲には大蒜が良いとされている。大西ら⁵⁾は隔物灸で、隔物として用いた生姜および大蒜から各々の含有成分が溶出することを確認し、それらの溶出成分の薬理作用が隔物灸の温熱刺激とともに重要な役割を持つことを示唆している。

一方、最近種々の疾病にフリーラジカルが関与しているという報告がある。フリーラジカルとは(後の付録で詳しく説明しているように)不対電子をもった反応性の高い分子や原子のことで、生体内において脂質過酸化等の有害反応を惹起するものである。そこで、大西ら⁵⁾の主張するような隔物の薬理作用の1つとして、フリーラジカルに対する作用とくにラジカルスカベンジャー(ラジカル消去)作用の有無について、ESRスピントラッピング

* Ryojin SUGATA 関西鍼灸短期大学

共同研究者: Motoyo OHNISHI, Kazuo TOHYA, Shizuo TODA, Kyoichi KUROIWA, Michio KIMURA 関西鍼灸短期大学

Key Words: ESR, ラジカル, 隔物灸, 生姜, 大蒜

法により調べたので報告する。

II 材料と方法

●材料

隔物は、市販の生姜と大蒜を用いた。スピントラップ剤の 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は Aldrich Chemical 社 (Milwaukee, WI) のものを、charcoal column にて精製して用いた。塩化第二鉄 (FeCl_3) は和光純薬工業社、3-Hydroxyanthranilic Acid (3-HAT) は Sigma Chemical 社 (St. Louis, MO)、そして過酸化水素 (31%, w/v) は三菱ガス化学社のものを用いた。また, allicin は ROTH 社 (Western Germany) のものを用いた。他の試薬もすべて特級試薬を用いた。

●隔物のエキス

隔物のエキスは、大西ら⁵⁾の方法を参考にして以下の手順にて作成した。まず隔物を乳鉢中でメタノールとともにすりつぶし、そのメタノール溶液をろ過したのちエバポレートした。次に、その濃縮液を水に溶解し、再度ろ過した。そして、そのろ液を濃縮したものをエキスとした。

●標準反応液

Iwahashi ら⁶⁾の方法を参考にし、ラジカル生成の標準反応液 (345 μl) を、0.22M Carbonate buffer (pH7.4), 0.22mM 3-HAT, 87mM DMPO, 2.9mM

H_2O_2 , 14 μM FeCl_3 に調整した。Carbonate buffer の pH の調整は、使用直前に、 NaHCO_3 溶液に CO_2 ガスを通気することにより行なった。3-HAT は 5.0mM potassium phosphate buffer (pH5.5) 150 μl に溶解して反応液に加えた。反応は、 H_2O_2 を添加することで開始し、室温 (約 20°C) で行なった。隔物のエキスをを用いる場合は反応開始前に添加した。大蒜の成分の 1 つである allicin についても調べた。

●ESR測定

ESR スペクトルは、FE2XG-ESR 分光計 (JEOL, 東京, 日本) にて測定した。マイクロ波キャビティの中央にテフロンチューブを通し、その中に水溶性反応液を吸引して測定に供した。ESR 分光計のセッティングは、マイクロ波を 5mW, modulation amplitude を 0.1mT, time constant を 1秒, 掃引磁場を 10mT, そして掃引時間を 4分とした。磁場の較正には、MnO のシグナル中 3 本目と 4 本目の間隔 ($\Delta H_{3-4} = 8.69\text{mT}$) を用いた。

III 結 果

標準反応液の ESR スペクトルを図 1 に示す。過酸化水素を添加して反応を開始してから、直後 (図 1a), 4 分 (b), 8 分 (c), 12 分 (d) と経時的に測定した。時間とともに大きくなっている強度比 1:2:2:1 の 4

図1 反応開始から(a)直後, (b)4分後, (c)8分後, (d)12分後の標準反応液の ESR スペクトル。両端の逆位相のシグナルは、磁場較正のための MnO のもので、この間隔が 8.69mT である。中央の経時的に大きくなっている 4 本のシグナルは、その強度比と分裂幅から DMPO-OH・スヒニアダクトのものであると同定される。

本のシグナルは、典型的な DMPO とハイドロキシルラジカル(OH $\cdot$)とのスピニアダクト($a^N=a^H=1.48\sim1.53\text{mT}$)のもので、Iwahashi ら⁶⁾の結果と一致している。

尚、ESRスペクトルの両端にあり逆の位相になっている2つのシグナルは、磁場較正のために入れた MnO のシグナルで、この間隔が8.69mTである。

図1の結果から、スピニアダクトのシグナルが十分大きくなるのに約10分かかることがわかる。そこで、ラジカル生成の反応インキュベーション時間を10分とし、隔物のエキスのラジカルスカベンジャー作用を調べた。コントロールとして水30 μ l (図2a)、生姜のエキス30 μ l (b)、大蒜のエキス30 μ l (c)、それぞれを反応開始前に添加し、10分間インキュベーションした。生姜および大蒜のエキスを添加した系では、スピニアダクトのシグナルが消失した。しかし、コントロールの水では、消失しなかった。

また、大蒜の臭み成分である allicin のラジカルスカベンジャー作用を調べた。図3に示すように、allicinの濃度依存的にESRシグナル強度が減少した。

IV 考 察

生姜はもともと「薑」を生薑と書いた。また、漢の許慎が撰述した『説文解字』には「薑は疆なり」という言葉があり、「薑」というのがよく百邪(多くの病氣)を疆御する(防ぐ)ので名付けられたということである⁷⁾。現在でも、生薑として生姜は重要な材

料であり、その薬理効果には中枢神経抑制作用や、プロスタグランジン合成阻害作用のあることが知られている⁸⁾。また、生姜を隔物として用いた生姜灸は、腹痛や関節痛などに治療効果があると言われている⁹⁾。

大蒜は『源氏物語』の中に「極熱の薬草」という名前で登場する。この時代には大蒜は食用ではなく専ら薬として用いられていたようである¹⁰⁾。大蒜も生姜と同様、生薬として重要な材料であり、その薬理効果には健胃、整腸、利尿、去痰、発汗、殺菌等の作用、また外用として疔腫や悪瘡の治療効果のあることが知られている¹⁰⁻¹³⁾。最近では、動脈硬化や血栓症、癌にも治療効果のあることが報告されている¹⁴⁾。一方、大蒜灸は癰疽、打撲、咬傷、肺結核などの治療に用いられている^{15,16)}。

このように生姜と大蒜は、生薬としてまた隔物灸の隔物として上記のような疾患や疾病に対し広く用いられている。このような種々の疾患や疾病には、付録で後述するフリーラジカルが関与している。老化でさえもこのフリーラジカルから派生する過酸化脂質が関与しているという説がある^{17,18)}。特に、このようなフリーラジカルのうち最も反応性の高いのは、ハイドロキシルラジカル(OH $\cdot$)である。そこで本研究では OH $\cdot$ に注目し実験を行った。

先ず、「方法」で述べた標準反応液を用いて OH $\cdot$ を発生させた(図1)。この反応液中で OH $\cdot$ は下に示すような Fenton 反応、

図2 標準反応液に、(a)水30 μ l、(b)生姜エキス30 μ l、(c)大蒜エキス30 μ lを添加した時のESRスペクトル。シグナルは、(a)では消えず、(b)、(c)では消失した。

によって作られる。この Fenton 反応には Fe^{2+} が必要であり、それは Fe^{3+} の還元により生成される。そこで還元剤として 3-HAT を標準反応液に入れ、次式のように Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元した。

このことにより、Fenton 反応が促進され、 $\text{OH}\cdot$ が発生した。

このようにして発生する $\text{OH}\cdot$ は、その標準反応液に生姜や大蒜のエキスを添加しておくと、そのラジカル由来のスピンアダクト特有の ESR スペクトルが得られなかった(図 2)。これは、隔物のエキ스가、ラジカルスカベンジャー作用をもっていか、あるいはラジカル生成反応阻害効果をもっていかどちらかであることを示している。生姜や大蒜を用いた隔物灸では、これらのラジカルに対する作用により治療効果を得ている可能性が示唆された。

前者のラジカルスカベンジャー作用を示唆する間接的な証拠としては、生姜のエキ스가プロスタグランジン生合成阻害効果⁸⁾を、大蒜のエキ스가脂質過酸化抑制作用¹⁴⁾をもっていることがあげられる。また、大蒜の成分である allicin がサルファー部分(S-S結合)をもっていることもスカベンジャー作用を示唆している。実際、allicin は濃度依存的にラジカルスカベンジャー作用を示した(図 3)。

後者のラジカル生成阻害効果を示唆するものは、

生姜の成分である [6]-gingerol がカテコール類に似た構造であることがあげられる。カテコールおよびその類似構造をもつ化合物の中には、鉄に対して配位(キレート)し、Fenton 反応を阻害するものがあることが報告されている⁶⁾。

一方、これらのエキ스는最初メタノールで抽出され、その後 60°C でエバポレートされていることなどから、エキス中にカタラーゼ等のラジカル消去作用をもつ酵素活性があるのではないかという可能性については否定することができる。

このあと、生姜の成分である [6]-gingerol などのラジカルに対する作用を詳しく調べる予定である。

フリーラジカルは、生体における種々の疾病に関与している。鍼灸はこれらの疾病に対する治療法であるから、当然そのラジカルに対する影響も調べられなくてはならない。共同研究者の大西ら¹⁹⁾は、艾の燃焼生成物中のエキ스가スーパーオキシドラジカル(O_2^-)生成抑制作用を持つことを報告している。また同じく大西ら²⁰⁾は、温灸艾にくらべ点灸艾の方が脂質過酸化抑制作用が強く、そのメカニズムはラジカルスカベンジャー作用であることを報告している。このような鍼灸刺激とフリーラジカルの関係についての研究では、ダイレクトな検出方法である ESR がますます有用であると考ええる。

図3 大蒜の成分 allicin の濃度と ESR シグナル強度との関係。allicin 濃度依存的に ESR シグナルが減少した。

V 付 録

① ESR²¹⁻²³⁾

電子は原子の中で、惑星の公転運動に相当する軌道運動をするとともに、自転運動に相当するスピン運動をもしている。そのどちらも環状の小電流であると考えることができ、この環状電流の磁氣的性質はひとつの磁気モーメントと同等である。特にスピンによる磁気モーメントは、強磁性や常磁性の源であり、ひとつの電子スピンをひとつの小さな棒磁石であると考えこともできる。正確には、ディラックの相対論的波動方程式により初めて理解されるものであり、その磁気モーメント μ の大きさは

$$\mu = g\beta S$$

となる。ここで g や β はそれぞれ g 値とボーア磁子であり、 S は電子のスピン(スピン角運動量)である。

いま、この棒磁石(磁気モーメント)を磁場中に置くと、磁場 H の方向に平行に $[S \text{ 極} \rightarrow N \text{ 極}]$ となっているときが一番安定でエネルギー状態が低く(図4a)、逆に $[N \text{ 極} \rightarrow S \text{ 極}]$ となっているときが一番不安定でエネルギーの高い状態である(図4b)。このエネルギー状態の高低は磁場の強さに比例し、また、電子スピンは量子力学的にこのどちらかの状態のみをとり、その中間はないことがわかっている。つまり電子スピンの磁場をかけると、もともとひとつであったエネルギー状態が、スピンのプラス・マイナスに応じて2つに分裂する。その変化の様子をグラフにすると図5aのようになる。

一方、電磁波は、振動する電場磁場としての波動性と、エネルギーの粒である光子の流れとしての粒子性を持っている。振動数 ν の電磁波は、大きさ $h\nu$ のエネルギーの粒の集団がその進行方向に流れているものと見ることができる。ここで、 h はプランク定数である。

磁場中の電子スピンのマイクロ波(振動数が約9.5 GHz の電磁波)を照射すると、電子スピンのエネルギー状態の分裂幅とマイクロ波のエネルギー $h\nu$ とが一致したとき、マイクロ波の吸収が見られる(図5b)。換言すると、電子が共鳴的にマイクロ波のエネルギーを受けとり、そのスピンの伴う磁気モーメント(棒磁石)の向きを逆転(平行から反平行へと変化)させる。これが電子スピン共鳴(ESR)である。

このように ESR は電波分光学的一种であるが、通常の分光計では光(電磁波)の波長を変化させるのに対して、ESR 分光計ではマイクロ波の波長を一定にしておいて磁場を掃引(スイープ)させて吸収(スピン共鳴)を見ている。そのため得られる ESR スペクトルの横軸は磁場となる。しかもそのスペクトルは、マイクロ波吸収の感度を上げるため、吸収曲線を一次微分した形で描かれる。ゆえに、吸収のピークはスペクトル曲線が軸(ベースライン)と交わる場所か、あるいは負の勾配が一番きつところである。その様子をコンピュータによりシミュレーションしたスペクトルを図6に示す。図6のaが1つの、bが3つのシグナルの場合で、上図はマイクロ波の吸収曲線を、下図はその一次微分曲線(ESRスペクトル)を示す。

物性学で ESR を用いる場合、電子スピンを磁気

図4 磁場中においた棒磁石(磁気モーメント)の状態。(a)では磁場に対し棒磁石が $[S \rightarrow N]$ (平行)となっていて安定であり、(b)では $[N \rightarrow S]$ (反平行)となっていて不安定である。

図5 電子スピン共鳴(ESR)の原理。(a)磁場の強さに応じて変化する電子のエネルギー状態を示している。電子スピンのプラス・マイナスにより2つのエネルギー状態がある。(b)この電子スピンの2つのエネルギー状態の分裂幅とマイクロ波のエネルギー $h\nu$ とが一致したとき、つまり $h\nu = g\beta H$ となる磁場(H_0)のとき(共鳴条件を満たしたとき)、マイクロ波の吸収が見られる。これが ESR である。

図6 シミュレーションによる ESR スペクトルの様子。ESR では感度をあげるため、マイクロ波吸収曲線を一次微分した形でスペクトルが描かれる。(a)が1つの、(b)が3つのシグナルの場合で、上図はマイクロ波の吸収曲線を、下図はその一次微分曲線(ESR スペクトル)をシミュレートしたものである。

探針(magnetic test probe)として局所的な有効磁場の測定を目的としている場合が多い。しかしながら、近年医学生物学の分野で ESR を用いるのは、

フリーラジカルを検出するためであることが多い。なぜなら、現在、ESR はフリーラジカルをダイレクトに検出できる唯一の方法だからである。

② ラジカル^{23,24)}

フリーラジカルは、その名のとおりに「過激な」反応をする分子または原子で、その過激な反応性は最外殻電子軌道に不対電子(unpaired electron)を持っていることに由来している。通常の安定な化合物では、ひとつの電子軌道に電子2個ずつが対になって入り、しかもパウリの原理によりそれらのスピンの向きが反対向きであるため、磁気モーメントが打ち消されてしまっている。それに対し、フリーラジカルなどのように、対をなさない余分の電子が入っていたりあるいは足りなかったりしている場合、これを不対電子と呼び磁気モーメントがある。この不対電子は、分子の熱あるいは光による分解、放射線分解、電子線照射、金属還元などによって生じる場合が多い。生体で問題になるのは酸素に不対電子のある活性酸素や、脂肪酸が酸化されてできる peroxy radical や alkoxy radical などであり、これらは上記した原因以外にリポキシゲナーゼなどのような酵素反応によってもつくられる。

再説すると、フリーラジカルとは不対電子を持った不安定な化合物であり、ESR は不対電子に基づく磁気モーメントを持ったもののみを測定できる。ゆえに、ESR はフリーラジカルをダイレクトに測定できるのである。

③ ESR スピントラッピング法^{23,25)}

ESR はフリーラジカルを測定可能であるが、フリーラジカルが非常に不安定で短命なためその測定は難しく、種々の工夫がなされている。具体的には、迅速混合-連続流通法(rapid mixing-continuous flow)、迅速混合-急速凍結法(rapid mixing-rapid quenching)そしてスピントラッピング法(spin trapping technique)の3つがある。このうち最も簡単で一般になされているのは、スピントラッピング法である。

スピントラッピング法とは、ニトロソ化合物(NO 基を持つ化合物)などのスピントラップ剤を用い、短命なラジカルを捕捉し準安定なスピンアダクト(ニトロキシド化合物)として ESR スペクトルを測

定する方法である。この ESR スピントラッピング法を用いた最近の研究が、多くの基礎および臨床医学分野でなされている。特に、酸素ラジカルによる高度不飽和脂肪酸の過酸化反応は、そのラジカル連鎖反応が生体にとって有害であることから詳しく研究され、例えば、Sugata et al.²⁶⁾は脂質過酸化反応中間体ラジカルをこの ESR スピントラッピング法と HPLC(高速液体クロマトグラフィ)を組み合わせたシステム(図 7)で分離している。

スピントラップ剤として用いられている代表的なニトロソ化合物は DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)と PBN(α -phenyl-N-t-butyl-nitron)である。それらがラジカル($R\cdot$)を捕捉する様子は、

図7 ESR を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に直接接続して、HPLCにより分離されたラジカルを検出する HPLC-ESR スペクトロメリーの流路構成図。この方法はまず HPLC によりラジカルを分離し、溶出液を直接 ESR の検出部に導入してラジカルを分離分析しようとするものである。

図 8 に示すように、窒素のとなりの炭素にラジカルが結合しニトロキシドラジカルをつくるというメカニズムである。特に DMPO は、水に対する溶解度が大きく、また、スピニアダクトの ESR スペクトルが捕捉されたラジカルの種類によって大きく変化するので、同定が容易であることから優れたスピントラップ剤として最もよく用いられている。本研究でも DMPO を用い、生成したラジカルがヒドロキシルラジカル($OH\cdot$)であると同定した。

参考文献

- 1) 山岸徳平：清水国語辞典，清水書院，(1988)，p.195.
- 2) 菅田良仁ほか：艾の燃焼温度と生体内温度変化に関する研究，全日本鍼灸学会雑誌 38(3);326～329，(1988)
- 3) 菅田良仁ほか：艾の燃焼温度と生体内温度変化に関する研究(第2報)－隔物灸について－，全日本鍼灸学会雑誌 39(2);241～245，(1989)
- 4) 戸田静男：艾の薄層クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーによる分析，日本東洋医学雑誌 38(1);53～55，(1987)
- 5) 大西基代ほか：隔物灸について，全日本鍼灸学会雑誌 38(4);420～422，(1988)
- 6) H. Iwahashi et al. : 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., Vol.276, No.1, 242-247, 1990.

図8 スピントラップ剤(DMPO と PBN)とラジカル($R\cdot$)とのスピニアダクト形成の様子。

- 7) 難波恒雄：原色和漢薬図鑑(上)，保育社，(1980)，p.118
- 8) 北川 勲ほか：生薬学—第3版—，廣川書店，(1986)，p.277～278.
- 9) 井垣清明ほか：針灸学，刊々堂，(1983)，p.445.
- 10) 伊沢一男：薬草カラー図鑑，主婦の友社，(1978)，p.133.
- 11) 木村康一ほか：原色日本薬用植物図鑑，保育社，(1983)，p.241.
- 12) 難波恒雄：原色和漢薬図鑑(上)，保育社，(1980)，p.167.
- 13) 北川 勲ほか：生薬学—第3版—，廣川書店，(1986)，p.291.
- 14) S. Knasmüller et al.: Studies on the Antimutagenic Activities of Garlic Extract. Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 13, p.357-365, 1989.
- 15) 木下晴都：針灸学原論，医道の日本，(1983)，p.182.
- 16) 國分 壯：最新鍼灸医学，医歯薬出版，(1956)，p.231.
- 17) D. Harman: Free Radicals, Aging, and Degenerative Diseases. ed. by J.E. Johnson et al., p.3, Alan., R. Liss Incorp., 1986.
- 18) 大柳善彦：活性酸素と病気，化学同人，(1989)，p.39～50.
- 19) 大西基代ほか：艾の燃焼生成物のスーパーオキシドに対する作用，全日本鍼灸学会雑誌 39(1)；132, (1989)
- 20) 大西基代ほか：艾のラジカルスカベンジャー作用の研究，全日本鍼灸学会雑誌 40(1)；157, (1990)
- 21) 小出昭一郎：量子力学(Ⅰ)，裳華房，(1983)，p.185～212 .
- 22) 伊達宗行：電子スピン共鳴，培風館，(1978).
- 23) 石津和彦：実用 ESR 入門，講談社，(1986).
- 24) 松尾光芳ほか：フリーラジカルと生体，学会出版センター，(1988).
- 25) 牧野圭祐：生化学における ESR，フリーラジカルの臨床 3；31～40, (1988)
- 26) R. Sugata et al.: Separation of Polyunsaturated Fatty Acid Radicals by High-Performance Liquid Chromatography with Electron Spin Resonance and Ultraviolet Detection. Journal of Chromatography, Biomedical Applications, Vol. 487, p.9-16, 1989.
(〒590-04 大阪府泉南郡熊取町小垣内990
関西鍼灸短期大学)

A Study on Indirect Moxibustion with ESR Spin Trapping Technique

Ryojin Sugata, Motoyo Ohnishi, Kazuo Tohya, Shizuo Toda, Kyoichi Kuroiwa and Michio Kimura
Kansai College of Acupuncture Medicine

In the previous paper, we reported that the indirect moxibustions (ginger- or garlic-moxibustions) kept high-temperature rather than those of the diathermic moxibustions. However, the effects of the indirect moxibustions include not only thermal stimulations but also medicinal actions of the materials. In this study, we found the effects of radical scavenger in ginger and garlic with ESR spin trapping technique. This suggested that ginger- or garlic-moxibustions were available to treatment of disease caused by the radicals.