薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
114 (6) 388-394 (1994)

脳虚血に用いられる漢方方剤のフリーラジカル消去活性 (第1報)

伏谷秀治,^{*,a} 土屋浩一郎,^a 水口和生,^a 高杉益充,^a 村上光太郎^b

徳島大学医学部附属病院薬剤部,^a 徳島大学薬学部^b

Studies on Attenuation of Post-ischemic Brain Injury by Kampo Medicines-Inhibitory Effects of Free Radical Production. I

Shuji FUSHITANI,^{*,a} Koichiro TSUCHIYA,^a Kazuo MINAKUCHI,^a
Masumitsu TAKASUGI,^a and Kotaro MURAKAMI^b

Department of Pharmacy, Tokushima University Hospital,^a 2-50
Kuramoto, Tokushima 770, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Tokushima University,^b 1-78 Shomachi,
Tokushima 770, Japan

(Received January 6, 1994)

In view of the recent investigation, highly reactive oxygen-derived free radicals may play a role in cerebral ischemia and brain damage, free radical scavenging activity of kampo formulations (Oren-gedoku-to, Keishi-bukuryo-gan, Saiko-ka-ryukotsu-borei-to and Daio-botampi-to) and Kampo components (Ityou, Shini, Menamomi, Arinosudama and Denshiti), used for the attenuation of brain damage, was investigated *in vitro*.

The used experimental system was a radical scavenging action against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) by the electron spin resonance technique at room temperature. All kampo formulations and kampo components showed radical scavenging activity in a concentration-dependent manner. This result indicates that kampo formulations, treated for brain damage, were good radical scavenger that could possibly prevent ischemic complications such as formation of brain damage. The intensity of scavenging activity of kampo formulations for three types of radicals were as follows; 1. DPPH: Daio-botampi-to > Saiko-ka-ryukotsu-borei-to = Keishi-bukuryo-gan > Oren-gedoku-to, 2. $O_2^{\cdot-}$: Daio-botampi-to = Keishi-bukuryo-gan > Saiko-ka-ryukotsu-borei-to > Oren-gedoku-to, 3. $OH^{\cdot}$: Daio-botampi-to = Saiko-ka-ryukotsu-borei-to > Keishi-bukuryo-gan = Oren-gedoku-to. Daio-botampi-to indicated the strongest scavenging activity against three types of radicals. Ischemic brain damage is thought to be an "oketsu" syndrome, which is correlated with abnormalities of the microcirculation. Therefore, Daio-botampi-to, which has been used for "oketsu" syndrome, showed superior free-radical scavenging activity.

Keywords—kampo formulation; ESR; free radical; ischemia-reperfusion; brain damage

緒

言

脳卒中に代表される脳虚血-再灌流に伴う脳浮腫とか細胞の壊死は、再灌流時に多量に発生する

活性酸素種が引き金になり、異常な細胞膜脂質の過酸化を引き起こし、その結果脂質膜の透過性を変化させ、ついには細胞を死に至らすことがその原因の1つであることが最近報告されるようになった。¹⁾

現在臨床で用いられている脳代謝改善剤の作用機序は、エネルギー代謝賦活作用、GABA 関連物質そして伝達物質及び受容体に働く物質に大別される。最近これら臨床で用いられている脳代謝賦活剤の中に、強力な活性酸素消去活性を持つものが見い出され、²⁾ また、現在開発中の脳代謝改善剤にも脂質過酸化抑制作用³⁾や活性酸素消去活性⁴⁾をその指標の1つとして研究が進められるようになってきた。

ところで、東洋医学で用いられている漢方方剤及び単味の生薬のうち、脳卒中直後や、脳卒中の後遺症の改善に使用されるものには柴胡剤・駆瘀血剤・瀉心湯類などがある。今回実験に用いた方剤のうちでは、黄連解毒湯に脂質過酸化抑制作用が報告されている⁵⁾が、活性酸素・脂質過酸化の抑制に関しては十分に検討されていない。

そこで、今回、脳卒中などの脳虚血性疾患に対して活性があると報告されている柴胡剤である柴胡加竜骨牡蠣湯、^{6,7)} 瀉心湯類である黄連解毒湯、^{8,9)} さらに、経験的に脳卒中の後遺症の改善に繁用される駆瘀血剤である大黃牡丹皮湯¹⁰⁾と桂枝茯苓丸、¹¹⁾ 単味の生薬であるイチョウ、¹²⁾ 辛夷、メナモミ、アリノスダマシとして田七について、電子スピン共鳴 (ESR, electron spin resonance) 法を用いて3種類のフリーラジカル消去活性を測定し、使用目標との関係について検討を行ったところ、興味深い知見が得られたので報告する。

実 験 の 部

(1) 試料 漢方用薬は栃本天海堂より購入した。1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), iron (II) sulfate heptahydrate, hydrogen peroxide, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), hypoxanthine, xanthine oxidase, from butter milk, superoxide dismutase, from bovine erythrocyte, L(+)-ascorbic acid は和光純薬 (株) より、5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) はラボテック (株) より購入した。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

(2) 試料の調製 各方剤及び単味の生薬は、1日分を1単位として煎出した (Table I)。1日量を500 mlの蒸留水で100°Cで1時間かけ、250 mlになるまで煎じ、ろ紙 (東洋濾紙, 5C) で熱時濾過し、さらに孔径 0.45 μm のメンブランフィルター (Millipore Millex-HA) で濾過した後、実験に供した。

水溶性の抗酸化剤であるアスコルビン酸の1日量は50—2000 mgであるが、¹³⁾ positive controlとして1日量を最大用量の2000 mgとし、これを250 mlの蒸留水に溶解して、同様に測定を行った。

(3) フリーラジカル消去活性の測定¹⁴⁾ ① DPPH ラジカル消去活性——安定なフリーラジカルである DPPH を ethanol で溶解し (100 μM)、この溶液の100 μl と試料溶液200 μl を10秒間混合し、ESR 測定用偏平セルに取り、1分後に ESR 法で測定を行った (Fig. 1a)。シグナル強

TABLE I. Components of Four Kampo Formulations

Formulation name	Components (g/d)
Daio-botampi-to	Daio 4 g, tonin 4 g, botampi 4 g, bosho 4 g, togashi 6 g
Oren-gedoku-to	Ogon 3 g, sanshishi 2 g, oren 1.5 g, obaku 1.5 g
Saiko-ka-ryukotsu-borei-to	Saiko 5 g, hange 4 g, bukuryo 3 g, keishi 3 g, ogon 2.5 g, taiso 2.5 g, shokyo 2.5 g, ninjin 2.5 g, ryukotsu 2.5 g, borei 2.5 g, daio 1 g
Keishi-bukuryo-gan	Keishi 4 g, bukuryo 4 g, botampi 4 g, tonin 4 g, shakuyaku 4 g

度の変化は、外部標準であるマンガンのシグナル高さ (Fig. 1a の、両端のシグナルのうち、 $\text{Mn}^{2+}_{(3)}$ で表した方のシグナル高さ) と、DPPH ラジカル の 5 本のピークシグナルの 3 本めの高さの比を用いて検討した。

② $\text{OH}^\cdot$ 消去活性——5 ml のポリカーボネートチューブに iron (II) sulfate heptahydrate (1 mM) 75 μl , DTPA (1 mM) 75 μl , hydrogen peroxide (1 mM) 75 μl , 試料 50 μl そして DMPO (2.7 M) 20 μl の順に取り、DMPO を添加してから 1 分後の DMPO-OH スピニアダクトを、ESR 法で測定した (Fig. 1b). シグナル強度の変化は、外部標準であるマンガンのシグナル高さとして、4 本線からなる DMPO-OH スピニアダクトの、2 本めのシグナル強度との比で検討を行った。

③ $\text{O}_2^\cdot$ 消去活性——5 ml のポリカーボネートチューブに phosphate buffer (100 mM, pH=7.2) 50 μl , 試料 50 μl , hypoxanthine (2 mM) 50 μl , DTPA (5.5 mM) 50 μl , DMPO (2.7 M) 10 μl , xanthine oxidase (0.272 U) 50 μl の順に取り、xanthine oxidase を添加して 1 分後に DMPO- $\text{O}_2^\cdot$ スピニアダクトを ESR 法で測定を行った (Fig. 1c).

シグナル強度の変化は、外部標準であるマンガンのシグナル高さとして、4 本線からなる DMPO- $\text{O}_2^\cdot$ スピニアダクトのシグナルの、1 本めのシグナルの強度との比で検討を行った。

④ ESR の測定条件——ESR スペクトルの測定は、日本電子社製 JEOL JES-FE1XG X-band ESR spectrometer で行った。DPPH ラジカル の測定条件は、magnetic field: 336 ± 5 mT; response: 0.1 s; sweep time: 2 min; power: 8 mW; modulation: 100 kHz, 2.0 gauss; amplitude: 1.6×1000 で、 $\text{OH}^\cdot$ の測定条件は、magnetic field: 331.5 ± 5 mT; response: 0.03 s; sweep time: 2 min; power: 8 mW; modulation: 100 kHz, 1.6 gauss; amplitude: 2.0×100 で、そして、 $\text{O}_2^\cdot$ の測定条件は、magnetic field: 336.5 ± 5 mT; response: 0.03 s; sweep time: 2 min; power: 8 mW; modulation: 100 kHz, 1.25 gauss; amplitude: 1.6×1000 で行った。

(4) 消去活性の評価 いずれの測定も、1 日量を 1 単位とし、蒸留水で希釈したものを試料として用いた。

フリーラジカル消去活性の評価は、次式に従って行った。

Fig. 1. ESR Spectra of Three Types of Radicals

DPPH radical (a), ESR spin adduct of DMPO-OH (b) and DMPO- $\text{O}_2^\cdot$ (c).

$$\text{ratio (sample)} = \frac{\text{試料を添加したときの ESR スペクトルのピーク高さ}}{\text{外部標準である Mn}^{2+} \text{ の ESR スペクトルのピーク高さ}}$$

$$\text{ratio (control)} = \frac{\text{試料を添加しないときの ESR スペクトルのピーク高さ}}{\text{外部標準である Mn}^{2+} \text{ の ESR スペクトルのピーク高さ}}$$

$$\text{radical scavenging activity (\%)} = \left\{ 1 - \frac{\text{ratio (sample)}}{\text{ratio (control)}} \right\} \times 100$$

測定は各測定濃度について4回ずつ行い、平均と標準偏差を求めた。

結 果

① DPPH ラジカル消去活性

測定を行ったすべての漢方方剤及び単味の生薬について、アスコルビン酸と同等か、それ以上に濃度依存的に DPPH ラジカルを消去することが見出された。

ラジカルを 80% 消去する濃度で比較すると、単味の生薬では活性の高い順にメナモミ>イチョウ=アリノスダマ>辛夷>田七となり、メナモミが最も活性が高かった。しかし、高血圧に対して活性を持つが脳虚血に対しては用いられない田七は、辛夷と比較しても DPPH ラジカル消去活性は低かった (Fig. 2a)。

方剤では大黃牡丹皮湯>柴胡加竜骨牡蠣湯=桂枝茯苓丸>黄連解毒湯の順になり、駆瘀血剤である大黃牡丹皮湯が最も高い活性を示した (Fig. 2b)。

② OH[•] 発生系に対する消去活性

DPPH ラジカルと同様に、脳虚血に対して活性を持つと言われている漢方方剤及び単味の生薬は濃度依存的に OH[•] を消去したが、DPPH ラジカルや O₂^{•-} と異なり、アスコルビン酸と比較するとその活性はメナモミを除いて低かった。

単味の生薬では活性の高い順にメナモミ>辛夷=アリノスダマ>イチョウ>田七となった。OH[•] の場合も DPPH ラジカルと同様に、田七は辛夷と比較しても活性が低かった (Fig. 3a)。

方剤では、活性が高い順に大黃牡丹皮湯=柴胡加竜骨牡蠣湯>桂枝茯苓丸=黄連解毒湯となり、この場合も駆瘀血剤が活性が高かった (Fig. 3b)。

③ O₂^{•-} 消去活性の検討

脳虚血に対して有効であると知られている漢方方剤及び単味の生薬の、O₂^{•-} に対する消去活性を Fig. 4 に示した。O₂^{•-} 消去活性はこの場合も濃度依存的で、単味の生薬ではイチョウ=メナモミ=アリノスダマ>辛夷>田七の順に活性が高かった (Fig. 4a)。

方剤では大黃牡丹皮湯=桂枝茯苓丸>柴胡加

Fig. 2. Concentration Dependent DPPH Radical Scavenging Activity of Kampo Components
a) ○, Ityou; ●, Shini; □, Menamoni; ■, Arinosudama; △, Denshiti and Kampo formulations, b) ○, Oren-gedoku-to; ●, Keishi-bukuryo-gan; □, Daio-botampi-to; ■, Saiko-ka-ryukotsu-borei-to; △, ascorbic acid (means±S.E.M.; n=4).

Fig. 3. Concentration Dependent Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Kampo Components a) ○, Ityou; ●, Shini; □, Menamomi; ■, Arinosudama; △, Denshiti and Kampo formulations, b) ○, Oren-gedoku-to; ●, Keishi-bukuryo-gan; □, Daio-botampi-to; ■, Saiko-ka-ryukotsu-borei-to; △, ascorbic acid (means $\pm$ S.E.M.; $n=4$).

Fig. 4. Concentration Dependent Superoxide Anion Radical Scavenging Activity of Kampo Components a) ○, Ityou; ●, Shini; □, Menamomi; ■, Arinosudama; △, Denshiti and Kampo formulations, b) ○, Oren-gedoku-to; ●, Keishi-bukuryo-gan; □, Daio-botampi-to; ■, Saiko-ka-ryukotsu-borei-to; △, ascorbic acid (means $\pm$ S.E.M.; $n=4$).

竜骨牡蠣湯>黄連解毒湯の順となり、駆瘀血剤である大黃牡丹皮湯と桂枝茯苓丸が活性が高かった。アスコルビン酸と比較しても、消去活性は同等か、それ以上であった (Fig. 4b)。

考 察

脳虚血後の後遺症に対する薬物治療としては、現在、脳代謝改善剤として、様々な医薬品が使用されている。その作用機序としては、エネルギー代謝賦活作用、脳内伝達物質賦活作用そして、GABA 関連物質に大別されている。ところが近年、脳虚血一再灌流時に活性酸素種の1つである $O_2^{\cdot-}$ が発生し、これが $O_2^{\cdot-}$ 消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼによって不均化され過酸化水素が発生し、さらに、遷移金属、特に鉄が触媒となり、細胞に対してより毒性が高い活性酸素種である $OH^{\cdot}$ が大量に発生し、脳細胞脂質膜の過酸化を引き起こし、ついには脳細胞を失活させた結果、脳障害を引き起こすという考え方が報告されるようになってきた。^{8b)}これは、脳が単位重量当りの酸素消費量が多く、過酸化を受け易い不飽和脂肪酸が豊富な臓器であり、脳虚血が起こった部位では遊離の鉄が増加するということ、¹⁵⁾さらに、遊離の鉄と活性酸素種が複合体を作り、脂質の過酸化を強力に開始するため¹⁶⁾と思われる。そのため、脳代謝改善作用を持ついくつかの薬物には、活性酸素消去活性及び脂質過酸化抑制作用も合わせ持つことが明らかにされてきた。²⁻⁴⁾我々はこれまで、抗炎症作用をもつ漢方方剤には高い活性酸素消去活性があることを見出している。¹⁷⁾そこで今回、脳卒中の後遺症の改善に繁用される漢方方剤4種 (瀉心湯類である黄連解毒湯、柴胡剤である柴胡加竜骨牡蠣湯そして駆瘀血剤である大黃牡丹皮湯と桂枝茯苓丸)、単味の生薬4種 (イチョウ、辛夷、メナモミ、アリノスダマ) 及び、高血圧に対しては有効であるが、脳虚血には用いられない田七を対照として実験を行った。その結果、これらの漢方方剤及び単味の生薬は DPPH

ラジカル, $\text{OH}^\cdot$ そして $\text{O}_2^\cdot$ とも濃度依存的に消去し, その活性はアスコルビン酸と同程度かそれ以上であったが, 脳虚血に対しては活性がない田七はすべてのラジカル種に対して消去活性が低いという結果が得られた. このことから, 脳卒中の後遺症の改善に繁用される漢方方剤は, その薬理作用の1つとして活性酸素消去活性があると考えられた.

生薬は, 症状を改善する強さの程度により分類, つまり, 虚実に分けることができる. 今回の実験に使用した方剤では, 大黃牡丹皮湯が最も症状を改善する作用が強く (実証), 次に柴胡加竜骨牡蠣湯, 黄連解毒湯, 桂枝茯苓丸の順に虚証に対して用いられることが知られている.¹⁸⁾ 今回の測定において, DPPH ラジカル及び $\text{O}_2^\cdot$, $\text{OH}^\cdot$ 共に, 実証に対して用いられる大黃牡丹皮湯が最も高い消去活性を示し, 伝統的な虚実の考え方とフリーラジカル消去活性が一致するという, 興味深い結果が得られた.

我々はこれまで, 瘀血を治療する漢方方剤は高い $\text{O}_2^\cdot$ 消去活性を示すことを報告している¹⁹⁾が, 今回の実験において, 脳虚血に対して活性があると報告されている3種類 (柴胡剤, 瀉心湯類, 駆瘀血剤) の方剤のうち, 駆瘀血剤が最も活性が高いという結果が得られた. これは, 瘀血の概念が, 血管あるいは血液の異常によって, 非生理的な状態になった血と定義されており, 脳卒中のように血管が損傷し, その結果血液が組織中で滞った状態は, 瘀血と見ることができるためと考えられた.

結 論

以上の実験より, 脳卒中の後遺症の改善に繁用される漢方方剤及び単味の生薬は, 脂質の過酸化に関与するラジカル種を, 脳卒中以外に使用される生薬に比べてかなり強力に, 濃度依存的に消去することが明らかになった. さらに, 駆瘀血作用を持つ漢方方剤に, 著明なラジカル消去活性があることが見出された. 今後は, 各漢方方剤の構成生薬及びその有効成分の, 活性酸素消去活性について更に検討を進めるつもりである.

引 用 文 献

- 1) H. B. Demopoulos, *Fed. Proc.*, **32**, 1859 (1973); M. D. Majewska, J. Strosznajder, J. Lazarewicz, *Brain Res.*, **158**, 423 (1978); E. S. Flamm, H. B. Demopoulos, M. L. Seligman, R. G. Poser, J. Ransohoff, *Stroke*, **9**, 445 (1978); K. Kogure, B. D. Watson, R. Busto, K. Abe, *Neurochem. Res.*, **7**, 437 (1982); P. H. Chan, J. W. Schmidley, R. A. Fishman, S. M. Longar, *Neurology*, **34**, 315 (1984); K. Abe, S. Yuki, K. Kogure, *Stroke*, **19**, 480 (1988).
- 2) M. Suno, A. Nagaoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 1046 (1984); J. Lin, N. Ogawa, X. Wang, A. Mori, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **311**, 177 (1991); K. Kubo, I. Yoshitake, Y. Kumada, K. Shuto, N. Nakamizo, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **272**, 283 (1984).
- 3) a) E. D. Hall, J. M. Braughler, P. A. Yonkers, S. L. Smith, K. L. Linseman, E. D. Means, H. M. Scherch, P. F. Voigtlander, R. A. Lahyi, E. J. Jacobsen, *J. Pharmacol. Exp. Thera.*, **258**, 688 (1991); b) H. Hara, K. Kogure, H. Kato, A. Ozaki, T. Sukamoto, *Eur. J. Pharmacol.*, **197**, 75 (1991); c) R. Oishi, Y. Itoh, M. Nishibori, T. Watanabe, H. Nishi, K. Saeki, *Stroke*, **20**, 1557 (1989).
- 4) J. Jinno, H. Mori, Y. Oshiro, T. Kikuchi, H. Sakurai, *Free Rad. Res. Comms.*, **15**, 223 (1991).
- 5) 林 高弘, 永田 稔, 西田圭志, 大田好次, 石黒伊三雄, 第10回和漢医薬学会大会要旨集,

- 富山, 1993 年 8 月, p. 34.
- 6) 大塚敬節, 矢数道明, 清水藤太郎, “漢方診療の実際,” 改訂版, 南山堂, 東京, 1956, p. 180.
 - 7) 尾崎正若, 太田 尚, 漢方医学, **9**, 17 (1985).
 - 8) 木下繁太郎, “健康保険が使える漢方薬一処方と使い方一,” 新星出版社, 東京, 1990, pp. 41—42.
 - 9) 川島孝一郎, 長沢治夫, 小暮久也, *Pharma. Medica.*, **6**, 33 (1988).
 - 10) 土本 重, 漢方の臨床, **15**, 827 (1980).
 - 11) 木下繁太郎, “健康保険が使える漢方薬一処方と使い方一,” 新星出版社, 東京, 1990, pp. 74—76.
 - 12) M. J. Attella, S. W. Hoffman, M. J. Stasio, D. G. Stein, *Exp. Neuro.*, **105**, 62 (1989).
 - 13) “医療薬 日本医薬品集,” 1992 年版, 日本医薬情報センター編, 薬業時報社, 東京, 1992, p. 10.
 - 14) J. Liu, N. Ogawa, X. Wang, A. Mori, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **311**, 177 (1991).
 - 15) 山崎靖人, 小暮久也, 活性酸素・フリーラジカル, **1**, 291 (1990).
 - 16) 福沢健治, 活性酸素・フリーラジカル, **2**, 182 (1991).
 - 17) 土屋浩一郎, 水口和生, 梅田貴文, 伏谷秀治, 濱岡廣安, 高杉益充, 清水 寛, 日本薬学会第 113 年会, 大阪, 1993 年 3 月, p. 252.
 - 18) 東 丈夫, 村上光太郎, “漢方薬の実際知識,” 増補版, 東洋経済新報社, 東京, 1972, pp. 69—79, pp. 120—126, pp. 50—60.
 - 19) 清水 寛, 土屋浩一郎, 水口和生, 高杉益充, 瘀血研究, **11**, 127 (1992).