

ラット肝ミトコンドリア Monoamine Oxidase による過酸化水素産生系に対する 柴胡加龍骨牡蠣湯の影響

佐々木健郎,* 伊東 宗一, 今野 那美, 吉崎 文彦

Effect of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on the Formation of Hydrogen Peroxide Generated by Rat Liver Mitochondria-monoamine Oxidase

Kenroh SASAKI,* So-ichi ITO, Tomomi KONNO, and Fumihiko YOSHIZAKI

(Received November 20, 2009)

Saiko-ka-ryukotsu-borei-to (SRBT) is adapted for psychoneurosis, such as autonomic dystonia and sleep disorder. It has been postulated that reactive oxygen species (ROSs) plays an important role in psychoneurosis arising from oxidative neurodegeneration. In this study, effect of SRBT on the formation of hydrogen peroxide generated by rat liver mitochondria-monoamine oxidase (MAO) was investigated by enzymatic colorimetric assay using 2,2'-Azino-bis (3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) oxidation catalyzed by peroxidase in vitro. SRBT (1 mg/ml) had exhibited notable inhibition on the coupling reaction of ABTS radical cation with a hydrogen peroxide formed by peroxidase, suggesting inhibitory effect on monoamine oxidase activity. Comparative determination of the consequence on MAO with the lacking of each crude drug blended in SRBT indicated that Scutellaria root should be the active constituent participated with this activity. In addition, when the MAO-inhibitory activity was compared with the partition of Scutellaria root decoction, the ethyl acetate-soluble layer had found to be the most effective in comparison with the other layers. Wogonin and baicalein had been revealed the principal components in ethyl acetate-soluble layer of Scutellaria root by TLC. These results have suggested that flavonoids derived from Scutellaria root might be involved in the inhibitory activity of SRBT on rat liver MAO.

Key words — saiko-ka-ryukotsu-borei-to; monoamine oxidase; hydrogen peroxide; ABTS/peroxidase colorimetric assay; Scutellaria root; flavonoids

自律神経失調症, 不眠症などの精神神経疾患に適用される柴胡加龍骨牡蠣湯 (SRBT) の抗ストレス作用のメカニズムのひとつに, 脳モノアミン神経系への影響が示唆されている。¹⁾ ノルエピネフリン (NE), ドーパミン (DA), セロトニン (5-HT) 等の神経伝達物質に代表されるモノアミン類は, モノアミンオキシダーゼ (MAO) で代謝される過程で活性酸素種 (ROSs) を産生する。²⁾ ROS は一重項酸素 ($^1\text{O}_2$), スーパーオキサイド (O_2^-), ヒドロキシラジカル ($\text{OH}\cdot$), 過酸化水素 (H_2O_2), 及びヒドロパーオキサイド (OOH) あるいはこれらから生じる過酸化脂質ラジカル, 硝酸ラジカル, 窒素や硫黄を含む化合物のラジカル及びハロゲンラジカル等の分子種が知られている。 H_2O_2 は Fenton 反応によりヒドロキシラジカルを産生し, フリーラジカルによる細胞障害を引き起こす。³⁾ 中枢においては, 脳虚血, 老化, アルツハイマー病及びパーキンソン病に関与しており,⁴⁾ その産生抑制は中枢神経系の機能異常が

関与する神経精神疾患に有効であると考えられる。また, 肝において, 肝硬変, 癌及び老化に伴う機能低下などに ROSs が関与しており, MAO の阻害による ROSs 産生抑制はそれら疾患に影響を及ぼすものと推察される。

このことから, ミトコンドリア MAO による H_2O_2 産生に対する SRBT の作用をペルオキシダーゼによる H_2O_2 の分解による 2,2-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) を基質とした H_2O_2 依存的酸化反応を利用して測定する比色定量法により検討した。

実験方法

使用動物 8週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。ラットは恒温恒湿 ($25\pm 1^\circ\text{C}$, $55\pm 5\%$) で明期 (7:00~19:00), 暗期 (19:00~7:00) の環境下, 固形飼料 (CE-2, 日本クレア) と水道水を自由に摂

取させた。ラットを断頭後直ちに肝を摘出し、1.15% KClにて瀉血・還流を行い、液体窒素により新鮮凍結して作製した。凍結組織は -80°C で保存した。

生薬材料 使用した生薬はすべて栃本天海堂（大阪）及び中井廣進堂（神戸）より購入した刻みもので、日本薬局方適合品である。

漢方方剤の煎出 SRBTの1日分、すなわち、Bupleurum root, Pinellia tuber各4.0g, Poria Sclerotium, Cinnamom branch, Scutellaria root, Jujube, Ginger, Ginseng, Longgu, Oyster shell各2.5g, Ruberb 1.0gを600 mlの水で半量になるまで600 Wの電熱器を用いて煎出し、温時綿栓ろ過後凍結乾燥してエキス(5.70g)とした。

ABTS比色定量法⁵⁾ Mondez-Alvarezらの方法⁶⁾に準じて、100 mM PBS buffer (pH 7.4, 以下PBS)にて肝ホモジネート12,500×gミトコンドリア画分を得た。ホモジネート100 μL に100 mM PBS, 3.6 mM NaN_3 , 10 mM MgCl_2 , 7.5 mM tyramineを各50 μL , 被験液100 μL を加え、 37°C , 60 min インキュベーションした後、100 mM citrate bufferを300 μL , 20 mM ABTS及び5U horseradish peroxidaseを各50 μL 加え発色させ、1.0 M HCl 800 μL にて反応を停止した後405 nmにおける吸光度を測定した。

SRBTからのMAO活性阻害成分の精製 阻害活性が認められたオウゴンにおいて活性成分の抽出を行った。クロロホルム, 酢酸エチル, *n*-ブタノール, 水でオウゴン50%メタノール抽出エキスを分配

した。それぞれのエキスの収率をはかり、オウゴンで阻害活性の認められた濃度×(収率)によりそれぞれのエキスの濃度を換算して阻害活性を検討した。

統計処理 すべての値は平均値±標準誤差で表示し、ANOVA法($p<0.05$)及びBonferroni法($p<0.05$)により有意差を検討した。

結果及び考察

*In vitro*におけるSRBT及びその配合生薬のMAO阻害活性をABTS比色定量法により検討した。SRBTに配合される各生薬を処方からひとつずつ抜いて煎出エキスを調整した。煎出エキスの収率をTable 1に示す。Fig. 1に示すように、SRBT 1

Table 1. Yields of Extracts of Saiko-ka-ryukotsu-borei-to Removed the Each Blended Crude drug

Removed crude drug	Yields(g)
None	5.70
Bupleurum root	3.55
Pinellia tuber	4.32
Poria sclerotium	5.34
Cinnamom Branch	5.57
Ginger	4.82
Scutellaria root	4.15
Jujube	3.34
Ginseng	5.59
Longgu	4.74
Oyster shell	4.84
Rhubarb	4.97

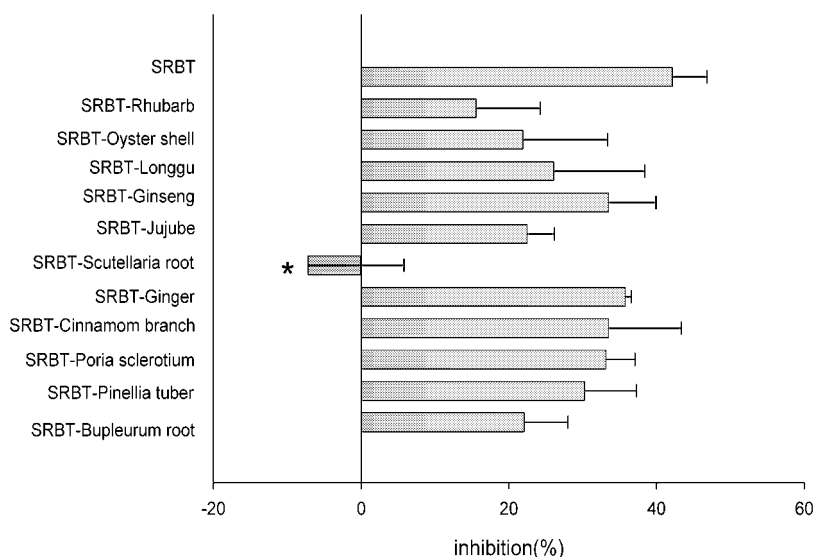


Fig. 1. Effect of SRBT Lacking the Each Blended Crude Drug on the Formation of Hydrogen Peroxide Generated by Rat Liver Mitochondria-monoamine Oxidase

Horizontal lines show the standard error of the mean (n=20). *, significantly different from SRBT-controlled value, $p<0.05$.

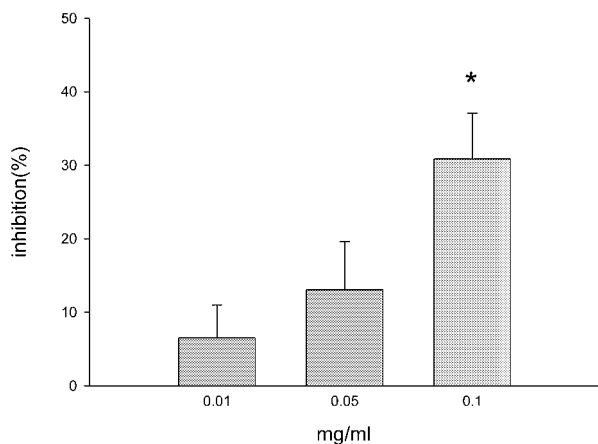


Fig. 2. Effect of 50% Methanol Extract of Scutellaria Root on the Formation of Hydrogen Peroxide Generated by Rat Liver Mitochondria-monoamine Oxidase

Vertical lines show the standard error of the mean (n =20).
*, significantly different from control-value, $p < 0.05$.

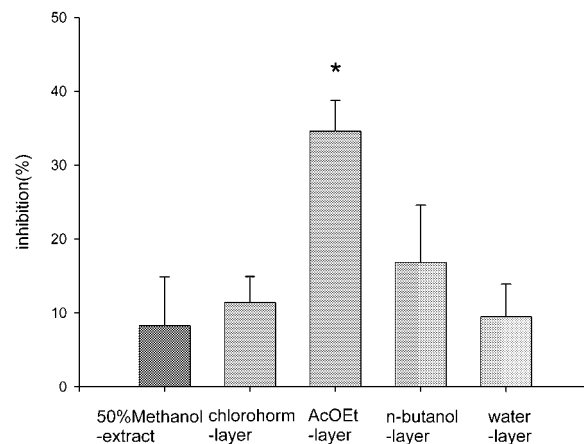


Fig. 3. Effect of 50% Methanol Extract and Layer of Scutellaria Root on the Formation of Hydrogen Peroxide Generated by Rat Liver Mitochondria-monoamine Oxidase

Vertical lines show the standard error of the mean (n =20).
*, significantly different from 50% methanol extract value, $p < 0.05$.

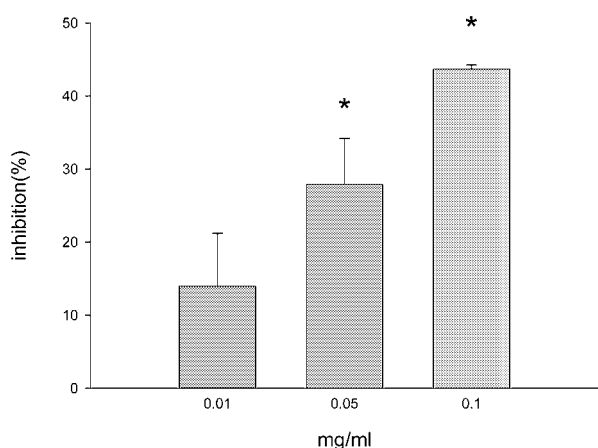


Fig. 4. Effect of Ethyl Acetate-soluble Layer of Scutellaria Root on the Formation of Hydrogen Peroxide Generated by Rat Liver Mitochondria-monoamine Oxidase

Vertical lines show the standard error of the mean (n =20).
*, significantly different from 50% methanol extract value, $p < 0.05$.

mg/ml の添加により、無添加群に比較し 42.14%の MAO 活性の阻害を認めた。次に、各エキスの収率から SRBT 1 mg/ml に換算した煎出エキスの MAO 阻害活性を測定した。SRBT 添加群に比較し、オウゴンを除いたエキスにおいてのみ有意な阻害活性の抑制が認められた。このことから、SRBT 構成生薬中、オウゴンに MAO 阻害作用が認められることが明らかになったので、次にオウゴン 50%メタノール抽出エキスの MAO 阻害活性を検討した結果を Fig. 2 に示す。50%メタノールエキス無添加群に比較し、エキス添加量 0.01 mg/ml で 6.51%、0.05 mg/ml で 13.08%、0.1 mg/ml で 30.85%と 0.01~0.1

mg/ml において用量依存的な MAO 阻害活性が認められ、0.1 mg/ml で有意であった。

さらに、オウゴン 50%メタノール抽出エキスをクロロホルム、酢酸エチル、*n*-ブタノールで分配した。各画分の収率はクロロホルムエキス 2.86%、酢酸エチルエキス 3.98%、*n*-ブタノールエキス 10.14%、水エキス 83.00%である。これらの収率からオウゴン 50%メタノール抽出エキス 0.01 mg/ml の用量に換算し MAO 阻害活性を比較した結果、各分配エキスの MAO 阻害活性はオウゴン 50%メタノール抽出エキスで 8.28%、クロロホルム画分で 11.39%、酢酸エチル画分で 34.61%、*n*-ブタノール画分で 16.85%、水画分では 9.48%であり、酢酸エチル画分には 50%メタノール抽出エキスの 4.18 倍の MAO 阻害活性が認められた。次に酢酸エチル画分の MAO 阻害活性の用量依存性を検討した結果を Fig. 4 に示す。酢酸エチル画分では 0.01 mg/ml で 13.99%、0.05 mg/ml で 27.92%、0.1 mg/ml で 43.70%と用量依存的な MAO 阻害活性が認められた。

以上の結果から、SRBT における MAO 阻害活性物質はオウゴンの酢酸エチル抽出画分に存在することが示唆された。オウゴンは漢方方剤の構成生薬において重要な生薬のひとつであり、薬理作用については抗菌作用⁷⁾、抗炎症作用⁸⁾、抗アレルギー作用⁹⁾などが報告されている。オウゴンは主要成分であるバイカリンをはじめ、オーゴニン、バイカレインなどのフラボノイド類を多数含有しており、その薬理作用にはフラボノイドが深く関与している。^{7,8)} 本研

究で活性が認められたオウゴン 50%メタノールエキスの酢酸エチル画分は、皮膚病原菌などに抗菌作用を示し、その活性物質はバイカレインであることが報告されている。⁷⁾ この画分には配糖体であるバイカリンより、アグリコンであるバイカレイン及びオーゴニンなどが多く含有されており、MAO 活性阻害作用にはアグリコンが深く関与していると思われる。フラボノイドはシクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、ミクロソームモノオキシゲナーゼ及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの ROSs 産生に関与する酵素を抑制し、¹⁰⁾ 抗酸化作用を示す。このような酵素に代謝経路で H₂O₂ を産生する MAO が存在する。この MAO によって産生された H₂O₂ は中枢神経細胞の機能低下に関与することから、フラボノイドによる MAO の阻害は、脳モノアミン神経系が関与する精神神経症状に有効であると考えられる。SRBT の MAO 活性阻害作用の発現には配合生薬のオウゴンが重要であり、その活性成分はオウゴンのフラボノイド類、特にバイカレイン、オーゴニンなどのアグリコンである可能性が推察された。以上から、SRBT が精神神経症状に対して有用であるというひとつの根拠になりうると考えられる。

REFERENCES

- 1) Sasaki K., Suzuki K., Ueno M., Takako K., Yoshizaki F., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **20**, 27–30 (1998).
- 2) Pizzinat N., Copin N., Vindis C., Parini A., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 428–431 (1999).
- 3) Ebadi M., Srinivasan S. K., Baxi M. D., *Prog. Neurobiol.*, **48**, 1–19 (1996).
- 4) Toda N., Ayajiki K., Okamura T., *Pharmacol. Rev.*, **61**, 62–97 (2009).
- 5) Szutowicz A., Kobes R. D., Orsulak P. J., *Anal. Biochem.*, **138**, 86–94 (1984).
- 6) Mendez-Alvarez E., Soto-Otero R., Sanchez-Sellero I., Lopez-Rivadulla L. M., *Life Sci.*, **60**, 1719–1727 (1997).
- 7) Li-Weber M., *Cancer Treat Rev.*, **35**, 57–68 (2009).
- 8) Chung C. P., Park J. B., Bae K. H., *Planta Med.*, **61**, 150–153 (1995).
- 9) 江田昭英, 現代東洋医学, **8**, 44–49 (1987).
- 10) Brown J. E., Khodr H., Hider R. C., Rice-Evans C., *Biochem. J.*, **330**, 1173–1178 (1998).