

原 著

酸化ストレスにより誘導される内分泌機能変化に対する 松寿仙の影響

獨協医科大学 生化学

叶 社房 市村 薫 松崎 茂

(株)和漢薬研究所

小屋佐久次

要 旨 活性酸素種は老化を始めとして、糖尿病、発癌、アテローム硬化症などの生活習慣病の発症と深くかかわっていると考えられている。さらに、活性酸素種により内分泌障害も生じる可能性がある。一方、抗酸化物質は活性酸素種により引き起こされる様々な障害を予防することが知られている。我々は一般医薬品である松寿仙が強力な抗酸化活性を持つことをすでに示している。今回は、生体内でヒドロキシルラジカルを産生する ferric nitrilotriacetate (FeNTA) により誘導される内分泌系の変化を松寿仙が保護するかどうかを調べることを目的にしてこの実験を行った。7週齢のWistar系雄ラットに飲料水に12.5%に含まれる松寿仙を12日間投与し、FeNTA (Fe, 7.5 mg/kg) を腹腔内注射し、12時間後に実験を行った。血中テストステロンはFeNTA投与により急速に低下したが、松寿仙前投与によりその低下が抑えられた。血中チロキシン値はFeNTAで低下したが、松寿仙はそれを正常化した。血中トリヨードチロニン値はFeNTAによっても松寿仙によっても何ら影響を受けなかった。血中コルチコステロンはFeNTAにより著しく増加したが、松寿仙はそれを正常化した。副腎のアスコルビン酸はFeNTAにより減少し、松寿仙により正常に復した。アスパラギン酸アミノ基転移酵素とアラニンアミノ基転移酵素および血清クレアチニンと尿素窒素はFeNTAにより上昇したが、松寿仙によりこれらの上昇はいずれにも正常とほぼ同じレベルまで戻った。以上の結果は、松寿仙はその中に含まれる生薬成分の抗酸化作用によりFeNTAで引き起こされた内分泌機能変化を保護することを示すものと考えられる。

Key Words : 松寿仙, ferric nitrilotriacetate, 酸化ストレス, 内分泌機能変化, 抗酸化作用

緒 言

活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) は老化や発癌、糖尿病、アテローム硬化症などの生活習慣病を引き起こす重要な因子であると考えられている^{1~3)}。最近、重金属であるカドミウムによるROSは内分泌障害を引き起こすことが示された⁴⁾。一方、抗酸化物質であるアスコルビン酸やビタミンEなどはROSにより引き起こされる内分泌系を含め様々な障害を予防することが報告された^{2~4)}。自然界には多くの抗酸化物質が存在することが知られている。なかでも、漢方薬には、抗酸

化作用を持つものが数多く見出されているが、それは含まれる様々な成分が有益な働きをすると考えられている^{5,6)}。しかし、その詳しい作用機序についてはいまだ不明な点が多く残されている。

松寿仙は一般医薬品 (滋養強壮剤) であり、アカマツ *Pinus densiflora* SIEB et Zucc の葉、クマザサ *Sasa krilen-sis* Makino et SHIBATA の葉、オタネニンジン *Panax ginseng* C. A. Meyer の抽出液の混合液であり、自然治癒力を賦活する自然薬として広く用いられている。これまでに、松寿仙が強力な抗酸化作用を有することが、*in vivo* および *in vitro* の実験より示されてきた^{5~7)}。さらに、免疫賦活作用やサイトカインの誘導作用があることも報告される⁶⁾。

生体内でヒドロキシルラジカルを発生させる ferric nitrilotriacetate (FeNTA) をラットに投与すると、腎臓、

平成15年11月21日受付, 平成15年12月17日受理

別刷請求先: 松崎 茂

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 生化学

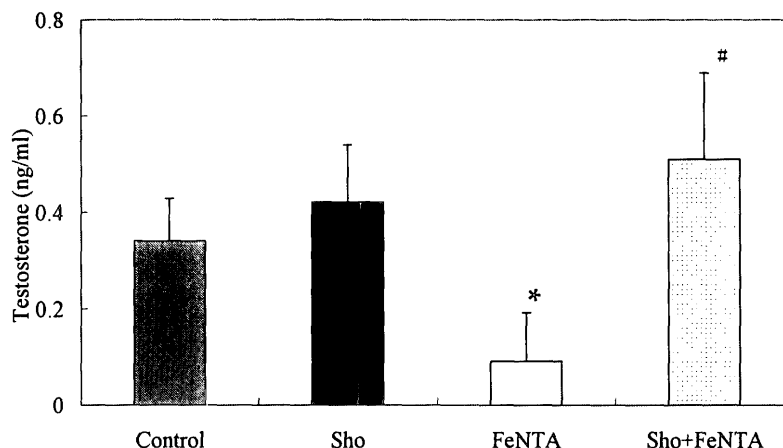


Fig. 1 Effects of Shojusen and ferric nitrilotriacetate (FeNTA) on serum testosterone at 12 h after FeNTA treatment. Each value represents mean \pm SD (n = 5). *, $p < 0.05$ vs. control group ; #, $p < 0.05$ vs. FeNTA group. Sho, Shojusen.

肝臓を始めとして様々な臓器に障害を与えることが知られている^{8,9)}。さらに、FeNTAを少量ずつある期間投与すると、腎細胞癌が生じることもすでに報告されている⁹⁾。我々は先にFeNTAによる急性期の酸化ストレスにより肝・腎オルニチン脱炭酸酵素 (ornithine decarboxylase, ODC) 活性が上昇するが、松寿仙により抑制されることを発表した¹⁰⁾。

今回、我々は強力な酸化ストレスを引き起こすFeNTAをラットに投与して、内分泌系に障害が生じるか、またそれを松寿仙が保護するかどうかを調べることを目的としてこの実験を行った。

材料と方法

7週齢の雄Wistar系ラットに、飲料水に12.5%を含まれる松寿仙を12日間投与した。松寿仙の投与量および期間は、以前の実験で最大の効果が見られた条件を参考にして決定した^{6,10)}。FeNTAは使用直前に調整し、実験12時間前にFeとして7.5 mg/kgを腹腔内に注射して、12時間後にその効果を判明した。この用量また時間の設定は様々な障害臓器の障害がFeNTA投与により最大になることが知られていることによるものである^{8,9)}。ラットは正常対照群、松寿仙投与群、FeNTA投与群および松寿仙とFeNTA併用群の四群に分け、各群五匹を用いた。

ラットを断頭により死に至らしめ、直ちに血液、肝臓および腎臓を取り出し、4℃の生理塩水で洗った後、ドライアイス・アセトン中で凍結し-70℃にて実験まで保存した。血中テストステロン、コルチコステロン、チロキシシン (T_4) とトリヨードチロニン (T_3) は免疫測定

法により測定した。副腎アスコルビン酸はFolin法¹¹⁾により測定した。血中過酸化脂質 (lipid peroxides, LPO) の測定にはYagi法¹²⁾を用いた。スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) 活性はSOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所, 日本) により測定した。血中アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) とアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) 活性はHenry et al.の方法で¹³⁾測定した。血中クレアチニンと血清尿素窒素はCreatinine-HRキットとUrea-Nitrogen testキット (和光, 大阪) により測定した。

統計計算

データはすべてmean \pm SDで示した。統計学的検討はANOVAとWilcoxon testを用いた。P < 0.05を有意差ありとした。

結 果

1. 血中ホルモン

松寿仙の単独投与では、血中テストステロンはやや増加の傾向がみられたが、 T_3 、 T_4 と共に対照群と有意の差は認められなかった。一方、FeNTA投与12時間後には、テストステロンおよび T_4 とも著明に低下した。しかし、血中 T_3 値はFeNTA投与にかかわらず、何ら影響が受けなかった。松寿仙を12日間に亘り前投与した場合は、FeNTAによる血中テストステロンと T_4 値ともほぼ正常値と変わりなかった。(Fig. 1, 2, 3)

2. 血中コルチコステロンと副腎のアスコルビン酸

ラットが様々なストレスを受けると、副腎のアスコル

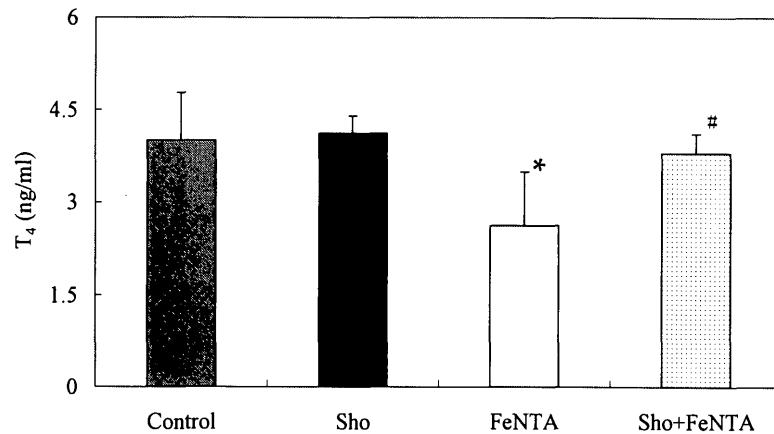


Fig. 2 Effects of Shojuzen and FeNTA on serum thyroxine (T_4) at 12 h after FeNTA treatment. Each value represents mean \pm SD ($n = 5$). *, $p < 0.05$ vs. control group ; #, $p < 0.05$ vs. FeNTA group. Sho, Shojuzen.

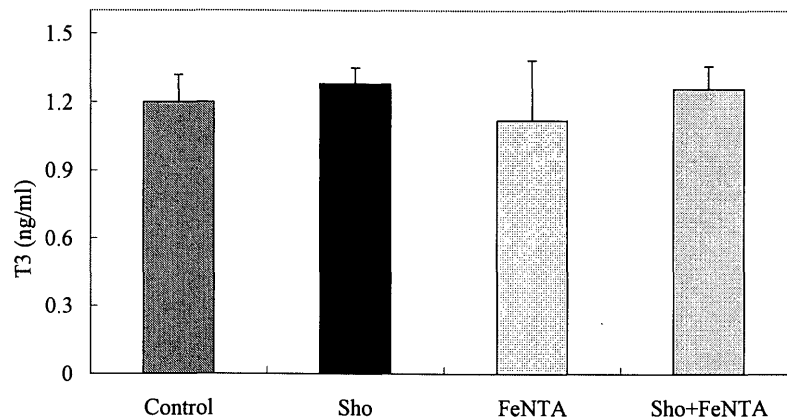


Fig. 3 Effects of Shojuzen and FeNTA on serum triiodothyronine (T_3) at 12 h after FeNTA treatment. Each value represents mean \pm SD ($n = 5$). No significant difference was noted between Sho + FeNTA and FeNTA group. Sho, Shojuzen.

ビン酸の含有量が激減し、血中コルチコステロンは上昇することがよく知られている^{15, 16}。FeNTAのみ投与により、12時間後副腎のアスコルビン酸量は有意に低下した。血中コルチコステロン値はFeNTA投与により急増したことが認められた。しかしながら、これらの数値は松寿仙前投与によって抑えられ、ほぼ正常値にまで戻った。(Fig. 4, 5)

3. 肝機能と腎機能

肝機能の指標となる血中アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) とアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) 活性はFeNTAにより著しく増加したが、松寿仙はその増加を抑制した。同様に腎機能をよく反映する血中クレアチニンと尿素窒素もFeNTAにより増加した。一方、松寿

仙を与えておくとその値が正常に近くまで回復した。(Tab. 1)

4. 血中過酸化脂質 (LPO)

FeNTAにより血中過酸化脂質は明らかに増加したが、松寿仙を前投与するとその増加が正常値まで抑えられた。(Tab. 1)

5. 血中スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性

血中SOD活性はFeNTAにより有意に低下したが、松寿仙を与えておくとその値がほぼ正常まで戻った。(Tab. 1)

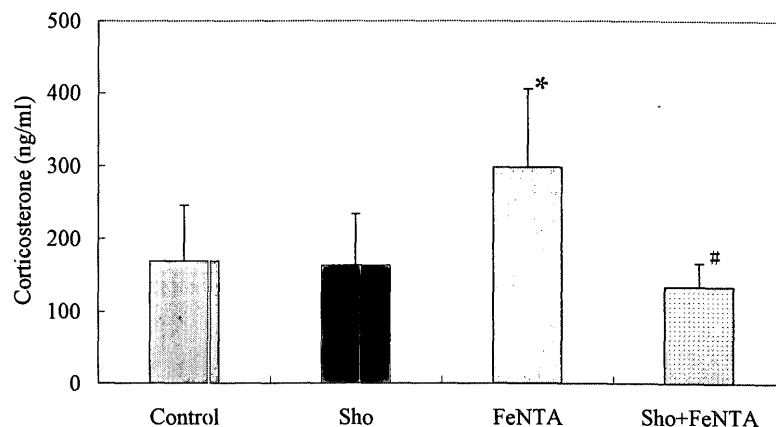


Fig. 4 Effects of Shojuzen and FeNTA on serum corticosterone at 12 h after FeNTA treatment. Each value represents mean \pm SD ($n = 5$). *, $p < 0.05$ vs. control group ; #, $p < 0.05$ vs. FeNTA group. Sho, Shojuzen.

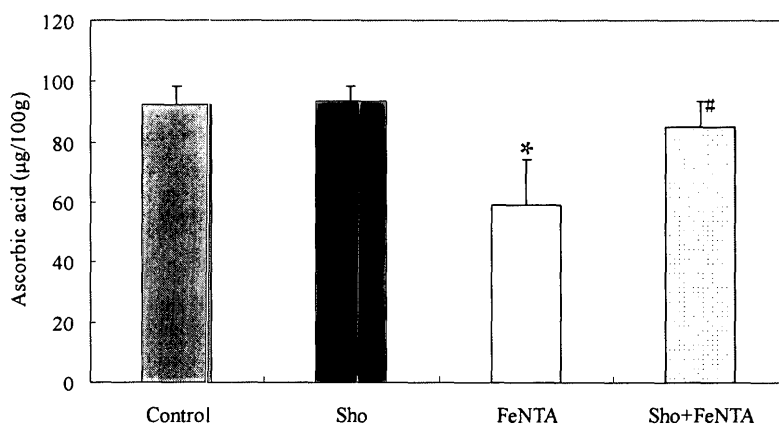


Fig. 5 Effects of Shojuzen and FeNTA on adrenal ascorbic acid at 12 h after FeNTA treatment. Each value represents mean \pm SD ($n = 5$). *, $p < 0.05$ vs. control group ; #, $p < 0.05$ vs. FeNTA group. Sho, Shojuzen.

Table 1 Protective effects of Shojuzen on FeNTA -induced oxidative stress in the rat

	Control	Shojuzen	FeNTA	Shojuzen + FeNTA
AST (IU/l)	234 \pm 58	188 \pm 16	969 \pm 611* [§]	207 \pm 67
ALT (IU/l)	32 \pm 5	74 \pm 10	606 \pm 445* [§]	81 \pm 20
Creatinine (mg/dl)	0.26 \pm 0.01	0.28 \pm 0.05	0.63 \pm 0.17* [§]	0.29 \pm 0.09
BUN (mg/dl)	15.8 \pm 1.0	19.2 \pm 2.4	31.2 \pm 5.2* [§]	19.0 \pm 5.0
LPO (nmol/ml)	3.2 \pm 0.2	3.4 \pm 0.5	5.9 \pm 1.2* [§]	3.3 \pm 0.8
SOD (U/ml)	24.7 \pm 3.8	24.8 \pm 3.5	16.3 \pm 2.2* [§]	24.4 \pm 1.7

* $P < 0.05$, compared with control group ; [§] $P < 0.05$, compared with Shojuzen + FeNTA group. Values are expressed as the mean \pm SD. Saline - treated animals served as control. Shojuzen at 12.5% in the drinking water was given to rats for 12 days. Rats were intraperitoneally treated with FeNTA (7.5 mg Fe/kg body) at 12 h before sacrifice. AST : aspartate aminotransferase ; ALT : alanine aminotransferase ; BUN : blood urine nitrogen ; LPO : lipid peroxides ; SOD : superoxide dismutase.

考 察

本実験の結果より, 生体内でFeNTAにより発生するヒドロキシルラジカルは, 腎や肝臓に対し様々な障害を引き起こすことが示された^{8,9)}. しかし, これらすべての悪影響は松寿仙前処理により認められなくなった. このように松寿仙はFeNTAによる腎臓や肝臓の有害作用を軽減することが明らかとなった. 以上の結果はわれわれの以前の報告^{6,10)}と同様である. 今回の実験では, FeNTAは内分泌系にも変化を与えることがわかった. これらの変化はFeNTAにより引き起こされた酸化ストレスによるものと考えられる. しかし, 松寿仙を前投与しておく, これらの内分泌変化はすべて改善された. 松寿仙のこの改善効果は, それに含まれる抗酸化物質の作用によるものと推測される.

本実験の結果より, FeNTA投与による血中コルチコステロンが増加したことから, この化学物質は視床下部-下垂体-副腎(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)系を刺激するものと考えられる. 人間やほかの哺乳類動物では, 副腎は他の組織よりもアスコルビン酸の含有量が高くなることをよく知られているが, これはACTH投与により激減することがすでに示されている^{14,15)}. つまり, ACTH分泌亢進により副腎アスコルビン酸が低下する. この現象は, 以前はACTHのbioassayとしてよく用いられていた^{14,15)}. 今回の結果は, FeNTAにより副腎アスコルビン酸濃度が低下したことから, ACTH分泌が亢進したものと考えられる. 松寿仙は, FeNTAの刺激による血中コルチコステロンと副腎アスコルビン酸量の変動をすべて正常化した. これは松寿仙が酸化ストレスによる視床下部-下垂体-副腎系の亢進を抑制するものと思われる.

近年, 活性酸素種(ROS)は内分泌系を含め様々な生活習慣病と深い関わりを持っていることが明らかになってきた. ROSにより, 血中トリヨードチロニン(T_3), チロキシン(T_4)やテストステロンなどが徐々に減少していくことを数多くの実験で認められた¹⁻⁴⁾. 古来より臨床に応用されてきた和漢薬には, 種々のタイプの抗酸化物質が広範囲にふくまれており, 近年はROSによる生活習慣病を初めとする各種疾患への予防のつながりが見出されつつある^{2,3,5)}. 今回の実験ではFeNTAにより, 血中 T_4 やテストステロンが低下することがわかった. しかし, 活性型甲状腺ホルモンである T_3 は何ら影響を受けなかった. T_4 が低下した状態でも T_3 が変わらない例は, 低ヨード状態などいろいろな病態で観察されている¹⁶⁾. T_4 は T_3 先駆体であり, 血中には T_3 よりかなり大量に存在し, T_3 が不足すると5'-deiodinaseにより合成

が進むと考えられる. また, T_4 値の低下はコルチコステロン上昇による影響も否定できないが, 上昇の程度が大きくないので, その影響はあまり多くないと思われる. 最近, 様々な原因によるROSは甲状腺ホルモンやテストステロンなどを低下させることが認められた^{4,17,18)}. 血中過酸化脂質の変化から, 細胞膜の障害により両者の分泌が低下したと推測される. 一方, 抗酸化物質であるアスコルビン酸などはカドミウムにより生じるROSの内分泌系に対する障害を軽減することが報告されている⁴⁾. 今回の実験では T_4 またテストステロン低下も, FeNTAによる酸化ストレスによるものと考えられる. また, 松寿仙は抗酸化作用を持つアスコルビン酸などと同様に, 低下した T_4 やテストステロンを正常値まで回復することから^{4,17,18)}, 抗酸化物質として働いていると考えられる. 本研究に示された結果より, 松寿仙に含まれる抗酸化物質がROSを消去する作用によって, 視床下部-下垂体-副腎系の亢進を抑制すると同時に, 精巣と甲状腺も保護するためと考えられる.

以上の結果は松寿仙の主な効果は抗酸化作用により発現するものと考えられる. 今回とは異なる実験系でも, 過酸化脂質の生成が松寿仙により明らかに抑えられている⁷⁾. また, 我々はデキサメサゾンにより引き起こされる胸腺のアポトーシスが松寿仙により抑制されることをすでに発表した¹⁹⁾. この効果も松寿仙の抗酸化作用による可能性が考えられる. 含まれる成分の中で, クマザサ葉抽出液が*in vivo*では最も強い抗酸化作用を示したので^{5,7)}, FeNTAによる酸化ストレスの場合もクマザサ葉抽出液が主として抗酸化作用を示すものと推測される. 今後は松寿仙に含まれるどの成分がFeNTAの酸化ストレスを最も強力に抑制しているかを詳しく調べる必要がある.

参考文献

- 1) Biesalski HK. : Free radical theory of aging, *Curr Opin Clin Nutr Metab. Care*, 5 : 5-10, 2002.
- 2) Urso ML, Clarkson PM. : Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 189 : 41-54, 2003.
- 3) Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. : Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now ? *J Lab Clin Med*, 119 : 598-620, 1992.
- 4) Gupta P, Kar A. : Role of ascorbic acid in cadmium-induced thyroid dysfunction and lipid peroxidation. *J Appl Toxicol* 1998 : 18 : 317-320.
- 5) 自然薬と自然治癒力 (6), *Wakan-yaku Med Inst Tech Review*, 29 : 8-10, 1997.

- 6) 王淑一, 市村薫, 松崎茂, 小屋佐久次: Ferric nitrilotriacetate による酸化ストレスに対する松寿仙の保護効果. *Dokkyo J Med Sci*, **27**: 487-491, 2000.
- 7) 岩田尚登, 高橋礼子, 富岡秀雄他. 松寿仙の抗酸化作用に関する研究. *新薬と臨床*, **11**: 1413-1439, 1999.
- 8) Iqbal M, Giri U, Athar M.: Ferric nitrilotriacetate (FeNTA) is a potent hepatic tumor promoter and acts through the generation of oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, **212**: 557-563, 1995.
- 9) Ansar S., Iqbal M., Athar M.: Nordihydroguaiaretic acid is a potent inhibitor of ferric-nitrilotriacetate mediated hepatic and renal toxicity, and renal tumour promotion, in mice, *Carcinogenesis*, **20**: 599-606, 1999.
- 10) 叶 社房, 小屋佐久次, 松崎茂: Ferric nitrilotriacetate による誘導されるラットの肝臓および腎臓オレニチン脱炭酸酵素活性に対する松寿仙の阻害効果. *Kitakanto Med J*, **53**: 143-148, 2003.
- 11) Jagota SK, Dani HM.: A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. *Anal Biochem*, **127**: 178-182, 1982.
- 12) Yagi K.: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem Med*, **15**: 212-216, 1976.
- 13) Henry RJ, Chiamori N, Golub DD, Berkman S.: Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase. *Am J Clin Pathol*, **34**: 381-398, 1960.
- 14) Overbeek GA.: Hormonal regulation of ascorbic acid in the adrenal of the rat. *Acta Endocrinol*, **109**: 393-402, 1985.
- 15) Kipp DE, Rivers JM.: Uptake and release of adrenal ascorbic acid in the guinea pig after injection of ACTH. *J Nutr*, **117**: 1570-1575, 1987.
- 16) Matsuzaki S, Suzuki M.: Paradoxical effect of perchlorate on thyroid weight, glucose 6-phosphate dehydrogenase and polyamines in methylothiouracil-treated rats, *Acta Endocrinol*, **97**: 491-495, 1981.
- 17) Sadani GR, Soman CS, Deodhar KK, Nadkarni GD.: Reactive oxygen species involvement in ricin-induced thyroid toxicity in rat. *Hum Exp Toxicol*, **16**: 254-256, 1997.
- 18) Sikka SC.: Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, *Curr Med Chem*, **8**: 851-862, 2001.
- 19) ブリハノフ R, 小屋佐久次, 松崎茂: デキサメサゾンにより誘導される胸腺アポトーシスに対する松寿仙の抑制効果. *Dokkyo J Med Sci*, **26**: 437-440, 1999.

Protective Effects of *Shojusen* on the Endocrine Disturbances Induced by Oxidative StressShe - Fang Ye¹, Kaoru Ichimura, Shigeru. Matsuzaki¹, Sakuji Koya²¹ *Department of Biochemistry, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, 321 - 0293 Japan*² *Wakan - yaku Research Institute, Seta, Gunma, 371 - 0101 Japan*

Abstract Reactive oxygen species (ROS) are involved in pathogenesis of various diseases, including senescence, diabetes mellitus, carcinoma and atherosclerosis. Endocrine disorders may also be induced by ROS. Antioxidants such as vitamin E and ascorbic acid have been shown to delay or prevent a variety of injuries caused by ROS. Our previous studies have shown that *Shojusen* acts as potent antioxidant in ROS - mediated disorders. The aim of our present study is to examine if *Shojusen* protects endocrine disturbances induced by ferric nitrilotriacetate (FeNTA) that generates hydroxyl radicals *in vivo*. Wistar rats of 7 - week old were treated with or without 12.5% *Shojusen* in drinking water for 12 d and FeNTA (7.5 mg/kg) was injected intraperitoneally 12 h before experiments. Serum testosterone decreased rapidly after FeNTA treatment, while *Shojusen* pretreatment prevented this fall in testosterone levels. Serum T₄ levels were decreased by

FeNTA, while *Shojusen* restored the decreased levels to normal. Serum T₃ levels remained unchanged either by FeNTA or *Shojusen*. Serum corticosterone levels increased significantly following FeNTA treatment, while *Shojusen* reduced the increase levels to normal. Adrenal ascorbic acid was decreased by FeNTA and restored to normal by *Shojusen*. Serum levels of aminotransferases, creatinine and urea nitrogen were increased by FeNTA, while these parameters was normalized in *Shojusen* - pretreated rats. These results show that *Shojusen* prevents hydroxyl radical - mediated endocrine disorders induced by FeNTA by acting as an antioxidant.

Key Words : *Shojusen*, ferric nitrilotriacetate, reactive oxygen species, endocrine disturbances, antioxidant.