

酸化ストレス誘発マウスの脂質過酸化に対する シャクヤク成分の効力比較

松永 孝之, 田村 隆幸, 横田 洋一, 川筋 透

Comparative Potency of peony components on the lipid peroxidation in oxidative stress-induced mouse

Takayuki MATSUNAGA, Takayuki TAMURA, Yoichi YOKOTA and Toru KAWASUJI

要 約

鉄キレート化合物を投与した酸化ストレスモデルの脂質過酸化を指標に、4種シャクヤク成分の改善効果を比較検討した。その結果、ペンタガロイルグルコースは、100mg/kgの高用量の投与でも過酸化脂質の生成に変化はなかったが、没食子酸では高用量で血中及び腎臓中の過酸化脂質生成が有意に抑制された。また、没食子酸誘導体である没食子酸メチルでは、腎臓中の過酸化脂質生成が抑制されたが、カテキンでは有意な変化は認められなかった。さらに、シャクヤクエキス1g/kg投与時にも血中及び腎臓中の過酸化脂質の生成を抑制する傾向が認められた。

以上の結果から、シャクヤクエキスに含まれる成分に酸化ストレスの動物モデルに対する有用性が示されたが、エキス中の成分含有率から考慮すると単一成分による効果では説明出来ないと思われる。

Summary

Antioxidative potency of 4 components contained in peony root was compared with the degree of lipid peroxidation in mice treated with iron chelating agent as oxidative stress model. Pentagalloylglucose had no effect on the formation of lipid peroxide in this model even when administered with high dosing of 100mg/kg, but, high dose of gallic acid significantly inhibited the formation of them in blood and kidney. And, methyl gallate inhibited the lipid peroxidation only in kidney, but catechin had no effect. Furthermore, peony root extract had the tendency to inhibit the lipid peroxidation in this model.

These results suggest that some components in peony root exert the improvement in oxidative stress model, but this effect appear to be due to the blend effect of some components.

キーワード: ペンタガロイルグルコース, 没食子酸, 没食子酸メチル, カテキン, 酸化ストレスモデル
Keywords: Pentagalloylglucose, Gallic acid, Methyl gallate, Catechin, Oxidative stress model

活性酸素は、正常な生体反応に際しても発生するが、反応性が高いため厳密に制御されている。しかし、老化や種々の要因により活性酸素の発生制御が不十分になると酸化ストレスとなって生体成分に障害を与え、種々病気の発症原因になるとされている¹⁾。そのため、抗酸化成分を摂取することにより酸化ストレスを抑制し、病気の発症を予防することが期待される。天然物に含まれるポリフェノールなどの天然成分には、抗酸化作用のあることが報告されており、これらの摂取による病気予防との関連性が指摘されている^{1, 2)}。

先に、我々は安定ラジカル還元能を指標にした評価系において、シャクヤクエキス及びそれらに含まれる数種成分に抗酸化作用のあることを報告した³⁾。また、鉄キレート剤投与による酸化ストレスの動物モデルを作成し、過酸化脂質生成を指標に抗酸化能を有する天然物の有効性を評価することが出来ることを示した⁴⁾。今回、シャクヤクエキスに含まれる数種成分について、酸化ストレス病態モデルを用いて有効性を評価した。

実験方法

1. 試薬

本試験で用いた主な試薬は、ニトリロ三酢酸Na (Fe-NTA)、没食子酸一水和物及び没食子酸メチル (以上、和光純薬)、カテキン (東京化成) 及びペンタガロイルグルコース (PGG, Cayman chemical) である。これらの化合物は、蒸留水または0.5%カルボキシメチルセルロースに加温しながら溶解または懸濁して試験に供した。

2. シャクヤクエキスの調製

本試験で用いた梵天 (4年物, 平成25年10月収穫) の根部のエキスは、既報⁵⁾に従い調製したものを試験に供した。

3. 動物

本試験で用いたマウス (Balb/c, 雄性, 6週令) は、三協ラボサービスより購入し、予備飼育後7-9週目に試験に供した。

4. Fe-NTA投与酸化ストレスマウスを用いた抗酸化能の測定

一晚絶食したマウスに鉄キレート化合物であるFe-NTA溶液投与前の4時間及び30分前の2回被検液を経口投与し、その後Fe-NTA溶液 (Fe相当量, 5 mg/kg) を腹腔内投与した。1時間後にマウスをインフルラン麻酔下で解剖し、下大静脈より採血した後腎臓を摘出した。血液を遠心分離して得た血漿及び腎臓は、過酸化脂質の定量に供した。なお、Fe-NTA溶液は、前報⁴⁾に従いFe相当量0.5mg/mlに調製して試験に供した。

5. 血中及び腎臓中の過酸化脂質の定量

血中及び腎臓中の過酸化脂質は、チオバルビツール酸を用いた方法により各々蛍光法及び比色法により定量した⁴⁾。

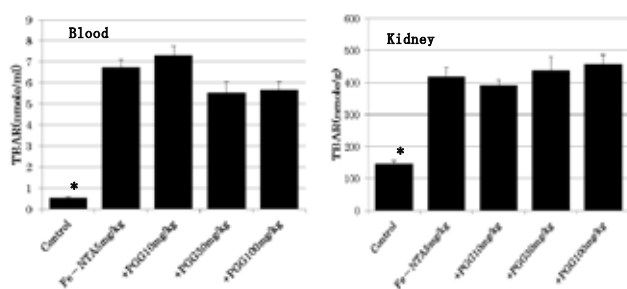


Fig. 1 Effect of pentagalloylglucose on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of pentagalloylglucose 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

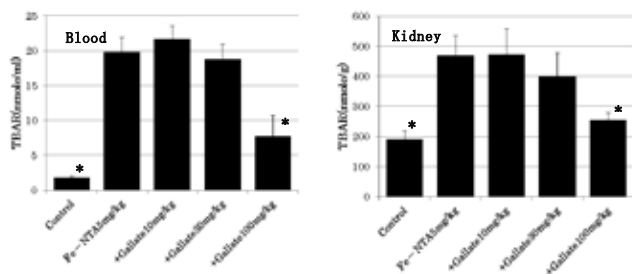


Fig.3 Effect of gallic acid on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of gallic acid 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

6. 統計処理

実験結果は、平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、One-way-ANOVAとDunnett's testによる多重比較を用いて行い、有意水準は5%とした。また、表の測定値の有意差検定は、Student's t-testにより行った。

実験結果

1. 酸化ストレス誘発マウスに対するPGG及びカテキンの効果

Fe-NTA投与により誘発した酸化ストレスマウスにおける脂質過酸化を指標に、PGG及びカテキンの効果を検討した。その結果、腎臓中の過酸化脂質の生成は、Fe-NTA投与により約3倍に上昇したが、PGG100mg/kgの投与においても有意な変化は見られなかった。また、血中の過酸化脂質は、Fe-NTA投与により約12.7倍に上昇したが、

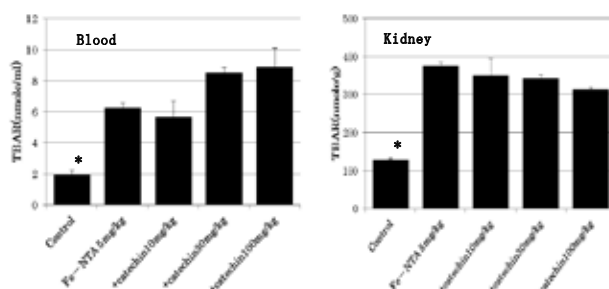


Fig.2 Effect of catechin on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of catechin 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

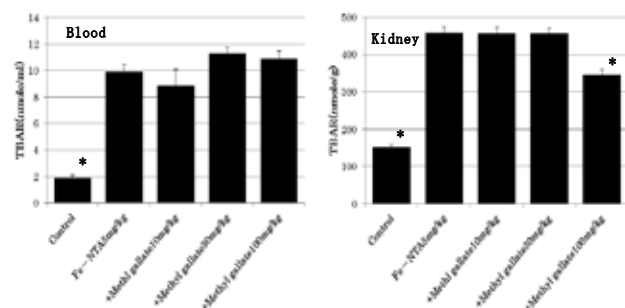


Fig.4 Effect of methyl gallate on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

Mice were administered perorally with 3 doses of methyl gallate 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each column shows the mean±SE of 5 mice. *:Significantly different from Fe-NTA.

PGG30及び100mg/kgの投与時には若干の減少傾向を示すのみであった (Fig. 1). 一方, カテキン100mg/kgの投与時においても, 腎臓中及び血中の過酸化脂質の生成には有意な変化は認められなかった (Fig. 2).

2. 酸化ストレス誘発マウスに対する没食子酸及び没食子酸メチルの効果

次に, 同モデルを用いて没食子酸及び没食子酸メチルの効果を検討した. その結果, 没食子酸100mg/kg投与時には, 腎臓中及び血中の過酸化脂質の生成が有意に抑制された (Fig. 3). 一方, 没食子酸メチルの場合は, 高用量の投与時において腎臓中の過酸化脂質生成が抑制された (Fig. 4).

3. 酸化ストレス誘発マウスに対するシャクヤクエキスの効果

次に, 薬用のシャクヤクとしてとして汎用されている梵天エキスについて, 酸化ストレスの動物モデルに投与して有効性を評価した. その結果, エキス1g/kgを経口投与した場合, 血中の過酸化脂質生成が有意に抑制された. また, 腎臓中の過酸化脂質においても低下傾向が認められた (Table).

考 察

天然物には活性酸素の消去能を有する化合物が多く知られているが, 試験管レベルで効力比較をなされている例が多い. 先に, 我々はシャクヤクエキス及びその中に含まれる代表的な成分の抗酸化能を試験管レベルで検証した結果, シャクヤクの品種及びそれぞれの成分ごとに効力に差のあることを報告した³⁾. 今回, 抗酸化性物質の評価系として有効であると既に報告している鉄キレート剤投与による酸化ストレスモデル⁴⁾を用いて, シャクヤクの代表品種である梵天のエキス及びシャクヤク含有成分について有効性を評価した.

今回用いた梵天エキスのジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) 還元能は, 22.9 μ g/mlと先に報告した平成21

年度収穫の梵天の34.6 μ g/ml³⁾より強いことを確認している. このエキスを1g/kg2回投与した時, 酸化ストレスマウスにおける血中の過酸化脂質生成が有意に抑制された. また, 腎臓中の過酸化脂質生成も抑制傾向が認められた. シャクヤクエキスには, 虚血に対する心筋保護作用⁶⁾や糖尿病に伴う腎障害⁷⁾に対して予防効果を示すことが報告されており, その作用機序として活性酸素の消去能及び生体内の抗酸化酵素の維持・活性上昇が関与することが指摘されている. 今回用いた梵天エキスには, 抗酸化成分としてよく知られているPGGの他, 没食子酸及びそのメチル体, そしてカテキンが含まれることが既に報告⁵⁾されており, 今回認められた酸化ストレスに対する保護効果は, これらの抗酸化成分に起因するものと考えられる.

そこで, シャクヤクエキスに含まれる4種の抗酸化性成分の酸化ストレスモデルに対する有効性を検討した. その結果, DPPH還元能の最も強かったPGG100mg/kg投与では脂質過酸化に対して有意な変化は認められず, 血中の過酸化脂質生成が高用量で若干の抑制傾向が認められるのみであった. また, 4種の抗酸化成分の中では効力が最も低いカテキン100mg/kg投与でも有意な変化は認められず, 高用量で腎臓中の過酸化脂質生成が若干抑制される傾向が, また, 血中では若干増加する傾向が認められた. PGGが, 試験管内では比較的強い抗酸化能を有することはAbdelwahedら⁸⁾も報告しているが, 特に, 動物に経口投与した場合のバイオアベイラビリティは悪いことが示唆されており, 水に対する難溶性及び消化管粘膜での代謝などに起因することが推察されている⁹⁾. このため, 生体に投与した場合には活性酸素の消去能が減弱したものと考えられる. また, カテキンについては, ヒトや動物で吸収される事が報告されおり¹⁰⁾, 今回, 有意な効果が見られなかったのは, 投与量が低かったこと, あるいは代謝による効果減弱などが考えられる. さらに, カテキンには, 濃度によっては活性酸素消去能あるいは活性酸素生成の促進効果の相反する作用を示す場合が知られており, このことも関与しているかもしれない^{11, 12)}.

次に, 没食子酸及びそのメチル体の酸化ストレスモデ

Table Effect of peony extract on lipid peroxidation in mice treated with Fe-NTA

	Dose	Blood	Kidney
		TBAR(nmole/ml)	TBAR(nmole/g)
Control		2.01 \pm 0.39 ^{***}	245 \pm 12.4 ^{***}
Fe-NTA	5mg/kg(Fe)	18.1 \pm 1.10	588 \pm 26.8
+Bonten extract	1g/kg	14.8 \pm 0.35 ^{**}	530 \pm 7.05

Mice were administered perorally with Bonten extract(1g/kg) 2 times 4 and 0.5hr before the intraperitoneal injection of Fe-NTA. Mice were sacrificed 1hr after the injection with Fe-NTA.

Each value shows the mean + SE of 5 mice.

,*:Significantly different from Fe-NTA at p< 0.01, 0.001

ルに対する効果を検討した。既報³⁾で、試験管内における没食子酸の抗酸化能は、没食子酸メチルに比べて約1.5倍強く、今回の動物モデルにおいても、血中及び腎臓中の過酸化脂質生成を100mg/kg投与時に有意に抑制した。また、メチル体では、腎臓中の過酸化脂質生成のみ抑制された。没食子酸は、比較的水に可溶であり、ラットではあるが経口投与後すみやかに吸収され、100mg/kg投与時には、静脈血中の没食子酸濃度は投与後3時間までは1 µg/ml以上の濃度が維持されることが報告されている¹³⁾。マウスでも同様の体内動態、血中濃度変化と想定すれば、試験管内の効力から考えると十分な抗酸化能を発現しているものと推察される。一方、没食子酸メチルは、抗酸化能が弱く、また、没食子酸に比べて疎水性であるため、血中及び腎臓中の局在濃度に違いがあると思われる。ことが有効性の差の原因の一つであるとも考えられる。抗酸化剤として食品添加物として利用されている没食子酸プロピルは、肝細胞のエステラーゼにより分解され、没食子酸を生成することが報告されている¹⁴⁾。没食子酸メチルにおいても、吸収された後肝臓において没食子酸に変換されることが考えられるが、吸収効率に差がある可能性もあると思われる。

今回、シャクヤクエキスに含まれる抗酸化成分4種の酸化ストレス動物モデルを用いて有効性を評価した結果、没食子酸及びそのメチル体100mg/kg投与時に過酸化脂質生成が抑制されることが明らかとなった。今回調べた梵天エキス中の両成分の含有率は各々0.17%及び1.24%であり、マウスへのシャクヤクエキス1g/kgの投与で認められた酸化ストレスの抑制効果は、これらの成分のみでは効果を説明できないものと思われる。酸化ストレスモデルに対するシャクヤクエキスの改善効果は、エキスに含まれる抗酸化性の多成分による複合効果あるいは未検出成分に起因するものと推察される。

参考文献

- 1) 抗酸化物質 (二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真編集), 学会出版センター (1995)
- 2) フリーラジカルと和漢薬 (奥田拓男, 吉川敏一編集), 国際医書出版 (1990)
- 3) 松永孝之, 横田洋一, 田村隆幸, 田中彰男: シャクヤクの品種別薬理試験 (1) シャクヤクエキスにおける抗酸化作用, 富山県薬事研究所年報, **38**, 17-20 (2011)
- 4) 松永孝之: 酸化ストレス病態動物における抗酸化物質の効力の比較検討, 富山県薬事研究所年報, **40**, 17-21 (2013)
- 5) 横田洋一, 高橋敏, 寺崎さち子, 田村隆幸, 松永孝之: シャクヤクの品種別成分分析 (1), 富山県薬事研究所年報, **39**, 61-68 (2012)
- 6) Luo, C., Wang, H., Chen, X., Cui, Y., Li, H., Long, J., Mo, X. and Liu, J.: Protection of H9c2 rat cardiomyoblasts against oxidative insults by total paeony glucosides from Radix Paeonia Rubrae, *Phytomed.*, **21**, 20-24 (2013)
- 7) Su, J., Zhang, P., Zhang, J.-J., Qi, X.-M., Wu, Y.-G. and Shen, J.-J.: Effects of total glucosides of paeony on oxidative stress in the kidney from diabetic rats, *Phytomed.*, **17**, 254-260 (2010)
- 8) Abdelwahed, A., Bouhlel, I., Skandrani, I., Valenti, K., Kadri, M., Guiraud, P., Steiman, R., Mariotte, AM., Ghedira, K., Laporte, F., Dijoux-Franca, MG., Chekir-Ghedira, L.: Study on antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6-pentagalloylglucose from Pistacia lentiscus, Confirmation by microarray expression profiling, *Chem. Biol. Interact.*, **165**, 1-13 (2007)
- 9) Zhang, J., Li, L., Kim, S.-H., Hagerman, A.E. and Lu, J.: Anti-cancer, antidiabetic and other pharmacological and biological activities of penta-galloyl-glucose, *Pharm. Res.*, **26**, 2066-2080 (2009)
- 10) 茶の機能 (村松敬一郎, 小国伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本万里編集), 学会出版センター (2002)
- 11) Lapidot, T., Walker, MD. And Kanner, J.: Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells in vitro, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7220-7225 (2002)
- 12) Chedea, V.S., Braicu, C., Chirila, F., Ogola, H.J.O., Pelmus, R.S., Calin, L.G. and Socaciu, C.: Antioxidant/prooxidant and antibacterial/probacterial effects of a grape seed extract in complex with lipoxygenase, *Biomed. Res. Internat.*, **2014**, 1-9 (2014)
- 13) Zong, L., Inoue, M., Nose, M., Kojima, K., Sakaguchi, N., Isuzugawa, K., Takeda, T. and Ogihara, Y.: Metabolic fate of gallic acid orally administered to rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 326-329 (1999)
- 14) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S. and Moldeus, P.: Metabolism and cytotoxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes: effects of a thiol reductant and an esterase inhibitor, *Mol. Pharmacol.*, **47**, 1021-1027 (1995)