

福井県産等生薬由来のROS消去活性を持つ抗酸化物質の探索

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-04-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 黒川, 洋一 メールアドレス: 所属:
URL	https://fpu.repo.nii.ac.jp/records/284

[研究論文]

福井県産等生薬由来の ROS 消去活性を持つ抗酸化物質の探索

黒川 洋一

1. 緒言

好氣的環境に生育する生物は、すべからく酸化ストレスに晒されて生きている。分子状酸素より生じる反応性の高い分子群である活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は代表的な酸化ストレスであり、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシルラジカル、一重項酸素が知られている¹⁾。過剰なROS、特にヒドロキシルラジカルは生体高分子 (タンパク質や遺伝子、生体膜など) に酸化的障害を与えたり、細胞毒性や各種生活習慣病の要因となったりするほか、老化にも関わると想定されている²⁻⁴⁾。抗酸化物質には、このような「酸化ストレス」に関わる各種生活習慣病のリスクを低減する効果が期待されており、健康長寿やヘルスケア、医療等の多様な観点から注目される。しかしながら、抗酸化物質には、ROSの発生を促進し、ROSが関与する不均化反応により酸化物を生じるという一見矛盾するような事例²⁾もあることから、抗酸化物質をヘルスケアなどの分野で活用するには注意が必要である⁵⁻¹¹⁾。抗酸化能およびROS発生能という「二面性を有する」有名な抗酸化物質の例では、アスコルビン酸 (ビタミンC) や、ケルセチン、カテキンなどのポリフェノール性抗酸化物質等が報告されている¹²⁻¹⁴⁾。抗酸化物質によるROSの発生は、その抗酸化物質の還元能に依存する。著者は、「生体高分子の酸化」を防ぐ「低プロオキシダント性抗酸化物質」を探索するために、「銅イオン還元能」および、プラスミドDNA切断活性を指標とした「ヒドロキシルラジカル発生能力」、「ルミノール化学発光阻害活性アッセイ」を併用する方法を提唱した⁹⁻¹⁰⁾。また、ヒトの健康改善に貢献する可能性を持つ低プロオキシダント性抗酸化物質をゴマ由来成分に見出している¹⁵⁾。ゴマ由来成分Sesaminolは、リグナンであるSesaminが水酸化されて生じる代謝物であるが、興味あることに、ルミノール化学発光抑制能を指標とした抗酸化能は、Sesamin には検出されず、Sesaminolに認められた。Sesaminolは、アルコール過多マウスに投与すると、腸管での酸化ストレス生成および腸管炎症を抑制した¹⁵⁾。低プロオキシダント性抗酸化物質は、酸化ストレスを原因とする疾患の発症を予防する可能性が期待される。

受付日 2022.11.01

受理日 2022.12.22

所属 福井県立大学生物資源学部

ところで、抗酸化能を持つ農産物や生薬等由来の素材には、経験的に使われてきた物が多いが、特筆すべきことに、現代科学の手法によって、これらの農産物や生薬の抗酸化能が証明され、経験的な利用の合理性が判明している。例えば、東洋医学で経験的に用いられてきた生薬では陳皮、甘草、生姜、蘇葉など、米国ガン予防プロジェクトでガン予防に有効とされた食材では甘草、生姜、ウコン、柑橘類、ハーブなど、そして、現在の医療現場で用いられる漢方薬（放射線療法の半夏瀉心湯、ガン患者の手術後の体力回復に用いられる補中益気湯など）では人參（オタネニンジン）、甘草、大棗、生姜、陳皮などが知られている。これらの農産物や生薬の共通する効能として抗酸化能が想定されている。本項では以降、オタネニンジンのことを人參と称する。

農産物や生薬の抗酸化能を評価する上で、酸化ストレスの発生法を統一することと、抗酸化能には多様な評価方法があることを踏まえた上で、統一した尺度での抗酸化能の評価を行うことが望まれていた。生薬等の抗酸化能の評価においては、①酸化ストレスの発生方法（放射線、紫外線などの物理的方法、または、遷移金属イオンを用いた化学的方法）、および、②抗酸化能の評価方法（ESR、その他分光学的手法など）の組み合わせによっては異なる結果が導かれることがあったため、本稿では鉄イオンよりもヒドロキシルラジカルを発生しやすいことが報告されている銅イオン^{1, 12)}を用いたフェントン反応を酸化ストレス発生法とし、ヒドロキシルラジカル発生法、および同ラジカル消去法など、種々の検出系を組み合わせた同一の手法を用いて、農産物や生薬の抗酸化能などを評価することとした。

本稿では、福井県産の生薬（人參、知母、黄蓮、芍薬、当帰、甘草）を対象として、プロオキシダント能および抗酸化能を解析することを第一の目的とし、黄蓮、甘草におけるヒドロキシルラジカル消去能に関わると考えられる成分の抗酸化能を評価することを第二の目的とした。その結果、いくつかの報告によりヒドロキシルラジカル消去能が報告されていた甘草含有成分Glycyrrhizin¹⁶⁾には本ラジカル消去能は検出されず、脂肪組織の繊維化に伴う炎症を抑制することが報告された甘草含有成分カルコンIsoliquiritigenin¹⁷⁾に高い抗酸化能を見出したので、以下報告する。

2. 材料と方法

2-1. 材料

「試薬」

銅 (I) イオン特異的指示薬Bathocuproine disulphonate (BCS)¹⁸⁾、ルミノールは、Sigma-Aldrich社より購入した。プラスミドDNA pBR322は、New England Biolab社より購入した。塩化銅 (II) 六水和物CuCl₂ · 6H₂Oは、富士フィルム和光純薬より購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO) はナカライテスク社より購入した。メトホルミン塩酸塩、イソリキリチゲニン、

グリチルリチンは東京化成より、塩化ベルベリン n 水和物は富士フィルム和光純薬より、それぞれ購入した。その他の試薬は、東京化成、富士フィルム和光純薬、ナカライテスクまたはシグマより購入した。

「農産物抽出物」

福井県産生薬の植物体（人参、知母、黄蓮、芍薬、当帰、甘草）は、越前夢ファーム（あわら市）で栽培された物をご供与いただいた（2016年5月採集）。生薬（人参、黄蓮、甘草）は比較対象のため、高砂薬業、ウチダ和漢薬などで市販入手可能な物（乾燥体）も購入して用いた。

福井県産生薬の植物体は、土を落として水でよく洗浄した後に、生の葉あるいは根などに切り分けた後、市販フードドライヤー（丸隆社）において40-70℃で24時間以上乾燥させた。生薬の乾燥試料については、以下のように、甘草、黄蓮などの生薬成分、あるいは漢方薬エキスの抽出溶媒として広く使われるDMSO^{19, 20)}を用いて抽出物を調製した。DMSOは、フェノール性抗酸化物質のような脂溶性化合物を効率よく抽出できると考えられる。上記の方法で乾燥させた福井県産生薬あるいは市販生薬は、食品用粉碎装置であるフォースミル（大阪ケミカル社）で均一に粉碎した後、1 mgあたりDMSO 1 mlを加えて室温でボルテックス（5分間）および、超音波洗浄機（パソリナ社USC-1）による超音波抽出（5分間）に供した後、不溶物がある場合にはデカンテーションまたは遠心（20,000×g、室温、5分間）を行って、上清を抽出液とした。得られたいずれの抽出物も、4℃で冷蔵保存した。

2-2. 方法

2-2-1. 「銅イオン還元能アッセイ」

銅イオン還元能は、既報に従い¹⁰⁾、銅 (I) イオン指示薬Bathocuproine の水溶性を改善したBCS¹⁸⁾を用いて評価した。最終濃度0.5 mM BCS、0.1 mM塩化銅 (II) を50 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) を用いて調製し、96穴プレート（ファルコン社）上で、37℃、30分間、試験サンプル (0.1 mg/ml) と反応させた（3連ずつ）。対照として、抽出物の代わりに、最終濃度0.1 mMのケルセチンを含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした。銅イオン還元が起こった場合には、BCS-Cu (I) 錯体形成の指標である480 nmでの吸光度が増加した。その後、モレキュラーデバイス社製プレートリーダーを用いて、480 nmの吸光度を測定し、バッファーのみ（ブランク）の吸光度を差し引いて、値を求めた。各サンプルとも3連で実験を行い、平均値と標準偏差を算出し、既報¹⁰⁾に従ってAbs₄₈₀の値が0.1以上を示した場合、銅イオン還元能があると判断し、各抽出物の銅イオン還元能の強さを、以下のようにH-Lの4段階に分類した。

H: Abs₄₈₀ 0.3以上

HM: Abs₄₈₀ 0.2以上0.3未満

LM : Abs₄₈₀ 0.1以上0.2未満

L : Abs₄₈₀ 0.1未満

2-2-2. 「Plasmid nicking assay」

Aruoma らの方法¹²⁾ に従い、ヒドロキシルラジカルの発生に伴うプラスミドDNAの酸化的切断を評価した。最終濃度50 mMリン酸ナトリウム-150 mM NaClバッファー (pH7.4) 中に、プラスミドDNA pBR322 100 ng、塩化銅 (II) (最終濃度0.2 mM)、および試験抽出物 (0.1 mg/ml) を加えて反応溶液 (総体積20 μ l) とし、マイクロチューブ内で、37°C、60分間、水槽でインキュベートした。対照として、抽出物の代わりに、塩化銅 (II) (最終濃度0.2 mM) およびアスコルビン酸 (最終濃度0.1 mM) を含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした (プラスミドDNAの酸化的分解が起こることを確認した)。反応終了後、10 μ lを分取して、1%アガロースゲルにアプライし、100V、40分間電気泳動に供した後、エチジウムブロマイド染色を行い、ゲルイメージングシステム FAS-IV (Nippon Genetics) を用いて短波長紫外線 (260 nm) 照射下でDNAの観察および撮影を行った。DNAの切断は、以下の構造変化¹¹⁾ を指標として判定した。

閉環状 (covalently closed circular; ccc) : 非酸化型プラスミドDNA

閉環状 (nicked) : 閉環状の二本鎖DNAの一箇所が切断された物

直線状 (linear) : さらに、もう一方のDNA鎖も切断された物

分解 : 酸化がさらに進行し、プラスミドDNA全体が分解され、電気泳動上ではバンドとして確認されなくなる

2-2-3. 「ルミノール化学発光阻害活性アッセイ」

ヒドロキシルラジカル発生に伴うルミノールの化学発光を阻害する能力は、Parejoらの方法²¹⁾ により評価した。最終濃度50 mMホウ酸-水酸化ナトリウムバッファー (pH9.0) 中で、最終濃度0.01 mMルミノール、0.1 mM塩化銅 (II)、1.0 mM過酸化水素、および試験抽出物 (0-0.1 mg/ml) の条件で、室温、5分間インキュベートした (96穴プレート (ファルコン社) を用い、いずれも3連ずつ)。対照として、抽出物の代わりに、最終濃度1 mMのEDTAを含む条件でも実験を行い、ポジティブ・コントロールとした (ルミノールの化学発光が阻害されることを確認)。その後、モレキュラーデバイス社製プレートリーダーを用いて、上記の反応液の450 nmの化学発光を測定し、平均値と標準偏差を求めた。抽出物に含まれる抗酸化物質によりヒドロキシルラジカルが捕捉されると、ルミノールの化学発光は阻害されることから、抽出物のルミノール化学発光阻害を調べることで、そのヒドロキシルラジカル捕捉活性を評価することができる。化学発光阻害率は、以下のように求めた。塩化銅および過酸化水素を酸化剤とし、Fenton様

反応によりヒドロキシルラジカルが発生する条件下で実験を行った。

阻害率 =

$$\frac{\{(\text{酸化剤添加時のルミノール化学発光値}) - (\text{酸化剤} \cdot \text{試験抽出物添加時のルミノール化学発光値})\}}{\{(\text{酸化剤添加時のルミノール化学発光値}) - (\text{酸化剤非添加時のルミノール化学発光値})\}} \times 100$$

3. 結果

3-1. 抽出物の銅イオン依存性プラスミド DNA ニック化促進能の評価

検討した抽出物のうち、代表的な物の結果を図1に示した。解析対象とした抽出物について、銅イオン存在下でのプラスミドDNA切断活性を調査し、以前の報告¹⁰⁾と同様に、プラスミドDNA切断を10%以上進行させた場合を、ROS発生能ありと定義した。

図1では銅イオンと抽出物存在下でプラスミドDNAをインキュベートした後、アガロース電気泳動に供したところ、人参、知母、黄蓮では0.1 mg/mlでは酸化型である開環状や直線状は検出されなかった(図1レーン3-9)が、芍薬(図1レーン13)、当帰(図1レーン17、19)、甘草(図1レーン23、25)では開環状や直線状が検出されたことから、これらの抽出物にはヒドロキシルラジカル発生能があるとした。当帰では、根より調製した試料では同ラジカル発生能は検出されなかった(図1レーン15)が、葉より調製した試料では、試料の乾燥方法(加熱あるいは天日)に関わらず、同ラジカル発生能が検出された(図1レーン17、19)。同様に、甘草では、根より調製した試料では同ラジカル発生能は検出されなかった(図1レーン21)が、葉より調製した試料では、強い同ラジカル発生能が検出された(図1レーン23)。甘草の市販

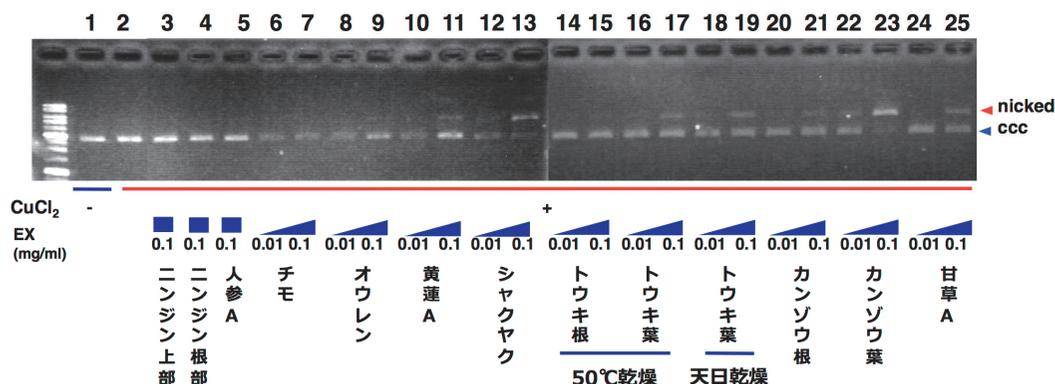


図1 各種生薬抽出物のプラスミドDNA切断能

プラスミドDNA pBR322 (100 ng) を 50 mM リン酸ナトリウム-150 mM NaCl バッファー (pH7.4) 中で、塩化銅 (II) 0.2 mM および図に示した濃度の各抽出物と共に 37°C、1 時間インキュベートした。その後、1% アガロースゲルにアプライし、100V、40 分間電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線照射下で撮影した。ccc は閉環状型、nicked は開環状型を表す。「A」と明記した物は、市販の生薬を表す。実験は少なくとも 3 回行い、代表的なデータを示した。

品由来の抽出物でも、同ラジカル発生能は検出された（図 1 レーン25）。

3-2. 銅イオン還元能の評価

表 1 では抽出物の供試濃度 0.1 mg/ml において、BCS を指示薬として銅イオン還元能を検討したところ、一価の銅イオン生成に伴う BCS-Cu (I) 錯体の形成を示す Abs₄₈₀ は人参、知母では 0.1 未満であった (L) が、当帰、甘草、黄蓮では 0.1 以上 0.2 未満 (LM)、芍薬では 0.3 以上 (H) であった (表 1)。

以上をまとめると、ニンジン、知母は「銅イオン還元能」「ヒドロキシルラジカル発生能」とともに検出されなかった。黄蓮では「銅イオン還元能」は検出されたが、「ヒドロキシルラジカル発生能」は検出されなかった。当帰、甘草、芍薬では「銅イオン還元能」「ヒドロキシルラジカル発生能」とともに検出された。

表 1 各種生薬抽出物の銅イオン還元能、プロオキシダント能、抗酸化能の一覧表

	人参	当帰	甘草	黄蓮	知母	芍薬
①銅イオン還元能(Abs ₄₈₀)	0.02 ± 0.001 L	0.12 ± 0.001 LM	0.19 ± 0.002 LM	0.12 ± 0.005 LM	0.06 ± 0.002 L	0.31 ± 0.002 H
②抗酸化能 Limino!発光阻害 (%)	24.9 L	62.0 M	75.1 H	58.8 M	29.3 L	91.4 H
③Pro-oxidant 活性酸素種発生能	n.d	+	+	n.d	n.d	+

①銅イオン還元能の指標である Abs₄₈₀ (上段：平均値と標準偏差値、下段：Abs₄₈₀ に基づく抽出物の銅イオン還元能の程度分類 H：Abs₄₈₀ 0.3 以上、HM：同 0.2 以上 0.3 未満、LM：同 0.1 以上 0.2 未満、L：同 0.1 未満)、②ルミノール化学発光抑制率 (上段：抑制率 (%)、下段：ルミノール化学発光抑制能に基づく抽出物の抗酸化能の程度分類 H：抑制率 70% 以上、M：同 30% 以上 70% 未満、L：30% 未満)、③プラスミド DNA pBR322 のニック化を指標としたプロオキシダント活性の有無 (n.d.: 検出されず、+:10% 以上) を示す (それぞれ最終濃度 0.1mg/ml で測定した値を示す)。

3-3. 抽出物のルミノール化学発光阻害活性

ついで、抽出物の供試濃度を 0.1 mg/ml として、銅イオンおよび過酸化水素存在下で増大するルミノール化学発光を抑制する能力を評価した (表 1)。人参、知母では、ルミノール化学発光抑制率は 30% 未満であり、当帰、黄蓮では約 60% と中程度、甘草、芍薬では約 90% と高い効果を示した (表 1)。

以上の結果より、人参、知母は「銅イオン還元能」「ヒドロキシルラジカル発生能」「ルミノール化学発光抑制能」がいずれも低いことが分かった。当帰、黄蓮では「銅イオン還元能」を持つものの、「ルミノール化学発光抑制能」は中程度であると分かった。甘草、芍薬では「銅イオン還元能」「ヒドロキシルラジカル発生能」「ルミノール化学発光抑制能」のいずれも高いことが分かった。換言すると、人参、知母は「低プロオキシダント性かつ、低抗酸化性」、当帰、黄蓮は「低プロオキシダント性かつ、中程度の抗酸化性」、甘草、芍薬は「高プロオキシダント性かつ、高抗酸化性」であると評価できる。

ト性かつ、高抗酸化性」であると示唆された。

3-4. 抽出物含有成分のルミノール化学発光阻害活性

ついで、中程度の抗酸化能を示した黄蓮、高い抗酸化能を示した甘草について、それぞれの成分であるベルベリン (berberine) (黄蓮)、イソリキリチゲニン (isoliquiritigenin; ILQ)、グリチルリチン (glycyrrhizin) (いずれも甘草) の抗酸化能の指標であるヒドロキシルラジカル消去能を、ルミノール化学発光抑制能を指標として調べることにした。対照として、2型糖尿病の治療薬として使われ、ヒドロキシルラジカル消去能が報告されているメトホルミン^{22, 23)}を用いることにした。なお、berberine、脂肪組織の炎症抑制効果が報告されたILQにはヒドロキシルラジカル消去能は報告されておらず^{22, 17)}、glycyrrhizinのヒドロキシルラジカル消去能は報告によって大きく異なった^{16, 25-27)}。

図2ではその結果を示す。メトホルミン、berberineのルミノール化学発光抑制率は、100 μ Mでは約40%、1000 μ Mでは100%以上であったことから、ヒドロキシルラジカル消去能が報告されていなかったberberineには、メトホルミンと同程度の同ラジカル消去能があると推測された。glycyrrhizinの抑制率は、100 μ Mでは約40%であったが、1000 μ Mでは約20%に

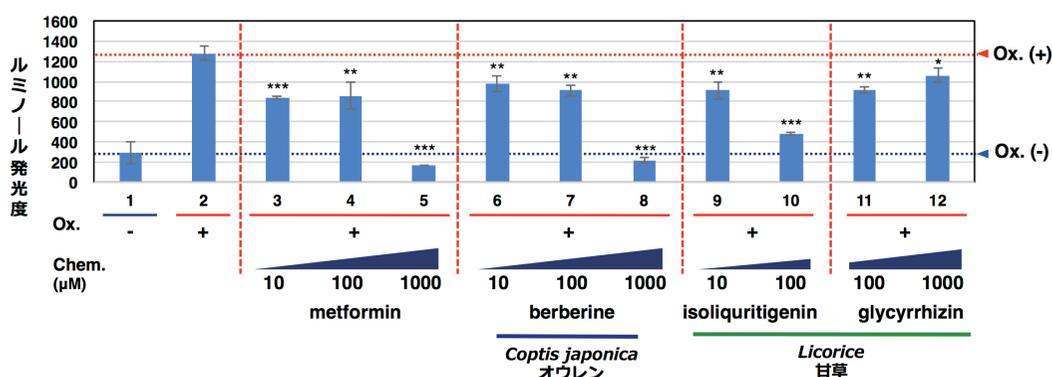


図2 各種化合物のルミノール化学発光抑制能

ルミノール (0.01 mM) を 50 mM ホウ酸-水酸化ナトリウムバッファー (pH9.0) 中で、酸化剤 (Ox) (0.1 mM 塩化銅 (II)、1.0 mM 過酸化水素)、および図に示した濃度の化合物と共に室温で、5 分間インキュベートした (96 穴プレート)。450 nm における化学発光を測定し、平均値と標準偏差を求めた (n=3)。グラフ右の「Ox.(+)」は酸化剤 (塩化銅および過酸化水素) を加えた場合の化学発光強度、「Ox.(-)」は酸化剤を加えない場合の化学発光強度を表す。berberine は黄蓮 (オウレン) に、isoliquiritigenin、glycyrrhizin は甘草 (カンゾウ) に含まれる。T 検定を行ない、* (p<5%)、** (p<1%)、*** (p<0.1%) で示したサンプルは有意差が認められた。

低下したことから、glycyrrhizinの抗酸化能は限定的だと考えられた。対照的に、ILQの抑制率は、10 μ Mでは約40%、100 μ Mでは約80%であった (図2)。従って、ILQのルミノール化学発光抑制能、すなわち、ヒドロキシルラジカル消去能は、調べた化合物の中で最も高いと考えられた (図2)。

4. 考察

本研究では、経験的に医薬として使われてきた生薬について、その銅イオン還元能およびプラスミドDNA切断能に基づいたプロオキシダント能評価を行うと共に、ルミノール化学発光阻害活性に基づく抗酸化能評価を組み合わせることで、各抽出物の抗酸化能およびプロオキシダント能を簡便に評価することを第一の目的とした。これにより、低プロオキシダント性かつ抗酸化性の生薬抽出物を簡便に見出すことが可能となる。このような性質を持つ生薬は、ヒドロキシルラジカルが関与する生体高分子の酸化、あるいは酸化ストレスにより引き起こされるような疾患を抑制する上で有用と期待される。第二の目的としては、生薬に含まれる成分（今回は、黄蓮、甘草由来の成分であるberberine（黄蓮由来）、ILQ、glycyrrhizin（共に甘草由来）を対象とした）の抗酸化能を解析し、生薬抽出物の抗酸化能との関係を考察することである。以下、本研究結果の妥当性について順を追って論じる。

4-1. 銅イオンを用いたヒドロキシルラジカル発生系、プラスミド DNA の切断を指標とした本ラジカル検出系の妥当性

本研究では、ヒドロキシルラジカルの発生系として、銅イオンおよび過酸化水素よりなるFenton反応試薬を用いた化学的手法を適用した。メトホルミンのヒドロキシルラジカル消去能を評価した報告^{21, 23)}では、 γ 線照射による物理的手法を用いている。生体内などにおける、生理的な条件下での同ラジカル発生を念頭におく場合には、化学的手法の方が簡易であると考えられる。また、glycyrrhizinのヒドロキシルラジカル消去能を評価した報告¹⁶⁾では、 γ 線照射あるいは紫外線照射による物理的手法の他に、鉄（II）イオンおよび過酸化水素を用いた化学的手法を用いている。この系はFenton反応のモデル反応として広く使われているが、本反応において触媒として用いられる鉄イオンは、理論的には高い酸化還元能力を有するものの、水酸化物を形成しやすいため、実際の反応性に乏しいことが報告されている^{1, 12)}。Fenton反応では、遷移金属イオンの中でも銅イオンが高いROS発生能を示すことが報告されている^{1, 12)}ことから、本研究においてもヒドロキシルラジカルの発生系としては、銅イオンおよび過酸化水素を用いている。本系は、簡便かつ生理的な条件下で本ラジカルを発生させるのに優れていると考えられる。

また、本研究では、ヒドロキシルラジカルの検出法として、プラスミドDNAの酸化的切断を指標にして評価を行った。本方法は、反応の確実さと、疎水性化合物を標的にする際に用いられる有機溶媒による影響を受けにくいことで有利と考えられる。すなわち、本法は、ラジカルトラップ剤を用いる場合と比較して時間はかかるが、プラスミドDNAが化学的に発生したヒドロキシルラジカルと、速やかに反応して、その構造変化を起こしやすいと考えられる。次に、ヒドロキシルラジカルの検出に用いられるCoumarin-3-carboxylic acid (3CCA)²⁸⁾などの

蛍光性低分子化合物は、エタノールやDMSOなどの極性有機溶媒による妨害を受ける²⁹⁾。従って、有機溶媒で調製する必要がある疎水性化合物の抗酸化能の評価は、3CCAを用いた系では困難である。対照的に、プラスミドDNAを用いた系では、有機溶媒に溶解させた疎水性化合物の評価を行うことが可能であり、ルミノールの化学発光を指標とした抗酸化能の評価を行う場合でも、同様に有機溶媒に溶解させた疎水性化合物の評価を行うことが可能であった。従って、本研究で用いた、プラスミドDNAの酸化的切断を指標にしたプロオキシダント能評価法と、ルミノールを用いた抗酸化能評価法は、極性溶媒であるDMSOに溶解させた疎水性化合物や、それらを含む抽出物にも適用可能と考えられた。

4-2. 高抗酸化性、高プロオキシダント性の抽出物について

芍薬、甘草抽出物が高抗酸化性および高プロオキシダント性を持つと考えられる。芍薬、甘草抽出物に、抗酸化性、プロオキシダント性それぞれを付与すると考えられる化合物について、以下考察する。

芍薬の代表的な成分としては、モノテルペン配糖体であるpaeoniflorin³⁰⁾などが知られている。本化合物は、ヒドロキシルラジカル消去能を有することが報告されており³⁰⁾、芍薬抽出物の抗酸化性を与えると考えられる。一方、高プロオキシダント性を与える成分については報告がなく、今後の研究が必要である。

甘草の代表的な成分としては、ILQ、glycyrrhizinがある。ILQに関しては抗酸化能またはプロオキシダント能に関する報告は見当たらず、本研究においてヒドロキシルラジカル消去能を持つことが示唆された。glycyrrhizinに関しては、前述したように、ヒドロキシルラジカル消去能を持つとする報告^{15, 25, 27)}と、持たないとする報告²⁶⁾の両方が存在した。本研究の結果からは、glycyrrhizinのヒドロキシルラジカル消去能は検出されなかった。本化合物がヒドロキシルラジカル消去能を持つとする報告^{15, 25, 27)}では、いずれも、ラジカル発生源として鉄イオンを用いており、本研究で用いた銅イオンとは異なる方法を適用していたことが、異なる結果が得られた理由かも知れない。以上より、甘草抽出物においてILQはヒドロキシルラジカル消去能を与える化合物であると考えるのが妥当である。甘草抽出物のプロオキシダント能は、どのような化合物によるものか本研究では明らかにできなかったため、今後の解明が待たれる。

4-3. 中程度抗酸化性、低プロオキシダント性の抽出物について

当帰、黄蓮抽出物は中程度抗酸化性および、低プロオキシダント性を持つと考えられる。当帰、黄蓮の主成分としては、それぞれ、bergaptenなどのクマリン誘導体、berberineなどのアルカロイド誘導体が知られている。bergaptenは、ROSを発生するプロオキシダント性を持つとする報告³¹⁾、ROS発生に伴う炎症を抑制するとの報告³²⁾事例がある。当帰の低プロオキシダント

性を合理的に説明できる化合物の報告は見当たらず、今後、その実態を担う化合物の同定が必要となる。本研究の結果において、berberineがヒドロキシルラジカル消去能を持つと示唆されたことは、Choiらにより、berberineはヒドロキシルラジカル消去能は高くないが、スーパーオキシドアニオン消去能を持つと示唆されている²⁴⁾こととは相反する。その想定される理由は、ヒドロキシルラジカル消去能の評価方法によると考えられる。すなわち、Choiらは、硫酸銅およびアスコルビン酸をヒドロキシルラジカル発生源とし、cytochrome cの吸収スペクトル変化を指標とした方法で同ラジカルの消去能を評価し、berberineには同ラジカルの消去能は低いとしている²⁴⁾。しかし、cytochrome cはヒドロキシルラジカルだけではなく、スーパーオキシドアニオンラジカルによっても酸化される³³⁾ことから、本化合物はヒドロキシルラジカルに対する特異性が高い方法とは言い難い。Choiらはその一方で、プラスミドDNAの酸化に伴う構造変化（ニック化）が、berberine添加により抑制されるデータを示している²⁴⁾。このプラスミドDNAの構造変化は、ヒドロキシルラジカルの発生によると広く受け入れられている¹²⁾ことから、彼らの報告でのberberineの効果はヒドロキシルラジカル消去能によると想定するのが妥当である。以上より、本研究で見られたberberine添加時のルミノール化学発光抑制効果は、ヒドロキシルラジカル消去能によると推定される。

4-4. 低抗酸化性、低プロオキシダント性の抽出物について

本研究においては、人参、知母抽出物では、銅イオン還元能およびプラスミドDNA切断能が低く、ルミノール化学発光阻害活性も低いことが判明した。すなわち、これらの抽出物では、高いROS発生能を示す成分または高い抗酸化能を示す成分は少ないと考えられる。人参、知母の主成分はそれぞれ、ginsenoside、sarsasapogeninなどのサポニンである。ginsenosideにはヒドロキシルラジカル消去能が報告されている^{34, 35)}。sarsasapogeninにはHeLa細胞における酸化ストレスの発生とアポトーシス誘導能が知られている³⁶⁾。従って、人参、知母にはヒドロキシルラジカル消去能、ROS発生能が期待されたのとは対照的に、本研究で得られた抽出物には同ラジカル消去能、同発生能は検出されなかった。その考えられる理由としては、本研究で得た抽出物には、これらの成分含量が低かった可能性や、当該化合物の効能を抑制するような他の化合物が存在する可能性が挙げられる。今後、これらの可能性を追求することに関心が持たれる。

4-5. 高抗酸化性を与える化合物について

4-3.で論じた、銅イオン還元能を示すが、プラスミドDNA切断能が検出されなかった黄蓮抽出物では、berberineがルミノール化学発光抑制能（1000 μ Mで100%以上）、すなわちヒドロキシルラジカル消去の役割を担う可能性がある。また、4-2.で論じたプラスミドDNA切断能、ルミノール化学発光阻害活性が高かった甘草抽出物では、高いヒドロキシルラジカル発生

能、および、同消去能を示す成分が共存する可能性が考えられた。甘草に含まれる成分ILQは、銅イオン還元能、ヒドロキシルラジカル発生能をほとんど持たず、高いルミノール化学発光抑制能（100 μ Mで約85%）を示したことから、本化合物は高いヒドロキシルラジカル消去能を持つと示唆された。

II型糖尿病の治療薬として用いられるメトホルミンは、berberineと同程度のルミノール化学発光抑制能（1000 μ Mで100%以上）を示し、脂肪組織の繊維化に伴う炎症抑制効果が報告された甘草含有成分ILQは、それらの約1/10の濃度で同程度の効果を示したことは興味深い。今後、これらの抗酸化能を持つ化合物の薬効と酸化ストレスとの関係などの詳細な効能を解明することに関心が持たれる。*In vitro*における有用な抗酸化物質の選別は、酸化が原因である疾病の予防や発症メカニズムの解明に貢献すると期待される。

おわりに

本研究では、福井県産の生薬（人参、知母、黄蓮、芍薬、当帰、甘草）由来の抽出物について、その銅イオン還元能、およびプロオキシダント能に基づいた比較について検討した。さらに、黄蓮、甘草におけるヒドロキシルラジカル消去能に関わると考えられる成分の抗酸化能を評価した。プロオキシダント能の低い試料には、同様の効能を持つ他の化合物が新規に発見される可能性もあり、今後、その様な性質を持つ新規抗酸化物質の発見に期待が持たれる。

本アプローチは、最も反応性が高いROSであるヒドロキシルラジカル発生に伴う、生体高分子の酸化や細胞毒性の発現などを抑制できるような抗酸化物質を化合物あるいは抽出物ベースで選抜する上で応用が期待される。

謝辞

貴重な試料をご供与いただいた越前夢ファーム・土本昌亨様をはじめとする関係方面各位に、御礼申し上げます。

本研究の一部は、福井県立大学地域貢献研究による支援を受けて実施されたものです。ご支援に対し、心より御礼申し上げます。

引用文献

1. 吉川敏一ら、活性酸素・フリーラジカルのすべて -健康から環境汚染まで- 丸善 (2000)
2. Halliwell B, Gutteridge, JM, *Methods Enzymol.*, 186, 1-85 (1990)
3. Sakihama Y *et al.*, *Toxicology*, 177, 67-80 (2002)
4. D'Autreaux B, Toledano MB., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 813-24 (2007)
5. Bowry, VW., Stocker R. *J. Am. Chem. Soc.* 15, 141-51 (1993)
6. Yamashita N. *et al.*, *Mutat. Res.* 425, 107-15 (1999)

7. Zheng, LF. *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 46, 146-9 (2008)
8. Chobot V. , *J. Agri. Food. Chem.* 58, 2088-94 (2010)
9. 黒川洋一、*生物工学会誌*、95, 774 (2017)
10. 黒川洋一ら、*福井県立大学論集*、53, 87-106 (2020)
11. 和田光弘、*薬学雑誌*、128, 1031-36 (2008)
12. Aruoma Oi. *et al.*, *Biochem. J.*, 273, 601-4 (1991)
13. Asplund KU *et al.*, *Free Radic Res.*, 36, 1271-76 (2002)
14. Asaad SF *et al.*, *Chem Biol Interact.*,137, 59-74 (2001)
15. Ohira H. *et al.**Food Funct.*,13, 9285 (2022)
16. Matsumoto C. *et al.*, *J Radiat Res.* 56, 669-77 (2015)
17. Watanabe Y. *et al.*, *Scientific Reports* 6, 23097 (2016)
18. 菊池洋一ら、*分析化学*、39, 301-5 (1990)
19. 尾立純子ら、*生活衛生 (Seikatsu Eisei)* 37, 15-19 (1993)
20. 安藤秀明ら、*肝臓* 36, 171-172. (1995)
21. Parejo I *et al.*, *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 43, 183-90 (2000)
22. D Bonnefont-Rousselot D. *et al.*,*Metabolism* 52, 586-9 (2003)
23. Khouri H. *et al.*, *Eur J Biochem.* 271, 4745-52 (2004)
24. Choi DS, Kim SJ, Jung MY, *Biosci Biotechnol Biochem.* 65, 452-5 (2001)
25. Nagai T *et al.* *Arc. Environ Contam. Toxicol.* 20, 432-36 (1991)
26. Akamatsu H *et al.* *Planta Med.* 57, 119021 (1991)
27. Imai K *et al.* *Free Radical Antioxidants* 3, 40-42 (2013)
28. Manevich Y, Held KD, Biaglow JE. *Radiat. Res.* 148, 580-91 (1997)
29. Son Y. *et al.**Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 13678-95 (2015)
30. Kwon DY *et al.**Toxicol Res* 26, 321-7 (2010)
31. Aboul-Enein HY *et al.* *Biopolymers.* 72, 59-68 (2003)
32. Yang Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun.* 496, 763-9 (2018)
33. 浅田浩二ら、*活性酸素測定マニュアル 講談社サイエンティフィク*(1992)
34. Lü JM *et al.*· *Curr Pharm Des.* 18, 6339-47 (2012)
35. Kang KS *et al.* *Biol. Pharm. Bull.* 30, 724-8 (2007)
36. Shen S. *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 519-524 (2013)