

## 清宮寿桃丸の抗酸化活性に関する研究

西山 由美<sup>\*a</sup>, 石原由美子<sup>a</sup>, 山田 南雄<sup>a</sup>, 土反 伸和<sup>a</sup>, 守安 正恭<sup>a</sup>,  
中谷 典義<sup>b</sup>, 渡邊恵美子<sup>b</sup>, 佐々木泰介<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>神戸薬科大学生薬化学研究室, <sup>b</sup>株式会社カーヤ

## Study on Potential of Antioxidant Activity of Shingujuto-gan

Yumi Nishiyama<sup>\*a</sup>, Yumiko Ishihara<sup>a</sup>, Nao Yamada<sup>a</sup>, Nobukazu Shitan<sup>a</sup>, Masataka Moriyasu<sup>a</sup>,  
Noriyoshi Nakatani<sup>b</sup>, Emiko Watanabe<sup>b</sup> and Taisuke Sasaki<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Natural Medicinal Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku,  
Kobe 658-8558, Japan

<sup>b</sup>Kahya Co., Ltd., 3-4-11 Tarumicho, Suita, Osaka 564-0062, Japan

(Received February 5, 2014)

Shingujuto-gan, which is produced from Banto-gan based on the theory of traditional Chinese medicine, is used for eternal youth, longevity, nourishment and tonicity. There is, however, little evidence for the efficacy of this drug. Therefore, we investigated to confirm its activities. Because active oxygen is greatly involved in aging, we started to investigate the antioxidant activity of Shingujuto-gan and its constituent crude drugs. The potential of antioxidant activity was evaluated by the DPPH radical scavenging test, superoxide radical scavenging test and NO production inhibitory test. As a result, Shingujuto-gan showed antioxidant activity in all tests, and it was suggested that Lycium Fruit, Bitter Cardamon, Malaytea Scurfpea Fruit and Walnut Seed Coat were responsible for this activity.

**Keywords:** Shingujuto-gan, Antioxidant, DPPH, Superoxide, NO

## 緒言

現代社会はストレス社会ともいわれ、心身ともに疲れ、倦怠感や疲労感を感じることも多い。また、体調が悪く検査を受けるが、異常が見つからず、病気と診断されないことがある。このような状態を東洋医学では「未病」と称し、東洋医学的な観点からの診断で症状の改善に一役買っている。また、西洋医学では治療が困難な慢性疾患についても、その対症療法として東洋医学が活用されている。このように東洋医学が見直され、日本では個々の患者の証に合わせた薬物治療である漢方薬をはじめ、近年では中成薬も用いられるようになってきた。

中成薬は、中国の伝統医学である中医学の理論を元に、伝統的、経験的に昔から服用されてきた医薬品であるが、科学的な検証は少ない。そこで、本研究では、中成薬の効能に関

連した生物活性を調べ、その効果を検証することを目的とし、中成薬である清宮寿桃丸を取り上げた。清宮寿桃丸は「蟠桃丸」を基に作られた製剤であるが、「蟠桃丸」は中国・清の時代に乾隆帝が不老長寿・補腎強精・滋養強壯の秘薬として愛用されたと清宮医案集成に記されている。中国においては、清宮寿桃丸は老化による代謝機能低下や内循環失調を改変し、老化の症状を緩和調整する作用がある製剤として利用されている。日本においては、(株)カーヤが中成薬の処方と構成・分量が一部異なるが、生薬主薬保健薬として清宮寿桃丸の医薬品製造販売承認を取得しており、その効能・効果は虚弱体質、肉体疲労、病中病後、胃腸虚弱、食欲不振、血色不良、冷え性の場合の滋養強壯である。そこで、一部構成処方等は異なるが、日本で入手できる本製剤を用いて、老化の症状を緩和調整する作用に着目し、実験を行った。

一般に老化には、活性酸素が大きくかかわっていることが知られており<sup>1)</sup>、過剰に発生した活性酸素は、細胞に障害を与え、臓器への障害、老化の促進などさまざまな疾病の原因になることがわかっている<sup>2)</sup>。我々は、本製剤の老化症状の改善効果には抗酸化作用が一部関与すると考え、清宮寿桃丸が抗酸化作用を有するものと推測し、清宮寿桃丸および構成生薬について、抗酸化活性を検討した。

## 実験方法

### I. 実験材料

清宮寿桃丸は(株)カーヤから提供された。また構成生薬であるジオウ、クコシ、ニンジン、ゴシツ、ヤクチ、テンモンドウ、ホコツシ、コトウイは、清宮寿桃丸を製造する時に使用した原料生薬を用い、同社より譲り受けた。ただし、ロクジンに関しては、製品に使用したロクジンが保管されていなかったため、今回試料として用いていない。

清宮寿桃丸および各構成生薬は細切後、メタノールで抽出し、濾過した後に濃縮および減圧乾燥して得たエキスを各種試験に用いた。

清宮寿桃丸は、各構成生薬の粉末をハチミツで固めた丸剤で、そのまま服用する。今回の実験においては、丸剤(もしくはその粉末)をそのまま用いる事ができないことから、成分の抽出効率を考えメタノールで抽出を行い、そのエキスを試験に用いた。

### II. DPPH ラジカル消去活性試験

DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) は比較的安定なラジカルである。ラジカル状態で 517 nm に吸収極大を有する DPPH が、試料によって還元されることにより、極大付近における吸光度の減少を捉え抗酸化能を評価する方法である<sup>3, 4)</sup>。

#### 1. 試薬

DPPH は、ナカライテスク(株)から購入した。

#### 2. 手順

6000 µg/mL (コトウイについては、600 µg/mL) に調製した試料のエタノール溶液を 96 ウェルマイクロプレートに 100 µL 添加し、2 倍希釈法で順次希釈後、200 µM に調製した DPPH のエタノール溶液を 100 µL ずつ加えた。これを 25°C で 30 分間インキュベートし、550 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (iMark, BIO RAD) で測定した。各試料の DPPH ラジカル消去活性は次式で算出した。

消去活性 (%) =  $[(C - S) / C] \times 100$

C: コントロール溶液の吸光度

S: 試料溶液の吸光度

### III. スーパーオキシド消去 (SOD 様) 活性試験

スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) は活性酸素の 1 種で、体内においてエネルギー産生の際に絶えず発生している<sup>5)</sup>。これは実験的に発生させた  $O_2^-$  の消去量を測定し抗酸化能を評価する方法である。

#### 1. 試薬

測定には、SOD Assay Kit-WST (DOJINDO) を用いた。この Kit は、キサンチン/キサンチンオキシダーゼを  $O_2^-$  生成系とし、発生した  $O_2^-$  により生成する WST-1 ホルマザンの吸光度を測定する。試料による  $O_2^-$  消去活性を吸光度の減少として捉えるものである。

#### 2. 手順

DMSO とエタノールで調製した試料を 96 ウェルマイクロプレートに 20 µL 添加し、2 倍希釈法で順次希釈後、SOD Assay Kit-WST を使用して測定を行った。試料の終濃度は、DPPH ラジカル消去活性試験と同じである。そして、各試料の  $O_2^-$  消去活性は次式で算出した。

消去活性 (%) =

$$[(CX - CB) - (SX - SB)] / (CX - CB) \times 100$$

CX: コントロール溶液の吸光度 (酵素入り)

CB: コントロール溶液の吸光度 (酵素なし)

SX: 試料溶液の吸光度 (酵素入り)

SB: 試料溶液の吸光度 (酵素なし)

#### 3. キサンチンオキシダーゼ (XOD) 阻害活性試験

本試験においては、試料が XOD を阻害する事により  $O_2^-$  の生成が減少し、見かけ上  $O_2^-$  が消去されていると判定される可能性があることから、試料の XOD 阻害活性を検討した。方法は、キサンチンと XOD が反応する際、定量的に産生される尿酸の量を HPLC で測定し確認した。

HPLC 測定には、吸光度を測定する直前の試料を用いた。

HPLC 条件

Column: Cosmosil AR-II 5C<sub>18</sub> (4.6 mm x 150 mm)

Eluent: A; 0.2 M NaClO<sub>4</sub> trace HClO<sub>4</sub>, B; CH<sub>3</sub>CN

A/B: 100/0 → 95/5 (10min.)

Detection: UV 260 nm (尿酸の吸収極大波長)

Flow rate: 1 mL/min

試料が入っていない時の尿酸の量を 100 % とし、高濃度の試料が入っているウェルから測定を行い、80 % 以上を示すまで測定を行った。結果には、80 % 以上を示した時の濃度とその時の尿酸生成率を示した。

Table 1 Radical scavenging activities of Shingujuto-gan and constituting Crude Drugs of Shingujuto-gan

Samples	清宮 寿桃丸	ジオウ	クコシ	ニンジン	ゴシツ	ヤクチ	テンモ ンドウ	ホコツシ	コトウイ
DPPH radical SC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.94	2.41	1.17	2.84	1.68	0.73	2.96	0.14	0.02
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup> radical SC <sub>50</sub> (mg/mL)	0.6	0.29	0.15	> 3	0.5	0.09	2.29	0.14	0.0059
Uric acid Formation rate (%) (Sample conc. mg/mL)	84 % (3.0)	88 % (0.15)	81 % (3.0)	84 % (0.75)	80 % (1.5)	87 % (0.38)	91 % (0.75)	80 % (0.19)	80 % (0.15)

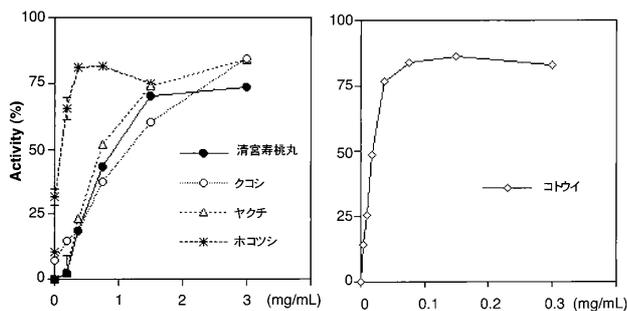


Fig. 1 Scavenging activities on DPPH radical

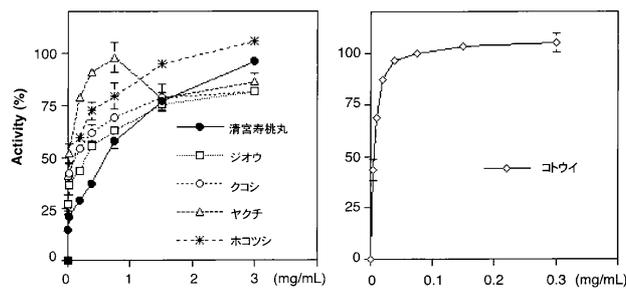


Fig. 2 Scavenging activities on superoxide radical

#### IV. NO 産生抑制試験

マウスマクロファージ細胞である RAW 264.7 細胞株を用いて、LPS (Lipopolysaccharide) 刺激で産生する NO の量を測定し、試料が NO の産生をどれくらい抑制するか検討し、抗酸化能を評価する方法である。

##### 1. 細胞培養

マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 株は、神戸薬科大学医療薬学研究室より譲り受け、10%牛胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) と penicillin-streptomycin (100 unit/mL) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) 中、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養し、週に 2 回継代を行い、必要に応じてアッセイに用いた。

##### 2. 試薬

NO 量の測定には、NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (DOJINDO) を用いた。発生した NO は NO<sub>2</sub> に変化して培地中に溶解することから、この kit で NO<sub>2</sub> を Griess 法で測定することにより、間接的に NO 量を測定することができる。また、細胞毒性試験には、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いた。

##### 3. 手順

2 X 10<sup>5</sup> 個の細胞を 96 ウェルマイクロプレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 時間前培養を行った。その後、各ウェルの培地を吸引除去し、DMSO で各濃度に調製した試料を含む培地を加え、さらに 20 分後に LPS を 10 ng/mL

になるように添加し、同条件下で、24 時間インキュベートした。培養後、細胞の上清を回収し、これを NO 測定用の試料とした。また、試料の細胞に対する毒性を確認するために、同様の手順で LPS まで添加、24 時間培養後、Cell Counting Kit-8 にて細胞毒性を確認し、試料が細胞増殖に影響を与えていないかチェックを行った。

#### 結果および考察

##### I. DPPH ラジカル消去活性試験

清宮寿桃丸のメタノールエキスは、SC<sub>50</sub> が 0.94 mg/mL と中程度の消去活性が認められた。構成生薬の中では、ホコツシとコトウイに強い活性が認められ、特にコトウイは SC<sub>50</sub> が 0.02 mg/mL と最も強い活性を示した。クコシとヤクチには清宮寿桃丸と同程度の活性が認められたが、その他の生薬にはほとんど活性が認められなかった。(Table 1, Fig.1)

DPPH ラジカル消去活性は、タンニンやフラボノイドなどフェノール性ヒドロキシ基を多く有するポリフェノール類に活性が強いことが知られ、またヒドロキシ基の結合位置も活性に影響を与えることが知られている<sup>6)</sup>。今回、活性を示した生薬はフラボノイドやタンニンなどを含んでおり、とくにコトウイはポリフェノール類を多く含むことから<sup>7)</sup>、強い活性を示したものと考えられる。

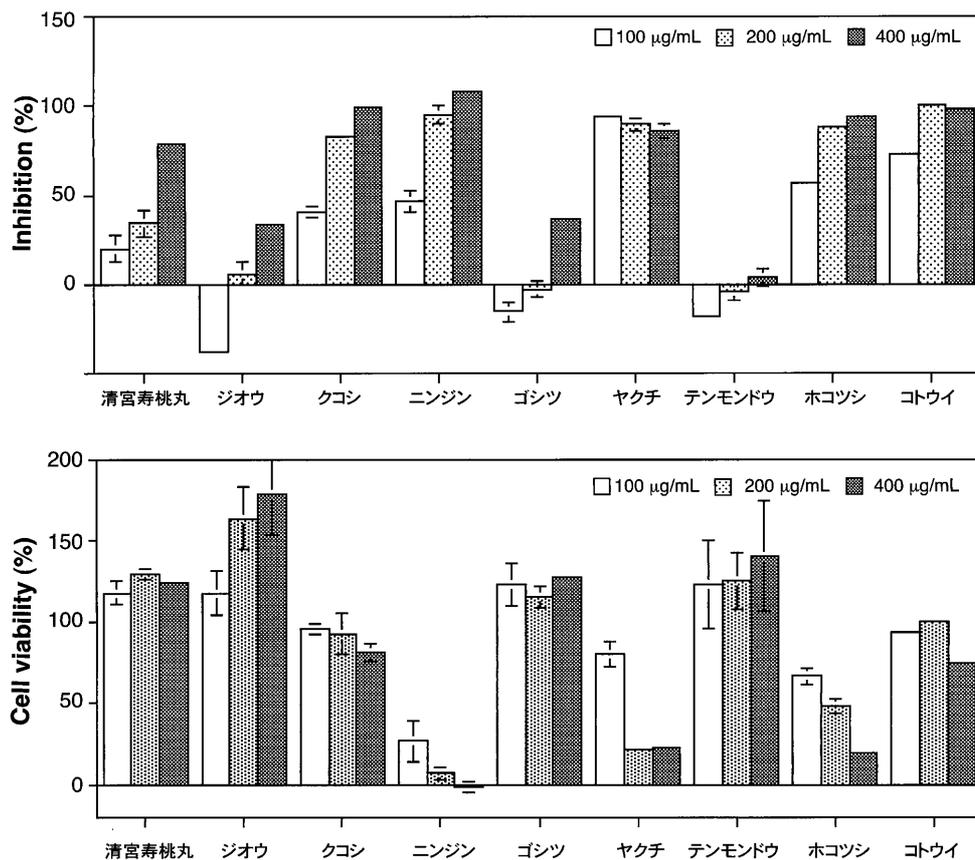


Fig. 3 Inhibitory effect of Shingujuto-gan and constituting Crude drugs of Shingujuto-gan on NO production, and cell viability.

## II. スーパーオキシド消去 (SOD 様) 活性試験

本試験においても、清宮寿桃丸のメタノールエキスは、 $SC_{50}$  が 0.6 mg/mL と中程度の消去活性を示した。構成生薬の中では、ジオウ、クコシ、ヤクチ、ホコツシおよびコトウイが、清宮寿桃丸よりも強い活性を示し、特にコトウイは  $SC_{50}$  が 0.0059 mg/mL と最も強い活性を示した。ゴシツは、清宮寿桃丸と同程度の活性を示した。一方、尿酸の生成率を見ると、ジオウとホコツシでは、約 80 %尿酸を生成している時の試料の濃度が  $SC_{50}$  値の濃度より低いまたは近いことから、試料による XOD 阻害が本試験に若干影響を与えていると考えられた。ヤクチ、クコシおよびコトウイに関しては、XOD 阻害はほとんど影響を与えていないことがわかった。他の構成生薬については、ほとんど活性は認められなかった。(Table 1, Fig. 2)

$O_2^-$  消去活性においても、比較的多くの報告がある。DPPH ラジカル消去試験と合わせて検討している場合が多いが、両者の活性は必ずしも相関するものではなく<sup>8)</sup>、今回の試験においても、ジオウとゴシツは  $O_2^-$  消去試験においてのみ活性を示した。

## III. NO 産生抑制試験

清宮寿桃丸のメタノールエキスには、濃度依存的に NO の産生抑制活性が認められた。クコシ、ヤクチ、コトウイについては、80 %以上の生存率を示す濃度で、産生抑制が認められた。ニンジンとホコツシにおいては、濃度依存的に産生抑制が認められたものの、細胞毒性も濃度依存的に認められたことから、試料の NO 産生抑制を評価することができなかった。その他の構成生薬については、NO 産生抑制はほとんど認められなかった。ジオウ、ゴシツ、テンモンドウにおいては、NO 産生を促進するような結果を示したが、これらの生薬は、生薬の投与により細胞増殖を促進する傾向があり、その結果、コントロールと比較して細胞の数が増えたため、NO の産生も増えたと考える。(Fig. 3)

NO 産生抑制試験においても、幾つかの報告がある。その内、今回活性を示した生薬については、すでに活性が報告されており、ヤクチは含有されるセスキテルペンに<sup>9)</sup>、ホコツシはフラボノイド類に NO 産生抑制があるとされている<sup>10)</sup>。

## まとめ

今回、DPPH ラジカル消去活性、スーパーオキシド消去活性およびNO 産生抑制活性を検討した結果、清宮寿桃丸は3つの抗酸化試験全てにおいて活性を示し、本製剤が抗酸化活性を有する事が示唆された。本製剤の抗老化や循環改善効果には、これらの抗酸化作用が一部寄与しているものと考えられる。清宮寿桃丸を構成する生薬について同様の試験を行ったところ、クコシ、ヤクチ、ホコツシ、コトウイは各試験において活性を示し、これらの生薬が、清宮寿桃丸の抗酸化作用を担っていると推察した。

清宮寿桃丸を構成する生薬のうち、含有割合の多いジオウ、ニンジン、クコシなどは、滋養・強壯薬としてのさまざまな活性が認められている<sup>11)</sup>。このような主配合生薬に抗酸化作用を有する生薬を一緒に処方することで、主薬の作用をサポートし、製剤の抗老化や循環改善効果に寄与しているのではないかと推測している。今後は、抗酸化以外の活性についても検討していく予定である。

## 引用文献

- 1) Matsuo M., "Sankasutoresu – Rouka To Sankasutoresu", eds. By Yoshikawa T., Ishiyaku Shuppan. Tokyo, 2001, pp.172-176.
- 2) Niki E., "Sankasutoresu – Kousanka Bougyo Shisutemu", eds. By Yoshikawa T., Ishiyaku Shuppan. Tokyo, 2001, pp.139-141.
- 3) Uchiyama M., Suzuki Y., Fukuzawa K., *Yakugaku Zasshi*, **88**, 678-683 (1968).
- 4) Kikuzaki H., Sato A., Mayahara Y., Nakatani N., *J. Nat. Prod.*, **63**, 749-752 (2000).
- 5) Takeshita K., "Sankasutoresu – Ichijuukousanso Kara Sanso Rajikaru Heno Henkan No Kanousei", eds. By Yoshikawa T., Ishiyaku Shuppan. Tokyo, 2001, pp. 135-138.
- 6) Chevally I., Marston A., Hostettmann K., *Phytochemistry*, **50**, 151-154 (1999).
- 7) Liu C., Tai Z., Feng S., Fang Y., Cai L., Ding Z., *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, **37**, 1417-1421 (2012).
- 8) Matsuda H., Morikawa T., Toguchida I., Park J., Harima S., Yoshikawa M., *Bioorg. Med. Chem.*, **9**, 41-50, (2001).
- 9) Xu J., Ji C., Zhang Y., Su J., Li Y., Tan N., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 1660-1663, (2012).
- 10) Matsuda H., Kiyohara S., Sugimoto S., Ando S., Nakamura S., Yoshikawa M., *Biolog. Pharm. Bull.*, **32**, 147-149, (2009).
- 11) "Dai 16 Kaisei Nihon Yakkyokuhou Kaisetusho, Iyakuhin Kakujou Shouyaku Tou", Hirokawa shoten, 2011.