

平成 10 年度入学 大学院博士後期課程 生体センシング機能工学専攻 生体計測科学講座

氏 名 劉 文 偉 (Liu wenwei)

論文題目 漢方薬の抗酸化力の定量的評価および体系化の研究

英訳題目 Quantitative evaluation and systematic study of the antioxidantabilities of the traditional Chinese medicines

- **Abstract**

The purpose of this thesis is to develop a systematic method for evaluating the superoxide and singlet oxygen scavenging abilities of the traditional Chinese medicines using (electronic spin resonance) ESR technique, and discuss the function of these medicines from the viewpoint of the antioxidant abilities.

It is well known that reactive oxygen species are closely involved with various pathological events such as aging, cancer, inflammation, and certain diseases on blood circulation. It has been indicated that the intake of natural antioxidants enables the reduction of the risk of these diseases. From the viewpoints of efficiency and safety, traditional Chinese medicines have attracted special interest as an excellent natural antioxidant source.

The systematic study on the anti-oxygenating abilities of the traditional Chinese medicines is rare, because there are few suitable methods for accurately evaluating antioxidants with complicated components such as the traditional Chinese medicines.

Superoxide (O_2^-) is the reactive oxygen radical produced by one-electron reduction of molecular oxygen in metabolism processes and the source deriving other radicals. Singlet oxygen is another important active oxygen specie, which generated from oxygen through energy transfer. Therefore, it is very important to accurately examine the O_2^- scavenging and 1O_2 quenching ability of antioxidant. But old methods for evaluating these active oxygen species have many problems such as generating inhibition or some side reactions, and so on. In this thesis, the experimental source of these active oxygen species and the determining method are developed. In addition the systematic study proves the effectiveness of these established method.

This thesis is composed of 8 chapters, and the summary of each chapter is shown as follows.

In chapter 1, the background and the present situation related to the antioxidant abilities of the traditional Chinese medicines and the evaluating method were described, and the purpose of this thesis was presented.

In chapter 2, the source of superoxide was discussed. Although the hypoxanthine-xanthin oxidase (HPX-XOD) system is widely used as a O_2^- source for evaluating O_2^- scavenging abilities of antioxidants by using ESR technique, the problem of XOD-inhibiting limits its application. Most Chinese medicines had the properties of XOD-inhibiting. While the electrolytically generated superoxide system showed advantage in evaluating O_2^- amount without any O_2^- generating inhibition, and its reliability was also proved in this chapter.

In chapter 3, the feasibility of the electrolytically generated superoxide system was studied. This method was successfully applied to evaluating O_2^- scavenging abilities of 60 kinds of the traditional Chinese medicines. In addition the relationship between the yield of extract and O_2^- scavenging values of these medicines were also discussed.

In chapter 4, some new water-soluble endoperoxides were synthesized as a singlet oxygen source at mild temperature. In aqueous solution, the generated 1O_2 was detected using the ESR technique. As a result, these endoperoxides split off singlet oxygen more rapidly than previously reported compounds at mild temperature.

In chapter 5, Thermal decomposition of new endoperoxide was used as an efficient singlet oxygen source, and its reliability was also proved in this chapter. As an application, the 1O_2 quenching abilities of 60 kinds of the traditional Chinese medicines were succeeded by ESR method.

In chapter 6, the in vivo ESR study of flowery knotweed root, a representative of Chinese medicines, and Six-Ingredient Rehmannia Decoction, a famous medicine formula, were performed with L-band ESR spectrometer.

In chapter 7, comprehensive study and interactive effect of the antioxidant abilities of the traditional Chinese medicines were discussed.

Chapter 8 summarized the systematic study on the anti-oxygenating abilities of the traditional Chinese medicines proposed in this thesis, and the further development on this topic was discussed.

Chapter 3 mentioned the effect of additives ((1) ion type, neutralization level, (2) water, and (3) low or high molecular acid) on rheological properties under dynamic shear and step-shear experiments. The results revealed that the association and disassociation of ionic bonding can be controlled by the additives (1,2,3).

Furthermore, the type of additives (1,2,3) influenced the size of ionic aggregates.

Chapter 4 described an overview about new findings of this thesis to clarify the essential role of ionic bonding, ionic aggregates, and their new control parameters. A systematic concept and view about designing new ionomers by rheological control was proposed. Furthermore, future research subjects about ionomers were written.

The new findings of this thesis are summarized in the scheme. Melt rheological properties are divided into two regions, linear (small deformation) and non-linear (large deformation), which could be mostly interpreted only by two factors, ionic bonding and ionic aggregates, respectively. Under the linear region (1), it was reconfirmed that the degree of ionic bonding could be controlled by the type of ions and its neutralization. It was discovered by the present study that the association and disassociation of ionic bonding is controlled by new additives, such as low molecular acids and water. Under the non-linear regions (2), it was newly found that the size of ionic aggregates can be governed by the additives. In addition, the deformation degree of ionic aggregates strongly depends on deformation rates. It can be concluded from this thesis that the complexed melt rheological properties of ionomers can be systematically understood by using the two factors, "ionic bonding" and "ionic aggregate", both of which can be controlled by the new additives, like low molecular acid and water. The new overview would be valuable, also from industrial point of view, as a new direction about designing new ionomers by rheological control.

(和訳)

本論文では、生体科学の分野で活性酸素における工学と医学の接点を求め、電子スピン共鳴(ESR)法を用いる抗酸化物質の評価法を確立し、漢方薬の抗酸化能力の定量的評価を試み、さらに体系化を図ろうとするものである。

合成抗酸化剤の有効性の限界、副作用などの問題により、天然抗酸化物質に多くの注目が集められている。その中でも漢方薬の抗酸化力に期待がかけられているが、多成分を含んでいる漢方薬に対して、抗酸化力の総合評価あるいは評価の標準化には様々な問題点が残され、未だ確立された結論が得られていない。

活性酸素の中で、

最も代表的なものはスーパーオキシド(O_2^-)および一重項酸素($1O_2$)である。酸素は外界から適当なエネルギーを得ると $1O_2$ になり、また外界から一電子を受けて O_2^- になる。本研究では、漢方薬の O_2^- および $1O_2$ の消去能力に着目した。

本論文では、電解 O_2^- 発生系の信頼性を確立し、漢方薬の O_2^- の正しい評価を実現した。また、新規化合物の合成の成功による水溶性で、かつ、発生効率が高い $1O_2$ 源を得た。その $1O_2$ 発生源を用いて、漢方薬の $1O_2$ 消去の ESR 定量計測方法を確立した。老化、炎症、血管疾病、および腫瘍に効果のある 60 種類の漢方薬について、抗酸化能力の定量的評価を行い、in

vivo 評価、抗酸化相乗作用、 O_2^- 消去力と $1O_2$ 消去力の関係などの体系化研究を試みた。

論文は 8 つの章から構成されており、以下は各章の概略を記す。

第 1 章では、漢方薬の抗酸化作用および抗酸化評価方法に関する研究分野の背景と状

況を述べ、これまでの漢方薬の抗酸化体系化研究および抗酸化計測法の特徴と問題点について分析整理し、本研究の動機と目的を概説した。

第2章では、O₂⁻の発生源について検討した。ヒポキサンチン—キサンチンオキシダーゼ(HPX-XOD)酵素発生系を用いる実験の結果、60種類の漢方薬の中で50種類はXOD阻害が示した。結論として、従来よく使われているHPX-XOD酵素発生系は、XOD阻害のため、数多くの漢方薬に対して、O₂⁻の発生源として不適切であることを示した。SODにはXOD阻害がないので、SODを用いてO₂⁻の電解生成系とHPX-XOD系との信頼性を検討した。DMSOを含んでいるHPX-XOD系で得られたSOD検量線の傾きと電解生成系のSOD検量線の傾きが一致したので、O₂⁻の電解生成系の信頼性が示された。

第3章では、O₂⁻の発生源を検討した上で、確立したスピントラップESRによる評価法を用いて、漢方薬のO₂⁻除去能力を評価した。60種類の漢方薬に対して、漢方薬のO₂⁻除去能のデータベースを作成し、漢方薬の抽出率と抗酸化作用の関係も検討した。

第4章では、より効率的に1O₂を発生させるため、水溶性があり、適当な分解率を持つ新たなエンドペルオキシドを2種類合成した。1O₂検出用ラジカル剤を用いる1O₂のESR評価法によると、2つの新規エンドペルオキシドは、従来のものより、それぞれ、1.7倍と5.8倍速い1O₂発生速度をもつことが分った。従来の光増感剤を用いる1O₂発生源は、測定試料への妨害反応など多くの問題を抱えているので、発生源としての応用が限られている。1O₂のより効率的な発生系の確立、および、それを用いる1O₂除去物質の定量的な評価の成功は、様々な応用が幅広く展開できると予想される。

第5章では、1O₂除去評価法の確立および漢方薬の1O₂除去能力の評価を試みた。最適なエンドペルオキシドとラジカル化試薬を用いて、1O₂除去能評価法を確立した。1O₂の消光剤であるタウリンの1O₂除去速度定数が文献値と一致したので、本法の信頼性が示された。本法を用いて、60種類の漢方薬の1O₂除去能力を評価した。

第6章では、漢方薬の抗酸化力の *in vivo* 機能解析を試みた。漢方薬の一つである何首烏に、*in vivo* でのラジカル除去作用が認められた。一方、漢方薬の魅力は、各生薬単味の上手な配合によって薬理作用が相乗的に発揮されることである。しかし、抗老化の古典的名薬方剤「六味丸」では、組成生薬の *in vitro* 抗酸化相乗作用が認められなかった。逆に、抗酸化拮抗作用を認めた。また、「六味丸」をラットに投与し、L-Band ESR法を用いて、肝臓における *in vivo* の機能解析を試みたが、効果は認められなかった。

第7章では、確立した抗酸化物質評価法を用いて、漢方薬の抗酸化力の定量的評価を行い、組成生薬の *in vitro* 抗酸化相互作用や、代表的な漢方薬の *in vivo* 機能解析などを含め、漢方薬の総合的な機能解析を試み、体系化を図った。

第8章では、本論文で論じた漢方薬の抗酸化力の定量的評価法、体系化を図る研究を総括し、今後の研究の方向についてまとめた。