

光酸化溶血反応を用いた光過敏症防御物質の探索

富田 英美, 梶浦 智代, 木村 修一

(昭和女子大学大学院生活機構研究科*)

Screening for Photoprotective Agents Using Photo-oxidized Hemolysis

Amy TOMITA, Tomoyo KAJIURA and Shuichi KIMURA

Showa Women's University, Graduate School of Human Life Science

Summary

Pheophorbide a is a catabolite of chlorophyll a and often found in food such as abalones, pickles and herb tea. Upon ingestion of food contained pheophorbide a and subsequent exposure to sunlight, humans and animals will develop cutaneous photosensitivity. The molecular mechanism of this photosensitivity is that pheophorbide a, sensitized by sunlight, produces singlet oxygen (reactive oxygen) and this in turn oxidizes lipids and proteins in the cell membrane causing damage to the cells. In search for photoprotective agents, we have screened herbs and vitamin-like substances using photo-oxidized hemolysis as an *in vitro* model for cutaneous photosensitivity. Red blood cell suspensions from Wistar rats were exposed to visible light in the presence of pheophorbide a with or without test substances. At the end of light exposure, absorbance of the supernatants at 570 nm was measured and hemolysis ratios were calculated. Among ten herbs studied, the Indian herb *Bacopa monnieri* (Otomeazena) inhibited photo-oxidized hemolysis most effectively. Among vitamin-like substances, carnosine inhibited photo-oxidized hemolysis more effectively than histidine, which is a well known singlet oxygen scavenger. The photoprotective effects of these substances will be further investigated in an animal model.

クロロフィルの分解産物であるフェオフォルバイドは、あわびのきも、野沢菜漬け、どくだみ茶などの食品中にしばしば存在する。ヒトや動物がこれらを摂取し、光に当たると、光過敏症としての皮膚炎を引起すことが報告されている。発症のメカニズムとしては、フェオフォルバイドが光照射により励起され、活性酸素の一種である一重項酸素を生成し、これが生体膜の脂質およびタンパク質を酸化し、細胞に傷害をもたらすということが明らかになっている。そこでわれわれは、光過敏症防御物質の探索を目的に、フェオフォルバイドによる光酸化溶血反応を *in vitro* モデルとして用い、ハーブおよびビタミン様作用物質について、これらを防御する物質のスクリーニングを行った。ラット赤血球懸濁液に、フェオフォルバイドのみを加えたもの、または、フェオフォルバイドと試料を加えたものを準備し、光照射をした。光照射後、反応液上清の吸光度 (570 nm) を測定することにより、溶血率を求めた。10種類ハーブ試料中、インドのハーブ、オトメアゼナ (*Bacopa monnieri*) に最も強い溶血防御活性が認められた。ビタミン様作用物質の中では、カルノシンに、ヒスチジンと同等以上の溶血防御活性が見られた。今後、これらの物質

の光過敏症防御効果を、動物モデルを用いて検討していく予定である。

フェオフォルバイドは、クロロフィルからマグネシウム (Mg) とフィチル基が解離してできる分解物である。Mg は熱や酸性条件で容易に離脱し、フィチル基は加水分解酵素、クロロフィラーゼにより切り離される (Fig. 1)。フェオフォルバイドは、比較的身近な物質であり、あわびのきも、野沢菜漬け、どくだみ茶、などの食品中にもしばしば含まれる。葉菜類の漬物では、乳酸発酵の過程で pH が低下し Mg がはずれ、これに植物中に広く存在するクロロフィラーゼの働きが加わると、フィチル基が取り除かれて、容易にフェオフォルバイドが生成する。ヒトや動物が、フェオフォルバイドを含む食品を摂取し光に当たると、光過敏症による皮膚炎を起し、紅斑、痛痒、水腫といった症状が現れることが報告されている¹⁾。この皮膚炎は、一般の皮膚炎と異なり、UVA や UVB などの紫外線ではなく、可視光線のみでも引き起こされることが特徴的である。発症のメカニズムとしては、フェオフォルバイドが光照射により励起され、活性酸素の一種である一重項酸素を生成し、これが生体膜の脂質およびタンパク質を酸化し、細胞

*所在地：東京都世田谷区太子堂 1-7 (〒154-8533)

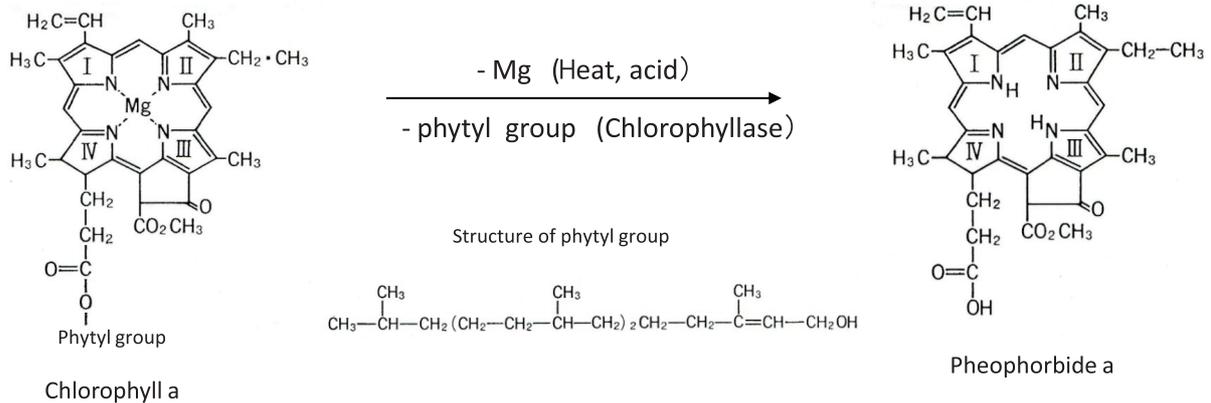


Fig. 1 Formation of pheophorbide a from chlorophyll a.

に障害をもたらすことが明らかになっている²⁾ (Fig. 2)。本研究では、光過敏症の *in vitro* モデルとして光酸化的溶血反応³⁾を使用した。光酸化的溶血反応とは、光存在下、光増感剤によって生成された一重項酸素が、赤血球膜の脂質およびタンパク質を酸化して、脆弱させることで起こる溶血現象である。光増感剤としては、フェオフォルバイドのほか、ポルフィリン、ローズベンガル、メチレンブルーなどの色素が知られている。本研究では、光過敏症防御物質の探索を目的に、フェオフォルバイドによる光酸化的溶血反応を *in vitro* モデルとして用い、ハーブおよびビタミン様作用物質について、これらを防御する物質のスクリーニングを行った。

実験方法

1. 材料

フェオフォルバイド a (タマ生化学) は、500 µg/mL となるようにジメチルスルホキシドに溶解し、さらにリン酸衝動液 (PBS, pH = 7.4) で希釈し、4~10 µg/mL のフェオフォルバイド溶液 (Pheo) を調製した。ハーブエキス粉末 9 種 (イスクラ産業) は 50 mg/mL、ヤマブシタケ原末 (サンバイオケミカル) は 250 mg/mL となるように蒸留水に溶解し、さらに PBS で適宜希釈し、サンプル溶液

として使用した。ビタミン様作用物質およびヒスチジンは、市販の高純度品を、PBS に溶解して使用した。

2. 方法

1) 赤血球懸濁液の調製

Wistar 系ラットをエーテル麻酔し、腹部大動脈より採血した。血液をヘパリン入り試験管に移し、2 倍量の PBS (pH = 7.4) を加え、3,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した。血漿層および白血球層を除去後、赤血球層に 2 倍量の PBS を加え、再び 3,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、洗浄した。上清を除去し、赤血球層に PBS を加えて 5% (v/v) 赤血球懸濁 (RBC) を調製した。

2) 光酸化的溶血試験

96 穴平底マイクロプレートに、① 5% RBC 100 µL + PBS 100 µL (バックグラウンド)、② 5% RBC 100 µL + Pheo 50 µL + PBS 50 µL (フェオフォルバイド)、③ 5% RBC 100 µL + Pheo 50 µL + サンプル溶液 50 µL (サンプル)、を各 3 穴 (n = 3) ずつ準備し、シェイカー上で攪拌しながら照射した。光源には 500 W のレフランプ (岩崎電気) を用い、反応液の温度上昇防止および紫外線カットのために、ランプとシェイカーの間に、水を張った透明バットを設置した。照射後、反応液を直ちに 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心分離し、上清 100 µL を別の 96 穴マイクロプレートに移し、570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (BIO-RAD) で測定した。さらに、5% RBC 100 µL を遠心分離して得られた赤血球に、200 µL の蒸留水を加えて完全に溶血させ、上清 100 µL の吸光度を測定して 100% 溶血の指標とした。溶血率は下式で算出した。

溶血率 (%) =

$$\frac{\text{吸光度(サンプル)} - \text{吸光度(バックグラウンド)}}{\text{吸光度(フェオフォルバイド)} - \text{吸光度(バックグラウンド)}} \times 100$$

結果と考察

まず、光酸化的溶血反応の経時変化を調べるために、RBC にフェオフォルバイドのみを加え、10,000 ルクス

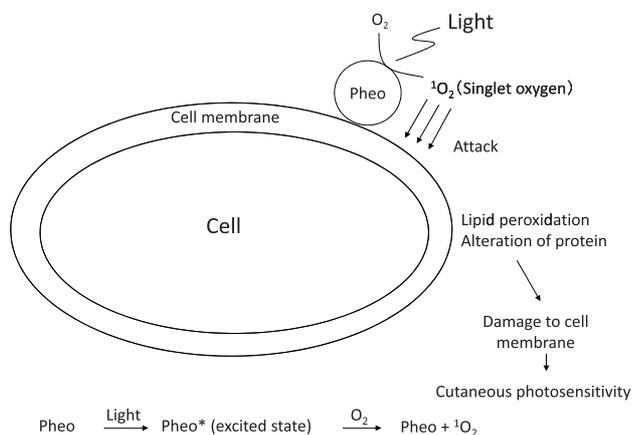


Fig. 2 Molecular mechanism of subcutaneous photosensitivity caused by pheophorbide a.

光照射をした (Fig. 3)。フェオフォルバイドを1.6 μM 添

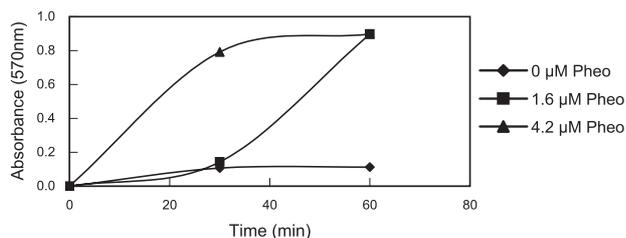


Fig. 3 Time course of photohemolysis caused by pheophorbide a. RBC was exposed to 10,000 lux visible light for the time indicated in the presence of 0, 1.6, 4.2 μM pheophorbide a.

加した RBC では、照射後 30 分では溶血が認められなかったが、その後、徐々に進み、1 時間後には、ほぼすべての RBC が溶血した。一方、フェオフォルバイドを 4.2 μM 添加した RBC では、照射後 30 分で、約 80% の RBC が溶血し、1 時間後には完全溶血に達した。また、フェオフォルバイドを加えなかった RBC では、いずれの時間においても、ほとんど溶血が認められなかったことより、この系の溶血が光酸化によって起こるものであることが確認された。

つぎに、ハーブエキス 10 種類 (Table 1) につき、光酸化的溶血反応を用いて、光過敏症防御効果を検討したとこ

ろ、インドの薬草、オトメアゼナ (*Bacopa monnieri*) と中国の薬草、板藍根 (*Isatis tinctoria*) に溶血防御活性が認められた (Fig. 4)。最も活性の強いオトメアゼナにつき、さらに詳細に検討した結果、750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (最終濃度) で約 50% の防御活性があることが判明した (Fig. 5)。オトメアゼナは池や湿地に生息する多年草で、インドの伝統医学では古くから脳の機能を改善する薬草として用いられてきた。記憶力増強、鎮静、抗てんかん効果が期待され、全草やアルコール抽出エキスを用いた臨床試験や動物実験でも、オトメアゼナの記憶力増強効果が確認されている^{4,5)}。さらに、オトメアゼナのメタノール抽出エキスには、ヒト繊維芽細胞を用いた *in vitro* 試験で、フリーラジカル消去活性や、DNA の損傷防御活性が認められている⁶⁾。今回の実験で新たに示された、オトメアゼナの光酸化的溶血の防御活性は、一重項酸素の消去活性による可能性が高いが、一重項酸素による生体膜の酸化を実際にどの段階で阻害しているのかは、今後さらに詳しく検討する必要がある。

ビタミン様作用物質の中では、カルノシンに、一重項酸素消去剤であるヒスチジンと同等以上の溶血防御活性が認められた (Fig. 6)。カルノシンは、ヒスチジンと β -アラニンからなるジペプチドあり、哺乳類の筋肉および脳に高濃度で存在する。体内に低濃度でしか存在しない遊離ヒスチジンに比べ、酸化ストレスの多い骨格筋に存在するカル

Table 1 The herbs studied

No.	Name of herbs	Origin	Extracted from	Extracted by	Family	Nomenclature
1	ツボクサ	India	Whole plant	Water, Ethanol	Apiaceae	<i>Centella asiatica</i>
2	インド人参	India	Root	Water, Ethanol	Solanaceae	<i>Withania somnifera</i>
3	オトメアゼナ	India	Whole plant	Water, Ethanol	Scrophulariaceae	<i>Bacopa monnieri</i>
4	アムラ	India	Fruit	Water, Ethanol	Euphorbiaceae	<i>Emblica officinalis</i>
5	白花蛇舌草	China	Whole plant	Hot water	Rubiaceae	<i>Hedyotis diffusa</i>
6	板藍根	China	Root	Hot water	Brassicaceae	<i>Isatis tinctoria</i>
7	心沙棘	China	Fruit	Water, Ethanol	Elaeagnaceae	<i>Hippophae rhamnoides</i>
8	柳茶	China	Stem and leaf	Hot water	Rosaceae	<i>Sibiraea angustata</i>
9	チャガ	Russia	Fruit body	Hot water	Hymenochaetaceae	<i>Inonotus obliquus</i>
10	ヤマブシタケ	Japan	Whole fungi	Water	Hericiaceae	<i>Hericium erinaceum</i>

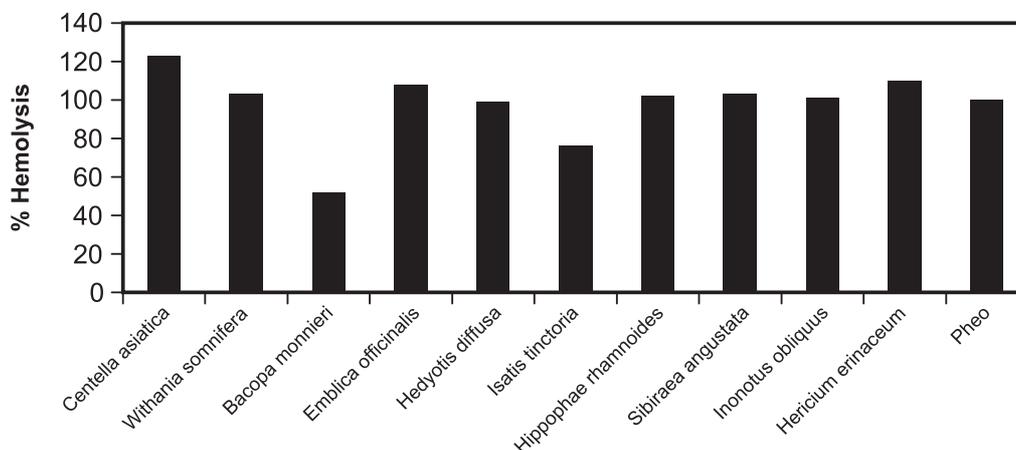


Fig. 4 Inhibition of photohemolysis by various herb extracts. RBC and herb extracts were exposed to 10,000 lux visible light for 1hr. in the presence of 2.5 μM pheophorbide a.

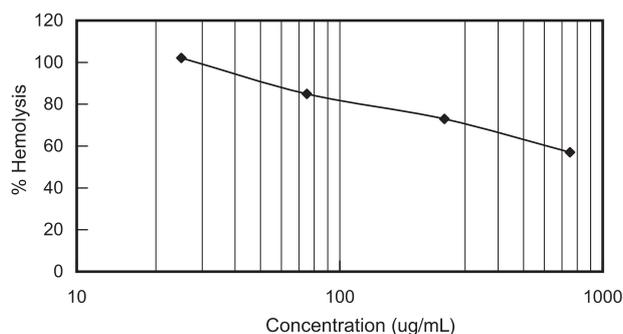


Fig. 5 Dose dependant inhibition of photohemolysis by *Bacopa monnieri*. RBC and *Bacopa monnieri* extract was exposed to 10,000 lux visible light for 1 h. in the presence of 2.5 μ M pheophorbide a.

ノシンは 20 mM にも及ぶ。生体内での役割は、抗酸化剤、緩衝剤（バッファー）、金属イオンのキレート剤、神経伝達物質などが示唆されているが⁷⁾、特に抗酸化剤としての働きが注目されている。カルノシンには、ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドの消去活性、また一重項酸素の消去活性が報告されている^{8,9)}。カルノシンの一重項酸素の消去活性は、同量のヒスチジンよりも高いことが Dhal や Lee らによっても示されており^{9,10)}、本研究の光酸化的溶血反応における溶血防御活性の結果と一致する。

天然物由来の一重項酸素消去剤としては、 β -カロテンや α -トコフェロールなどの脂溶性物質がよく知られており、 α -トコフェロールは光酸化的溶血反応においても、強い防御活性を示す³⁾。今回、 α -トコフェロールに比べ、活性は弱いながらも、水溶性のカルノシンで溶血防御活性が認められてことは興味。今後、*in vivo* のモデルを用いて、オトメアゼナおよびカルノシンの光過敏症防御効果を検討していく方針である。

参考文献

- 1) 竹中成憲, 沢田玄弘, 吉岡峰雄 (1899) 毒あわびに就いて. 東京医事新誌 1114 : 1359-1365.
- 2) 木村修一 (1991) 食物と光皮膚炎. 皮膚 33 (11) : 8-18.
- 3) Kimura S, Takahashi Y (1981) Preventive effects of L-ascorbic acid and calcium pantothenate against photosensitive actions induced by pheophorbide a and hematoporphyrin. J Nutr Sci Vitaminol 27 : 521-527.

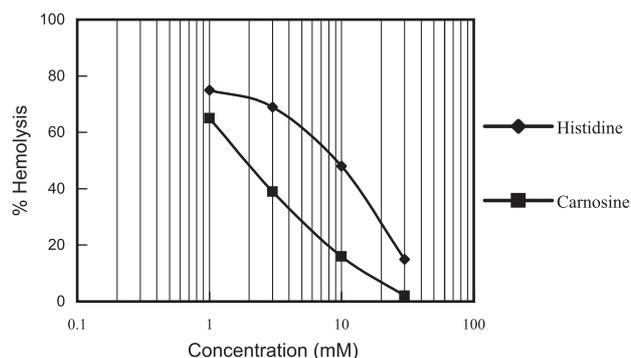


Fig. 6 Dose dependant inhibitions of photohemolysis by histidine and by carnosine. RBC and either histidine or carnosine was exposed to 6,000 lux visible light for 20 min in the presence of 3.3 μ M pheophorbide a.

- 4) Stough C, Lloyd J, Clarke J, Downey LA, Hutchison CW, Rodgers T, Nathan PJ (2001) The chronic effects of an extract of *Bacopa monniera* (Brahmi) on cognitive function in healthy human subjects. Psychopharmacology 156 : 481-484.
- 5) Singh HK, Dhawan BN (1997) Neuropsychopharmacological effects of the ayurvedic nootropic *Bacopa monniera* Linn. (Brahmi). Indian J Pharmacol 29 : 359-365.
- 6) Russo A, Izzo AA, Borrelli F, Renis M, Vanella A (2003) Free radical scavenging capacity and protective effect of *Bacopa monniera* L. on DNA damage. Phytother Res 17 : 870-875.
- 7) Gariballa SE, Sinclair AJ (2000) Carnosine : physiological properties and therapeutic potential. Age Aging 29 : 207-210.
- 8) Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN (1988) Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. Proc Natl Acad Sci USA 85 : 3175-3179.
- 9) Dahl TA, Midden WR, Hartman PE (1988) Some prevalent biomolecules against singlet oxygen damage. Photochem Photobiol 47 : 357-362.
- 10) Lee JW, Miyawaki H, Bobst EV, Hester JD, Ashraf M, Bobst AM (1999) Improved functional recovery of ischemic rat hearts due to singlet oxygen scavengers histidine and carnosine. J Mol Cell Cardiol 31 : 113-121.