

植物エキスによる光過敏症防御効果の検討

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*)

Evaluation of the Protective Effect of Plant Extracts Against Pheophorbide a-induced Photosensitive Damage

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 often found in food and supplements. Upon ingestion of pheophorbide a contained in food and subsequent exposure to sunlight, humans and animals can develop cutaneous photosensitivity. In search for photoprotective agents, we have first screened plant extracts using photo-oxidized hemolysis as an *in vitro* model for cutaneous photosensitivity. Thereafter, the photoprotective potential of the plant extracts was further tested in an animal model. Red blood cell suspensions from Wistar rats were exposed to visible light in the presence of pheophorbide a with or without the plant extracts. At the end of the light exposure, absorbance of the supernatants was measured and hemolysis ratios were calculated. For an animal test, the plant extracts or extraction solvent was given orally to female Wistar rats for one week prior to the light exposure. On the 8th day, after the pheophorbide a administration, the dorsal skin of rats was shaved and exposed to visual light to induce cutaneous photosensitivity. The dorsal skins were observed for redness, edema, and necrosis, and were also examined histologically. In hemolysis assays, the extract from *Larix sibirica* (Siberian larch) showed strong inhibitory activity. This extract was also shown to be effective in reducing the severity of the photosensitivity in rats. Furthermore, histological examination of the rats given *Larix sibirica* extract revealed that the inflammation remained mainly in epidermis and did not affect dermis.

緑色植物には、多くのクロロフィルが含まれるが、このクロロフィル中のマグネシウム (Mg) が食品加工の過程で離脱し、さらに内因性の加水分解酵素、クロロフィラーゼの働きが加わりフィチル基が切り離されると、容易にフェオフォルバド a が生成される (Fig.1)。ヒトや動物が、これらフェオフォルバド a を含む食品やサプリメントを摂取し光に当たると、光過敏症による皮膚炎を起こし、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、一般に皮膚に有害とされているUVB (290~320 nm) や UVA (320~400 nm) といった紫外線ではなく、可視光線 (400~780 nm) で引き起こされることが特徴的である。可視光線は地表に届く太陽光の約 50% を占め²⁾、また波長が長いことから皮膚透過率が高く、一部は皮下組織にまで達し³⁾炎症を起こす可能性がある。この光

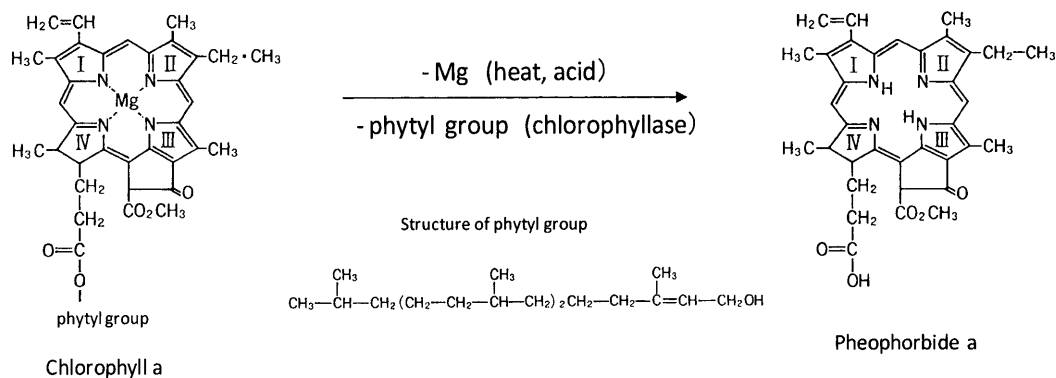


Fig. 1 Formation of pheophorbide a from chlorophyll a.

*所在地：東京都世田谷区太子堂 1-7 (〒154-8533)

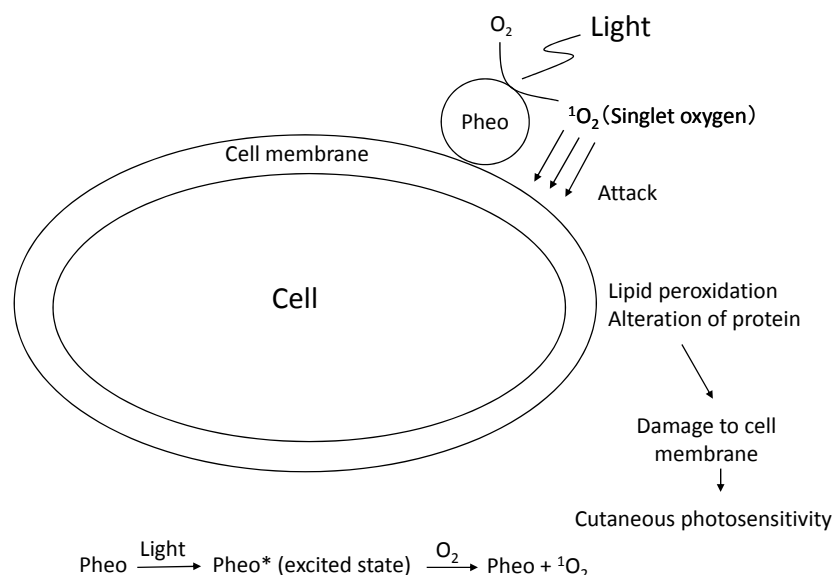


Fig. 2 Molecular mechanism of cutaneous photosensitivity caused by pheophorbide a.

線は紫外線防護用に開発されたサンスクリーンでは十分防ぎきれないことから注意が必要である。発症の原因は、可視光線により励起されたフェオフォルバイド a が、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、細胞に障害をもたらすためと考えられている⁴⁾ (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⁵⁾を用いた。光酸化的溶血反応とは、光存在下、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。可視光線の増感剤としては、天然に存在するフェオフォルバイド a やポルフィリンのほか、人工色素のローズベンガル、メチレンブルーなどが知られている。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 a による光酸化的溶血試験を *in vitro* モデルとして用い、植物エキスのスクリーニングを行った。その後、*in vitro* で光過敏症防御効果が示唆された植物エキスについて、その効果を動物モデルで検討した。

実験方法

1. 光酸化的溶血試験

Wistar 系ラット (日本チャールスリバー) の腹部大動脈より採血をし、遠心分離後、5% (v/v) 赤血球懸濁 (RBC) を調製した。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 (DMSO) に溶解し、さらにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で希釈し、6 μg/mL のフェオフォルバイド溶液 (Pheo) を調製した。植物エキスの乾燥粉末 (イスクラ産業) は、PBS で適宜希釈し、サンプル溶液として使用した。

① 5% RBC 100 μL + PBS 100 μL

(バックグラウンド群)

② 5% RBC 100 μL + Pheo 50 μL + PBS 50 μL

(フェオフォルバイド a 群)

③ 5% RBC 100 μL + Pheo 50 μL + サンプル溶液 50 μL
(サンプル群)

をそれぞれマイクロチューブ中で混合し、シェイカー上で振とうしながら、10,000 lux の光を照射した。光源には 500 W のレフランプ (岩崎電気) を用い、反応液の温度上昇と UV を防ぐために、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。

光照射後、反応液を直ちに 3,000 rpm、4℃ で 5 分間遠心分離し、上清 100 μL を 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、

$$\text{溶血率} (\%) = \frac{\text{吸光度} (\text{試験液})}{\text{吸光度} (\text{完全溶血液})} \times 100$$

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。

2. 光過敏症モデル動物

Wistar 系ラット (雌, 7~9 週令, 日本チャールスリバー) 8 匹を 2 群に分け、サンプル投与群には、植物エキス (植物エキス乾燥物 150 mg/kg を 5% エタノールに溶解) を、また対照群には等量の 5% エタノール溶液を胃ゾンデ法で 11 日間投与した。8 日目に、フェオフォルバイド a (35 mg/kg 体重) を経口投与し、ラット背部の剪毛をした。その後、ラットをボールマニケージで軽く固定し、常に剪毛部に光が当たるように気をつけながら、10,000 lux の可視光を 6 時間照射し、皮膚炎を誘発させた。皮膚炎の度合いは、光照射から 24, 48, 72 時間後に、紅斑、浮腫、壊死について肉眼で判定した。さらに、炎症部位を解剖にて採取し、4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製した。HE 染色後、病理組織学的検討を行った。

結果と考察

昨年度に引き続き、抗酸化作用の強いとされている植物エキスについて、まず *in vitro* の系を用いて光過敏症防御効果の検討を行った。その結果、フェオフォルバド a による光酸化的溶血反応を用いたスクリーニングで、*Larix sibirica* シベリアカラマツエキス (SK) に強い溶血防御活性が認められた。ラット赤血球懸濁液にフェオフォルバド a を加えた対照群 (Pheo+) では、照射後9分から徐々に溶血が始まり、16分後には90%以上の赤血球が溶血した (Fig. 3)。一方、フェオフォルバド a を添加しない赤血球 (Pheo-) では、16分後でもほとんど溶血が起こらないことより、この溶血反応がフェオフォルバド a の光増感作用によるものであることが確認された。この系に SK を添加すると、反応開始後13分および16分で溶血は有意に抑制された ($p < 0.01$, Fig. 3)。また、溶血率は SK 濃度依存的に有意に減少した ($p < 0.01$, Fig. 4)。

SK はシベリアに生育するカラマツの樹皮より抽出された成分で、その約 80% をジヒドロケルセチンが占める。ジヒドロケルセチンは抗酸化作用が強く、血管保護効果、抗炎症作用、UV 防御効果等があることがロシアで数多く報告されている⁶⁾。また、Jovanovic *et al.* の研究でもジヒドロケルセチンはケルセチンとほぼ同等の一重項酸素消去活

性があることが明らかとなっており⁷⁾、*in vivo* でも酸化ストレスから皮膚を守る働きがあるのではないかと期待される。

次に、*in vitro* で示唆された SK の光過敏症防御効果を、動物モデルを用いて検討した。光過敏症モデル動物は、背部を剪毛した Wistar 系ラットに、フェオフォルバド a を経口投与し、10,000 lux の可視光を6時間照射することで、剪毛部に皮膚炎を誘発させ、作製した。皮膚炎の度合いは、照射から、24, 48, 72 時間後に、紅斑、浮腫、壊死について肉眼で判定した。

試験期間中、SK を 150 mg/kg/day 投与した SK 群は、SK を投与しなかった対照群に比べ、フェオフォルバド a によって誘発される皮膚炎の症状が軽かった (Fig. 5)。SK 群 (4 匹) の皮膚炎は、軽症 2 匹と中症 2 匹であったが、対照群 (4 匹) では、中症 2 匹と重症 2 匹で、皮膚炎の度合いに肉眼でも明らかな差が認められた。さらに、対照群では、照射翌日から皮下深部に紫斑が観察され、時間の経過とともにその範囲は拡大したが、SK 群では、皮下浅部に紫斑がみられ、拡大範囲も限られていた。いずれの場合も、皮膚炎は1日目、2日目と進行し、3日目に炎症のピークをむかえた。この皮膚炎は、その後、回復に向うが、完全に治癒するまでかなりの時間を要することから、紫外線による日焼けや光老化とは異なり、皮膚のさらに深

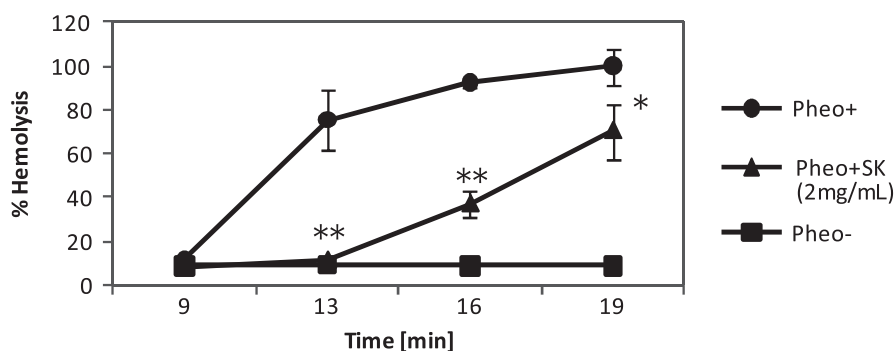


Fig. 3 Time course of photohemolysis caused by pheophorbide a. RBC was exposed to 10,000 lux visible light for the time indicated in the presence of 2.5 μ M pheophorbide a. Values are means \pm SD of triplicate experiments. (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ as compared to Pheo+, Student's t-test).

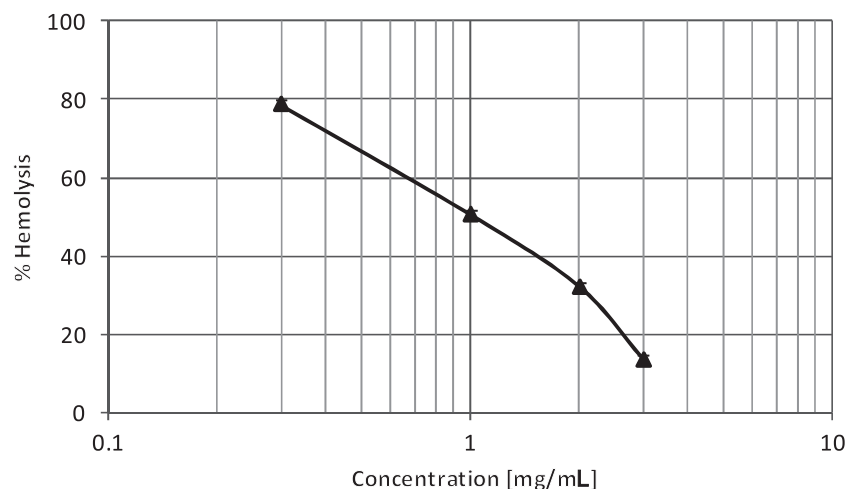


Fig. 4 Dose dependant inhibition of photohemolysis by *Larix sibirica* (SK). RBC and SK extract was exposed to 10,000 lux visible light in the presence of 2.5 μ M pheophorbide a. Values are means of triplicate experiments. ($p < 0.01$, one-way ANOVA).

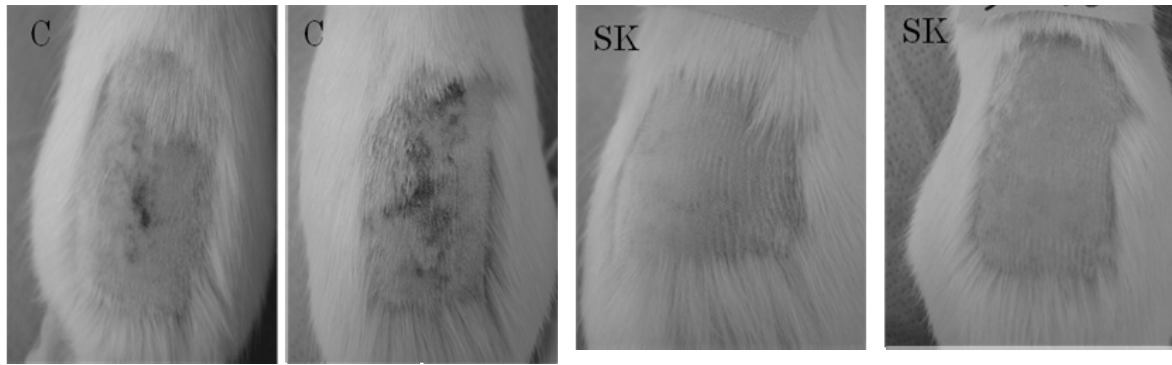


Fig. 5 Pheophorbide a-induced photosensitive damage in control rats (C) and in SK treated rats (SK). The photographs were taken 3 days after the light exposure and are two representatives for each of the two groups (n = 4).

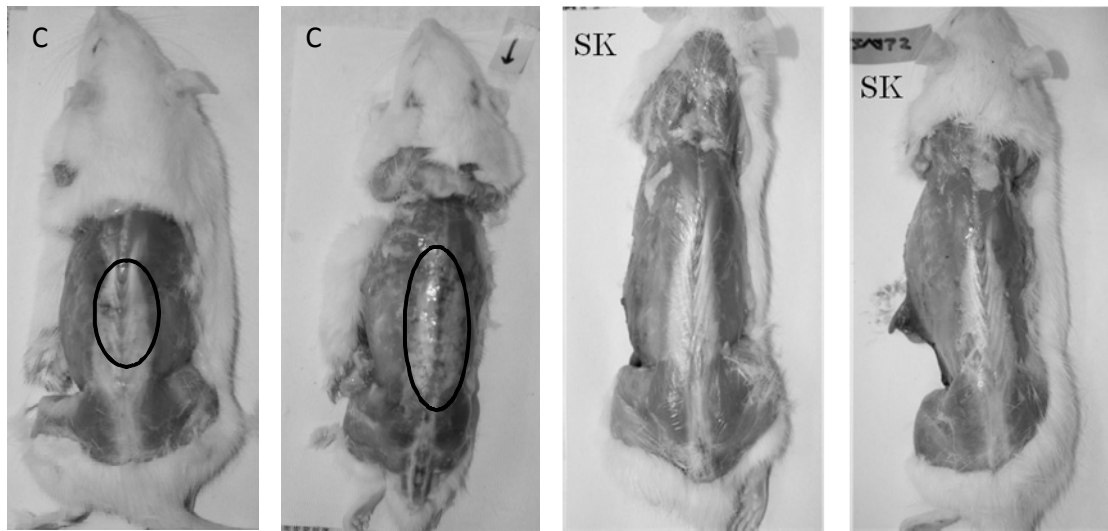


Fig. 6 The inflammation (indicated by the black circles) was observed in the muscle layer of control rats (C), but not in that of SK treated rats (SK). The photographs are two representatives for each of the two groups (n = 4).

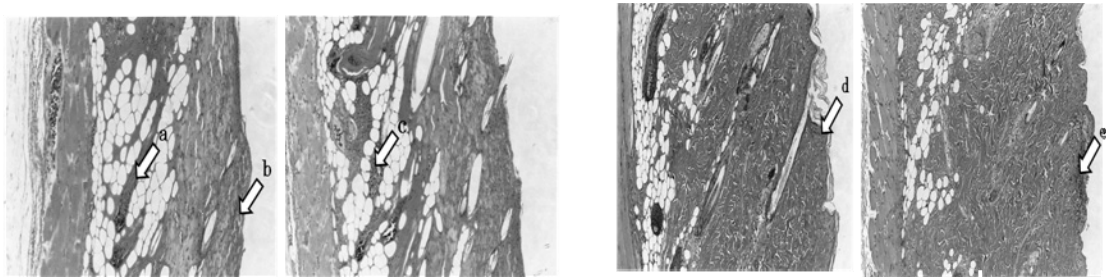


Fig. 7 Histological examination of the dorsal skins obtained from control rats (left) and SK treated rats (right). The paraffin embedded sections were stained by hematoxylin and eosin. The arrows indicate: a) bulking of collagen fibers, b) desquamated epidermis, c and e) inflammatory cell invasion, and d) epidermal thickening. The photographs (magnification 250) are representatives for each of the two groups (n = 4).

部で起こる炎症と考えられる。

皮膚炎の経過観察期間終了後に解剖を行った結果、対照群では、4匹中2匹のラットの背筋に数か所の出血が見られ、炎症が筋層にまで及ぶことが明らかとなった (Fig. 6, C)。この炎症が、皮膚から筋層にも及んだのか、または体内から現れたものかの判断は難しいが、炎症は剪毛部直下の筋層のみならず、十分な光が当たらないと思われる有毛部下の筋層にまで及んでいた。一方、SK群では、いずれのラットの筋層にも炎症は認められず (Fig. 6, SK)、フェオフォルバド a によって誘発された光過敏症は軽度であった。光過敏症による皮膚炎を、さらに詳しく検討

するために、ラット背部の病変部を採取し、組織学的検討を行った。対照群の皮膚では、表皮層が脱落し、真皮層に炎症細胞の浸潤と膠原繊維の膨化が見られた (Fig. 7)。SK群の皮膚では、表皮層に良性的肥厚と、炎症細胞の浸潤が認められ、炎症が皮膚の浅い部分で起こっていることが確認された (Fig. 7)。病理組織学的検討の結果からも、SKがフェオフォルバド a による光過敏症の防御に有効であることが示唆された。

SKの主要成分であるジヒドロケルセチンは、フランス南西部に生育する海岸松 (*Pinus maritima*) の樹皮抽出物であるピクノジェノール®またはフラバンジェノール®の

主成分、プロアントシアニジンに似た構造を持つ。プロアントシアニジンは、これまでの研究から血管保護効果やUV 防御効果の他、皮膚の機能維持に重要な役割を果たすコラーゲン、エラスチンおよびヒアルロン酸の分解酵素を阻害する働きもあることが明らかとなっており⁸⁾、SK にも類似の皮膚保護効果があるのではないかと推測される。今後、SK の体内での動態と薬理作用を明らかにするために、ラット尿および血漿中の酸化ストレスマーカーの変動についても検討していきたい。

参考文献

- 1) Jitsukawa K, Suizu R, Hidano A (1984) Chlorella photosensitization. New phytophotodermatitis. *Int J Dermatol* 23: 263-268.
- 2) 上出良一 (2008) 光を知る 一冊でわかる光皮膚科. 森田明理, 宮地良樹, 清水 宏編, 文光堂, 東京: pp.2-8.
- 3) 堀尾 武 (2006) 光皮膚科学—基礎から臨床へ—. 医薬ジャーナル社, 大阪: pp.26-29.
- 4) Kimura S, Isobe A, Sai H, Takahashi Y (1982) The role of lipid peroxidation on the development of photosensitive syndrome by pheophorbide a. *Lipid peroxides in biology and medicine*, Academic press, Burlington, MA: pp.243-254.
- 5) 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.
- 6) Plotnikov MB, Tjukavkina NA, Plotnikova TM (2005) ジクベルチン系医薬製剤, トムスク大学出版, トムスク: pp.25-41. (露文)
- 7) Jovanovic SV, Simic MG (2000) Antioxidants in nutrition. *Ann N Y Acad Sci* 899: 326-334.
- 8) Packer L, Rimbach G, Virgili F (1999) Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, *Pycnogenol*. *Free Radic Biol Med* 27: 704-724.