

ラット肝ミクロゾームの Fe^{2+} 関与の脂質過酸化反応に対する 八味地黄丸エキスの抑制作用

太田 好次,*^{a)} 砂田 季彦,^{b)} 永田 稔,^{b)} 石黒伊三雄^{a)}

^{a)}藤田保健衛生大学医学部生化学教室, ^{b)}藤田保健衛生大学病院薬剤部

Preventive action of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) extract on Fe^{2+} -catalyzed lipid peroxidation in rat liver microsomes

Yoshiji OHTA,*^{a)} Toshihiko SUNADA,^{b)} Minoru NAGATA^{b)} and Isao ISHIGURO^{a)}

^{a)}Department of Biochemistry, School of Medicine, Fujita Health University

^{b)}Department of Pharmacy, Fujita Health University Hospital

(Received April 16, 1991. Accepted May 15, 1991.)

Abstract

The inhibitory effect of Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) extract on Fe^{2+} -catalyzed lipid peroxidation was examined in isolated rat liver microsomes. Hachimi-jio-gan extract dose-dependently inhibited NADPH-dependent or ascorbic acid-dependent lipid peroxidation in the presence of Fe^{2+} or Fe^{3+} in which a lag phase was observed and/or lengthened. This extract inhibited not only the stimulation by Fe^{2+} of NADPH-dependent or ascorbic acid-dependent lipid peroxidation competitively, but also the oxidation of Fe^{2+} following lipid peroxide formation in Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in a dose-dependent manner. In addition, Hachimi-jio-gan extract reacted with 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, a model of unsaturated fatty acid free radical.

The present results indicate that Hachimi-jio-gan extract inhibits Fe^{2+} -catalyzed lipid peroxidation in rat liver microsomes possibly by scavenging lipid radical and / or lipid hydroperoxide radical formed at the initiation step which Fe^{2+} participates in.

Key words Hachimi-jio-gan, lipid peroxidation, antioxidant, ferrous ion, NADPH, ascorbic acid, rat liver, microsomes.

Abbreviations BPDSA, bathophenanthroline disulfonic acid; DPPH, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; G-6-P, glucose-6-phosphate; G-6-PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; SOD, superoxide dismutase; Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan), 八味地黄丸.

緒 言

著者ら¹⁾は、長期間アルコールを摂取させたラットの脂質代謝の変動に対する八味地黄丸エキスの影響を調べた際、アルコール摂取による肝ミクロゾームでの過酸化脂質レベルの上昇が八味地黄丸エキス併用投与で抑制され、このエキ스가脂質過酸化抑制

作用を示すことを報告した。

肝ミクロゾームにおける過酸化脂質の生成に関しては、単離したミクロゾーム画分やそれより抽出した脂質を用い、種々の条件下で調べられている。肝ミクロゾームにおける脂質過酸化反応のうち、NADPH-チトクローム P-450 還元酵素を介して起る酵素的な NADPH-依存性脂質過酸化反応が最もよく研究されている。また、この反応の開始には

*〒470-11 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98
1-98 Denagakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake,
Aichi 470-11, Japan

微量の遊離 Fe²⁺, ADP などとキレートした Fe²⁺, あるいは Fe²⁺ と Fe³⁺ の複合体が必要であることが報告されている。^{2,6)} 更に, 非酵素的なアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応についても肝ミクロゾームを用いて調べられ, この反応の開始にも微量の遊離 Fe²⁺, ADP などとキレートした Fe²⁺, Fe²⁺ と Fe³⁺ の複合体などを必要とすることが報告されている。^{2,7)}

そこで, 肝ミクロゾームでの脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの抑制作用を明らかにする目的で, 著者らはラット肝より単離したミクロゾーム画分を用い, Fe²⁺ あるいは Fe³⁺ 存在下での酵素的な NADPH-依存性と非酵素的なアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応, および Fe²⁺ のみで惹起される Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響について調べた。

材料と方法

(1) **実験動物**: 日本エスエルシー K.K. (浜松) より購入し, オリエンタル固形飼料で1週間飼育した7週令の Wistar 系雄性ラットを実験に用いた。

(2) **試薬**: 八味地黄丸エキスはツムラ K.K. (東京) より提供されたエキス原末を用いた。Glucose-6-phosphate (G-6-P) と glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) はペーリンガー・マンハイム社製を, NADP⁺ はオリエンタル酵母社製を, superoxide dismutase (SOD) と catalase (チモールフリー) はシグマ社製を, また 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) およびその他の試薬は和光純薬工業社製の試薬特級品を用いた。

(3) **実験方法**: 一夜絶食し, 屠殺したラットの肝臓は冷 0.15 M KCl で灌流して十分に血液を除去した後に摘出した。摘出した肝臓は冷 0.15 M KCl で洗浄, 秤量後, 冷 0.25 M サッカロースで 10% ホモジネートとした。ミクロゾーム画分は既報⁸⁾ の方法に従い, 遠心分画法によって調製した。

Fe²⁺ 存在下での NADPH-依存性 (NADPH-Fe²⁺ 系) とアスコルビン酸-依存性 (アスコルビン酸-Fe²⁺ 系) 脂質過酸化反応の測定は, 既報⁸⁾ の方法に従って行った。即ち, 肝ミクロゾーム (0.25 mg タンパク/ml), 1.0 mM KH₂PO₄, 10 μM FeSO₄ (NH₄)₂SO₄, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) および NADPH 生成系 (2 mM G-6-P, 0.2 U/ml G-6-PDH および 0.3 mM NADP⁺) あるいは 0.1 mM アスコルビン酸より成る反応液 (全量 1.0 ml) を 37°C, 好気的条件下で一定時間振盪し, 反応を行った。八味地

黄丸エキスは一定量の H₂O で懸濁して反応系に添加した。脂質過酸化活性は, 反応によって生成した malondialdehyde (MDA) の量より求めた。即ち, Beuge & Aust⁹⁾ の方法に従い, 生成した MDA は 2-thiobarbituric acid と反応させ, 生じた赤色色素を 535 nm で測定し, MDA の生成量はその吸光度で表した。Fe³⁺ 存在下での NADPH-依存性 (NADPH-Fe³⁺ 系) とアスコルビン酸-依存性 (アスコルビン酸-Fe³⁺ 系) 脂質過酸化反応の測定は, 上記の反応系に FeCl₃ (終濃度 10 μM) を FeSO₄ (NH₄)₂SO₄ の代わりに添加して行った。Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応の測定は, 肝ミクロゾーム (0.25 mg タンパク/ml), 1.0 mM KH₂PO₄, 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) および 0.1 mM FeSO₄ (NH₄)₂SO₄ より成る反応系 (全量 1.0 ml) を用い, 上記と同様の操作で行った。

Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応における Fe²⁺ の酸化は, 肝ミクロゾーム (0.25 mg タンパク/ml), 0.1 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 5.0) および 0.1 mM FeSO₄ (NH₄)₂SO₄ より成る反応系 (全量 1.0 ml) を用い, 37°C, 振盪下で一定時間加温して調べた。八味地黄丸エキスは H₂O に懸濁し, 反応系に添加した。残存する Fe²⁺ は bathophenanthroline disulfonic acid (BPDSA) を用いる Cheng ら¹⁰⁾ の方法で測定した。即ち, 反応液 0.5 ml に 4% Triton X-100 を含む 25 mM リン酸 1.0 ml と 4 mM BPDSA 0.5 ml を加え, 残存する Fe²⁺ を BPDSA とキレートさせ, 生ずる赤色色素を 535 nm で測定した。Fe²⁺ の量はこの色素のミリモル吸光係数 22.4 mM⁻¹ cm⁻¹ を用いて算出した。

DPPH 還元法の測定は, 佐藤ら¹¹⁾ の方法で行なった。0.1 mM DPPH (エタノールに溶解) および 0.04 M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) より成る反応液を 30°C で 10 分間加温し, DPPH の 517 nm における吸光度を測定した。八味地黄丸エキスは H₂O に懸濁して用いた。DPPH の還元量は 517 nm における吸光度の減少度で表した。

タンパクの測定は, Lowry ら¹²⁾ の方法に従い, その標準物質に牛血清アルブミンを用いて行った。

結 果

1. NADPH-Fe²⁺ 系の脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響

Fig. 1A に示すように, 八味地黄丸エキスの添加で肝ミクロゾームの NADPH-Fe²⁺ 系での脂質過酸化反応は lag phase を伴って抑制され, しかも

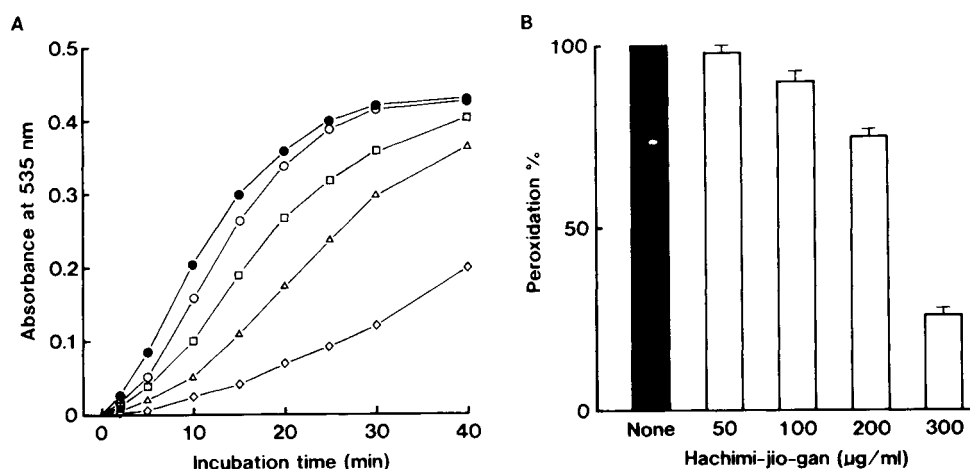


Fig. 1 Effect of Hachimi-jio-gan extract on the time cours (A) and strength (B) of NADPH-dependent lipid peroxidation in the presence of Fe^{2+} in rat liver microsomes.

A. The reaction mixtures were incubated with the following concentrations of Hachimi-jio-gan extract: ●, 0 $\mu\text{g/ml}$; ○, 50 $\mu\text{g/ml}$; □, 100 $\mu\text{g/ml}$; △, 200 $\mu\text{g/ml}$; ◇, 300 $\mu\text{g/ml}$. Each point represents the mean value from two independent determinations. B. The reaction mixtures were incubated for 30 min. The percentage of lipid peroxidation in the presence of Hachimi-jio-gan extract was estimated based on the activity of lipid peroxidation in the absence of the extract. Each value in the presence of the extract is a mean $\pm$ S.E. from three independent determinations.

lag phaseはこのエキスの添加濃度が増すに従って長くなった。この脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの抑制効果は、コントロール（八味地黄丸エキス無添加系）の脂質過酸化反応がプラトーに達する時点（反応開始後30分）での脂質過酸化活性を100%として調べると、Fig. 1Bに示す結果が得られた。その抑制効果は八味地黄丸エキスの添加濃度が50 $\mu\text{g/ml}$ では殆ど見られないが、その100, 200および300 $\mu\text{g/ml}$ の添加での抑制率はそれぞれ10, 25および74%であった。また、このNADPH- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応は、EDTA (0.5 mM)や α , α' -dipyridyl (0.1 mM)の添加によって完全に抑制された。

2. アスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響

肝ミクロゾームのアスコルビン酸- Fe^{2+} 系での脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響について調べると、Fig. 2に示す結果が得られた。八味地黄丸エキスはアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応をlag phaseを伴って抑制し、またlag phaseはその添加濃度の増加に伴って長くなった (Fig. 2A)。このアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの抑制効果は、コントロール（八味地黄丸エキス無添加系）の脂質過

酸化反応がプラトーに達した時点（反応開始後10分）の脂質過酸化活性を100%として調べると、Fig. 2Bに示す結果が得られた。その抑制効果は100 $\mu\text{g/ml}$ の八味地黄丸エキスの添加では殆ど見られないが、その200 $\mu\text{g/ml}$ と300 $\mu\text{g/ml}$ の添加でそれぞれ36%および95%の抑制が見られた。このように、八味地黄丸エキスはアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応に対して、その添加濃度が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上で顕著な抑制作用を示した。この脂質過酸化反応は、EDTA (0.05 mM)や α , α' -dipyridyl (0.1 mM)の添加によって完全に抑制された。

3. Fe^{2+} によるNADPH-依存性とアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応の促進に対する八味地黄丸エキスの影響

肝ミクロゾームでのNADPH- Fe^{2+} 系とアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応は二価鉄のキレート剤によって完全に抑制され、また両脂質過酸化反応の開始には微量の遊離 Fe^{2+} 、ADPなどとキレートした Fe^{2+} 、 Fe^{2+} と Fe^{3+} の複合体などが必要であると報告されている。²⁻⁶⁾しかも、八味地黄丸エキスはこれらの脂質過酸化反応をlag phaseの発現や延長を伴って抑制した。そこで、反応系に添加する Fe^{2+} の濃度を変化させ、 Fe^{2+} による肝ミクロゾームのNADPH-依存性とアスコルビン酸-依存性の

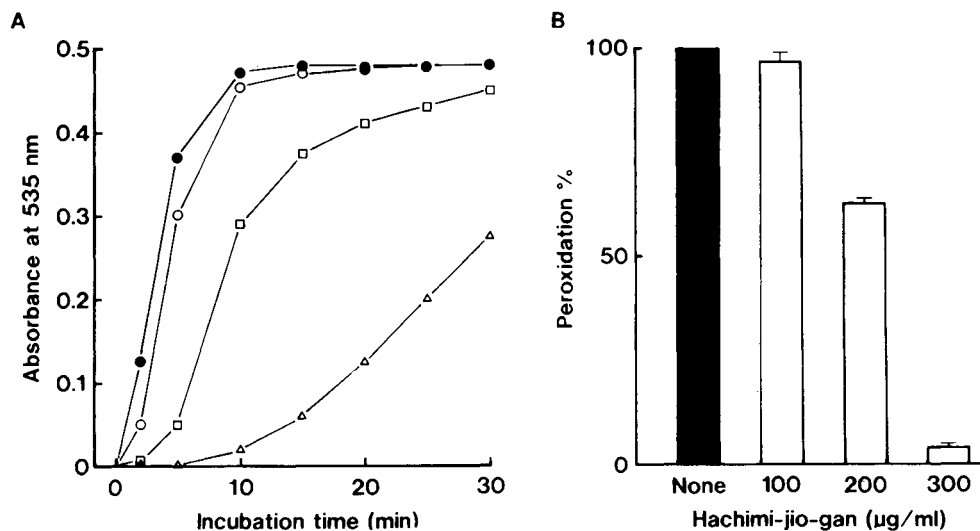


Fig. 2 Effect of Hachimi-jio-gan extract on the time course (A) and strength (B) of ascorbic acid-dependent lipid peroxidation in the presence of Fe²⁺ in rat liver microsomes.

A. The reaction mixtures were incubated with the following concentrations of Hachimi-jio-gan extract: ●, 0 μg/ml; ○, 100 μg/ml; □, 200 μg/ml; △, 300 μg/ml. Each point represents the mean value from two independent determinations. B. The reaction mixtures were incubated for 10 min. The percentage of lipid peroxidation in the presence of Hachimi-jio-gan extract was estimated based on the activity of lipid peroxidation in the absence of the extract. Each value is a mean ± S.E. from three independent determinations.

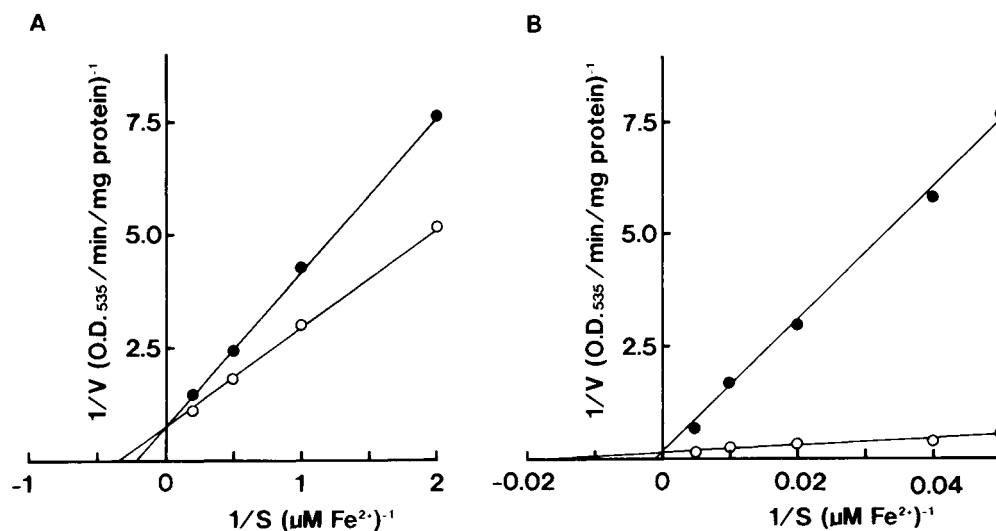


Fig. 3 Effect of Hachimi-jio-gan extract on the stimulation of NADPH-dependent (A) or ascorbic acid-dependent (B) lipid peroxidation by Fe²⁺ in rat liver microsomes.

A. The reaction mixtures containing various concentrations of FeSO₄(NH₄)₂SO₄ were incubated in the presence (●) or absence (○) of 80 μg/ml of Hachimi-jio-gan extract for 10 min. B. The reaction mixtures containing various concentrations of FeSO₄(NH₄)₂SO₄ were incubated in the presence (●) or absence (○) of 200 μg/ml of Hachimi-jio-gan extract for 5 min. Each point represents the mean value from two independent determinations.

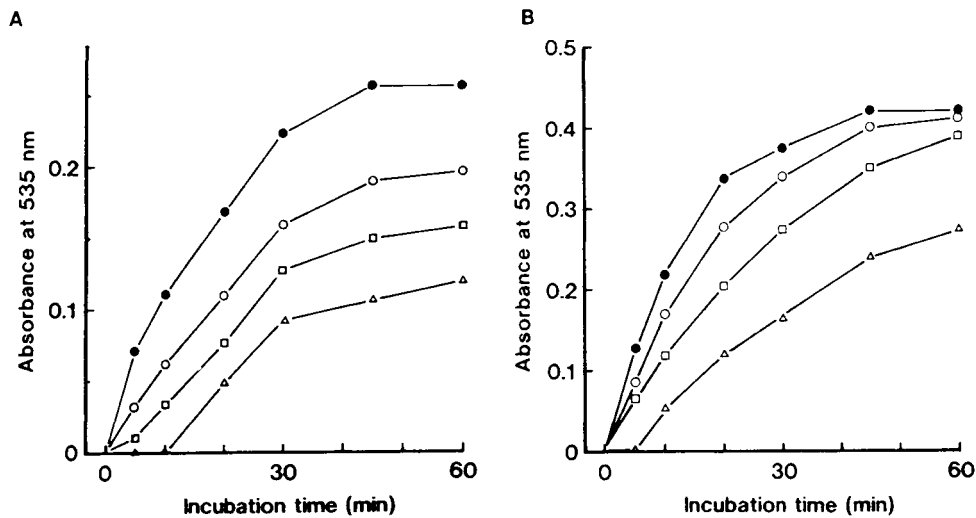


Fig. 4 Effect of Hachimi-jio-gan extract on NADPH-dependent (A) or ascorbic acid-dependent (B) lipid peroxidation in the presence of Fe^{3+} in rat liver microsomes.

NADPH-dependent or ascorbic acid-dependent lipid peroxidation was conducted in the presence of $10 \mu\text{M}$ FeCl_3 and the following concentrations of Hachimi-jio-gan extract for the indicated times: $\bullet$, $0 \mu\text{g/ml}$; $\circ$, $100 \mu\text{g/ml}$; $\square$, $200 \mu\text{g/ml}$; $\triangle$, $300 \mu\text{g/ml}$. Each point represents the mean value from two independent determinations.

脂質過酸化反応の促進に対する八味地黄丸エキスの影響を調べた。即ち、添加した Fe^{2+} の濃度と脂質過酸化活性の両方の逆数プロット (Lineweaver-Burk プロット) を用い、 Fe^{2+} の添加によって促進される両脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの抑制作用の様式を調べた結果、このエキスは Fe^{2+} による両脂質過酸化反応の促進を拮抗的に阻害した (Fig. 3A と 3B)。

4. NADPH- Fe^{3+} 系とアスコルビン酸- Fe^{3+} 系の脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響

NADPH- Fe^{2+} 系やアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応に対して八味地黄丸エキスが抑制作用を示すことが明らかとなったので、このエキスの Fe^{3+} 存在下での NADPH-依存性とアスコルビン酸-依存性の脂質過酸化反応に対する影響を調べた。Fig. 4A と 4B に示すように、八味地黄丸エキスは NADPH- Fe^{3+} 系およびアスコルビン酸- Fe^{3+} 系の脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制し、しかもこのエキスの添加濃度が $300 \mu\text{g/ml}$ では両脂質過酸化反応において明らかな lag phase が認められた。また、両脂質過酸化反応は EDTA (0.1 mM) や α, α' -dipyridyl (0.05 mM) の添加によって完全に抑制された。このように、八味地黄丸エキスは NADPH- Fe^{3+} 系とアスコルビン酸- Fe^{3+} 系の脂質過酸化反応を NADPH- Fe^{2+} 系やアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の

脂質過酸化反応の場合と同様の様式で抑制した。

5. Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応に対する八味地黄丸エキスの影響

八味地黄丸エキスの Fe^{2+} 関与の NADPH-依存性およびアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応に対する抑制作用を更に明らかにするために、 0.1 mM Fe^{2+} を反応系に添加した際の脂質過酸化反応 (Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応) に対する八味地黄丸エキスの影響を調べた。 Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応は八味地黄丸エキスの添加で濃度依存的に抑制され、しかもその添加濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ において明らかな lag phase が認められた (Fig. 5)。また、lag phase は八味地黄丸エキスの添加濃度の増加に伴って長くなった (Fig. 5)。この Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応は EDTA (0.2 mM) や α, α' -dipyridyl (0.2 mM) によって完全に抑制された。このように、八味地黄丸エキスは Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応を NADPH- Fe^{2+} 系やアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応の場合と同様の様式で抑制した。

6. Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応における過酸化脂質の生成に伴う Fe^{2+} の酸化に対する八味地黄丸エキスの影響

八味地黄丸エキスは、 Fe^{2+} -依存性脂質過酸化反応を NADPH- Fe^{2+} 系やアスコルビン酸- Fe^{2+} 系の脂質過酸化反応の場合と同様の様式で抑制した。

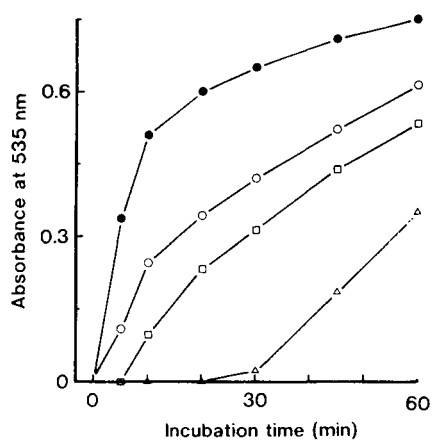


Fig. 5 Effect of Hachimi-jio-gan extract on Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes.

The reaction mixtures were incubated with the following concentrations of Hachimi-jio-gan extract for the indicated times: ●, 0 $\mu\text{g/ml}$; ○, 50 $\mu\text{g/ml}$; □, 100 $\mu\text{g/ml}$; △, 200 $\mu\text{g/ml}$. Each point represents the mean value from two independent determinations.

しかも、このエキスは Fe²⁺ による NADPH-依存性やアスコルビン酸-依存性の脂質過酸化反応の促

進を拮抗的に抑制した。そこで、Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応において過酸化脂質の生成に伴う Fe²⁺ の酸化に対する八味地黄丸エキスの影響を調べた。37°C における Fe²⁺ 存在下でのリポソームを用いての脂質過酸化反応において、Fe²⁺ の酸化は pH 7.4 では速やかにおきるが、pH 5.0 では緩やかにおきることが Leung ら¹³⁾ により示されているので、肝ミクロゾームの Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応における過酸化脂質の生成に伴う Fe²⁺ の酸化を 37°C, pH 5.0 において調べた。その結果、Fe²⁺ の酸化は過酸化脂質の生成に伴っておき、lag phase がみられた (Fig. 6A と 6B)。八味地黄丸エキスによって過酸化脂質の生成と共に、その生成に伴う Fe²⁺ の酸化は抑制され、lag phase の延長が認められた (Fig. 6A と 6B)。このように、八味地黄丸エキスによる Fe²⁺ の酸化に対する抑制パターンと過酸化脂質の生成に対する抑制のパターンとはよく類似していた。

7. DPPH の還元に対する八味地黄丸エキスの影響

八味地黄丸エキスに脂質過酸化反応で生ずるフリーラジカルを消去する作用があるか否かを明らかにするために、不飽和脂肪酸フリーラジカルのモデル

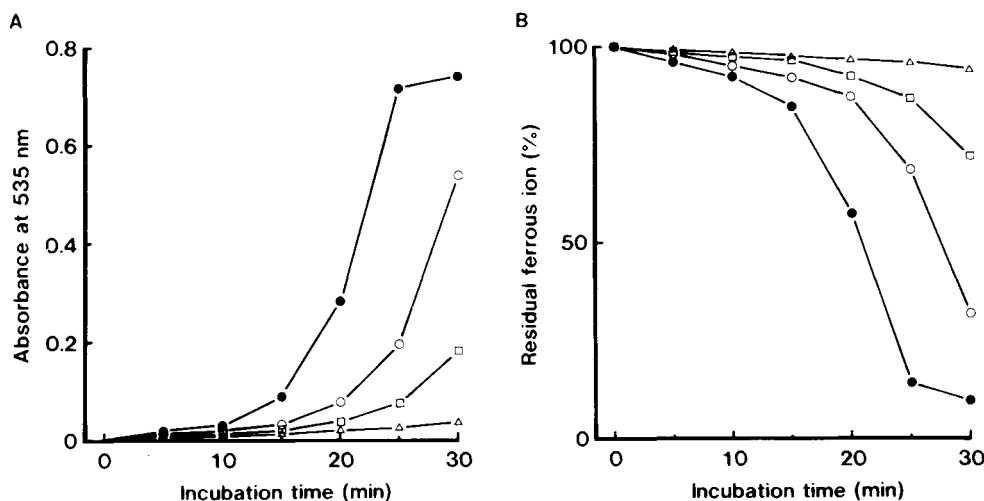


Fig. 6 Effect of Hachimi-jio-gan extract on the oxidation of Fe²⁺ (B) following the formation of lipid peroxide (A) in Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes.

The reaction mixtures were incubated with the following concentrations of Hachimi-jio-gan extract for the indicated times under the conditions as described in Materials and Methods: ●, 0 $\mu\text{g/ml}$; ○, 25 $\mu\text{g/ml}$; □, 50 $\mu\text{g/ml}$; △, 100 $\mu\text{g/ml}$. The oxidation of Fe²⁺ is given as the percentage of Fe²⁺ remaining in the reaction mixtures. The concentration of Fe²⁺ at 0 min was $98.7 \pm 0.7 \mu\text{M}$ (n=4). Each point represents the mean value from two independent determinations.

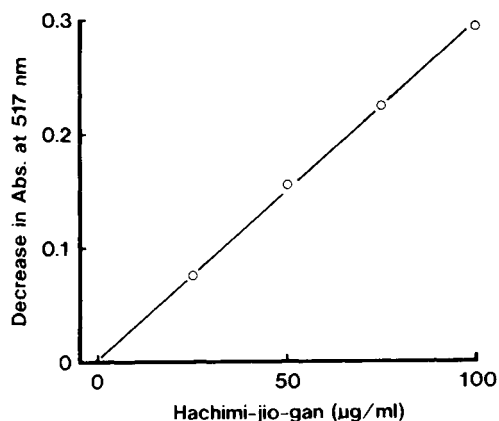


Fig. 7 Effect of Hachimi-jio-gan extract on the reduction of 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

Control reaction mixtures containing 0.1 mM DPPH and 40 mM acetate buffer (pH 5.5) were incubated with the indicated concentrations of Hachimi-jio-gan extract at 30°C for 10 min and the decrease in absorbance at 517 nm was measured. Each point represents the mean value from two independent determinations.

である DPPH^{11, 15, 16)} を用い、フリーラジカルとの反応性を調べた。その結果、Fig. 7 に示すように、DPPH の 517 nm における吸光度は八味地黄丸エキスの添加濃度に比例して減少し、このエキスは DPPH との反応性を示した。

考 察

肝ミクロゾームの酵素的な NADPH-依存性脂質過酸化反応および非酵素的なアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応では、微量の遊離 Fe²⁺、ADP などとキレートした Fe²⁺、Fe²⁺ と Fe³⁺ の複合体などが反応の開始に必要であるとされている。²⁻⁷⁾ Ernster らの研究グループ^{5, 6)} は、肝ミクロゾームでの酵素的な NADPH-依存性脂質過酸化反応において、ADP などとキレートした Fe²⁺ が触媒的に作用して脂質ラジカルの生成により、またこのラジカルの生成に伴って脂質ヒドロペルオキシラジカルが生成されることを提唱し、しかもこの機作が非酵素的なアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応にも当てはまることを示している。八味地黄丸エキスはラット肝ミクロゾームでの NADPH-Fe²⁺ 系やアスコルビン酸-Fe²⁺ 系の脂質過酸化反応ばかりでなく、

NADPH-Fe³⁺ 系、アスコルビン酸-Fe³⁺ 系、Fe²⁺ 単独系などの脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制した。しかも、八味地黄丸エキスによってこれらの脂質過酸化反応が抑制された際に、lag phase の発現や延長が認められた。また、NADPH-Fe³⁺ 系やアスコルビン酸-Fe³⁺ 系の脂質過酸化反応では、Fe³⁺ は NADPH やアスコルビン酸によって還元されて Fe²⁺ となり、作用することが示されている。^{2, 7)} しかも、これらの脂質過酸化反応は二価鉄のキレート剤である EDTA や α, α' -dipyridyl によって完全に抑制された。このように、八味地黄丸エキスは Fe²⁺-関与の脂質過酸化反応の開始を抑制することが示唆された。更に、Fe²⁺ による NADPH-依存性およびアスコルビン酸-依存性の脂質過酸化反応の促進に対する八味地黄丸エキスの影響を調べると、このエキスは Fe²⁺ によるこれらの脂質過酸化反応の促進を拮抗的に阻害することが明らかとなった。これらのことより、八味地黄丸エキスは Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応において、この反応の開始に必要な Fe²⁺ に対して直接、あるいはこの鉄の関与する反応開始過程において生成される脂質ラジカルや脂質ヒドロペルオキシラジカルに対して作用している可能性が考えられた。

そこで、著者らは八味地黄丸エキスの Fe²⁺ に対する直接的な作用を明らかにするために、八味地黄丸エキスが Fe²⁺ の自動酸化に対して影響するか否かを調べた。その結果、データには示していないが、このエキスは濃度依存的に Fe²⁺ の自動酸化を促進することが明らかとなった。しかし、Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応における Fe²⁺ の酸化に対する八味地黄丸エキスの影響を調べると、このエキスは過酸化脂質の生成に伴っておこる Fe²⁺ の酸化を抑制していた。このことより、八味地黄丸エキスは Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応をこの反応の開始に必要な Fe²⁺ の酸化を促進することによって抑制していないことが示唆された。また、八味地黄丸エキスは肝ミクロゾーム存在下と非存在下では Fe²⁺ に対して異なる作用を示すことが明らかとなった。

更に、著者らは八味地黄丸エキスの Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応に対する抑制作用を明らかにするために、このエキスのフリーラジカルとの反応性を不飽和脂肪酸フリーラジカルのモデルである DPPH^{11, 15, 16)} との反応性によって調べた。その結果、八味地黄丸エキスは DPPH との反応性を示すことが明らかとなった。また、Goddard & Sweeney¹⁴⁾ は肝ミクロゾームにおける Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応の開始がブチルヒドロキシルエンやカテキ

ンなどのフリーラジカル補捉剤によって延長されること、即ちこの脂質過酸化反応でみられる lag phase がこれらのフリーラジカル補捉剤の添加で長くなることを報告している。これらのことより、八味地黄丸エキスの Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応に対する抑制には、このエキスのフリーラジカル補捉作用が係わり、この作用によって脂質過酸化反応の開始が延長されると考えられた。

従って、八味地黄丸エキスによるラット肝ミクロゾームでの Fe²⁺ 関与の NADPH-依存性とアスコルビン酸-依存性、並びに Fe²⁺-依存性の脂質過酸化反応の抑制は、八味地黄丸エキ스가 Fe²⁺ の関与する反応開始過程において生成される脂質ラジカルや脂質ヒドロペルオキシラジカルと反応し、これらのラジカルの生成を阻害することに基づくと推察される。

しかし、Fe²⁺ 関与の NADPH-依存性の脂質過酸化反応の開始およびプロパゲーションには種々の酸素ラジカル (O₂⁻, OH[·], ¹O₂ および H₂O₂) の関与が示唆されている。¹⁷⁻²²⁾ また、Fe²⁺ 関与のアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応においてもアスコルビン酸の自動酸化で生ずる O₂⁻ やこれの不均化反応で生ずる H₂O₂、更に H₂O₂ と Fe²⁺ の反応 (Fenton 反応) で生ずる OH[·] などの関与が考えられる。一方、八味地黄丸エキスは O₂⁻ や OH[·] の消去能を有することが報告されている。²³⁾ 従って、八味地黄丸エキ스가これらの酸素ラジカルの消去によって、Fe²⁺ 関与の NADPH-依存性およびアスコルビン酸-依存性の脂質過酸化反応を阻害している可能性が考えられる。そこで、著者らは本実験での NADPH-Fe²⁺ 系とアスコルビン酸-Fe²⁺ 系の脂質過酸化反応に酸素ラジカルが関与しているか否かを種々のラジカスカベンジャーを用いて調べた。その結果、データには示していないが、O₂⁻ の消去による SOD, OH[·] ラジカルの消去剤として知られているギ酸および H₂O₂ の消去による catalase によっては両脂質過酸化反応は抑制されなかったが、¹O₂ の消去剤として知られている 1, 4-diazacyclo-[2, 2, 2] octane によって両脂質過酸化反応は 20~30% だけ抑制された。このことより、八味地黄丸エキ스가ラット肝ミクロゾームの Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応を酸素ラジカルを消去することにより抑制している可能性は少ないと考えられる。

八味地黄丸エキスは地黄、山茱萸、山薬、沢瀉、茯苓、牡丹皮、桂皮および附子の 8 種類で構成されている。これらの生薬のうちで、山茱萸、牡丹皮、桂皮などは抗酸化作用を示すタンニンを多く含んで

おり、またタンニン類は ADP 存在下でのラット肝ミクロゾームの NADPH-依存性脂質過酸化反応を抑制し、しかも DPPH との反応性を示すことが奥田ら²⁴⁾によって報告されている。従って、このエキスの肝ミクロゾームにおける Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応に対する抑制作用は、山茱萸、牡丹皮、桂皮などに含まれているタンニンに基づいている可能性が示唆される。しかし、このことに関しては、今後検討する必要がある。

結 論

八味地黄丸エキスは Fe²⁺ および F³⁺ 存在下におけるラット肝ミクロゾームの NADPH-依存性およびアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応を濃度依存的に抑制し、しかもこれらの脂質過酸化反応において lag phase の発現や延長をもたらした。また、このエキスは Fe²⁺ による NADPH-依存性とアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応の促進を拮抗的に阻害した。更に、八味地黄丸エキスは Fe²⁺-依存性脂質過酸化反応を Fe²⁺ 関与の NADPH-依存性やアスコルビン酸-依存性脂質過酸化反応の場合と同様の様式で抑制し、しかもこの脂質過酸化反応での過酸化脂質の生成に伴う Fe²⁺ の酸化を濃度依存的に抑制した。また、このエキスは不飽和脂肪酸フリーラジカルのモデルである DPPH との反応性を示した。従って、八味地黄丸エキスによる肝ミクロゾームでの Fe²⁺ 関与の脂質過酸化反応の抑制は、このエキ스가 Fe²⁺ の関与するその反応開始過程において生成される脂質ラジカルや脂質ヒドロペルオキシラジカルと反応し、これらのラジカルの生成を阻害することに基づくと推察された。

文 献

- 1) 太田好次, 星野知久, 石黒伊三雄, 砂田季彦, 奥村義金, 原田治良: 長期アルコール投与ラットの脂質代謝に及ぼす八味地黄丸エキス末の影響, 和漢医薬学会誌 2, 120-121, 1985.
- 2) Hochstein, P., Nordenbrand, K. and Ernster, L.: Evidence for the involvement of iron in the ADP-activated peroxidation of lipid in microsomes and membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 223-238, 1964.
- 3) Pederson, T.C. and Aust, S.D.: The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 385, 232-242, 1975.
- 4) Kornbrust, D.J. and Mavis, R.D.: Microsomal lipid peroxidation. I. Characterization of the role of iron

- and NADPH. *Mol. Pharmacol.* **17**, 400-407, 1980.
- 5) Ernster, L. and Orrenius, S.: Microsomal lipid peroxidation: Mechanism and some biomedical implications. In "Lipid peroxides in Biology and Medicine", (Ed. by K. Yagi), Academic Press, New York, pp.55-79, 1982.
- 6) Ursini, F., Maiorino, M., Hochstein, P. and Ernster, L.: Microsomal lipid peroxidation: Mechanisms of initiation. The role of iron and iron chelators. *Free Rad. Biol. Med.* **6**, 31-36, 1989.
- 7) Miller, D.M. and Aust, S.D.: Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 113-119, 1989.
- 8) 石黒伊三雄, 太田好次, 荻津直通, 伊藤宜則, 原田治良, 篠原力雄: 肝ミクロゾームの脂質過酸化反応に対するトランスフェリンおよびセルロプラスミンの影響. *臨床化学* **11**, 207-213, 1982.
- 9) Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in Enzymology" (Ed. by S. Fleischer and L. Packer), Academic Press Inc., New York, vol. 52, pp.302-310, 1978.
- 10) Cheng, K.L., Ueno, K. and Imamura, T.: N,N-Donating chelating agents. In "CRC Handbook of Organic Analytical Reagents" (Eds. by K.L.Cheng, K. Ueno and T. Imamura), CRC Press, Boca Raton, pp.309-321, 1982.
- 11) 佐藤正基, 井口ナチ子, 小谷友香, 村田敏郎: 銅クロロフィリンナトリウムの脂質過酸化反応におよぼす影響 (第2報) ラットホモジネート脂質および遊離不飽和脂肪酸の過酸化に対する影響. *衛生化学* **23**, 23-26, 1977.
- 12) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275, 1951.
- 13) Leung, H. -W., Vang, M.J. and Mavis, R.D.: The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochem. Biophys. Acta* **664**, 266-272, 1981.
- 14) Goddard, J. G. and Sweeney, G.D.: Delayed, ferrous iron-dependent peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 372-381, 1987.
- 15) Blois, M.S.: Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200, 1958.
- 16) Mellors, A. and Tappel, A.L.: The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **241**, 4353-4356, 1966.
- 17) King, M.M., Lai, E.K. and McCay, P.B.: Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250**, 6495-6502, 1975.
- 18) Barid, M.B., Massie, H.R. and Piekelnia, M.J.: Formation of lipid peroxides in isolated rat liver microsomes by singlet molecular oxygen. *Chem. -Biol. Interactions* **16**, 145-153, 1977.
- 19) Lai, C.-S. and Piette, L.H.: Hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 51-59, 1977.
- 20) Lai, C.-S. and Piette, L.H.: Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 27-38, 1978.
- 21) Kameda, K., Ono, T. and Imai, Y.: Participation of superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in NADPH-cytochrome P-450 reductase-catalyzed peroxidation of methyl linolenate. *Biochem. Biophys. Acta* **572**, 77-82, 1979.
- 22) Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O. and Aust, S.D.: The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **254**, 5892-5899, 1979.
- 23) 吉川敏一, 高橋周史, 内藤祐二, 谷川 徹, 上田茂信, 小山田裕一, 杉野 成, 近藤元治: 漢方薬の活性酸素産生系に及ぼす影響. 電子スピン共鳴によるスピントラッピング法を用いての検討. *医学のあゆみ* **152**, 741-742, 1990.
- 24) 奥田拓男, 藤田勇三郎, 吉田隆志, 波多野力: 天然物の活性酸素除去作用. ポリフェノール・タンニン類について. "フリーラジカルと臨床" 日本医学館, 東京, vol.3, pp.19-30, 1990.