

マウス肝ミクロソームの四塩化炭素依存性脂質過酸化反応に対する
大豆胚軸サポニン A と B 群画分の影響

西田 圭志,^{a)}太田 好次,^{a)}荒木 康久,^{b)}樋口 哲也,^{b)}伊藤 圓,^{b)}長村 洋一,^{c)}石黒伊三雄^{a)}

^{a)}藤田保健衛生大学医学部生化学 I 教室, ^{b)}同・医学部消化器内科学教室, ^{c)}同・衛生学部臨床化学教室

Effects of "group A saponin" and "group B saponin" fractions from
soybean seed hypocotyls on carbon tetrachloride-dependent lipid
peroxidation in mouse liver microsomes

Keiji NISHIDA,^{a)} Yoshiji OHTA,^{a)} Yasuhisa ARAKI,^{b)} Tetsuya HIGUCHI,^{b)}
Madoka ITO,^{b)} Yoichi NAGAMURA^{c)} and Isao ISHIGURO^{a)}

Departments of ^{a)}Biochemistry and ^{b)}Internal Medicine, School of Medicine and
^{c)}Department of Clinical Chemistry, School of Health Sciences, Fujita Health University

(Received March 8, 1993. Accepted May 28, 1993.)

Abstract

The inhibitory effects of "group A saponin" and "group B saponin" fractions, which were extracted and separated from soybean seed hypocotyls, on carbon tetrachloride (CCl₄)-dependent lipid peroxidation were examined in isolated mouse liver microsomes and compared to that of α -tocopherol. "Group A saponin" and "group B saponin" fractions dose-dependently inhibited CCl₄-dependent lipid peroxidation without a lag time. The inhibitory effect of "group A saponin" fraction was much stronger than that of "group B saponin" fraction. In addition, "group A saponin" fraction inhibited CCl₄-dependent lipid peroxidation even when added to the reaction mixture on the way of this reaction. The inhibitory mode of "group A saponin" fraction on this lipid peroxidation resembled that of α -tocopherol. A high concentration of "group A saponin" fraction inhibited neither aniline hydroxylation and aminopyrine demethylation nor NADPH-cytochrome P-450 reductase activity in mouse liver microsomes. Moreover, CCl₄-dependent lipid peroxidation was markedly inhibited in liver microsomes pretreated with "group A saponin" fraction. These results indicate that "group A saponin" fraction inhibits CCl₄-dependent lipid peroxidation in mouse liver microsomes possibly by inhibiting the chain reaction of this lipid peroxidation in a similar manner to α -tocopherol without affecting the microsomal monooxygenase system and that "group A saponin" fraction rather than "group B saponin" fraction may have a high affinity to mouse liver microsomes.

Key words soyasaponin, lipid peroxidation, carbon tetrachloride, mouse liver microsomes, antioxidant, cytochrome P-450 reductase, soybean seed hypocotyl.

Abbreviations CCl₄, carbon tetrachloride; MDA, malondialdehyde; p-AP, p-aminophenol; TBA, 2-thiobarbituric acid.

緒 言

著者ら¹⁾は大豆胚軸の粗サポニンおよびそれから

分離したサポニン群画分を四塩化炭素 (CCl₄) 肝障害マウスに投与すると, 肝障害の抑制傾向がみられると共に, 肝組織中の過酸化脂質 (LPO) の増加が抑制されることを報告した。また, ラット単離肝細

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

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 10, 54-60, 1993

胞に CCl_4 を作用させて惹起した肝障害およびその肝障害に伴う肝細胞壊死も、大豆胚軸のサポニン群画分によって抑制されることを明らかにしている。²⁾ 最近、 CCl_4 肝障害に伴う肝細胞壊死は CCl_4 による肝細胞の脂質過酸化の亢進によることが報告されている。³⁾ 従って、大豆胚軸から得たサポニン群画分中には脂質過酸化反応に対して抑制作用を示す成分が存在し、この成分が CCl_4 肝障害の抑制に寄与していると考えられる。

CCl_4 投与における肝細胞での LPO の生成は、 CCl_4 が肝細胞の小胞体 (ミクロソーム) に局在する NADPH-cytochrome P-450 reductase と cytochrome P-450 を介する薬物代謝系で代謝された際に生成した $\text{CCl}_3\cdot$ や $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ などのフリーラジカルがミクロソーム膜をはじめ、ミトコンドリア膜や細胞膜の脂質を過酸化することによると考えられている。⁴⁾

そこで、著者らは大豆胚軸のサポニン群画分のマウス肝ミクロソームにおける CCl_4 -依存性脂質過酸化反応に対する影響について調べた。

材料と方法

(1) 実験動物：日本エルエスシー社 (浜松) より購入した 6 週令の ddY 系雄性マウスを実験に用いた。

(2) 試薬：Glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) はベーリンガーマンハイム社製を、酸化型 cytochrome c はシグマ社製を、NADPH と NADP^+ はオリエンタル酵母社製を、また、 α -tocopherol はエーザイ社製を用いた。また、 CCl_4 , aniline, aminopyrine およびその他の試薬は和光純薬工業社製の特級品を用いた。

(3) 大豆胚軸からのサポニンの分画とその含有サポニンの検出：大豆胚軸からのサポニンの分画とこのサポニン中に含まれるサポニン成分の検出は Shiraiwa ら⁵⁾ の方法に従って行った。すなわち、大豆胚軸の粗サポニンは 70% エタノール抽出物を、ODS カラム (C-18 オクタデシル基化学結合型シリカ系充填剤：逆層系) に通し、さらに 45% メタノール洗浄後、80% メタノール処理によって分画した。この粗サポニンは Sephadex LH-20 カラムを用いてゲル濾過を行い、サポニン A と B 群画分を分取した。得られたサポニン A と B 群画分中のサポニン成分の検出は薄層クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。サポニン A 群

画分は, soyasaponin Ab (acetyl-soyasaponin A_1) と soyasaponin A_1 をそれぞれ 60% と 40% の割合で含んでいた。サポニン B 群画分は, soyasaponin Ba (soyasaponin V), soyasaponin Bb (soyasaponin I) およびその他の soyasaponin B 群 (soyasaponin II (Bc), III (Bb') および IV (Bc')) をそれぞれ 20%, 70% および 10% の割合で含んでいた。

(4) マウス肝ミクロソームの調製：一晚 (15 時間) 絶食したマウスの肝臓は 1 mM EDTA を含んだ冷 0.15 M KCl で灌流し、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 0.15 M KCl で 10% ホモジネートとした。肝ミクロソーム分画はこの肝ホモジネートを既報⁶⁾ の方法に従い、遠心分画して得た。また、肝ミクロソームのタンパク濃度の測定は Lowry ら⁷⁾ の方法に従って行い、その標準物質にウシ血清アルブミンを用いた。

(5) 肝ミクロソームの CCl_4 -依存性脂質過酸化反応の測定： CCl_4 -依存性脂質過酸化活性は調製した肝ミクロソームを用い、Kornbrust & Mavis⁸⁾ の方法に準じて測定した。すなわち、1 mM EDTA, 10 μl CCl_4 , 0.1 mM NADPH, ミクロソーム (1 mg タンパク) および 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) よりなる反応液 (全量 1.0 ml) を試験官に入れ、シリコン栓をして 37°C、振盪下で反応を行った。サポニン群画分は H_2O に懸濁し、また、 α -tocopherol は、エタノールで溶解して反応系に添加した。脂質過酸化活性は 2-チオバルビツール酸 (TBA) を用いる Buege & Aust⁹⁾ の方法によって測定し、マロンジアルデヒド (MDA) の生成量で表した。その量の算出は、TBA と MDA の反応で生ずる色素の 535 nm における吸光係数 ($156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を用いて行った。なお、TBA を用いる MDA の測定は、反応系に添加した何れの濃度のサポニン群画分および α -tocopherol によっても影響されなかった。

(6) 肝ミクロソームの aniline の水酸化活性と aminopyrine の脱メチル化活性の測定：肝ミクロソームにおける aniline の水酸化活性と aminopyrine の脱メチル化活性は、著者ら¹⁰⁾ の方法に準じて測定した。すなわち、aniline の水酸化活性の測定には 1.25 mM MgCl_2 , NADPH-generating system (0.3 mM NADP^+ , 2 mM G-6-P および 0.2 unit G-6-PDH), 10 mM aniline, ミクロソーム (1 mg タンパク) および 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) よりなる反応液 (全量 1.0 ml) を用い、反応は 37°C、振盪下で 15 分間行った。2 mg/ml のサポニン群画分は H_2O に懸濁し、また、20 nmol/ml の α -tocopherol

はエタノールで溶解して反応系に添加した。この水酸化活性は生成した p-aminophenol (p-AP) を用いる Kashiwamata ら¹¹⁾の方法によって測定し、その生成量で表した。Aminopyrine の脱メチル化活性の測定は aniline の水酸化活性の測定と同様の反応系を用い aniline の代わりに 2 mM aminopyrine を反応系に添加して行った。反応は 37°C で振盪下において 10 分間行った。この脱メチル化活性は生成した formaldehyde (HCHO) を acetylacetone を呈色薬として用いる Nash¹²⁾の方法で測定し、その生成量で表した。なお、反応系に添加した濃度のサポニン群画分は両酵素活性測定における呈色反応に若干の影響を与えたので、それぞれの活性値は補正して求めた。

(7) 肝ミクロソームの NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性の測定: NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性の測定は、Williams & Kamin の方法¹³⁾に準じて行った。すなわち、測定には 20 μ M 酸化型 cytochrome c, 1 mM KCN, 0.1 mM NADPH, ミクロソーム (25 μ g タンパク) および 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) よりなる反応液 (全量 1.0 ml) を用い、25°C における 550 nm の吸光度の増大を経時的に測定し、生成する還元型 cytochrome c を定量した。なお、本酵素活性は 1 分間に 1 μ mol の cytochrome c を還元する酵素量で表し

た。2 mg/ml のサポニン群画分は H₂O に懸濁し、また、20 nmol/ml の α -tocopherol はエタノールで溶解して反応系に添加した。

(8) サポニン群画分による肝ミクロソームの前処理: 肝ミクロソーム (10 mg 蛋白/ml) は、20 mg/ml のサポニン A 群画分あるいはサポニン B 群画分の共存下において 37°C, 120 分間振盪下で加温した。対照のミクロソームは、サポニン群画分の懸濁液と同量の H₂O を添加して加温した。加温処理したこれらのミクロソーム懸濁液中のサポニン群画分の除去は、5 倍量の冷 0.15 M KCl にそのミクロソームを懸濁し、105,000 $\times$ g で 60 分間遠心し、この操作を 2 回繰返すことによって行った。このサポニン群画分を除去したミクロソームは、CCl₄-依存性脂質過酸化反応の測定に用いた。

(9) 統計学的検討: 統計学的有意差の検定は、Students'-*t* test を用いて行い、危険率 5% 以下を有意とした。

結 果

1. CCl₄-依存性脂質過酸化反応に対するサポニン A と B 群画分および α -tocopherol の影響

肝ミクロソームの CCl₄-依存性脂質過酸化反応における過酸化脂質の生成は、反応開始後 30 分では

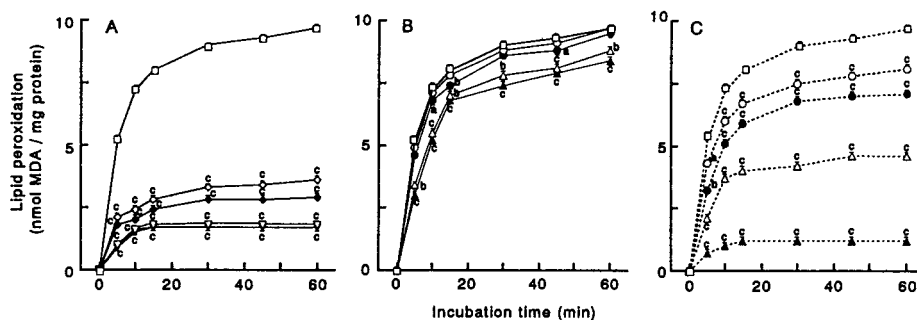


Fig. 1 Effect of the simultaneous addition of "group A saponin" fraction (A), "group B saponin" fraction (B) or α -tocopherol on CCl₄-dependent lipid peroxidation in mouse liver microsomes as a function of incubation time. The reaction mixtures were incubated in the presence or absence of 0.1, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml of either "group A saponin" fraction or "group B saponin" fraction and of 2.5, 5.0, 10.0, and 20.0 nmol/ml of α -tocopherol. A. $\square$ — $\square$, CCl₄; $\diamond$ — $\diamond$, CCl₄ with 0.1 mg/ml of "group A saponin" fraction; $\blacklozenge$ — $\blacklozenge$, CCl₄ with 0.5 mg/ml of "group A saponin" fraction; ∇ — ∇ , CCl₄ with 1.0 mg/ml of "group A saponin" fraction; $\blacktriangledown$ — $\blacktriangledown$, CCl₄ with 1.0 mg/ml of "group A saponin" fraction. B. $\square$ — $\square$, CCl₄; $\circ$ — $\circ$, CCl₄ with 0.1 mg/ml of "group B saponin" fraction; $\bullet$ — $\bullet$, CCl₄ with 0.5 mg/ml of "group B saponin" fraction; $\triangle$ — $\triangle$, CCl₄ with 1.0 mg/ml of "group B saponin" fraction; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, CCl₄ with 2.0 mg/ml of "group B saponin" fraction. C. $\square$ — $\square$, CCl₄; $\circ$ — $\circ$, CCl₄ with 2.5 nmol/ml of α -tocopherol; $\bullet$ — $\bullet$, CCl₄ with 5.0 nmol/ml of α -tocopherol; $\triangle$ — $\triangle$, CCl₄ with 10.0 nmol/ml of α -tocopherol; $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, CCl₄ with 20.0 nmol/ml of α -tocopherol. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from three determinations. Vs CCl₄: a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$.

はプラトーに達した (Fig. 1)。この脂質過酸化反応に対するサポニン A と B 群画分の影響を、それら

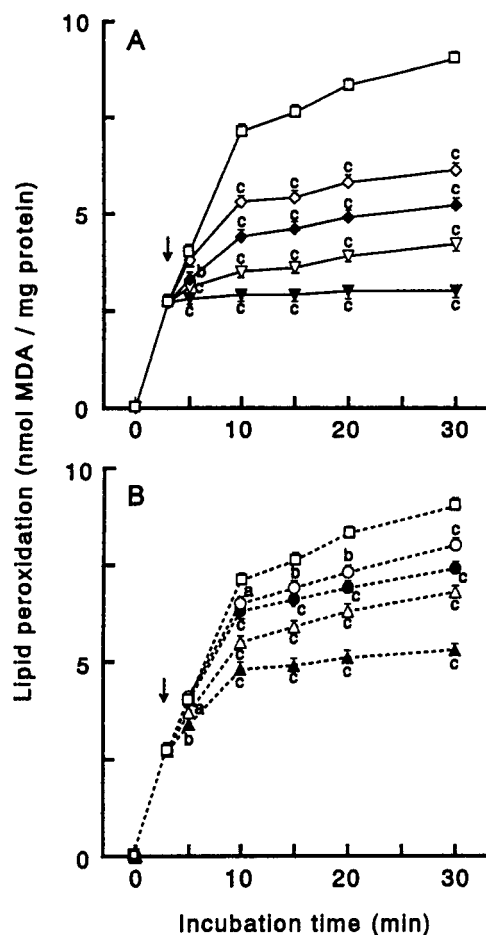


Fig. 2 Effect of the post-addition of "group A saponin" fraction or α -tocopherol on CCl_4 -dependent lipid peroxidation in mouse liver microsomes as a function of incubation time. "Group A saponin" fraction at a concentration of 0.1, 0.5, 1.0 or 2.0 mg/ml and α -tocopherol at a concentration of 2.5, 5.0, 10.0 or 20.0 nmol/ml were added to the reaction mixture 3 min after the onset of lipid peroxidation. A. $\square-\square$, CCl_4 ; $\diamond-\diamond$, CCl_4 with 0.1 mg/ml of "group A saponin" fraction; $\blacklozenge-\blacklozenge$, CCl_4 with 0.5 mg/ml of "group A saponin" fraction; $\nabla-\nabla$, CCl_4 with 1.0 mg/ml of "group A saponin" fraction; $\blacktriangledown-\blacktriangledown$, CCl_4 with 1.0 mg/ml of "group A saponin" fraction. B. $\square\cdots\square$, CCl_4 ; $\circ\cdots\circ$, CCl_4 with 2.5 nmol/ml of α -tocopherol; $\bullet\cdots\bullet$, CCl_4 with 5.0 nmol/ml of α -tocopherol; $\triangle\cdots\triangle$, CCl_4 with 10.0 nmol/ml of α -tocopherol; $\blacktriangle\cdots\blacktriangle$, CCl_4 with 20.0 nmol/ml of α -tocopherol. Each point represents the mean $\pm$ S.E. from three determinations. Vs CCl_4 : a, $p < 0.05$; b, $p < 0.01$; c, $p < 0.001$.

の添加濃度を変化させ、 α -tocopherol の場合と比較すると、Fig. 1 に示す結果が得られた。サポニン A と B 群画分は CCl_4 -依存性脂質過酸化反応をその反応初期より、lag time を伴うことなく抑制した (Fig. 1 A と B)。また、この脂質過酸化反応がほぼプラトーに達した 30 分の時点でサポニン A 群画分の脂質過酸化抑制効果を調べると、0.1, 0.5, 1.0 および 2.0 mg/ml の添加での抑制率はそれぞれ 63, 69, 80 および 81 % であった (Fig. 1A)。しかし、反応開始後 30 分の時点におけるサポニン B 群画分の抑制率は 2.0 mg/ml の添加でも 18 % であり、その抑制効果はサポニン A 群画分よりも著しく弱かった (Fig. 1 B)。 α -Tocopherol はサポニン A 群画分と同様に CCl_4 -依存性脂質過酸化反応をその反応初期より、lag time を伴うことなく抑制し、しかもその抑制効果はほぼその添加濃度に比例していた (Fig. 1 C)。

更に、サポニン A 群画分と α -tocopherol の CCl_4 -依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果を、反応開始後 3 分の時点でサポニン A 群画分と α -tocopherol をそれぞれ反応系に添加し、経時的に調べると、Fig. 2 に示す結果が得られた。サポニン A 群画分と α -tocopherol は CCl_4 -依存性脂質過酸化反応をそれらの添加時より抑制し、しかも両者のこの脂質過酸化反応に対する抑制はそれらの添加濃度に依存していた。

次に、サポニン A 群画分の CCl_4 -依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果をその添加濃度を 5, 10, 50 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と変化させて調べると、Fig. 3 に

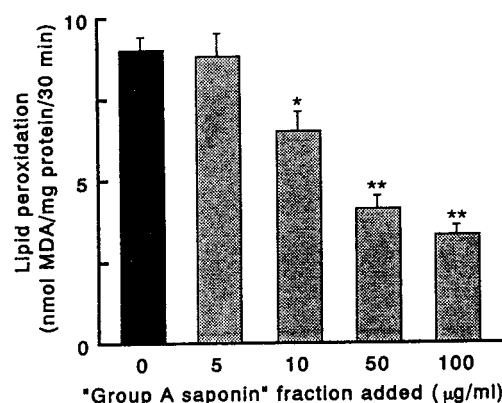


Fig. 3 Concentration dependency of "group A saponin" fraction on its preventive effect on CCl_4 -dependent lipid peroxidation in mouse liver microsomes. The reaction mixtures were incubated in the presence or absence of 5, 10, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of "group A saponin" fraction. Vs no addition: * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Table I Effects of "group A saponin" fraction, "group B saponin" fraction, and α -tocopherol on activities of aniline hydroxylase, aminopyrine demethylase, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in mouse liver microsomes.

	Aniline hydroxylase activity (nmol p-AP/mg protein/15 min)	Aminopyrine demethylase activity (nmol HCHO/mg protein/10 min)	NADPH-cytochrome P-450 reductase activity (nmol Cyt. c reduced/min/mg protein)
None	44.3 $\pm$ 1.5	39.2 $\pm$ 0.5	22.8 $\pm$ 0.1
"Group A saponin"	39.9 $\pm$ 1.3	37.8 $\pm$ 0.6	23.7 $\pm$ 0.3
"Group B saponin"	42.8 $\pm$ 1.1	38.8 $\pm$ 0.7	22.6 $\pm$ 0.2
Vitamin E	44.3 $\pm$ 0.2	38.9 $\pm$ 0.3	22.9 $\pm$ 0.3

Activities of aniline hydroxylase, aminopyrine demethylase, and NADPH-cytochrome P-450 reductase were determined as described in Materials and Methods. Each value is a mean $\pm$ S.E. (n=3).

示す結果が得られた。サポニン A 群画分の添加濃度が 10 μ g/ml 以上において、CCl₄-依存性脂質過酸化反応は有意に抑制された。

2. 肝ミクロソームの aniline の水酸化活性と aminopyrine の脱メチル化活性および NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性に対するサポニン A と B 群画分および α -tocopherol の影響

肝ミクロソームにおける aniline の水酸化反応での p-AP の生成, aminopyrine の脱メチル化反応での HCHO の生成および NADPH-cytochrome P-450 reductase による還元型 cytochrome c の生成は, Table I に示すように, 2.0 mg/ml のサポニン A と B 群画分および 20 nmol/ml の α -tocopherol の添加によって影響を受けなかった。

3. サポニン A と B 群画分で前処理した肝ミクロソームにおける CCl₄-依存性脂質過酸化反応

サポニン群画分で前処理しないミクロソームでの CCl₄-依存性脂質過酸化活性値は 8.91 $\pm$ 0.04 nmol MDA/mg protein/30 min であったが, サポニン A 群画分で前処理したミクロソームでのその活性値は 6.10 $\pm$ 0.02 nmol MDA/mg protein/30 min で, その抑制率は 31% であった。これに対して, サポニン B 群画分で前処理したミクロソームでの CCl₄-依存性脂質過酸化反応では 10% の抑制が認められた。

考 察

大豆胚軸の粗サポニンから分画したサポニン A と B 群画分について, マウス肝ミクロソームの CCl₄-依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果を α -tocopherol の場合と比較検討した。その結果, 0.1~2.0 mg/ml のサポニン A 群画分は 10~20 nmol/ml の α -tocopherol と同程度の抑制効を示すことが明らかとなった (Fig. 1)。サポニン A 群画分と α -toco-

pherol は, この脂質過酸化反応をその反応初期から抑制したが, その抑制には lag time は認められなかった (Fig. 1)。また, サポニン A 群画分は, CCl₄-依存性脂質過酸化反応をその反応開始後の添加においても抑制した (Fig. 2)。これらのことから, 大豆胚軸の粗サポニンから分離されたサポニン A 群画分には CCl₄-依存性脂質過酸化反応を抑制する成分が存在し, この成分は cytochrome P-450 を介する CCl₄ の代謝やこの代謝で生成した CCl₃・や CCl₃O₂・などのフリーラジカルによる脂質フリーラジカルの生成を抑制することが推察された。しかもサポニン A 群画分の CCl₄-依存性脂質過酸化反応に対する抑制のパターンは, α -tocopherol の場合と類似していた (Fig. 1 と 2)。 α -Tocopherol の脂質過酸化抑制機序の一つが脂質フリーラジカル生成後の連鎖反応の抑制である¹⁴⁾ことから, サポニン A 群画分はこの連鎖反応を抑制している可能性が示唆された。大南ら¹⁵⁾は, サラダオイルの加熱による過酸化脂質の生成を 0.1 mg/ml と 1.0 mg/ml の soyasaponin A₁ がそれぞれ 36 と 22% のレベルに抑制することを示している。サポニン A 群画分は soyasaponin A₁ とその糖鎖部分のアセチル体である soyasaponin Ab を 4:6 の割合で含んでいる。従って, サポニン A 群画分による CCl₄-依存性脂質過酸化反応の抑制作用が soyasaponin A₁ と soyasaponin Ab の何れのサポニンによってより強く抑制されるか, あるいは両サポニンの相乗的作用によるのかは今後検討する必要がある。これに対して, サポニン B 群画分の CCl₄-依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果は, サポニン A 群画分の場合と比較して弱かった (Fig. 1)。サポニン B 群画分は soyasaponin Ba (soyasaponin V) と soyasaponin Bb (soyasaponin I) を 2:7 の割合で含んでいる。soyasaponin Bb はサラダオイルの加熱による過酸化脂質の生成を抑制す

るが、その抑制の程度は soyaaponin A₁ の場合よりも弱いことが示されている¹⁵⁾。また、soyaaponin Ba の抗酸化作用に関しては明らかにされていない。これらのことから、サポニン B 群画分の CCl_4 -依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果はサポニン A 群画分の場合よりも弱いと考えられた。また、soyaaponin Ba の抗酸化作用は soyaaponin A 群や他の soyaaponin B 群よりも弱いことが示唆された。

サポニン A 群画分は CCl_4 -依存性脂質過酸化反応のプロパゲーションを主に抑制していることが推測されたが、Abe ら¹⁸⁾ は CCl_4 肝障害に抑制作用を示す saikosaponin の一つである saikosaponin d が肝ミクロソームにおける cytochrome P-450 量の減少および NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性の低下を伴った形で薬物代謝系を抑制し、この抑制作用が saikosaponin d による CCl_4 肝障害の防御機序の一つであることを示している。そこで、サポニン A と B 群画分の aniline の水酸化活性と aminopyrine の脱メチル化活性を指標とした肝ミクロソームの薬物代謝系と NADPH-cytochrome P-450 reductase の活性への影響を調べた。その結果、サポニン A と B 群画分はこれらの薬物代謝活性および NADPH-cytochrome P-450 reductase 活性に対して影響しなかった (Table 1)。これらの結果から、サポニン A 群画分は肝ミクロソームにおける CCl_4 代謝による $\text{CCl}_3\cdot$ や $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ などのフリーラジカルの生成を直接抑制せず、生成したフリーラジカルの消去あるいはフリーラジカルと不飽和脂肪酸との反応を抑制することにより CCl_4 -依存性の脂質過酸化反応を抑制していることが推察された。

サポニン A 群画分による肝ミクロソームの CCl_4 の代謝で生成したフリーラジカルの消去やフリーラジカルと不飽和脂肪酸との反応に対する抑制は、そのミクロソームの外で行われる場合とこのサポニン群画分がミクロソーム膜内に存在するかもしれないこの膜に結合する形で行われる場合とが考えられる。そこで、サポニン A と B 群画分で前処理した肝ミクロソームを用いて CCl_4 -依存性脂質過酸化反応に対する抑制効果を調べると、この反応は両サポニン群画分の前処理によって抑制され、しかもサポニン A 群画分の抑制効果はサポニン B 群画分の場合よりも強いことが明らかとなった。このことは、サポニン A 群画分が肝ミクロソームの膜内あるいは膜表面に結合し、ミクロソームで CCl_4 の代謝に伴って生成するフリーラジカルの消去やそのフリーラ

ジカルによる不飽和脂肪酸の過酸化を抑制していることを示唆している。

結 語

大豆胚軸から抽出、分離したサポニン群画分のうち、サポニン A 群画分はマウス肝ミクロソームの CCl_4 -依存性脂質過酸化反応を CCl_4 の代謝に影響することなく、反応の開始時および開始後において強く抑制した。この抑制効果は濃度依存性で、しかもその抑制作用は α -tocopherol の場合と類似していた。また、サポニン A 群画分には、肝ミクロソーム膜に比較的親和性の高いサポニンが含まれていることが推察された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、大豆胚軸サポニンの提供を頂いたマルサンアイ株式会社 (岡崎) 本多芳孝氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 樋口哲也, 西田圭志, 長村洋一, 本多芳孝, 伊藤 圓, 石黒伊三雄: 大豆胚軸抽出成分の四塩化炭素肝障害に対する抑制効果. 基礎と臨床 26, 257-263, 1992.
- 2) 西田圭志, 荒木康久, 長村洋一, 太田好次, 伊藤 圓, 石黒伊三雄: 四塩化炭素によるラット単離肝細胞の障害に対する大豆サポニン画分の抑制効果. 医学と生物 126, 87-90, 1993.
- 3) Biasi, F., Albano, E., Chiarotto, E., Corongiu, F., Pronzto, M. A., Marinari, U. M., Parola, M., Dianzari, U. M. and Poli, G.: In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. *Cell. Biochem. Funct.* 9, 111-118, 1991.
- 4) Slater, T. F.: Activation of carbon tetrachloride: Chemical principles and biological significance. In *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer* (Ed. by D. C. H. McBrien and T. F. Slater), Academic Press Inc., London, pp. 243-274, 1982.
- 5) Shiraiwa, M., Kudo, S., Shimoyamada, M., Harada, K. and Okubo K.: Composition and structure of "group A saponin" in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* 55, 315-322, 1991.
- 6) 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: 肝ミクロソ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.
- 7) 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.
- 8) Kornbrust, D. J. and Mavis, R. D.: Microsomal lipid peroxidation. II. Stimulation by carbon tetrachloride. *Mol. Pharmacol.* **17**, 408-414, 1980.
- 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) 石黒伊三雄, 篠原力雄, 石倉明弘, 内藤純子: 2-Aminobenzoyl 誘導体の水酸化反応に関するタンパク性因子と薬物代謝酵素活性. *薬学雑誌* **94**, 1240-1245, 1974.
- 11) Kashiwamata, S., Nakashima, K. and Kotake, Y.: Anthranilic acid hydroxylation by rabbit-liver microsomes. *Biochem. Biophys. Acta* **113**, 244-254, 1966.
- 12) Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* **55**, 416-421, 1953.
- 13) Williams, H. C. and Kamin, H., Jr.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of liver. *J. Biol. Chem.* **237**, 587-595, 1962.
- 14) 二木鋭雄: ビタミン E の抗酸化作用に関する反応論的研究. *ビタミン* **63**, 539-549, 1989.
- 15) 大南宏治, 奥田拓道, 浜井藤次郎, 北川 勲, 吉川雅之, 有地 滋, 林 照明: 肝障害に及ぼす大豆サポニンの作用. *栄養と食糧* **34**, 105-108, 1981.
- 16) Abe, H., Sakaguchi, M., Yamada, M., Arichi, S. and Odashima, S.: Pharmacological action of saikosaponins isolated from *Bupleurum falcatum*. *Planta Med.* **40**, 366-372, 1980.