

エゾウコギ含有成分のラット肝ミクロソームに おける脂質過酸化に対する抑制効果

Inhibitory Effects of Constituents of *Acanthopanax senticosus*
on Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes

高橋 哲夫 佐藤 隆司 * 後藤 徹 *
林 隆章 金島 弘恭

Tetsuo Takahashi, Takashi Sato, Tohru Goto
Takaaki Hayashi and Hiroyasu Kaneshima

エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus* Harms) は朝鮮人参と同じウコギ科に属する薬用樹木であり、ソ連東部、中国東北部に分布するが、日本では北海道東部にのみ自生している。朝鮮人参と同様に滋養強壮作用があるとされ、中国やソ連では医薬品原料として使われている。我が国においても近年、医薬品や健康食品への利用開発が積極的に進められており、北海道の有用な薬用資源の一つとしてその有効利用が期待されている。

エゾウコギ成分の薬理作用としてはこれまでに鎮静作用¹⁾、抗ストレスならびに疲労回復作用²⁾、脂質代謝の改善作用³⁾などが報告されているが、新たな薬理活性成分の検索はエゾウコギの薬用植物としての位置付けを明確にし、医薬品や健康食品への利用を図るうえで重要と思われる。

近年、生体内での活性酸素の作用が注目されており、これにより生成する過酸化脂質と血栓症、動脈硬化症、肝疾患などの種々の疾病との関連が指摘されている⁴⁾。ビタミンCやビタミンEなどの抗酸化性物質はこのような活性酸素による毒性を軽減させる効果があると考えられており、植物成分など天然からの新しい抗酸化剤の検索が行なわれている⁵⁾。

著者らは、エゾウコギの薬理活性検索の一環として、肝ミクロソームにおける過酸化脂質の生成におよぼすエゾウコギ成分の効果について検討し、若干の知見を得たので報告する。

脂質過酸化反応はラット肝ミクロソームを用いて、アデノシン二リン酸(ADP)-Fe²⁺-アスコルビン酸系による非酵素的な脂質過酸化反応⁶⁾と、ADP-Fe²⁺-NADPH系によ

る酵素的な脂質過酸化反応⁷⁾の二つの反応系を用いて行った。

エゾウコギ根は昭和63年8月、茎および葉は昭和62年7月に足寄町にて採集したものを用いた。

エゾウコギの抽出分画：乾燥したエゾウコギの根、茎お

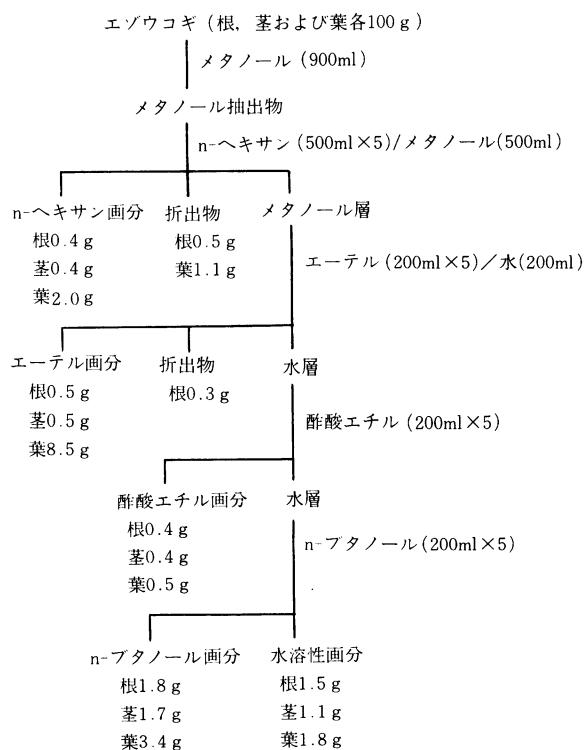


図1 エゾウコギ根、茎および葉の抽出および溶媒分画

*ヤクハン製薬株式会社

および葉の粉碎物各100gにメタノール900mlを加え、室温下2日間放置後ろ過した。ろ液にn-ヘキサンを加えて振とうし、生じた析出物およびn-ヘキサンを分離後、メタノールを減圧留去した。残留物を水に溶解後、図1に示すとおりエーテル、酢酸エチルおよびn-ブタノールで順次抽出を行い、各溶媒による抽出画分を得た（図1）。

試料溶液の調製：上記抽出画分のうち水溶性画分は水に、析出物画分はジメチルスルホキシドに溶解し、その他の画分はエタノールに溶解し試料溶液とした。

ラット肝ミクロゾームの調製：ラット（ウイスター系雄ラット、体重240～290g、7～10週齢）から摘出した肝臓に1.15%塩化カリウム溶液を灌流して脱血後細切し、9倍量の1.15%塩化カリウム含有50mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）を加えポリトロンにてホモジナイズし、10%ホモジネートを調製した。ホモジネートを10,000×gで20分間遠心分離後、上清を105,000×gで60分間遠心分離した。得られた沈渣を50mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）で洗浄後、30%グリセリン含有50mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）で均一な懸濁液とした後-80°Cで凍結保存し、用時溶解して用いた。

過酸化脂質の測定：ADP-Fe²⁺-アスコルビン酸により誘起される脂質過酸化：ミクロゾーム（2.5mg 蛋白質/ml）400μlを試験管にとり、これに3mM ADP100μl、20μM FeSO₄ 50μl、試料溶液20μl、10mMアスコルビン酸50μlおよび50mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）380μlを加え、全量を1mlとした。この混合溶液を37°Cで15分間インキュベーションした。ADP-Fe²⁺-NADPHにより誘起される脂質過酸化：ミクロゾーム（2.5mg 蛋白質/ml）400μlを試験管にとり、これに3mM ADP100μl、5μM FeSO₄ 50μl、試料溶液20μl、12.5mM NADPH 20μlおよび50mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.4）410μlを加え、全量を1 mlとした。この混合溶液を37°Cで30分間インキュベーションした。

チオバカルビツール酸反応：上記反応溶液に2%ブチルヒドロキシトルエン（BHT）エタノール溶液30μlおよび2-チオバカルビツール酸-トリクロロ酢酸-塩酸（0.375%-15%-0.25N）混液2 mlを加えて密栓し、沸騰水浴中で15分間加熱した。水冷後3,000rpmで5分間遠心分離を行い、上清の535nmにおける吸光度を測定して過酸化脂質量とした。

図2はADP-Fe²⁺-アスコルビン酸およびADP-Fe²⁺-NADPHによって誘起される脂質過酸化反応における反応時間と過酸化脂質量との関係を示したものである。両反応系とも過酸化脂質量は30分まで直線的に増加し、以後漸増する傾向が見られた。一方、ADPおよびアスコルビン酸或いはADPおよびNADPHを無添加の条件では過酸化脂質の生成はほとんど認められなかった。

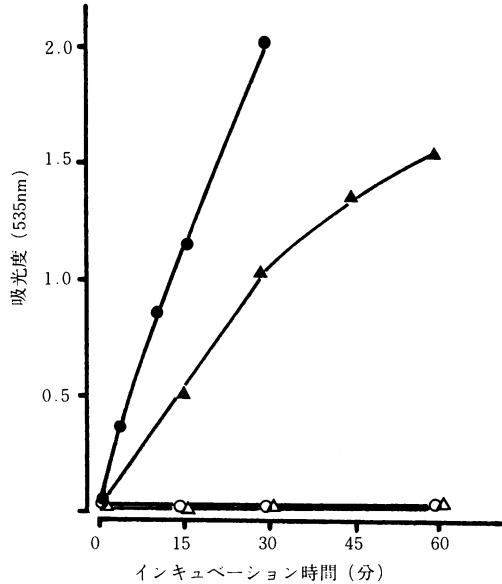


図2 ミクロゾームでの脂質過酸化反応におけるインキュベーション時間と過酸化脂質生成量の関係
—●—●— : ADP(300μM) + Fe²⁺(1μM) + アスコルビン酸(500μM)
—○—○— : Fe²⁺(1μM)
—▲—▲— : ADP(300μM) + Fe²⁺(0.25μM) + NADPH(250μM)
—△—△— : Fe²⁺(0.25μM)

反応液にエゾウコギ分画試料を添加した時の過酸化脂質生成量を、試料無添加時のそれと比較して過酸化脂質生成反応に対する阻害率を算出した。各添加濃度における阻害率を求め、これから試料の50%阻害濃度（I₅₀値、μg/ml）を求めた。表1にその結果を示した。根、茎、葉ともエーテルあるいは酢酸エチルで抽出される比較的脂溶性の高い化合物を含む画分に強い活性が認められた。一方、n-ブタノール画分や水層などの水溶性画分の活性は低かった。又、n-ヘキサン抽出およびエーテル抽出の際得られた析出物にも強い活性が認められたが、これらはADP-Fe²⁺-NADPH系に比べADP-Fe²⁺-アスコルビン酸系において10～30倍高い活性を示し、非酵素的な脂質過酸化反応を効率よく抑制した。

今後、エーテル画分および酢酸エチル画分についてさらに分画、精製を進め、活性成分の単離、構造決定を行う予定である。

表2には天然の代表的な抗酸化性物質であるα-トコフェロールとエゾウコギに含まれる数種の既知薬効成分のI₅₀値を示した。コーヒー酸誘導体であるクロロゲン酸とフラボン配糖体であるハイペリンは植物界に広く存在し、抗酸化性物質として知られているが、ミクロゾームにおける

脂質過酸化に対しても α -トコフェロールと同程度の抑制効果を示した。一方、エゾウコギを含有する医薬品等の指標物質として用いられているイソフラキシジン、エレウテロサイドB、エレウテロサイドEには活性はほとんど認められなかった。今回、我々はエゾウコギの根の酢酸エチル抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよびイ

ナートシリODS-2カラム(ガスクロ工業製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離、精製を行ない活性化合物を単離した。本化合物の化学構造については現在検討中であるが、その I_{50} 値は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下と見られ、極めて強い活性を示した。

表1 エゾウコギ根、茎および葉のメタノール抽出物より得られた各溶媒抽出画分の過酸化脂質生成反応に対する50%阻害濃度

試 料		I_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		ADP-Fe ²⁺ -アスコルビン酸			ADP-Fe ²⁺ -NADPH		
		根	茎	葉	根	茎	葉
メタノール抽出物		10	23	11	—	—	—
n-ヘキサン画分		>75	180	70	—	—	—
エーテル画分		3.2	6.5	15	1.9	2.3	1.5
酢酸エチル画分		5.1	2.4	1.7	2.3	5.8	4.0
n-ブタノール画分		24	35	25	—	—	—
水溶性画分		1,570	54	80	—	—	—
メタノール・n-ヘキサン 析出物		0.3	*	0.2	7.5	*	6.6
水・エーテル析出物		0.2	*	*	2.1	*	*

*印は析出物が無かったことを示す。

表2 dl - α -トコフェロールおよびエゾウコギ含有成分の過酸化脂質生成における50%阻害濃度 (I_{50})

化 合 物	I_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	ADP-Fe ²⁺ -アスコルビン酸		ADP-Fe ²⁺ -NADPH
dl - α -トコフェロール	3.0		1.2
クロロゲン酸	3.6		30
ハイペリン	1.8		4.0
イソフラキシジン	55		—
エレウテロサイドB	>100		—
エレウテロサイドE	>100		—

植物中にはトコフェロール類をはじめとしてコーヒー酸誘導体、フラボン誘導体、没食子酸誘導体など数多くの抗酸化性物質が存在しており、それらの中には生体内での過酸化脂質の生成を抑制し、過酸化脂質に起因する肝臓障害などに対する防御効果が期待されているものもある⁸⁾。今回の実験により、エゾウコギのいくつかの既知成分に加えて、新たに単離した化合物に、肝ミクロソームにおける脂質過酸化を強く抑制する作用が見い出された。これらの抗酸化性成分の *in vivo* における薬理作用に興味がもたれる。

なお、本研究は、昭和62年度よりスタートした共同研究

「北方系薬用植物の高度利用に関する研究」の一環として行われたことを付記し、あわせて関係各位の御協力に感謝いたします。

文 献

- 1) 王 明禹、郭 秀芳：中国刺五加研究、39、国竜江科学技術出版社、ハルビン（1981）
- 2) N. Takasugi *et al.* : Shoyakugaku Zasshi, 39, 232 (1985)
- 3) Y. Kimura *et al.* : Chem. Pharm. Bull., 33, 2028 (1985)

- 4) 八木国夫他：過酸化脂質と疾患、133、医学書院、東京
(1981)
- 5) 糸川秀治他：生薬利用と新医薬品開発、62、シーエム
シー、東京 (1988)
- 6) A. Ottolenghi: Arch. Biochem. Biophys., 79, 355
(1959)
- 7) P. Hochstein and L. Ernster: Biochem. Biophys.
Res. Commun., 12, 388 (1963)
- 8) Y. Kimura *et al.*: Chem. Pharm. Bull., 32, 1866
(1984)