

脂質過酸化反応に対するセファランチンの影響について

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導: 青野 要教授)

上 者 郁 夫

(昭和60年2月8日受稿)

Key words : 脂質過酸化反応(Lipid peroxidation), X線照射(X-irradiation), 二価鉄(Ferrous ion), セファランチン(Cepharanthine), α -トコフェロール(α -Tocopherol)

序 論

脂質過酸化反応(Lipid peroxidation)は生体内では主として不飽和脂肪酸を多量に含む生体膜で起きると考えられており, その最終産物として過酸化脂質(Lipid peroxide)が生成され, それは老化と関係のある退行性変化の原因となり, また動脈硬化をはじめ, 放射線障害, 白内障, 未熟児網膜症等にも関係があるとされている^{1)~3)}.

この脂質過酸化反応はラジカル(Radical)により引き起こされることが明らかにされているが, 生体内ではラジカルの中でも O_2^- (Superoxide anion), $\cdot OH$ (Hydroxyl radical), 1O_2 (Singlet oxygen)等がその主要な原因と考えられている。^{4)~6)} このラジカルによって引き起こされる反応は連鎖的に起こるもので, 生体膜の不飽和脂肪酸で起これば膜構造の変化やそれに伴う膜機能の障害もたらされることが予期され, いくつかの報告もなされている^{7)~16)}.

生物は活性酸素を細胞内でできるだけ生じないような構造と機能に分化しているが, それでもなおこの機構の不完全さによって生じてくる活性酸素に対して, いくつかの防御機構を備えている。生物の最も大きな酸素障害の防御機構は生じた活性酸素を反応性の低い 3O_2 , H_2O , ROHに変える酵素や細胞成分である。例えば, 代表的な物として, スーパーオキシドディスムターゼ(Superoxide dismutase), カタラーゼ(Catalase), グルタチオンパーオキシダーゼ(Glutathione peroxidase), トコフェロール

(Tocopherol), カロチノイド(Carotinoid), 尿酸(Uric acid)等がある。この中でSODは O_2^- を異性化することで, カタラーゼは, H_2O_2 を H_2O と O_2 に分解することで, グルタチオンパーオキシダーゼは過酸化脂質の分解への関与で, トコフェロールはラジカルと反応してトコフェリルラジカル(Tocopheryl radical)と成ることで, カロチノイドは一重項酸素(1O_2)の消去剤として, 尿酸はヒドロキシルラジカル($\cdot OH$)の捕捉剤, あるいは 1O_2 の消去剤として, それぞれ活性酸素依存の反応を阻害するために, 重要な働きをしていると考えられている^{6), 17)~19)}.

脂質過酸化反応の阻害をする物質については, この他にも, 天然抗酸化剤として, Gallic acid (Tannin), Sesamol (Sesame), Quercetin, Gossypol (Cotton seed), Nordihydroguaiaretic acid (Creosote bush, NDGA), n-Tritriacontan-16, 18-dione (Eucalyptus leaf wax)等の, 合成抗酸化剤として, Butylhydroxyanisole(BHA), Dibutylhydroxytoluene (BHT), Ethyl protocatechuate, Propyl gallate (PG)等の報告があり, 医学や食品化学の分野で注目されている^{20), 21)}.

タマサキツヅラフジから抽出された, アルカロイドであるセファランチン(Cepharanthine)は, 従来白血球減少症など, 広く臨床面で使用されている薬物であるが, このセファランチンが, in vitroの実験によって, 脂質過酸化反応を阻害することが, Inoue et al.²²⁾, Shiraiishi et al.¹⁰⁾, Aono et al.¹³⁾, Nagatsuka et al.¹⁵⁾によって報告されているが, その阻害の機作につい

では、十分な説明がなされているとはいえない。

現在までになされている、セファランチンを使った研究について、特に生体膜関係での報告例をみると、Lead acetateやLysolecithinによる赤血球の K^+ 遊離に対する阻害(Utsumi et al.)²³⁾、Bilirubinによる赤血球の K^+ 遊離に対する阻害(Yoshioka et al.)²⁴⁾、膜流動性への影響(Utsumi et al.)²⁵⁾、Snake venome, Phospholipase A₂, LysolecithinやLead acetateによるミトコンドリアの障害の抑制(Miyahara et al.)²⁶⁾、赤血球の形態変化への影響(Fujii et al., Sato et al.)^{27), 28)}、血小板凝集への影響(Watanabe et al., Kanaho et al., Watanabe)^{29)~32)}といったように、この薬物が膜に何らかの作用を持つことは確かであると思われる。これらのことから、セファランチンによる脂質過酸化反応の阻害は、セファランチンによる膜の修飾により、脂質と活性酸素との反応が抑制されるのではないかと推定されているが^{10), 15)}、これを支持する実験結果は今のところ得られていない。

本研究は、リポソーム、ミトコンドリア、ミクロゾーム等生体膜における脂質過酸化反応が、*in vitro*の実験において、膜安定化作用をもつと考えられているアルカロイドの一種であるセファランチンによって著しく抑制されることが報告されていることから、この阻害の機構を明らかにする目的で、①セファランチンの抗酸化剤としての働きの有無を、すでに報告されているいくつかの系を使ってSODやトコフェロールとの比較検討し、②膜安定化作用による過酸化反応の阻害という点を明確にするために、脂質が膜構造を取らない系での脂質過酸化反応を行い、セファランチンの影響を検討し、得られた結果について報告する。

材 料 と 方 法

試薬：Xanthineoxidase, Superoxide dismutase, Nitroblue tetrazolium, Xanthine, p-nitrosodimetylaniline, Dianisidine, Riboflavin, Catalase (Sigma chemical Co.), Egg L- α -phosphatidylcholine (egg-PC), (半井化学薬品K.K.), Cepharanthine (化研生薬K.K.),

Nitroso-PSAP (2-nitroso-5-N-propyl-N-sulfo-propylaminophenol hydrochloride), (同仁化学研究所)を購入、あるいは供与されたものを使用した。その他、実験には全て特級の試薬を使用した。

動物：市販のオリエンタル固型飼料(MF)を用いて飼育したWistar系雄ラット(5-8週令)を実験に使用した。

リポソームの作製：有機溶媒に溶かした卵黄レシチンをフラスコに入れ、室温にて溶媒を窒素ガスを流して、除去し、0.15 M KCl-10 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)を加えて(2 mg Egg-PC/ml)、ボルテックスミキサーでかくはんして、作製した。なお、セファランチンを含有したりリポソームを作製する場合は、超音波処理(4°C, 15分)後、10,000 rpm, 2分間の遠心を行い、その上清を、リポソームとして実験に使用した。

肝ミトコンドリアの分離：ラット肝ミトコンドリアの分離はHogeboom et al.³³⁾の方法に準じて行った。

活性酸素の測定： O_2^- (Superoxide anion)の測定はニトロブルーテトラゾリウム(NBT, Nitroblue tetrazolium)法³⁴⁾、ディアニシジン(Dianisidine)法により³⁵⁾、 $\cdot OH$ (Hydroxyl radical)の測定はp-ニトロソジメチルアニリン(p-Nitrosodimetylaniline)法により³⁶⁾、過酸化水素(H_2O_2 , Hydrogen peroxide)の測定はFerrithiocyanate法³⁷⁾により行った。

(1) NBT法； O_2^- 生成系にキサンチン

(Xanthine)ーキサンチン酸化酵素(Xanthine oxidase)系を用いてNBTの還元阻害率を560 nmの吸光度変化量より算出し、 O_2^- の除去活性を25°C下で求めた。反応液は、 80×10^{-6} M Nitroblue tetrazolium, 0.1 mM Xanthine, 25 μ g/ml Xanthine oxidase, 10 mM Tris/HCl 緩衝液(pH 8.4)を用いた。

(2) ディアニシジン法； O_2^- 生成系にリボフラビン(Riboflavin)ー光照射系を用いてディアニシジンの吸光度変化量(410 nm)から、 O_2^- の除去活性を求めた。光照射には蛍光灯20Wにより、室温下で反応を行った。反応液は、 2×10^{-4} M Dianisidine, 1, 3×10^{-5} M Riboflavin, 10 mM Tris/HCl 緩衝液(pH 7.4)を用いた。

(3) p-ニトロソジメチルアニリン法； $\cdot\text{OH}$ 生成系にキサンチン-キサンチン酸化酵素系を用いてp-ニトロソジメチルアニリンの440nmの吸光度の変化から、 $\cdot\text{OH}$ の除去活性を25°C下で求めた。反応液は、 $53.5 \times 10^{-6}\text{M}$ p-nitrosodimethylaniline, $0.1 \times 10^{-3}\text{M}$ Xanthine, 25 μg , /ml Xanthine oxidase, 10mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.8) を用いた。

(4) Ferrithiocyanate法；25°C, 10分間の反応後、残存する H_2O_2 量をFerrithiocyanate法により測定した。反応液は、 $13.7 \times 10^{-6}\text{M}$ H_2O_2 , 10mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いた。

脂質過酸化反応の誘導と測定：脂質過酸化反応は、25°Cで二価鉄で、あるいは放射線照射によって誘導した。

(1) 二価鉄：二価鉄による脂質過酸化反応の誘導はミトコンドリアを使用した実験系では、0.15M KCl-10 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で、egg-PCを使用した実験系では、メタノール中で二価鉄 ($\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) の添加により行った。

二価鉄誘導によるミトコンドリアの脂質過酸化反応の測定は、チオバルビツール酸 (TBA) 反応により行った³⁸⁾。反応終了後、各反応液に40%トリクロロ酢酸 (TCA) 0.5 ml 1.5N HCl 0.25 ml, 2% TBA 0.5 ml 加え、沸騰水中で15分間処理後、冷却し、遠心を行い、上清について、532nmと600nmの吸光度の測定を行いマロンアルデヒド含量 (MDA 値) に換算して表わした。なお、標準物質には1,1,3,3,-テトラエトキシプロパン (1,1,3,3,-tetra-ethoxypropane) の加水分解物を用いた³⁹⁾。

二価鉄誘導による、egg-PCの過酸化反応の測定は、反応液 2 ml に、40% TCA 0.5 ml, 1.5 N HCl 0.25 ml, 2% TBA 0.5 ml を加えた後、 α -トコフェロールを含むメタノール3.0 ml を加えて、80°Cで、30分間前加熱後、沸騰水中で15分間処理、冷却後、メタノールを全量が10 ml になるように加えて、532nmの測定を行った。

(2) 放射線：放射線照射による脂質過酸化反応の誘導は、東芝深部X線照射装置 (Cu 0.5 mm + Al 0.5 mm, 69 rad/min) を用いて、25°C下、0.15M KCl-10mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、

あるいはクロロホルム/メタノール/水 (Chl/MeOH/ H_2O , 1/2/0.8) の系で、アクロバットスターラーで攪拌しながら行った。

脂質過酸化反応の測定はリポソーム系については上述のミトコンドリアと同じ方法で TBA 反応を行った。クロロホルム/メタノール/水の系の場合は、反応液 2 ml に、40% TCA 0.5 ml, 5 N HCl 0.25 ml, 2% TBA 0.5 ml を加えた後、 α -トコフェロールを含むメタノール3.0 ml を加えて、80°Cで30分間、前加熱後、沸騰水中で15分間処理、冷却後、メタノールを全量が10 ml になるように加えて、532nmの測定を行った。

二価鉄の定量：二価鉄の定量はニトロソフェノール試薬 (Nitroso-PSAP) を用いて、行った。経時的に反応液 2 ml を取り、これに40% TCA 0.5 ml を加えて反応を停止し、遠心後上清 1 ml に対して Nitroso-PSAP 溶液 (1mM Nitroso-PSAP/0.2M リン酸緩衝液, pH 7/NaOH/ H_2O , V/V, 0.5/2.5/0.6/0.4) 4 ml を加えて、752 nm の吸光度の測定を行った^{40),41)}。

ラジカルによるトコフェロールの酸化：クロロホルム/メタノール/ H_2O (1/2/0.8) に、あるいは20mM HCl-95%エタノールに溶かしたセファランチン、トコフェロールをX線照射 (69 rad/min, 3h, 25°C) し、直接に、あるいは反応液で希釈してUV スペクトルの測定を行った。

結 果

(1) 放射線照射によって誘導されるリポソームの脂質過酸化反応とセファランチンによる阻害：Table 1 はX線照射によって誘導したEgg-PCリポソームの脂質過酸化反応に対するセファランチン (Cepharanthine) の阻害作用をMDAの生成量から測定したものであるが、セファランチンは、50 μM で34%の、100 μM で59%の阻害率を示した。一方、抗酸化剤として知られているトコフェロール (α -Tocopherol) では、50 μM で83%とより高い阻害率を示した。この反応は、SODによる阻害も認められることから、この過酸化反応に O_2^- が何らかの関与をしていることが推定された。すでに報告されている放射線照射による過酸化反応のセファランチンによる阻害については、ダイズレシチンリポソ-

Table 1. Effect of cepharanthine on radiation-induced lipid peroxidation in egg-PC liposomes.

	Lipid peroxidation (nmol MDA/mg egg-PC/3h)	Inhibition(%)
Control	0	
Irradiation	1.044	
+ [•] + SOD (5.5 μg/ml)	0.804	23
+ [•] + α-Tocopherol (5 μM)	0.965	8
+ [•] + α-Tocopherol (50 μM)	0.179	83
+ [•] + Cepharanthine (50 μM)	0.688	34
+ [•] + Cepharanthine (100 μM)	0.425	59

Liposomes were irradiated at a total dose of 124.2 Gy. Each value represents the average of two experiments.

ムを使った⁶⁰Co照射によるものがあるが¹³⁾, この場合の阻害率は, 50, 200 μMで40%となっており, この阻害率の違いは実験系によるものではないかと推定した.

(2) 二価鉄によって誘導される脂質過酸化反応とセファランチンによる阻害: X線照射によって生成する活性酸素にO₂⁻, •OH, ¹O₂等が考えられるが⁴²⁾, 二価鉄によって誘導される過酸化反応にはこのような活性酸素ばかりでなく, 鉄イオンと酸素の複合体であるPerferryl ion [FeO₂]²⁺やFerryl ion(FeO)²⁺などの関与も推定されており, 放射線照射の場合と異なる活性酸素種によって過酸化反応が誘導されている可能性がある⁴³⁾⁻⁴⁷⁾. セファランチンはこのような系においても過酸化反応を阻害することが知られておりすでに報告されている^{10),13)}.

本実験におけるミトコンドリアを使った二価鉄誘導による脂質過酸化においても, 5 μM 26%, 10 μM 53%, 50 μM 98%といったセファランチンによる定量的な濃度依存性の阻害が認められた(Fig. 1). この二価鉄誘導による脂質過酸化反応においては二価鉄の減少が, 過酸化の誘導に重要であることが, すでに報告されているが^{40),41)}この二価鉄の減少に対してセファランチンがどのような作用を持つか検討してみた. その結果, 予期されたようにセファランチンの存在下では, この減少の速度が, 濃度依存的に

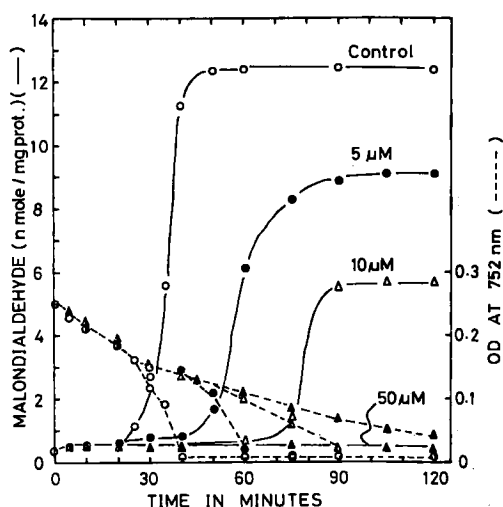


Fig. 1. Effect of cepharanthine on lipid peroxidation in mitochondria and consumption of Fe²⁺.

Mitochondria were incubated in medium containing 0.15 M KCl-10mM Tris/HCl buffer(pH 7.4) at 25°C in the presence of 50 μM Fe²⁺. Concentration of malondialdehyde formed and Fe²⁺ were determined spectrophotometrically. The methods are described in the text. (○), Control; (●), Cepharanthine 5 μM; (△), 10 μM; (▲), 50 μM.

阻害されていた(Fig. 1). この阻害は二価鉄とセファランチンが直接に, 何らかの反応をしたものでなく, セファランチンが膜系に作用し, そのために二価鉄と膜系との反応が抑制されたものであることが, 膜系が存在しない状態での二価鉄の減少がセファランチンにより阻害されないことから推定された(Fig. 2).

(3) クロロホルム/メタノール/H₂O系とメタノール系での脂質過酸化反応とセファランチンの影響について: 以上のようにセファランチンがリポソームやミトコンドリアといった膜系での脂質過酸化反応を阻害することは明らかであるが, 脂質がリポソームのような膜構造を取らない状態での脂質過酸化反応に対してセファランチンがどのような影響を持つかは興味ある問題でありその検討を行った.

Fig. 3は脂質を抽出に一般的に用いられている, メタノール/クロロホルム/H₂O(v/v, 2/1/

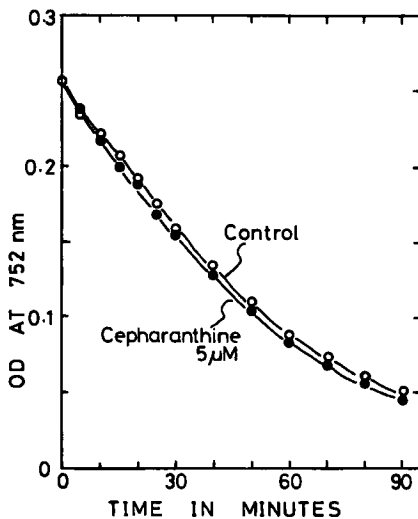


Fig. 2. Effect of cepharanthine on consumption of Fe^{2+} .

Fe^{2+} (50 μM) and cepharanthine (5 μM) were added in medium 0.15 M KCl-10 mM Tris/HCl buffer (pH 7.4) at 25°C in the absence of mitochondria. Concentration of Fe^{2+} was determined spectrophotometrically. (○), Control (Fe^{2+}); (●), Cepharanthine (Fe^{2+} +Cepharanthine).

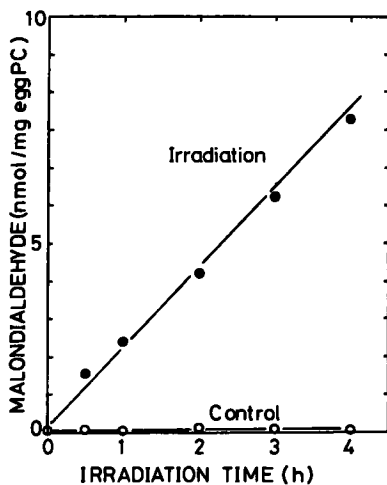


Fig. 3. Radiation-induced peroxidation of egg-PC dissolved in MeOH/ CHCl_3 / H_2O . Egg-PC (2 mg/ml) dissolved in MeOH/ CHCl_3 / H_2O (V/V, 2/1/0.8) was irradiated at a dose rate of 0.69 Gy/min at 25°C. Malondialdehyde formed was determined spectrophotometrically. The methods are described in the text. (○), Control; (●), Irradiation.

Table 2. Effect of cepharanthine and α -tocopherol on radiation-induced peroxidation of egg-PC dissolved in MeOH/ CHCl_3 / H_2O

	Lipid peroxidation (nmol MDA/mg egg-PC/2h)	Inhibition (%)
Control	0	—
Irradiation	4.33	—
+ " + Cepharanthine (100 μM)	2.98	31.2
+ " + α -Tocopherol (100 μM)	1.31	69.7

Lipids were irradiated at a total dose of 82.8 Gy. Each value represents the average of two experiments.

0.8) 系での Egg-PC の X 線照射による過酸化反応を示したものである。照射時間とともに MDA 値の増加が認められ、4 時間照射で 8 nmol/mg Egg-PC の MDA 値を示した。

この系の中にセファランチンを添加したものは、リポソームの系やミトコンドリアの系で示されたような強い阻害は認められなかった。一方、トコフェロールを添加したものでは、このような MDA の生成に対してその濃度依存性の強い阻害が認められた (Table 2, Fig. 4)。このような膜系以外でのセファランチンの作用についてさらに検討するため、メタノール中での Fe^{2+} 誘導による過酸化反応に対する影響を検討した。Table 3 は egg-PC の Fe^{2+} 誘導による過酸化反応を示したものである。1 mM Fe^{2+} の存在下、0.181 nmol/mg Egg-PC の MDA の生成が認められた。この系の中に、セファランチン、トコフェロールを添加したものでは Table 3, Fig. 5 に示す結果となり、トコフェロールが強い阻害を示すのに対してセファランチンは阻害を示さなかった。

以上メタノール/クロロホルム/ H_2O 系とメタノール系での過酸化反応が MDA 形成のみを限り、セファランチンが弱い阻害しか示さず抗酸化剤としての働きがあるトコフェロールが強い阻害を示したことは、①セファランチンは抗酸化剤としての活性をもたないか、あるいは弱い活性であること、②セファランチンが過酸化反応を強く阻害できるのは、リポソームやミトコンドリアのように、脂質が一定の構造を取る時に見られることの二点を示唆するものと思われた。しかし、この結果のみによってセファラン

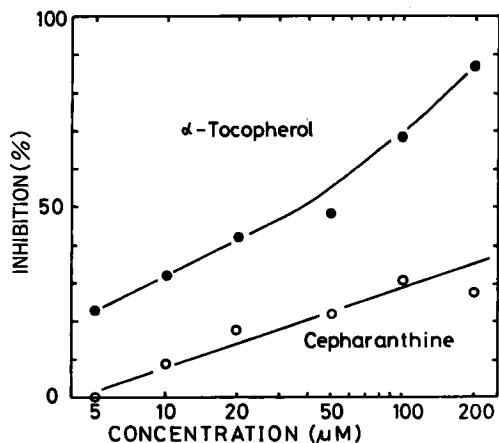


Fig. 4. Concentration effect of cepharanthine and α -tocopherol on radiation-induced peroxidation of egg-PC dissolved in MeOH/CHCl₃/H₂O.

Percent of inhibition was estimated using MDA formed in egg-PC after 120 min irradiation. The methods are described in the text. (○), Cepharanthine; (●), α -Tocopherol.

Table 3. Effect of cepharanthine and α -tocopherol on Fe²⁺-induced peroxidation of egg-PC dissolved in MeOH.

	Lipid peroxidation (nmol MDA/mg egg-PC/20 min)	Inhibition(%)
Control	0	—
Fe ²⁺ (1 mM)	0.181	—
+ Cepharanthine (100 μ M)	0.169	6.6
+ α -Tocopherol (100 μ M)	0	100

Each value represents the average of two experiments.

チンの抗酸化剤としての働きを否定することはできないと思い、更にいくつかの系で検討を試みた。

(4) 活性酸素とセファランチンの反応について：Fig. 6はNBT-キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系を使用してセファランチンやSODのO₂⁻の除去活性をみたものであるが、SODにはO₂⁻の除去活性が認められたが、反応系にエタノール溶液として加えられたセファランチンには全く除去活性が認められなかった。このよ

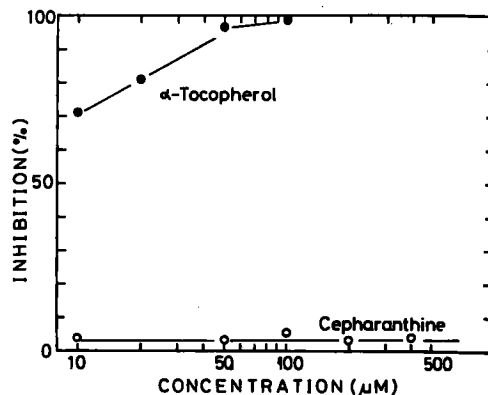


Fig. 5. Concentration effect of cepharanthine and α -tocopherol on Fe²⁺-induced peroxidation of egg-PC dissolved in MeOH. Percent of inhibition was estimated using MDA formed in egg-PC after 20 min incubation. The methods are described in the text. (○), Cepharanthine; (●), α -Tocopherol.

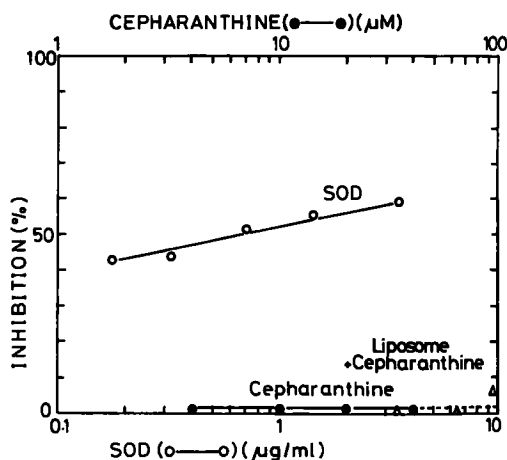


Fig. 6. Percent inhibition of nitroblue tetrazolium assay of different concentrations of superoxide dismutase and cepharanthine using xanthine-xanthine oxidase system. The methods are described in the text. (○), Superoxide dismutase; (●), Cepharanthine; (△), Liposome-cepharanthine.

うな現象は、セファランチン含有リポソームを反応系に加えた場合でも同じであった。

これと同じ結果は、図には示さないが、O₂⁻生成系として、非酵素反応系を用いたディアニジン系を使用した実験においても認められた。

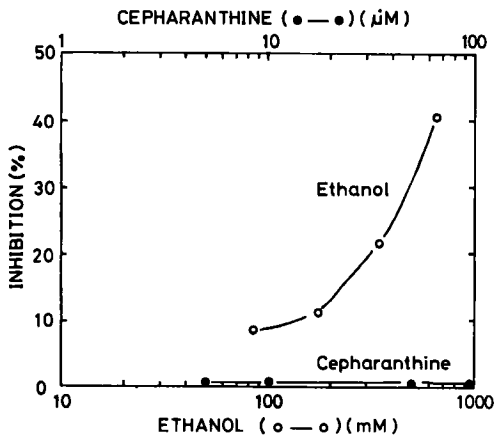


Fig. 7. Percent inhibition of p-nitrosodimethylaniline assay of different concentrations of methanol and cepharanthine using xanthine-xanthine oxidase system.

The methods are described in the text. (○), Ethanol; (●), Cepharanthine.

Fig. 7は $\cdot\text{OH}$ 除去活性についてみたものであるが、すでに報告されているようにエタノールにはその除去活性が認められたが³⁶⁾、セファランチンにはその除去活性は認められなかった。この他に、 H_2O_2 除去活性についても検討したが、カタラーゼに認められるような除去活性がセファランチンには認められなかった。以上のようにセファランチンには O_2^- 、 $\cdot\text{OH}$ 、 H_2O_2 といった活性酸素の除去活性は認められなかった。

以上の結果は活性酸素測定系を利用してセファランチンと活性酸素との反応を解析しようとしたものであるが、活性酸素とセファランチンが反応しているかどうか、更にセファランチンのUVスペクトルの変化から、検討してみた。

Fig. 8はリポソームにエタノールに溶かしたセファランチンあるいはトコフェロールを添加し、X線照射3時間を行った反応終了後のメタノール/クロロホルム/反応液(v/v, 2/1/0.8)中でのセファランチンとトコフェロールのUVスペクトルを示している。この系ではセファランチン、トコフェロール共に脂質過酸化反応を阻害するのであるが、UVスペクトルに著大な変化は認められなかった。この原因については十分な検討を行っていないが、この反応系でのラジ

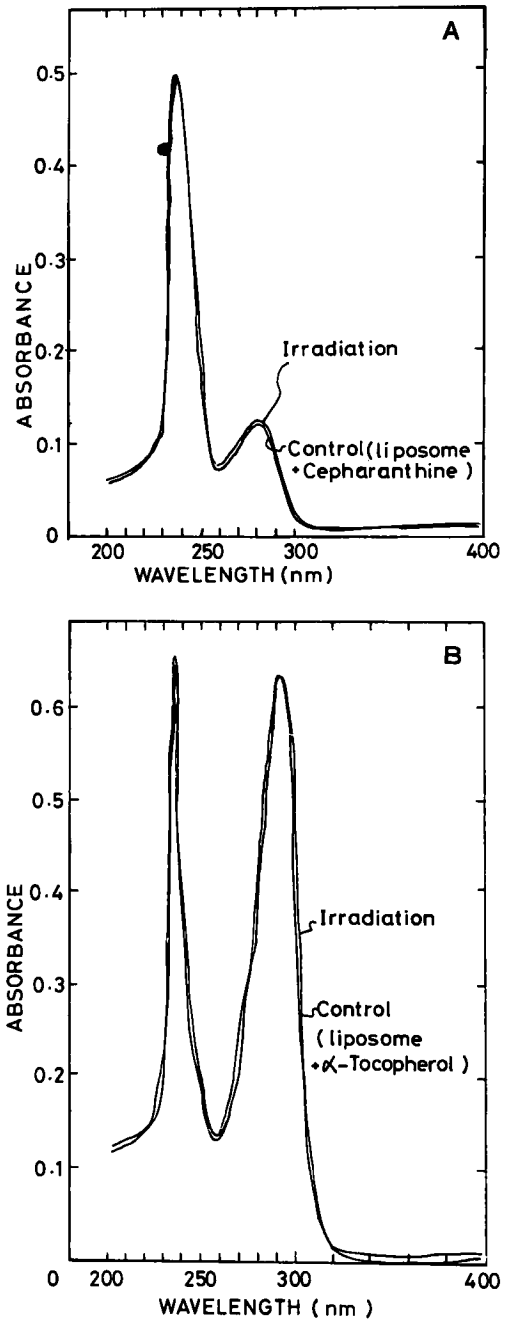


Fig. 8. Sequential spectra of cepharanthine and α -tocopherol in liposome exposed to X-irradiation.

Ethanol solution of cepharanthine or α -tocopherol were added to the liposomes. The samples were irradiated at a total dose of 124.2 Gy. The methods are described in the text. A, Cepharanthine (20 μM); B, α -Tocopherol (20 μM).

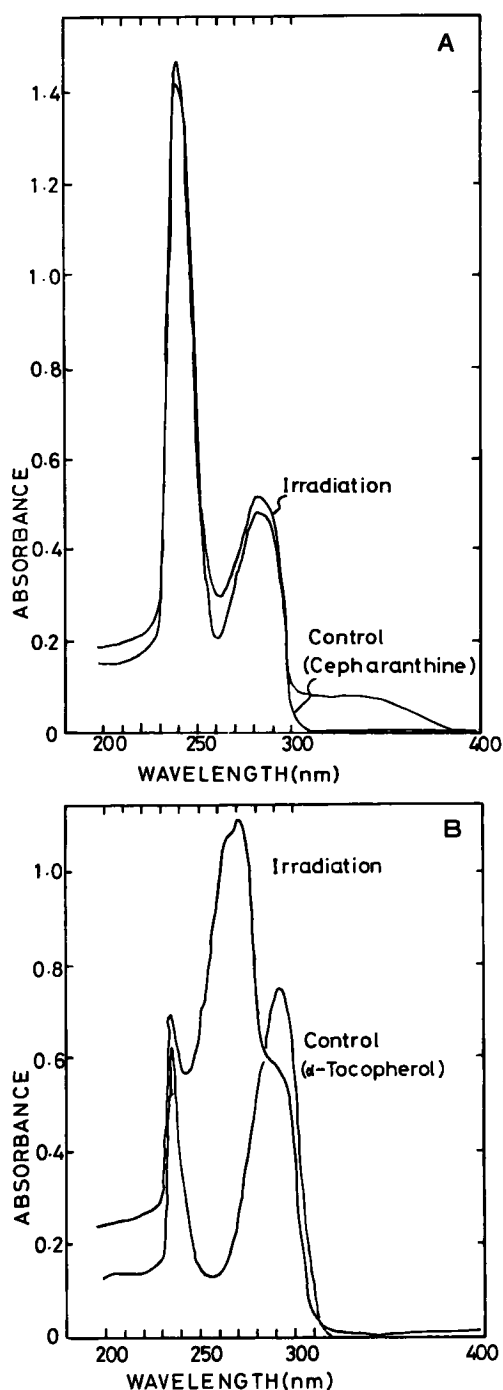


Fig. 9. Sequential spectra of cepharanthine and α -tocopherol dissolved in MeOH/CHCl₃/H₂O exposed to X-irradiation. Cepharanthine (100 μ M) and α -tocopherol (100 μ M) were dissolved in MeOH/CHCl₃/H₂O (V/V, 2/1, 0.8) and irradiated at a total dose of 124.2 Gy. The methods are described in the text. A, Cepharanthine (100 μ M); B, α -Tocopherol (25 μ M)

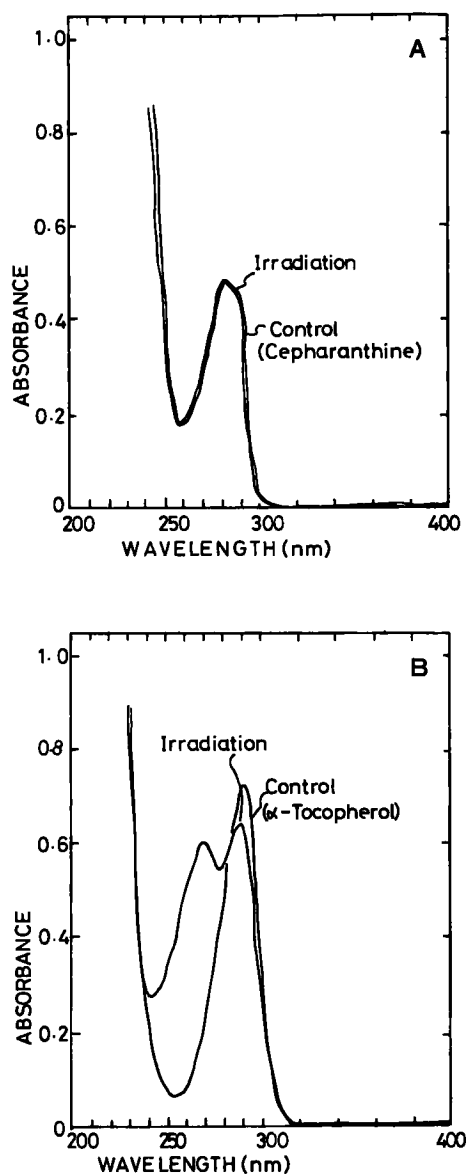


Fig. 10. Sequential spectra of cepharanthine and α -tocopherol in acidified 95% ethanol exposed to X-irradiation. Cepharanthine (100 μ M) and α -tocopherol (100 μ M) were dissolved in 95% ethanol acidified with 20 mM HCl and irradiated at a total dose of 124.2 Gy. The methods are described in the text. A, Cepharanthine (100 μ M); B, α -Tocopherol (100 μ M).

カルによる反応自体が低いことと (MDA 値で比較すると, MeOH/CHCl₃/H₂O の 1/6 程度である), さらに, トコフェロールがリポソームの系では酸化されにくいことによると思われる。リポソームの系でトコフェロールが酸化されにくいことは, すでに Fukuzawa et al. が報告しているが⁴⁸⁾, その結果と一致するものかもしれない。しかし, トコフェロールが O₂⁻ によって酸化されることは, 非水溶媒系⁴⁹⁾, デオキシコール酸によるミセル系⁵⁰⁾ で明らかにされており, その違いについては今後尚解析が必要と考えられる。

一方, 脂質過酸化反応でセファランチンが弱い阻害率を示した系であるメタノール/クロロホルム/H₂O ではトコフェロールは, Fukuzawa et al.⁴⁸⁾ が酸性エタノール, γ -線照射で報告したと同じような酸化によると思われる 292nm の吸光度の減少 (O.D.=0.168), 270nm の吸光度の増加 (O.D.=0.88) という UV スペクトルの著

明な変化を示したが, セファランチンでは 400-300nm, 280nm, 260nm での増加 (O.D.=0.05-0.08) 以外は, 吸光度の減少は認められなかった。(Fig. 9 A, B), この変化が何によるかは更に検討する必要があるが, もし照射によって発生した活性酸素による酸化によるものであるとしても, セファランチンの抗酸化剤としての働きは, MDA 値でみるかぎり, この系の中での脂質過酸化反応をセファランチンが強く阻害しないことと, (Table 2, Fig. 4) 考え合わせると, 抗酸化剤及びラジカル捕捉剤としての活性が明らかであるトコフェロールに, 比較するとその活性は極めて弱いものと推定された。

次にトコフェロールが酸化を受けることが, すでに報告されている酸性エタノール系⁴⁸⁾ を用いて, セファランチンのスペクトルの変化を検討してみた。Fig. 10 は酸性エタノール中での X 線照射後の, UV スペクトルを示すが, トコフェロールが酸化による 292nm の吸光度の減少, 270nm の吸光度の増加という著明な吸収スペクトルの変化を示すのに比較して, セファランチンは全く変化を示さず, クロロホルム/メタノール/H₂O の系で見られた, わずかの吸光度の

増加も認められなかった。

以上のように, トコフェロールが酸化を受けるといった条件で, セファランチンのスペクトルの変化はクロロホルム/メタノール/H₂O の系以外では認める事はできなかった。

考 察

ビスコクラウリン型アルカロイドの一種であるセファランチンによる, 脂質過酸化反応の阻害が報告されているが^{(10), (13), (15), (22)}, その阻害機構は依然不明のままである。最近, この阻害機構について, Nagatsuka et al.¹⁵⁾ がセファランチンによる脂質過酸化反応の阻害は, その抗酸化剤としての働きによるものでなく, セファランチンが脂質の脂肪酸部分に入り込んで, ラジカルの不飽和脂肪酸に対する攻撃を防護するという考えを, リポソーム膜の流動性や透過性に対する影響やラジカルトラッピング作用を持たないという結果から, 述べているが, 実験的根拠には乏しく推定の域を出ていない。

本実験では, セファランチンの阻害作用を考える上で, その脂質過酸化反応の阻害の報告が, リポソーム, ミトコンドリア, ミクロゾームといった膜系に限られていることから, このような系以外での脂質過酸化反応に対しての影響に興味を持ち検討した。また, Nagatsuka et al.¹⁵⁾ が否定した抗酸化剤としての働きも, 彼らが用いた, 1,1-diphenyl 2-picrylhydrazyl (DPPH) を使う方法以外に, 他の系で更に検討する必要があると考え, いくつかの系を用いて実験を行い, 以下の点を明らかにすることができた。

① セファランチンは, リポソームやミトコンドリアといった膜系での過酸化反応では強い阻害を示すが, クロロホルム/メタノール/H₂O やメタノールといった溶媒系での反応では弱い阻害を示した。(Table 2, 3)。抗酸化剤であるトコフェロールが, このような溶媒系の脂質過酸化反応を強く阻害すること (Table 2, 3) から考えて, この結果は, セファランチンが, 抗酸化剤として働いている可能性が低いこと, またこのような系の中では, リポソームの系と比較してセファランチンと脂質の相互作用は, 弱いことが考えられ, そのために過酸化反応を阻害

しない事を示唆するものであると考えられた。

② セファランチンは、トコフェロールが酸化によって示したような著明なスペクトルの変化を示さなかった。(Fig. 9, Fig. 10).

これらの結果から、本実験では、セファランチンの脂質過酸化反応の阻害は、その抗酸化剤としての作用によるものでなく(?), 膜構造を取った脂質とラジカルとの相互作用を膜構造内でのセファランチンの組み込みにより阻害するものと考えている。このことは、Nagatsuka et al.¹⁵⁾の考えと相反するものではない。

抗酸化及びラジカル捕捉活性に依らず、セファランチンの脂質過酸化反応の阻害を、考える場合、膜安定化作用ということが問題になる。序論で述べたように、この作用に基づくと思われる多くの報告²³⁾⁻³²⁾がなされている。しかしこの膜安定化作用についても、その分子レベルでの説明は尚不十分で、過酸化反応の阻害機構を考える上での十分な情報を提供しない。膜と抗酸化剤の相互作用に関してはトコフェロールの例があるが、これにしても、Lucy et al.⁵¹⁾の仮説が提出されて以後、明らかな証明はされておらず、膜安定化作用についての分子レベルでの説明には困難な点が多い。しかし、膜安定化作用という機構による脂質過酸化反応の阻害を、説明するには、膜物性に及ぼすセファランチンの効果についての情報が必要である。現在までの報告としては、膜流動性に関するものがあり^{15), 25)}、セファランチンによって膜流動性が低下するとされている。これに関係してピレン(Pyrene)を用いて、検討中であり同様な結果を得ている。しかし、これ以外の、膜物性に対するセファランチンの影響についての報告はなく、今後この分野での研究が注目される。

結 語

- ① セファランチンはX線照射によって誘導されるリポソームや、 Fe^{2+} によって誘導されるミトコンドリアの脂質過酸化反応を濃度依存的に阻害した。
- ② セファランチンは、ミトコンドリア存在下での Fe^{2+} の酸化速度を抑制したが、非存在下での速度を抑制しなかった。
- ③ X線照射によって誘導されるクロロホルム/メタノール/ H_2O の系や Fe^{2+} によって誘導されるメタノール中での脂質過酸化反応はセファランチンによって阻害されにくい。トコフェロールはこれらの反応を濃度依存的に強く阻害した。
- ④ セファランチンは O_2^- (ニトロブルーテラゾリウム法、ディアニシジン法)、 $\cdot OH$ (p-ニトロソジメチルアニリン法)、 H_2O_2 (Ferrithiocyanate法)の除去活性を示さなかった。
- ⑤ X線照射-クロロホルム/メタノール/ H_2O 系、X線照射-酸性エタノール系で α -トコフェロールは酸化による著明なUVスペクトルの変化を示したがセファランチンはX線照射-クロロホルム/メタノール/ H_2O 系でわずかな変化を示したのみで、X線照射-酸性エタノール系では全く変化を示さなかった。以上の結果から、セファランチンの脂質過酸化反応の阻害作用は膜脂質内へのセファランチンの組み込みがその原因であると推定した。

謝 辞

原稿を終わるに当たり御懇切なる御指導を頂いた放射線医学教室、青野要教授に、並びに、白石則之助手、教室の各位に謝意を表します。また、実験機器の使用につき御配慮下さいました、麻酔学教室、小坂二度見教授、並びに教室の各位に、原稿の御校閲を頂いた高知医科大学生物学教室、内海耕徳教授に謝意を表します。また、セファランチンを御提供下さいました、化研生薬K.K.に謝意を表します。

文 献

1. 五島雄一郎：序論—過酸化脂質の臨床的意義，過酸化脂質と疾患，八木国夫，五島雄一郎 編，医学書院，pp. 133—146，1981.
2. 武田佳彦：網膜の酸素障害，未熟児，新生児の酸素障害—活性酸素，フリーラジカル，馬場一雄，坂本正一，美濃 真 監編，医歯薬出版，pp. 106—125，1981.
3. 大柳善彦：第12章，その他の病気と活性酸素，スーパーオキシドと医学，早石 修 監編，共立出版，pp. 209—220，1981.
4. 浅田浩二：活性酸素の生物に対する作用，代謝，15，1277—1285，1978.
5. Willson, R.L.: Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo., In *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage* ed. D.W. Fitzsimons, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 19—42, 1979.
6. Slater, T.F.: Mechanisms of protection against the damage produced in biological systems by oxygen-derived radicals., In *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage* ed. D.W. Fitzsimons, Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 143—176, 1979.
7. Pfeifer, P.M. and McCay, P.B.: Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase catalyzed alteration of membrane phospholipids. V. Use of erythrocytes to demonstrate enzyme-dependent production of a component with the properties of a free radical. *J. Biol. Chem.* 246, 6401—6408, 1971.
8. Fee, J.A. and Teitelbaum, H.D.: Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red cells against peroxidative hemolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 150—159, 1972.
9. Dobretsov, G.E., Borschevskaya, T.A., Petrov, V.A. and Vladimirov, Yu.A.: The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* 84, 125—128, 1977.
10. Shiraishi, N., Arima, T., Aono, K., Inouye, B., Morimoto, Y. and Utsumi, K.: Inhibition by biscoclaurine alkaloid of lipid peroxidation in biological membranes. *Physiol. Chem. Phys.* 12, 299—305, 1980.
11. Yukawa, O. and Nakazawa, T.: Radiation-induced lipid peroxidation and membrane-bound enzymes in liver microsomes. *Int. J. Radiat. Biol.* 37, 621—631, 1980.
12. Vladimirov, Yu.A., Olenev, V.I., Suslova, T.B. and Cheremisina, Z.P.: Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.* 17, 173—249, 1980.
13. Aono, K., Shiraishi, N., Arima, T., Inouye, B., Nakazawa, T. and Utsumi, K.: Changes in mitochondrial function by lipid peroxidation and their inhibition by biscoclaurine alkaloid. *Physiol. Chem. Phys.* 13, 137—144, 1981.
14. 内海耕髓，白石則之：1. 生体膜と過酸化脂質について，未熟児・新生児の酸素障害—活性酸素，フリーラジカル，馬場一雄，坂本正一，美濃 真 監編，医歯薬出版，pp. 127—139，1981.
15. Nagatsuka, S. and Nakazawa, T.: Effects of membrane-stabilizing agents, cholesterol and cepharanthine, on radiation-induced lipid peroxidation and permeability in liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 691, 171—177, 1982.
16. Eichenberger, K., Bohni, P., Winterhalter, K.H., Kawato, S. and Richter, C.: Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* 42, 59—62, 1982.
17. 八木国夫，錦見盛光：酸素毒性とビタミン，代謝，15，1287—1295，1978.

18. Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E. and Hochstein, P.: Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 6858—6862, 1981.
19. 大柳善彦：第1章，序論，スーパーオキシドと医学，早石 修 監編，共立出版，pp. 1—22, 1981.
20. Osawa, T. and Namiki, M.: Anovel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 735—739, 1981.
21. 大澤俊彦，並木満夫：脂質の過酸化と変異原性，変異原と毒性，**5**，243—252, 1982.
22. Inoue, B., Morita, K., Ishida, T. and Ogata, M.: Cooperative effect of sulfite and vanadium compounds on lipid peroxidation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**, 101—107, 1980.
23. Utsumi, K., Miyahara, M., Inoue, M., Mori, M., Sugiyama, K. and Sasaki, J.: Inhibition by cepharanthin of red blood cell potassium release induced by lead acetate and lysolecithin. *Cell Struct. Funct.* **1**, 133—136, 1975.
24. Yoshioka, T., Sekiba, K. and Utsumi, K.: Effect of bilirubin on potassium release from cord blood erythrocytes. *Cell Struct. Funct.* **5**, 209—213, 1980.
25. Utsumi, K., Miyahara, M., Sugiyama, K. and Sasaki, J.: Effect of bisococlaurine alkaloid on the cell membrane related to membrane fluidity. *Acta Histochem. cytochem.* **9**, 59—68, 1976.
26. Miyahara, M., Aono, K., Quesada, J.S., Shimono, K. and Yamashita, S.: Protection by cepharanthine of the mitochondrial function from damage induced by snake venom, phospholipase A₂, lysolecithin and lead. *Cell Struct. Funct.* **3**, 61—65, 1978.
27. Fujii, T., Sato, T., Tamura, A., Wakatsuki, M. and Kanaho, Y.: Shape changes of human erythrocytes induced by various amphipathic drugs acting on the membrane of the intact cells. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 613—620, 1979.
28. Sato, T., Kanaho, Y. and Fujii, T.: Relation of the characteristic action of bisococlaurine alkaloids on the erythrocyte membrane and their incorporation into the membrane. *Cell Struct. Funct.* **5**, 155—163, 1980.
29. Watanabe, S., Morimoto, Y., Shiraishi, N., Sano, A. and Utsumi, K.: The inhibition of platelet aggregation by bisoclaurine alkaloids. *Cell Struct. Funct.* **6**, 263—267, 1981.
30. Kanaho, Y. and Fujii, T.: Effect of some amphilic drugs on the membrane morphology and aggregation of rabbit platelet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **106**, 513—519, 1982.
31. Kanaho, Y., Sato, T. and Fujii, T.: Mechanism of the inhibitory effect of cepharanthine on the aggregation of platelets. *Cell Struct. Funct.* **7**, 39—48, 1982.
32. Watanabe, S.: Inhibition of platelet aggregation by cepharanthine is accomplished during the early, membrane-related activation process. *Acta Med. Okayama* **38**, 101—115, 1984.
33. Hogeboom, G.H.: fractionation of cell components of animal tissues., In *Methods in Enzymology* ed. S.P. Colowick, and N.O. Kaplan, Academic Press, New York, vol. 1, pp. 16—19, 1981.
34. Beauchamp, C. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276—287, 1971.
35. Misra, H.P. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 308—312, 1977.
36. Bors, W., Michel, C. and Saran, M.: On the nature of biochemically generated hydroxyl radicals. Studies using the bleaching of p-nitrosodimethylaniline as a direct assay method. *Eur. J. Biochem.* **95**, 621—627, 1979.
37. Thurman, R.G., Ley, H.G. and Scholz, R.: Hepatic microsomal ethanol oxidation. Hydrogen

- peroxide formation and the role of catalase. *Eur. J. Biochem.* **25**, 420—430, 1972.
38. Hunter, F.E., Jr., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* **238**, 828—835, 1963.
 39. 内山 充：過酸化脂質，生化学実験講座3. 脂質の化学（日本生化学会 編），東京化学同人，pp.531—540, 1974.
 40. Hashimoto, K.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation. Part I. Quantitative analysis of ferrous ion in a system of ferrous ion-induced lipid peroxidation. *Okayama Igakkai Zasshi* **94**, 349—357, 1982.
 41. Hashimoto, K.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation. Part II. Analysis of the induction period (lag) of ferrous ion-induced lipid peroxidation. *Okayama Igakkai Zasshi* **94**, 359—368, 1982.
 42. Kong, S. and Davison, A.J.: The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 18—29, 1980.
 43. Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates. Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* **92**, 321—326, 1978.
 44. Halliwell, B.: Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* **96**, 238—242, 1978.
 45. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Formation of a thiobarbituric-acidreactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* **128**, 347—352, 1981.
 46. Gutteridge, J.M.C.: Fate of oxygen free radicals in extracellular fluids. *Biochem. Soc. Trans.* **10**, 72—73, 1981.
 47. Tien, M., Svingen, B.A. and Aust, S.D.: Superoxide dependent lipid peroxidation. *Federation Proc.* **40**, 179—182, 1981.
 48. Fukuzawa, K. and Gebicki, J.M.: Oxidation of α -tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **226**, 242—251, 1983.
 49. Matsumoto, S. and Matsuo, M.: The reaction of a α -tocopherol model compound with KO_2 , a new oxidation product of 6-hydroxy-2,2,5,7,8-pentamethylchroman. *Tetrahedron Lett.* **23**, 1999—2000, 1977.
 50. Nishikimi, M., Yamada, H. and Yagi, K.: Oxidation by superoxide of tocopherols dispersed in aqueous media with deoxycholate. *Biochim. Biophys. Acta* **627**, 101—108, 1980.
 51. Lucy, J.A. and Dingle, J.T.: Fat-soluble vitamins and biological membranes. *Nature* **204**, 156—160, 1964.

Effect of cepharanthine on lipid peroxidation

Ikuo JOJA

Department of Radiation Medicine, Okayama Univeristy Medical School

(Director: Prof. K. Aono)

The effect of cepharanthine on radiation- and Fe^{2+} -induced lipid peroxidation was examined. Cepharanthine and α -tocopherol inhibited radiation-induced lipid peroxidation of liposomes and Fe^{2+} -induced lipid peroxidation of mitochondria. Cepharanthine reduced the velocity of Fe^{2+} oxidation in the presence of mitochondria but not in the absence. α -Tocopherol strongly inhibited radiation-induced peroxidation of lipid dissolved in $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (v/v, 2/1/0.8) and Fe^{2+} -induced peroxidation of lipid dissolved in MeOH . Cepharanthine, on the other hand, only weakly inhibited lipid peroxidation in the $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ system, and did not inhibit peroxidation in the MeOH system.

The change in the absorption spectrum of α -tocopherol and cepharanthine by free radicals(X irradiation) was measured. The reagents were dissolved in 95% EtOH acidified with 20 mM HCl and $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (v/v, 2/1/0.8). α -Tocopherol exhibited a change in its absorption spectrum in both systems and seemed to be oxidized at a higher rate by radicals. However, cepharanthine did not exhibit a change in its absorption spectrum in acidified 95% EtOH exposed to X irradiation, and slightly exhibited a change in its absorption spectrum in $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ exposed to X irradiation. From these observations, cepharanthine seemed not to exhibit a radical-trapping ability.