塩蔵漬菜中フェオホーバイドaの白ネズミに対する 光力学的作用について

山 田 幸 二

郡山女子大学家政学部食物栄養学科

Photodynamic Action of Pheophorbide a in Pickled Green on Rats

Koji YAMADA

*Food and Nutrition Laboratory, Faculty of the Science of Living, Koriyama
Women's College, Koriyama, Fukushima*

In order to elucidate the mechanism of photodynamic action of pheophorbide a in the salted Takana on rats, photosensitized degradation of amino acids and fatty acids were studied in comparison with that of rose bengale.

A 10 mg/rat dose of pheophorbide a or rose bengale was injected intraperitoneally into rats, and after being kept in dark place for 15 hr they were irradiated under a light intensity of 20,000 lux. The pheophorbide a injected rats died within 45 min. On the contrary the rose bengale injected rats were alive even after the irradiation for 8 hr. But subsequent feeding for one week in the dark caused loss of hair and necrosis of skin.

Amino acids mixture solutions containing pheophorbide a or rose bengale were irradiated for 8 hr. Consequently, rose bengale caused photodynamic degradation of histidine, methionine, cystine and tyrosine, whereas pheophorbide a did not have such effects. Also, fatty acids solutions containing pheophorbide a were irradiated for 3 hr or 5 hr, and it was found that unsaturated fatty acids were broken down.

(Received March 11, 1974)

塩蔵漬菜（野沢菜漬、タカ菜漬）を白ネズミに投与し可視光線を照射して飼育すると成長阻害、死亡、背部の脱毛、耳や背部のネクロゼ等の食餌性の光過敏症がみられ、これらの原因は塩蔵漬菜中フェオホーバイドaが増感剤となって起こる光力学的作用によることを著者らはすでに報告した¹⁾。

光増感作用を有する物質の溶血作用²⁾³⁾、抗菌作用⁴⁾⁵⁾、酵素の失活⁶⁾⁷⁾、アミノ酸の光酸化等⁷⁾⁻¹⁰⁾について多く報告されている。これらはいずれもキサンテン系色素、チアジン系色素、アクリジン系色素等についての報告である。

本研究は塩蔵漬菜中フェオホーバイドaが増感剤となって起こる白ネズミの光過敏症の機構を明らかにするため、フェオホーバイドaによる白ネズミの光毒性、アミノ酸、脂肪酸の光分解に及ぼす影響についてローズベンガルと対比して検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 供 試 品

実験に使用したフェオホーバイドaは、タカ菜（12月に収穫）を10%食塩で2カ月間漬込んだのち、室内で乾燥、粉末として、先に報告した方法¹⁾、すなわち、エーテル-酢酸（5:1 v/v）混液で色素を抽出、水洗法でエーテル層を分離、ついで数回水洗し、濃度の異なる塩酸で分画、15%塩酸区分を分離し、その塩酸区分をエーテルで洗浄したあと、クロロホルムで色素を抽出し、そのクロロホルム層を数回水洗し、ロータリーエボレーターで蒸発乾固し結晶とした。この物質はフェオホーバイドa以外に若干のフェオホーバイドbを確認したが、エーテル溶液の吸収スペクトル（Fig. 1）は410 m μ 、505 m μ 、535 m μ 、607 m μ 、665 m μ に吸収ピークがみられ、Holtら¹¹⁾のフェオホーバイドaの吸収スペクトルと一致したので完全な単一物質ではないがフェオホーバイドaとした。

この物質は脂溶性であるため、使用の際、pH 10の

Fig. 1. Absorption spectra of pheophorbide a in ether.

0.067 M りん酸緩衝液, アセトンまたはクロロホルムに溶かした。

フェオホーバイド a と対比のためのローズベンガルは, 食品添加物としての市販品 (三栄化学製) を pH 10 の 0.067 M りん酸緩衝液, またはアセトンに溶かして使用した。

2. 白ネズミに対するフェオホーバイド a, ローズベンガルの光力学的作用

体重 72~84 g の呑竜系雄白ネズミに光照射前日の午後 5 時に 1 頭当たり 10 mg/ml のフェオホーバイド a, またはローズベンガルのりん酸緩衝液 (pH 10) 1 ml を腹腔内投与し, 翌日の午前 8 時まで, 恒温恒湿 (温度 23°C, 湿度 50%) の暗い部屋で飼育したのち, 先に報告した装置, すなわち, 光源としてタングステンランプ (日立の屋内反射型, 100 V, 200 W) を用い, 20,000 ルックスの照度で 8 時間照射し観察した。なお, コントロールはりん酸緩衝液 (pH 10) のみを腹腔内に投与し試験群と同じ条件で行なった。

3. アミノ酸の光分解

17 種のアミノ酸 (田辺必須アミノ酸研究基金) をトリス緩衝液 (pH 9) で 0.002 mmole/ml の溶液を作成し, その 9.5 ml とフェオホーバイド a, またはローズベンガルのりん酸緩衝液 (2.0 mg/ml) 0.5 ml を 2 本の試験管 (18×180 mm) にとり, 一方を静置, もう 1 本の試験管はアスピレーターを用い通気し, 照度 20,000 ルックスで 8 時間照射したのち, 純水で希釈し, 残存アミノ酸をアミノ酸自動分析機 (柳本製作所製 LC-51 A 型) で分析し, アミノ酸の分解度をみた。

4. 脂肪酸の光分解

脂肪酸の光分解にはリノール酸 (和光純薬製で C_{16:0}, C_{18:1} が若干検出), ステアリン酸 (半井化学製で C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0} の混合物であるため, 以後飽和脂肪酸と記す), 大豆油脂脂肪酸, アマニ油脂脂肪酸 (いずれも日清製油製) を用いた。

フェオホーバイド a とローズベンガルとの比較実験はリノール酸のアセトン溶液 (0.6 mg/ml) 9.5 ml とフェオホーバイド a またはローズベンガルのアセトン溶液 (2.0 mg/ml) 0.5 ml を秤量瓶 (30×30 mm) にとり, 照度 20,000 ルックスに調製したタングステンランプで一定時間照射した。その他の実験は溶媒としてクロロホルムを使用し, 飽和脂肪酸は 0.6 mg/ml, 大豆油脂脂肪酸, アマニ油脂脂肪酸はいずれも 2.0 mg/ml の溶液とし, その 9.5 ml とフェオホーバイド a クロロホルム溶液 (2.0 mg/ml) 0.5 ml を秤量瓶にとり, リノール酸の場合と同じ条件で行なった。

脂肪酸の分解は脂肪酸のガスクロマトグラムより判定した。すなわち, 光照射を行なったあと, 溶媒を除き, さらに塩酸メタノールでメチル化したあと, 柳本製作所製 G 8 型ガスクロマトグラフィーを用いて脂肪酸組成を調べた。ガスクロマトグラフィーの条件はキャリアガスに He を使用し, 流速 15~20 ml/min, カラム温度 180 °C, 注入口温度 250 °C, カラム内径 4 mm, 長さ 2.25 m のステンレスカラムで, 充てん剤には 15% DEGS を用い, 水素炎イオン化検出器で測定した。

実験結果および考察

1. フェオホーバイド a, ローズベンガルの白ネズミに対する光力学的作用

フェオホーバイド a, ローズベンガルを腹腔内に投与し, 光を照射した結果を Table 1 に示した。りん酸緩衝液のみを投与した群 (control) は光照射中, 照射後いづれも異常現象はみられないが, フェオホーバイド a 投与群は前報¹⁾と同じように光照射と同時に耳が紅斑し, かゆみを訴え, 4~5 分後には籠の中を激しく動き始め, その後, 両後肢が麻痺症状を呈し, ついで歩行困難, 呼吸困難となり, 35~45 分後に死亡した。死亡した白ネズミを剖開した結果, 投与したフェオホーバイド a は肉眼でも観察できるほどの大きな粒子となり胃の下に蓄積がみられた。おそらく, 血中に入る前にこのような部位に蓄積されたあと, 徐々に血中に放出されているものと考えられる。ローズベンガル投与群は 8 時間光を照射したが, 照射中には異常は認められなかった。その後 1 週間暗所で飼育した結果, 後遺症として背部, すなわち良く光の当たった部分の脱毛が起こり, さらに脱毛した部分に壊死症状が観察された。

フェオホーバイド a の光力学的作用は強力な致死効果をもたらした, また先に報告したように野沢菜漬, タカ菜漬を投与し, 光を照射して起こる現象として死亡, 耳の壊死, ついで背部の脱毛, ネクローゼ等が起こるのに対し, ローズベンガルは背部の脱毛, 壊死のみで死亡, 耳の異常現象などはみられないことから, フェオホーバイ

Table 1. Effects of pheophorbide a and rose bengale on photosensitization in rats.

Group	Body wt.	Dose/rat	During irradiation		After irradiation	
			Pruritus	Death (min)	Loss of hair	Necrosis of skins
Control	79 g	0 mg	—	—	—	—
	75	0	—	—	—	—
	78	0	—	—	—	—
Pheophorbide a	82	10	+	+(35)		
	77	10	+	+(45)		
	78	10	+	+(45)		
Rose bengale	80	10	—	—	+	+
	84	10	—	—	+	+
	72	10	—	—	+	+

A 10 mg/rat dose of pheophorbide a or rose bengale was injected intraperitoneally into rats, and after being kept in a dark place for 15 hr they were irradiated under light intensity of 20,000 lux.

Results: + active, — negative.

ド a とローズベンガルの光力学的作用は異なるものと推定される。

2. フェオホーバイド a あるいはローズベンガル存在下アミノ酸に及ぼす光の影響

フェオホーバイド a とローズベンガルによるアミノ酸の光分解の結果を対照区 (control) の残存アミノ酸を 100 とし、おのおのを Table 2, 3 に示した。アミノ酸溶液にローズベンガルを添加し、光を照射するとヒスチジン、メチオニン、シスチン、チロシンの分解がみられ、とくにヒスチジン、チロシンの分解が大であった。またこれらアミノ酸の分解は、静置 (Table 2) して光照射するよりも通気したほう (Table 3) が分解は著しいことから、これらの分解反応は好気的な反応であり、すでに報告されている結果⁷⁾と一致する。一方、フェオホーバイド a 添加と光照射によるアミノ酸の分解は、静置、通気いずれの条件においてもみられないことから、フェオホーバイド a はアミノ酸の光分解能がみられない。

橋本¹²⁾、Clare¹³⁾は光過敏症の機構について、光力学的物質は可視光線下にさらされると一定の光エネルギーを吸収して活性化し、第二の物質に出会うとこれにエネルギーを移し、このエネルギーを受けた物質は酸素があると酸化される。この場合酸化を受けるのはたん白質で、その構成アミノ酸であるヒスチジン、トリプトファン、チロシンの酸化によって起こる現象であるとしている。したがってローズベンガルによる光過敏症の機構は、アミノ酸のモデル実験より生体のアミノ酸の分解との関連性は大であると推察されるが、フェオホーバイド a による光過敏症はローズベンガルによる脱毛や組織

(とくに皮膚)の壊死現象と異なって、短時間に両後肢の麻痺、呼吸困難等を呈し、ただちに死亡すること、アミノ酸の光分解がみられないことなどから、フェオホーバイド a の光力学的作用とローズベンガルの光力学的作用は異なるものと推察される。

3. フェオホーバイド a あるいはローズベンガル存在下脂肪酸に及ぼす光の影響

リノール酸のアセトン溶液にローズベンガル、またはフェオホーバイド a を添加し、5 時間光照射した結果を Fig. 2 にガスクロマトグラムで示した。その結果、ローズベンガル添加と対照 (blank) との差はみられないがフェオホーバイド a 添加によってリノール酸 (以後ガスクロマトグラム上の脂肪酸は炭素の数と二重結合の数で記す) のピークが著しく小さくなり、溶媒近くに C_{18:2} の分解物と思われる多くの新しいピークがチャート上に検出された。

飽和脂肪酸 (C_{14:0}、C_{16:0}、C_{18:0} の混合物)、リノール酸の多い大豆油脂肪酸、リノレン酸の多いアマニ油脂肪酸のクロロホルム溶液にフェオホーバイド a を添加し、光照射した結果を Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に各ガスクロマトグラムで示した。

飽和脂肪酸はフェオホーバイド a の存在下で光を照射しても、ほとんど対照と同じガスクロマトグラムを示したが、大豆油脂肪酸、アマニ油脂肪酸にフェオホーバイド a を添加して、5 時間光を照射すると C_{18:1}、C_{18:2}、C_{18:3} のピークが著しく小さくなり、C_{16:0} または C_{16:0} 以前に不飽和脂肪酸の分解物と思われる新しいピークがチャート上に多く検出された。なお、脂肪酸溶液のみに

Table 2. The effect of visible light on amino acids in the presence of pheophorbide a or rose bengale.

Amino acids	Control	Pheophorbide a	Rose bengale
Lys	100	93	94
His	100	100	63
Arg	100	101	93
Asp	100	115	102
Thr	100	98	94
Ser	100	113	107
Glu	100	114	99
Pro	100	99	102
Gly	100	110	93
Ala	100	89	113
Cys	100	118	92
Val	100	98	115
Met	100	93	65
Ile	100	113	105
Leu	100	110	99
Tyr	100	107	74
Phe	100	101	93

To 9.5 ml of Tris-buffer (pH 9) containing 0.002 mmole/ml of the amino acids was added 0.5 ml of phosphate buffer (pH 10) containing 2.0 mg/ml of the pheophorbide a or rose bengale and irradiated for 8 hr. Control system contained 0.5 ml of phosphate buffer (pH 10) instead of 0.5 ml pheophorbide a or rose bengale. Each amino acid is showed as percentage of the sample against that of the control.

Table 3. The effect of visible light on amino acids in the presence of pheophorbide a or rose bengale.

Amino acids	Control	Pheophorbide a	Rose bengale
Lys	100	102	101
His	100	94	0
Ahg	100	101	107
Asp	100	99	102
The	100	97	96
Ser	100	102	99
Glu	100	99	97
Pro	100	109	110
Gly	100	105	103
Ala	100	95	92
Cys	100	99	74
Val	100	96	88
Met	100	98	7
Ile	100	96	95
Leu	100	98	97
Tyr	100	99	17
Phe	100	93	104

A reaction mixture was the same as Table 2. The mixture were irradiated in air for 8 hr. Each amino acid is the same as Table 2.

Fig. 2. Changes in the gas chromatograms of linoleic acid produced by the photodynamic action of pheophorbide a or rose bengale.

9.5 ml of chloroform solution containing 0.6 mg/ml of the linoleic acid was mixed 0.5 ml of chloroform solution containing 0.2 mg/ml of the pheophorbide a or rose bengale, and irradiated for 5 hr. Control system contained 0.5 ml of chloroform instead of 0.5 ml chloroform solution of pheophorbide a or rose bengale.

1=C_{16:0}, 2=C_{18:1}, 3=C_{18:3}.

Fig. 3. Changes in the gas chromatograms of saturated fatty acids produced by the photodynamic action of pheophorbide a.

9.5 ml of chloroform solution containing 0.6 mg/ml of the saturated fatty acids was mixed 0.5 ml of chloroform solution containing 0.2 mg/ml of the pheophorbide a, and irradiated under light intensity of 20,000 lux. Control system contained 0.5 ml of chloroform instead 0.5 ml chloroform solution of pheophorbide a.

(A) control, irradiation time was 0 hr, (B) control, irradiation time was 3 hr, (C) control, irradiation time was 5 hr, (D) with pheophorbide a, irradiation time was 3 hr, (E) with pheophorbide a, irradiation time was 5 hr.

1=C_{14:0}, 2=C_{16:0}, 3=C_{18:0}.

Fig. 4. Changes in the gas chromatograms of soybean oil fatty acids produced by the photodynamic action of pheophorbide a.

9.5 ml of chloroform solution containing 2.0 mg/ml of the soybean oil fatty acids was mixed 0.5 ml of chloroform solution containing 2.0 mg/ml of the pheophorbide a, and irradiated under light intensity of 20,000 lux. Control system contained 0.5 ml of chloroform instead 0.5 ml chloroform solution of pheophorbide a.

(A) control, irradiation time was 0 hr, (B) control, irradiation time was 3 hr, (C) control, irradiation time was 5 hr, (D) with pheophorbide a, irradiation time was 3 hr, (E) with pheophorbide a, irradiation time was 5 hr.

1=C_{16:0}, 2=C_{18:0}, 3=C_{18:1}, 4=C_{18:2}, 5=C_{18:3}.

光を照射してもガスクロマトグラム上に変化はみられない。

これらの結果、すでに光増感作用を有するといわれているローズベンガルについてリノール酸の光分解能を検討した結果、分解能はみられない。フェオホーバイド a はいずれの実験材料についても光の存在によって C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3} 等の二重結合を有する不飽和脂肪酸の分解能がみられた。これらの機構については明らかではないが、フェオホーバイド a が光エネルギーを吸収し、励起状態となり、そのエネルギーが二重結合を有する脂肪酸に特異的に作用し、不飽和脂肪酸の分解が起こるものと考えられるので、さらに今後その機構について検討したい。

フェオホーバイド a の投与によって起こる白ネズミの光過敏症（死亡）と不飽和脂肪酸の光分解との関係、すなわち、生体内反応と試験管内反応とを同一視して論ずることは問題であるが、Clare¹³⁾ が光学的物質の投与と光照射によって生体中のたん白質（それを構成する特定のアミノ酸）の分解によって光過敏症が起こると述べていることから、生体内脂肪酸がフェオホーバイド a と光の存在によって分解が起こり体内にその分解産物が生

成されることも考えられる。また自動酸化油の毒性についても多くの報告がみられ、そのうちでも過酸化物の分解物による毒性は著しく、投与後数時間で死亡すること¹⁴⁾¹⁵⁾ などから、フェオホーバイド a 投与と光照射によって起こる光過敏症と脂肪酸の光分解との関連性について今後さらに検討を要する。

要 約

タカ菜漬より分離したフェオホーバイド a の光学的作用の機構を明らかにするため、ローズベンガルと対比して白ネズミの光過敏症、アミノ酸、脂肪酸の光分解等について検討した。

1) フェオホーバイド a を白ネズミに投与し光を照射すると強い致死効果がみられたが、ローズベンガルを投与した白ネズミは光照射後 1 週間目に脱毛、皮膚の壊死等の後遺症がみられた。

2) アミノ酸溶液（トリプトファン、システインを除く 17 種のアミノ酸）にローズベンガルを添加し、光照射すると、ヒスチジン、メチオニン、シスチン、チロシンの分解がみられるが、フェオホーバイド a ではないずれのアミノ酸も分解されなかった。

Fig. 5. Changes in the gas chromatograms of linseed oil fatty acids produced by the photodynamic action of pheophorbide a.

9.5 ml of chloroform solution containing 2.0 mg/ml of the linseed oil fatty acids was mixed 0.5 ml of chloroform solution containing 2.0 mg/ml of the pheophorbide a, and irradiated under light intensity of 20,000 lux. Control system contained 0.5 ml of chloroform instead 0.5 ml chloroform solution of pheophorbide a.

(A) control, irradiation time was 0 hr, (B) control, irradiation time was 3 hr, (C) control, irradiation time was 5 hr, (D) with pheophorbide a, irradiation time was 3 hr, (E) with pheophorbide a, irradiation time was 5 hr.

1=C_{16:0}, 2=C_{18:1}, 3=C_{18:1}, 4=C_{18:2}, 5=C_{18:3}.

3) 脂肪酸にフェオホーバイドaを加え、光を照射すると不飽和脂肪酸であるリノレン酸 (C_{18:3})、リノール酸 (C_{18:2})、オレイン酸 (C_{18:1}) の分解がみられた。しかし、ローズベンガルによるこれら脂肪酸の分解はみられなかった。

文 献

- 1) 山田幸二, 中村延生蔵: 栄養と食糧, 25, 466 (1972)
- 2) 黒田嘉一郎, 吉川春寿, 中尾喜久, 脇坂行一: 血液化学, 228 (1968), 朝倉書店, 東京
- 3) 山田幸二: 日本栄養食糧学会東北支部大会講演要旨 (1972)
- 4) 稲田邦子, 宮沢文雄: 食衛誌, 10, 344 (1969)
- 5) 稲田邦子, 宮沢文雄, 谷村顕雄: 食衛誌, 11, 238 (1970)
- 6) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, 13, 12 (1972)
- 7) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, 13, 19 (1972)
- 8) Weil, L., Seibles, T.S. and Herskovits, T.T.: Arch. Biochem. Biophys. 111, 308 (1965)
- 9) Bellin, J.S. and Yankus, C.A.: Arch. Biochem. Biophys., 123, 18 (1968)
- 10) 松浦輝雄, 野崎一編: 化学の領域 増刊 93 有機光化学, 263 (1970), 南江堂, 東京
- 11) Holt, A.S. and Jacobs, E.E.: Am. J. Botany, 41, 701 (1954)
- 12) 橋本芳郎, 堤 淳二: 食衛誌, 4, 185 (1963)
- 13) Clare, N.T.: Advance in Vet. Sci., 2, 181 (1955)
- 14) 吉岡倭子, 金田尚志: 油化学, 21, 316 (1972)
- 15) 天野立爾: 食衛誌, 13, 293 (1972)

(昭和49年3月11日受理)