薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (3) 199-202 (1992)

薬物の極微弱化学発光に関する研究 (第 14 報¹⁾) ラット脳ホモジネート
脂質過酸化反応から生成する極微弱化学発光の
アントラキノン誘導体による抑制効果

佐藤秀昭,^a 石沢文章,^a 平山秀樹,^b 菱沼隆則,^a 水柿道直*,^a
東北大学医学部附属病院薬剤部,^a 株式会社ツムラ^b

Extra-weak Chemiluminescence of Drugs. XIV.¹⁾ Quenching Effects of
Anthraquinones on the Extra-weak Chemiluminescence from
Lipid Peroxidation in Rat Brain Homogenates

Hideaki SATO,^a Fumiaki ISHIZAWA,^a Hideki HIRAYAMA,^b
Takanori HISHINUMA,^a and Michinao MIZUGAKI*,^a

Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University
Hospital,^a 1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku Sendai 980, Japan and
Research Department of Quality Control & Evaluation,
Tsumura Co., Ltd.,^b 3586 Yoshiwara, Ami-machi,
Inashiki-gun, Ibaraki 300-11, Japan

(Received November 21, 1991)

Quenching effects of anthraquinones on the extra-weak chemiluminescence (CL) derived from lipid peroxidation in rat brain homogenates were investigated. Such anthraquinone derivatives as emodin, rhein, and alizarin quenched the CL, while anthraquinone did not quench the CL. A linear relationship between CL-quenching activity and inhibitory rate of malondialdehyde production of various compounds was demonstrated. This technique is useful for the screening method of antioxidants.

Keywords—extra-weak chemiluminescence; emodin; rhein; quenching; lipid peroxidation

一重項酸素や励起カルボニル化合物に起因した極微弱化学発光 (extra-weak chemiluminescence, CL) は、肝ミクロソームや虚血後血流再開した脳ホモジネートを用いた脂質過酸化反応系で発生することが報告されている。^{2,3)} 著者らは先に、メイラード反応から発生する CL は、一重項酸素に起因し、大黃 (Rhei Rhizoma) 含有成分の emodin, rhein 等のアントラキノン系化合物の添加により抑制されることを報告した。^{4,5)} 通常、キノン系化合物は、酸化剤としての作用と抗酸化剤としての作用を有している。

今回、著者らは、極微弱化学発光測定装置を用い、脳ホモジネートの脂質過酸化反応から発生する CL の emodin, rhein 等のアントラキノン系化合物による、抑制作用について検討した。

実 験 の 部

試料 Anthraquinone, alizarin, α -tocopherol (和光純薬), rhein, emodin (Extrasynthese) を使用した。Idebenone は武田薬品 (株) より供与を受けた。

動物 体重 230—240 g の雄性 Wistar 系ラット (静岡実験動物 (株) 供給) を用いた。

脳ホモジネートの調製 ラットを断頭し、室温にて脳を摘出した。小脳を除去した脳を氷冷生

理食塩水で洗浄し、秤量後、9 倍量の生理食塩水を添加し、ホモジナイズし、ナイロン布で濾過後、実験に供した。蛋白定量は、Lowry らの方法に準じた。⁶⁾

極微弱化学発光の測定 脳ホモジネート液にアスコルビン酸と Fe^{2+} とを添加して脂質過酸化反応を惹起し、反応液から発生する CL を東北電子産業 (株) 製 chemiluminescence analyzer OX-70 にて測定した。反応液 (全量 3 ml) の組成は脳ホモジネート 1.25 ml (5.13 mg protein/ml), 119 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 μM ascorbic acid, 20 μM FeSO_4 とし、これをステンレス製プレート (直径 53 mm, 高さ 13 mm) に入れ、25°C, 暗所に放置し、経時的に CL を測定した。CL 値は経時的に増加し、210 分で最大値約 5500 counts/10s を示した。この結果から、各試料は 20% エタノールに溶解し、反応開始後 CL 値が約 3000 counts/10s を示した 70 分の時点で添加した。エタノールの最終濃度は 2% とした。反応開始 210 分後、測定プレートを 37°C の試料室に設置し、10 秒間隔で 10 回で測定し、その平均値を CL 値とした。また、コントロール試料については CL 測定後、cut-off 波長間隔が 10 nm の一連の色ガラスフィルターを用いて、波長域 420—610 nm 間の発光スペクトルを測定した。Malondialdehyde (MDA) の量は、既報⁷⁾ の thiobarbituric acid 法にて測定した。

結 果

極微弱発光スペクトル

420—610 nm の発光スペクトルを Fig. 1 に示した。発光スペクトルは、460, 520, 570, 590 nm に強い発光帯が認められた。

極微弱発光抑制率と脂質過酸化抑制作用

アスコルビン酸と Fe^{2+} によって誘起されたラット脳ホモジネートの脂質過酸化反応で発生する CL の抑制率と MDA 値を Table I に示した。Anthraquinone 以外は、いずれの薬物も

Fig. 1. Spectral Analysis of Chemiluminescence Caused by Lipid Peroxidation of Rat Brain Homogenates

TABLE I. Effect of Anthraquinone Derivatives on Lipid Peroxidation of Rat Brain Homogenate

Compounds	Conc. (μM)	CL		MDA	
		(counts/10s)	(%) ^{a)}	(nmol/ml)	(%) ^{b)}
Control		5596	0	89.1	0
Anthraquinone	300	5571	0	88.4	0
Emodin	1500	309	94.4	28.7	67.7
	300	1730	69.0	56.3	36.6
	60	2988	46.6	70.0	21.0
Rhein	300	4052	27.5	77.7	12.7
Alizarin	300	291	94.7	34.7	61.0
	60	409	92.6	39.5	55.6
Idebenone	300	1823	67.4	51.3	42.4
α -Tocopherol	300	2781	50.3	61.0	31.5

a) CL quenching activity (%) = $(C_t - C_s / C_t) \times 100$

in which C_t , CL counts from a control (counts/10s); C_s , CL counts from a sample (counts/10s).

b) Inhibitory rate of MDA production (%) = $(M_t - M_s / M_t) \times 100$

in which M_t , MDA value from a control (nmol/l); M_s , MDA value from a sample (nmol/l).

300 μM の添加で CL 抑制作用及び脂質過酸化抑制作用が認められた. 各々の薬物の CL 抑制率は, alizarin > emodin > idebenone > α -tocopherol > rhein の順であった. MDA 値は, alizarin > idebenone > emodin > α -tocopherol > rhein の順であった. 大黃含有成分の emodin は, 添加濃度に依存して CL を抑制し, MDA 値も添加濃度に依存して低下した. Alizarin は, 60 μM の添加で 92.6% の強い CL 抑制率を示した.

考

察

アスコルビン酸と Fe^{2+} によって誘起されるラット脳ホモジネートの脂質過酸化反応過程で観察された CL は, 460, 520 nm 及び 580 nm 付近に発光帯を有しており (Fig. 1), これらの発光帯は, $^1\text{O}_2$ の関与が示唆されている化学発光系のスペクトルに類似している.⁸⁾ したがって, この反応系で生じる CL の一部は, 虚血後血流再開した脳ホモジネートや肝ミクロソームで生じる CL^{2,8)} と同様に, 脂質過酸化反応の成長反応の過程で生じたペルオキシラジカルの 2 分子反応から Russell 機構⁹⁾によって生じる一重項酸素に起因していると考えられる.

CL 抑制作用は, anthraquinone には認められず, alizarin, emodin, rhein に認められた (Table I). この結果, CL 抑制作用にはカテコール性やフェノール性の水酸基の存在が必要であると推測される. Idebenone や menadione などのキノン系化合物は, 段階的な一電子還元を受けセミキノンラジカルやヒドロキノンを生成し, この還元型が, 自動酸化過程で生成するペルオキシド及びアルコキシラジカルを捕捉し, 過酸化反応を抑制する機構が報告されている.¹⁰⁻¹²⁾ Emodin や rhein などのアントラキノ系化合物は 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いた実験系でフリーラジカル消去作用が認められなかった (結果未掲載). これらの結果, アントラキノ系化合物は, 脳ホモジネート系で還元型に変換し, この還元型が脂質過酸化反応を抑制し, CL が抑制されたものと推察される. すなわち, 自動酸化過程で生成するペルオキシラジカルの生成量の低下に伴う一重項酸素の生成量の低下が, CL 抑制の主原因であると考えられる. この結果は, 各薬物の CL 抑制率が過酸化脂質生成抑制作用を反映していることを示唆している. そこで, 各薬物の CL 抑制率と MDA 値の抑制率との関連性について検討した結果, Fig. 2 に示す相関性 ($r^2=0.9649$) が認められた. したがって, CL 強度は, 脂質過酸化の反応性に対応していることが示唆される.

以上, 迅速簡便に脳ホモジネートの脂質過酸化反応を抑制する化合物をスクリーニングする方法として, 本法は有用と考える. また, 大黃含有成分の emodin, rhein などのアントラキノ系化合物に脂質過酸化抑制作用が新たに認められたことは, たいへん興味深い.

謝辞 本研究にあたり idebenone を提供下さいました武田薬品 (株) に深謝します.

引用文献

- 1) H. Sato, Y. Kurosaki, F. Ishizawa, M. Mizugaki, *Biolumin. Chemilumin.*, 投稿中.
- 2) M. Nakano, T. Noguchi, K. Sugioka, H. Fukuyama, M. Sato, Y. Shimizu, Y. Tsuji,

Fig. 2. Relationship between CL Inhibition and Inhibition of MDA Production

$$y = -2.2787 + 0.65419x \quad r^2 = 0.965$$

- H. Inaba, *J. Biol. Chem.*, **250**, 2404 (1975).
- 3) 上之原広司, 今泉茂樹, 吉本高志, 鈴木二郎, 脳神経, **39**, 205 (1987).
 - 4) 佐藤秀昭, 黒崎雄一郎, 平山秀樹, 水柿道直, 薬誌, **110**, 55 (1990).
 - 5) Y. Kurosaki, H. Sato, M. Mizugaki, *Biolumin. Chemilumin.*, **3**, 13 (1989).
 - 6) H. O. Lowry, J. N. Rosebrough, L. A. Farr, J. R. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 - 7) H. Okawa, N. Ohishi, K. Yagi, *Anal. Biochem.*, **95**, 351 (1979).
 - 8) H. Inaba, Y. Shimizu, Y. Tsuji, A. Yamagishi, *Photochem. Photobiol.*, **30**, 169 (1979).
 - 9) G. A. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 3871 (1957).
 - 10) E. D. Wills, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1879 (1972).
 - 11) M. Suno, A. Nagaoka, *Jpn. J. Pharmacol.*, **35**, 196 (1984).
 - 12) 寿野正廣, 永岡明伸, 武田研究所報, **44**, 30 (1985).