

フラボノイドのスーパーオキシドアニオン消去作用 ならびにリソソーム酵素遊離抑制効果について

小澤 祥子, 大西 稚芽, 中山 真由美, 西山 由美子,
権平 理美, 曾雌 桂子, 中川 一夫

Inhibitory effects of flavonoids on lysosomal enzyme release
induced by active oxygen species.

Sachiko Ozawa, Chiga Ohnishi, Mayumi Nakayama, Yumiko Nishiyama,
Masami Gondaira, Keiko Soshi, and Kazuo Nakagawa

I. はじめに

フラボノイドはベンゾγ-ピロン構造をもつ植物の色素成分の総称であり, 抗炎症作用や抗アレルギー作用などヒトの健康に有益な効果をもつものが多いとされる^{1,2)}。植物性食品中にも種々のフラボノイドが含まれ³⁻⁷⁾, よく知られているフラボノイドとしては, ルチンがソバに, ルチンのアグリコンであるケルセチンがタマネギ, トマト, レタス, リンゴ, ブドウなどの野菜や果実に, ルテオリンやアピゲニンがレタスに, ナリンゲニンやケムフェロールがグレープフルーツに含まれている。また, カテキン類やアントシアニン系色素はそれぞれ, 茶やワインに含量が多い。さらに, ルチン, ケルセチン, カテキンなどやこれらのフラボノイドを含む植物抽出物が添加物として使われるので, 起源植物とは関係ない食品からも検出されている⁸⁾。

フラボノイドは古くは Szent-Györgyi がビタミン P と呼称した物質であり⁹⁾, 毛細血管の透過性を減少させ, 毛細血管の抵抗性を強化することが知られている。近年の疫学的調査によれば, 食品からのフラボノイド摂取量と冠状動脈性心疾患による死亡率との間には, 強い逆相関性がある^{10,11)}。その詳細な機序は明らかではないが, フラボノイドの抗酸化性が関与していると推測されている。

フラボノイドの抗酸化作用については, スーパー

オキシドアニオンラジカル (O_2^-) や他のラジカルの消去作用^{12,13)} や脂質過酸化反応の抑制作用^{14,15)} などから検討されてきた。このような作用が生体内でも可能であれば, 細胞膜や細胞小器官の膜系は, フラボノイドの抗酸化性が発揮される重要な標的部位となる。我々は既に食品添加物などの肝リソソームからの酵素遊離に対する影響を検討し, 抗酸化剤のアスコルビン酸やエリソルビン酸がリソソーム酵素の遊離を抑制することを見いだしている¹⁶⁾。一方, Decharneux ら¹⁷⁾ は, キサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いて発生させた O_2^- によるリソソーム酵素遊離がフラボノール類により抑制されることを報告している。しかし, この O_2^- 発生系ではキサンチンオキシダーゼへのフラボノイドの直接的な酵素活性阻害がみられる¹⁸⁾ ので, O_2^- 生成量そのものが減少した効果が含まれているおそれがある。

今回, 我々はフラボノイドがキサンチンオキシダーゼ活性を抑制することを確認すると共に, 酵素的又は非酵素的反応で O_2^- を発生させた系を用いてフラボノイドの O_2^- 消去作用を検討した。相互にアグリコンと配糖体の関係にあるフラボノイドの効果を比較すると, アグリコンにより強い消去作用があることを認めた。さらに, 我々は, 過酸化剤添加により誘起されるリソソーム酵素遊離をフラボノイドが抑制することを見だし, 食品成分であるフラボノイドが, 生体内において活性酸素種から生体膜を防護する可能性をもつことを指摘した。

II. 実験方法

1. 酵素的 O_2^- 発生系 (ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系) での O_2^- 消去能の測定

Öyanagui の亜硝酸法¹⁹⁾ によるスーパーオキシドジスムターゼ活性測定法を改変して、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により生じた O_2^- に対するフラボノイドの消去作用を検討した。

試験管に65 mM リン酸緩衝液 (pH 8.2) 0.2 ml, 0.5 mM ヒポキサンチン 0.2 ml, 10 mM ヒドロキシルアミン塩酸塩 0.1 ml, フラボノイド溶液 (ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解) 0.1 ml, および蒸留水 0.2 ml を加えて混合し, 37°C で5分間プレインキュベートした。キサンチンオキシダーゼ (0.01 Units/ml) 液 0.2 ml を加えて, さらに30分間インキュベートした。反応終了後, 30 μ M N-1-ナフチルエチレンジアミン・HCl/3 mM スルファニル酸を含む氷酢酸を加えて室温に放置し, 1時間後に550 nm で吸光度を測定した。

O_2^- 消去能は, フラボノイド添加時に残存する O_2^- の対照に対する割合で示した。すなわち, 被検検体の吸光度を, フラボノイド溶液のかわりに DMSO 0.1 ml を加えて得られる吸光度に対する百分率であらわした。

2. 非酵素的 O_2^- 発生系での O_2^- 消去能の測定

フェナジンメトサルフェートは, NADH により還元されたのち酸素と反応して O_2^- を生じるので, この系により生じた O_2^- によるニトロブルーテトラゾリウム還元を利用してフラボノイドの O_2^- 消去能を測定した。

恒温水循環装置のついた吸光度計内のセルに, 0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1.3 ml, 0.78 mM NADH 0.2 ml, 0.5 mM ニトロブルーテトラゾリウム液 0.1 ml, フラボノイド溶液 (12% DMSO に溶解) 0.1 ml, 及び蒸留水 0.2 ml をとり, つぎに, 0.2 mM フェナジンメトサルフェート 0.1 ml を加えて素早く攪拌し, 30°C に保温した。波長560 nm での吸光度変化を3分間描記した。 O_2^- 消去能は, フラボノイド添加時における吸光度変化量を対照 (12% DMSO 添加) の吸光度変化量に対する百分率であらわした。

3. キサンチンオキシダーゼ活性の測定

恒温水循環装置のついた吸光度計内のセルに, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 1.0 ml, キサンチンオキシダーゼ (0.4 Units/ml) 0.1 ml, フラボノイド溶液 (12% DMSO に溶解) 0.1 ml, 及び蒸留水

0.3 ml を加えた後, 0.4 mM キサンチン 0.5 ml を加えてよく攪拌して30°C でインキュベートし, 波長295 nm での吸光度変化を5分間描記した。

4. 過酸化剤添加によるリソソーム酵素遊離の測定

リソソーム画分の調製法: 実験には ddY 系雌性マウス (体重25~30 g) を用いた。屠殺後開腹して肝臓を露出し, 門脈から冷生理食塩水を還流した。テフロンホモジナイザーに秤量した肝臓をとり, 9倍量の0.25 M ショ糖-0.02 M Tris 酢酸緩衝液 (pH 7.4) を加えて磨砕した。600 \times g で5分間冷却遠心分離し, 得られた上清をさらに3,500 \times g 10分間遠心分離した。上清をデカンテーションで除いた後, 0.45 M ショ糖-0.02 M Tris 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を遠心チューブ内にしずかに注ぎ入れ, 残っている上清を洗い出した。液をできるだけ除いた後, 0.45 M ショ糖-0.02 M Tris 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 4 ml に懸濁し, リソソーム画分とした。

リソソーム酵素遊離量の評価: リソソーム画分と過酸化剤を試験管内でインキュベートし, リソソームから遊離する酸性ホスファターゼ活性を指標として, フラボノイドの膜系への影響を検討した。過酸化剤にはクメンヒドロペルオキシド (1 mM) と tert-ブチルヒドロペルオキシド (10 mM) を用いた。

遠心チューブに0.45 M ショ糖-0.02 M Tris 酢酸緩衝液 (pH 7.4) 1.5 ml, 過酸化剤溶液 0.1 ml, フラボノイド溶液 (DMSO に溶解) 0.2 ml, 蒸留水 (総活性測定時には1.5% Triton X-100) 0.2 ml をとり, 37°C で5分間プレインキュベートした。リソソーム画分0.2 ml を加えて, さらに30分間インキュベートした後, ただちに氷水中につけて冷却し, 10,000 \times g で10分間遠心分離をおこない, 上清に逸脱した酵素活性を測定した。この上清中酵素活性の総活性に対する比をとり, さらに対照 (DMSO 添加) に対する百分率でフラボノイドの酵素遊離への影響を評価した。

酸性ホスファターゼ活性の測定: 酸性ホスファターゼ活性は, Barrett ら²⁰⁾ の記載に従って測定した。試験管に0.24 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 1.0 ml, 酵素液0.3 ml, 蒸留水0.2 ml をとり, 37°C で10分間プレインキュベートした後, 32 mM p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム溶液0.5 ml を加えて反応を開始し, 20分間インキュベートした。冷 Tris HCl-0.4 M リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 8.5) 2.0 ml を加えて反応を終了させ, 波長420 nm で吸光度を測定した。

5. 試薬

ケムフェロール, ナリンゲニン, ヘスペレチンはSigma社製を用い, ケルシトリンは東京化成工業社製を用い, また, ヘスペリジン, ルチン, ケルセチンはナカライテスク社製を用いた。キサンチンオキシダーゼはSigma社製の xanthine oxidase (grade 1 from buttermilk) を使用した。tert-ブチルヒドロペルオキシドは片山化成社製を用いた。その他の試薬はナカライテスク社から購入した。

III. 実験結果

フラボノール類としてはケムフェロール (kaempferol: 3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone), ケルセチン (quercetin: 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone), ケルシトリン (quercitrin: 3-rhamnoside of quercetin), ルチン (rutin: 3-rutinoside of quercetin) を用い, フラバノン類としては, ナリンゲニン (naringenin: 5,7,4'-trihydroxyflavanone), ナリンギン (naringin: 7-rutinoside of naringenin), ヘスペレチン (hesperetin: 5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone), ヘスペリジン (hespridin: 7-rutinoside of hesperetin) を用

いた。

1. 酵素的 O_2^- 発成系におけるフラボノイドの O_2^- 消去作用

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いて酵素的に O_2^- を発生させ, フラボノイドの O_2^- 消去作用を検討した。フラボノール類に分類されるケムフェロール, ケルセチン, ケルシトリン, ルチンの O_2^- 消去活性を図1に示した。ケルセチンは4つのフラボノイドのうちでもっとも強い消去効果を示し, O_2^- 量を50%に減少させるために必要なケルセチン量は約25 μ Mであった。その配糖体であるケルシトリンやルチンの消去効果は弱く, ケルセチンと同程度の効果を得るためには10倍以上の濃度を必要とした。一方, ケムフェロールはケルセチンとほぼ同じ程度の O_2^- 消去効果が見られた。

今回検討した4種類のフラバノン類のなかではヘスペレチンの O_2^- 消去能が高く(図2), フラボノール類のルチンに匹敵する効力を示したが, 相対的にフラバノン類の消去効果はフラボノール類に比べて弱い結果となった。

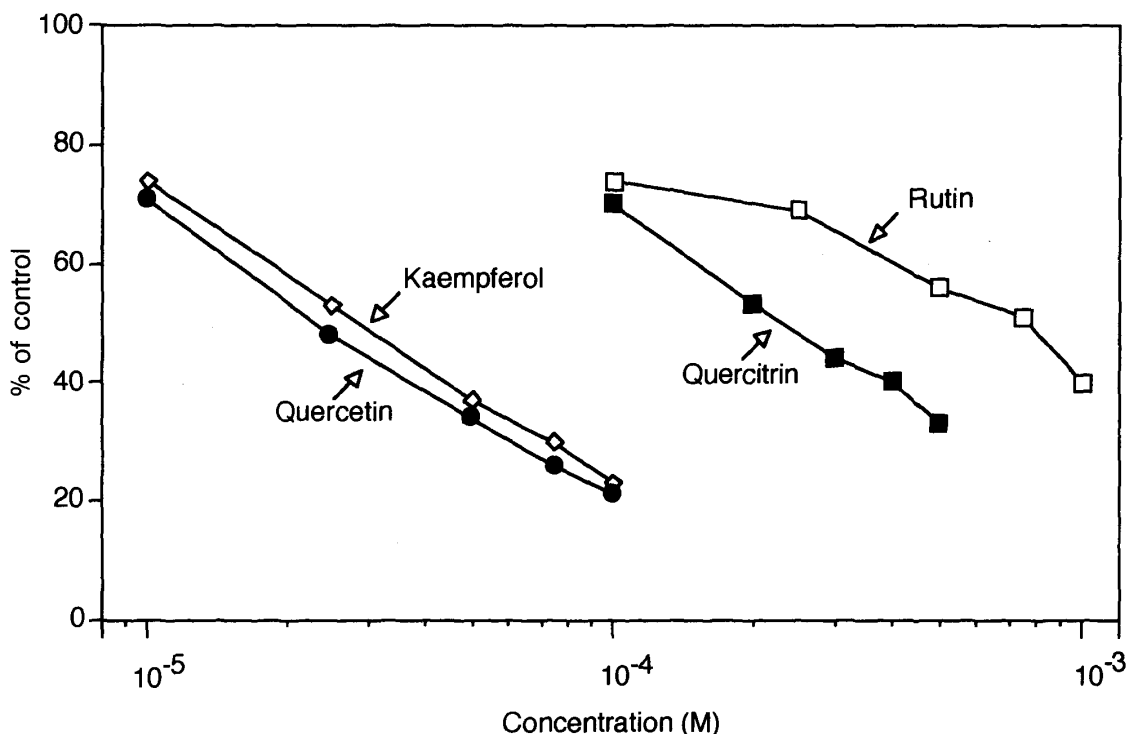


図1 フラボノール類のスーパーオキシドアニオンラジカル消去作用(酵素反応によるスーパーオキシドアニオン発生系)

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いてスーパーオキシドアニオンラジカルを発生させ, ケルセチン(Quercetin), ケルシトリン(Quercitrin), ルチン(Rutin)及びケムフェロール(Kaempferol)の消去能を検討した。残存するスーパーオキシドラジカルを対照(DMSO添加)に対する百分率で示した。各ポイントは4~5例の測定値の平均値をあらわす。

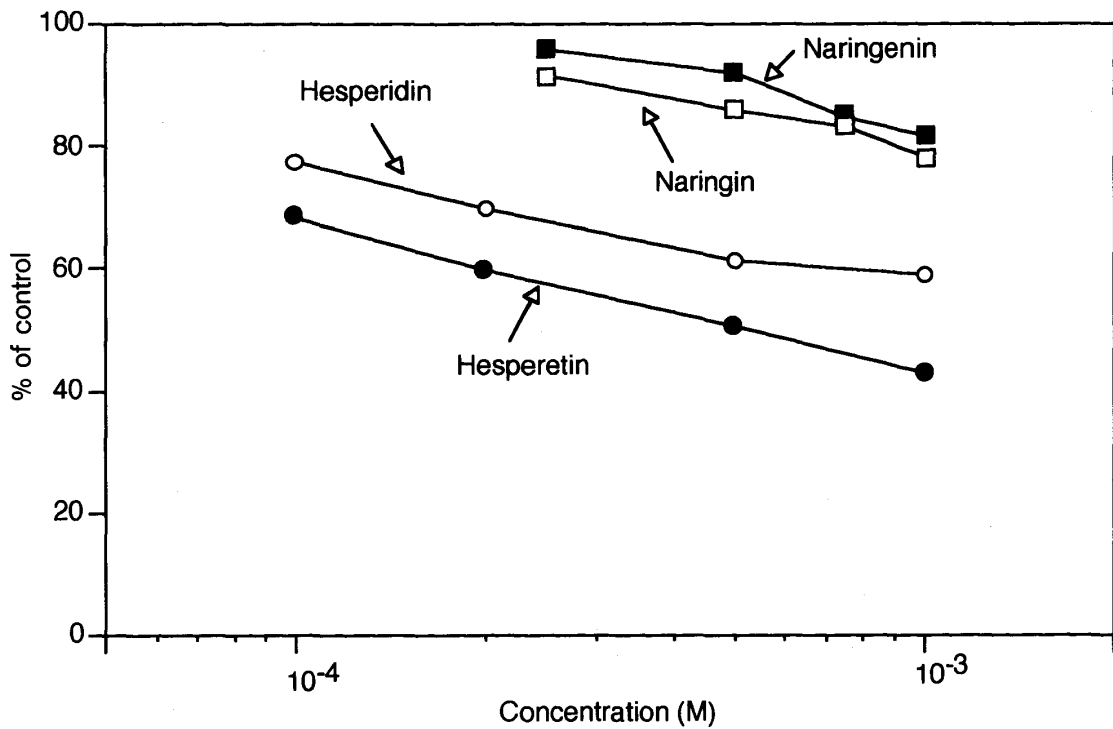


図2 フラバノン類のスーパーオキシドアニオンラジカル消去作用（酵素反応によるスーパーオキシドアニオン発生系）

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いてスーパーオキシドアニオンラジカルを発生させ、ヘスペレチン (Hesperetin)、ヘスペリジン (Hesperidin)、ナリンゲニン (Naringenin) 及びナリンギン (Naringin) の消去能を検討した。残存するスーパーオキシドラジカルを対照 (DMSO 添加) に対する百分率で示した。各ポイントは3~4例の測定値の平均値をあらわす。

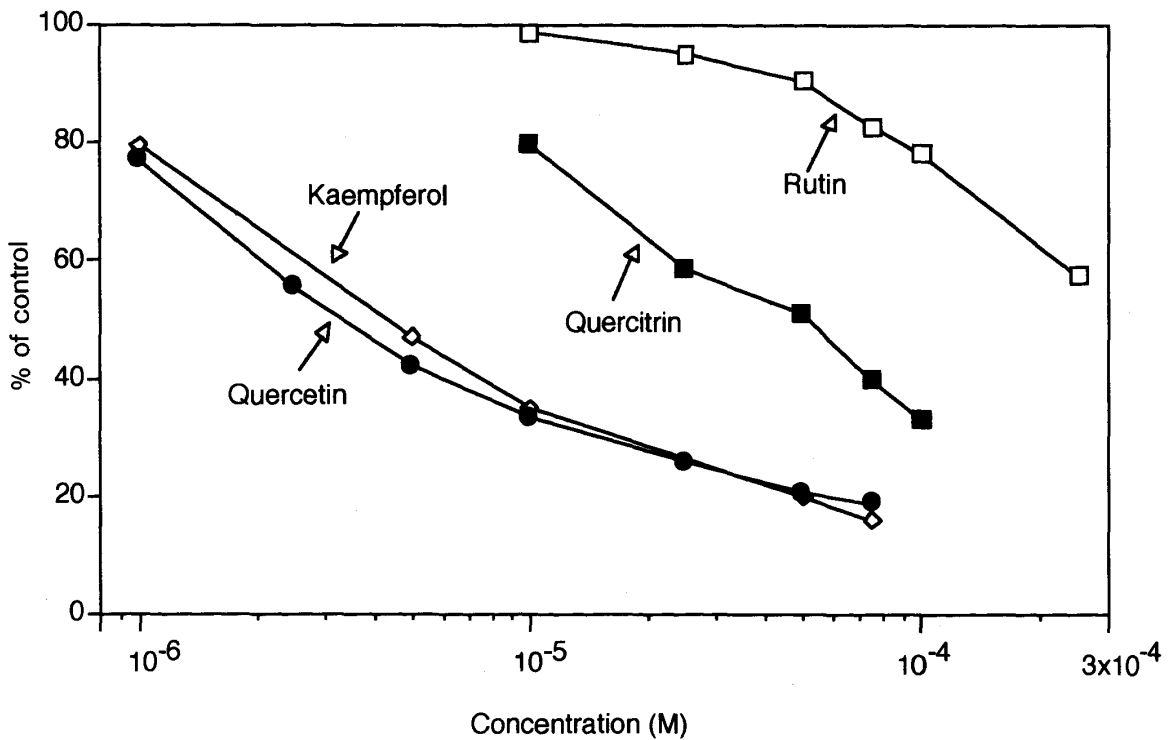


図3 フラボノール類のキサンチンオキシダーゼ活性に対する影響。

市販キサンチンオキシダーゼに対するケルセチン (Quercetin)、ケルシトリン (Quercitrin)、ルチン (Rutin) 及びケムフェロール (Kaempferol) の影響を検討した。生成する尿酸量を対照 (DMSO 添加) に対する百分率で示した。各ポイントは4例の測定値の平均値をあらわす。

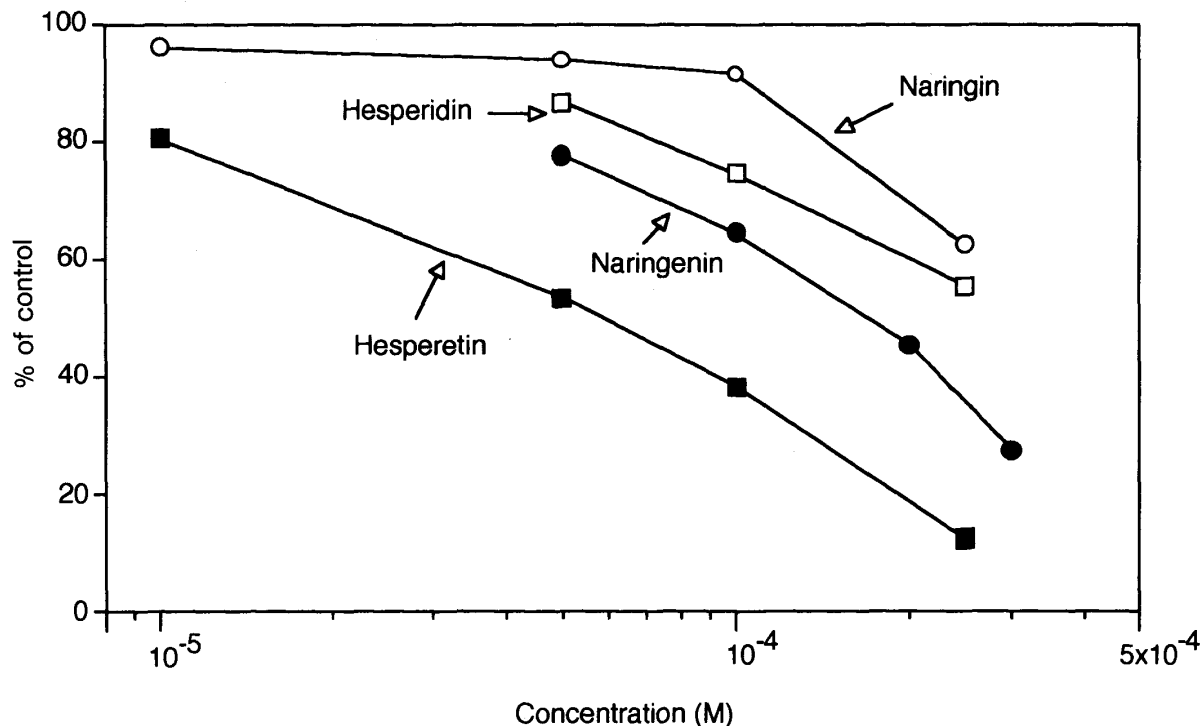


図4 フラバノン類のキサンチンオキシダーゼ活性に対する影響。
市販キサンチンオキシダーゼに対するヘスペレチン (Hesperetin), ヘスペリジン (Hesperidin), ナリンゲニン (Naringenin) 及びナリンギン (Naringin) の影響を検討した。生成する尿酸量を対照 (DMSO 添加) に対する百分率で示した。各ポイントは4例の測定値の平均値をあらわす。

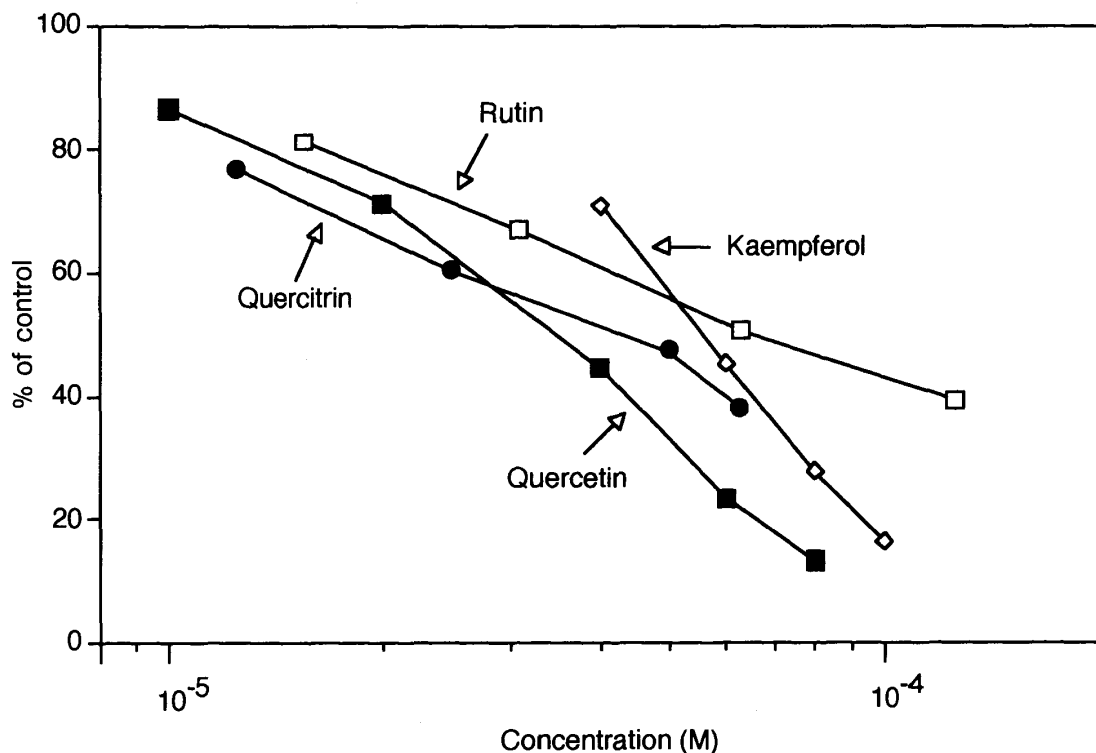


図5 フラボノール類のスーパーオキシドアニオンラジカル消去作用 (非酵素反応によるスーパーオキシドアニオン発生系)
フェナジンメトサルフェート-NADH を用いてスーパーオキシドアニオンラジカルを非酵素的に発生させ、ケルセチン (Quercetin), ケルシトリン (Quercitrin), ルチン (Rutin) 及びケムフェロール (Kaempferol) の消去能を検討した。残存するスーパーオキシドラジカルを対照 (DMSO 添加) に対する百分率で示した。各ポイントは4例の測定値の平均値をあらわす。

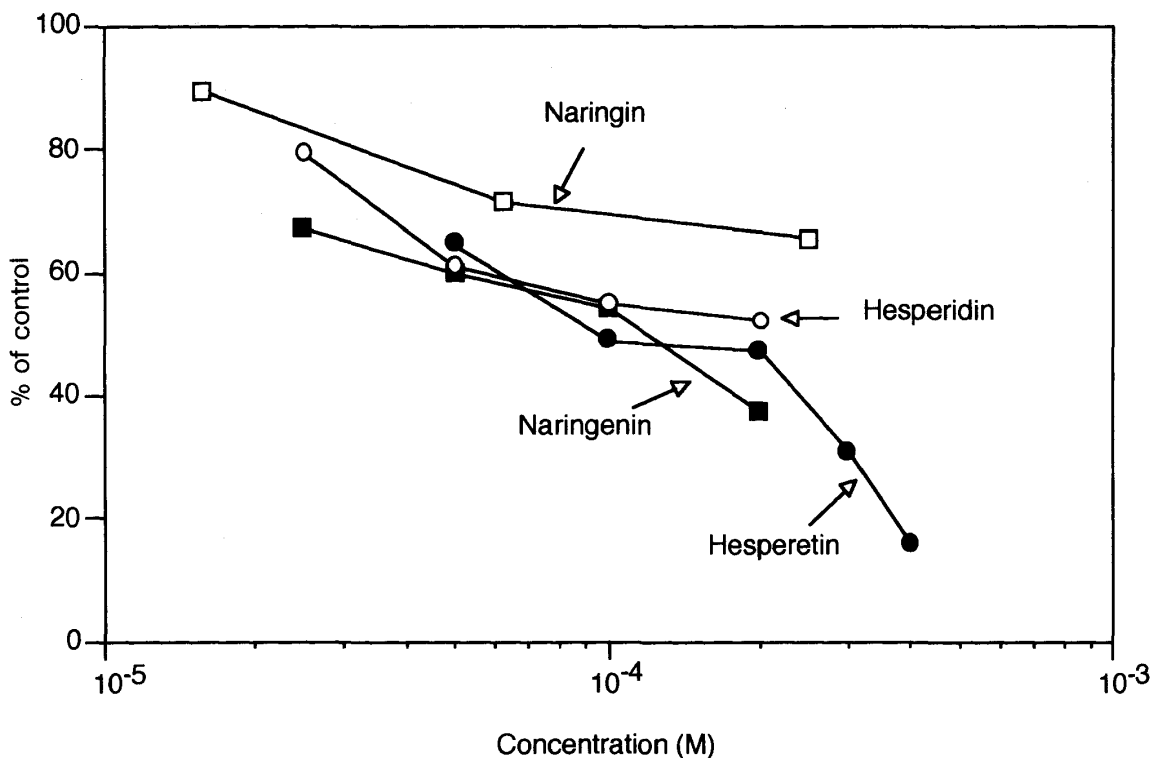


図6 フラバノン類のスーパーオキシドアニオンラジカル消去作用（非酵素反応によるスーパーオキシドラジカル発生系）

フェナジメトサルフェート-NADHを用いてスーパーオキシドアニオンラジカルを非酵素的に発生させ、ヘスペレチン (Hesperetin)、ヘスペリジン (Hesperidin)、ナリンゲニン (Naringenin) 及びナリンギン (Naringin) の消去能を検討した。残存するスーパーオキシドラジカルを対照 (DMSO 添加) に対する百分率で示した。各ポイントは4例の測定値の平均値をあらわす。

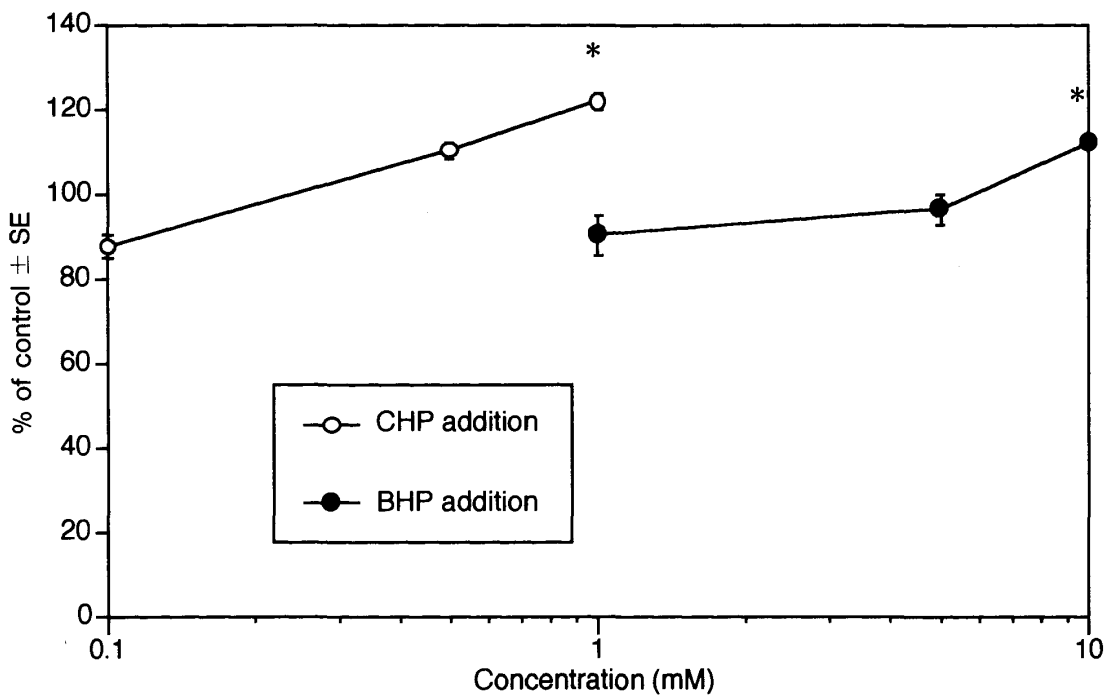


図7 過酸化添加による酸性ホスファターゼの遊離。

リソソーム画分をクメンヒドロペルオキシド (CHP) または tert-ブチルヒドロペルオキシド (BHP) とインキュベートして酸性ホスファターゼ活性を測定し、遠沈上清に逸脱する酸性ホスファターゼの総活性に対する割合を求めた後、対照 (過酸化無添加) と比較した。各ポイントは対照に対する百分率を平均値±SE (N=3) で示す。*p<0.05

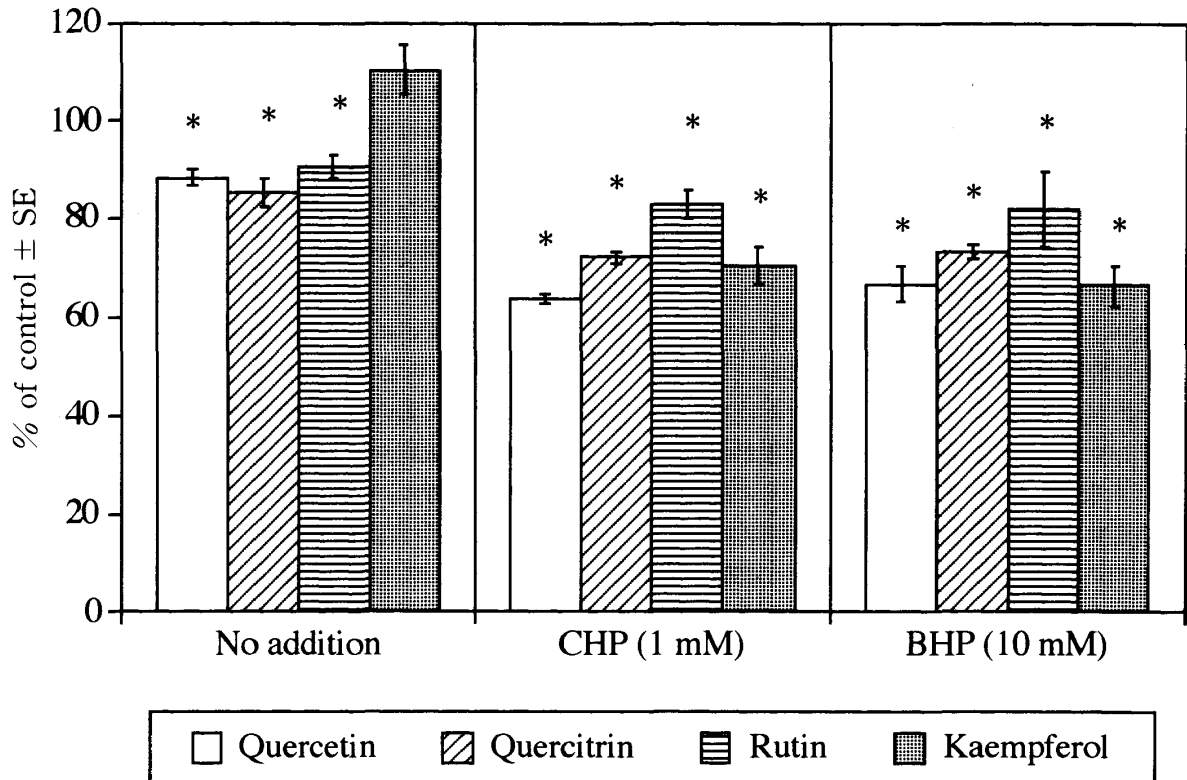


図8 過酸化剤添加によって誘起される酸性ホスファターゼの遊離に対するフラボノール類の影響。
 1 mM クメンヒドロペルオキシド (CHP) または10 mM tert-ブチルヒドロペルオキシド (BHP) 存在下、並びに過酸化剤非存在下に起きる酸性ホスファターゼの遊離に対するケルセチン (Quercetin)、ケルシトリン (Quercitrin)、ルチン (Rutin) 及びケムフェロール (Kaempferol) 各0.1 mM 添加の影響をフラボノイド無添加 (対照) と比較した。値は対照に対する百分率を平均値±SE (N=4) で示す。*p<0.05

2. キサンチンオキシダーゼ活性に及ぼすフラボノイドの影響

キサンチンオキシダーゼ活性に対するフラボノイドの影響をみると、フラボノール類では (図3)、ケルセチンとケムフェロールはほぼ同程度に活性を抑制し、酵素活性を50%抑制する濃度は約4 μMであった。また、配糖体のケルシトリンは、ケルセチンよりも弱い抑制を示し、ルチンの活性抑制作用はケルシトリンよりさらに弱かった。

フラバノン類では (図4)、ヘスペレチンがもっとも強い活性抑制作用を示したが、フラボノール類のケルシトリンとはほぼ同等の抑制効果であった。ナリンゲニンはヘスペレチンに次いで強い活性抑制作用を示した。配糖体のヘスペリジンとナリンギンはそれぞれのアグリコンよりも弱い活性抑制作用を示した。

3. 非酵素的 O₂⁻ 発生系におけるフラボノイドの O₂⁻ 消去作用

フェナジンメトサルフェート-NADH を用いて化学反応により O₂⁻ を発生させ、フラボノイドの O₂⁻

消去作用を検討した。

フラボノール類では (図5)、ケルセチン>ケルシトリン>ケムフェロール>ルチンの順に消去活性が強かった。ケルセチンが50%の O₂⁻ を消去するのに必要な濃度は約34 μM で、酵素的 O₂⁻ 発生系で得られた値より大きい、ケルシトリンとルチンは、むしろ低濃度で有効であった。

フラバノン類の O₂⁻ 消去能はフラボノール類に比べて弱い (図6)、ナリンゲニンとヘスペレチンは、それぞれ対応する配糖体のナリンギンやヘスペリジンよりも強い消去能を示した。

4. 過酸化剤により誘起されるリソソーム酵素遊離におよぼすフラボノイドの影響

図7には、クメンヒドロペルオキシドと tert-ブチルヒドロペルオキシドのリソソーム酵素遊離に対する影響を示した。1 mM クメンヒドロペルオキシドまたは10 mM tert-ブチルヒドロペルオキシドの添加により、酸性ホスファターゼの遊離は有意に増加した (p<0.05) ので、遊離実験にはこれらの濃度の過酸化剤を用いた。

強い O_2^- 消去能がみられたフラボノール類について、過酸化添加によるリソソーム酵素遊離への影響を検討した (図 8)。用いたフラボノール類の濃度は 0.1 mM とした。過酸化を添加しないときにみられる酸性ホスファターゼの遊離は、ケルセチン、ケルシトリン、ルチンの添加により有意に抑制されたが、ケムフェロールの添加によっては影響を受けなかった。 1 mM クメンヒドロペルオキシドまたは 10 mM tert-ブチルヒドロペルオキシドの添加により酵素遊離が促進された条件においては、ケルセチン、ケルシトリン、ルチンだけでなく、ケムフェロールにも有意な遊離抑制効果が認められた ($p < 0.05$)。また、ケルセチンとその配糖体の作用強度を比較すると、過酸化添加時には、アグリコンのケルセチンがもっとも強く遊離を抑制し、次いでケルシトリン > ルチンとなり、結合している糖の数の多いほうが抑制作用は弱くなった。

IV. 考察

食品中のフラボノイドは、配糖体の形で存在するものも多いが、それらは腸内細菌の働きでアグリコンに代謝されるなど、代謝的変換を受ける²⁾。そしてアグリコンの腸管からの吸収は配糖体に比べてよい^{21, 22)}。従って、食品成分のフラボノイドを生理的活性物質としてとらえるとき、このような化学的変換は重要な要素となる。そこで、配糖体-アグリコン関係にあるフラボノール類やフラバノン類を用いて、キサンチンオキシダーゼ活性への影響の違いをみると共に、異なる O_2^- 発生系を用いて O_2^- 消去能の違いについても検討した。

キサンチンオキシダーゼ活性への影響をみると、フラボノール類ではケルセチン > ケルシトリン > ルチンの順に強い酵素活性の抑制がみられた。フラボノイド B 環の OH 基がケルセチンより 1 つ少ないケムフェロールはケルセチンとほぼ同程度の活性抑制を示した。また、フラバノン類の酵素活性抑制は、ヘスペレチン > ヘスペリジン、あるいはナリンゲニン > ナリンギンとなり、それぞれ対応するアグリコンが強い阻害を示した。アグリコンがその配糖体よりも強いキサンチンオキシダーゼ活性阻害を示すことは、Iio らの成績¹⁸⁾ と一致する。

キサンチンオキシダーゼを用いて O_2^- を発生させ、フラボノイドの O_2^- 消去能を比較すると、フラボノール類は相対的にフラバノン類よりも強い消去能を示した。また、アグリコンとその配糖体を比較すると、キサンチンオキシダーゼ活性への影響と同

様にアグリコンが強い O_2^- 消去能を示した。この測定系では酵素反応で O_2^- を発生させているので、 O_2^- 消去能はキサンチンオキシダーゼ活性阻害を強く反映しているはずであるが、 O_2^- 消去に要するフラボノイド濃度は、酵素活性の阻害に必要な濃度よりも高い結果となり、酵素活性阻害がどの程度影響しているのか明らかでない。

一方、フェナジンメトサルフェート-NADH を用いた非酵素反応による O_2^- 発生系でフラボノイドの O_2^- 消去能をみると、フラボノール類とフラバノン類のいずれにおいても、酵素反応による O_2^- 発生系での O_2^- 消去能やキサンチンオキシダーゼ活性の抑制効果と同様に、アグリコンがその配糖体にくらべてより強い消去能を示した。このように非酵素的 O_2^- 発生系と酵素的 O_2^- 発生系のいずれにおいてもアグリコンが配糖体よりも強い消去作用を示したことから、食品中のフラボノイドは O_2^- 消去作用に関して、腸内細菌により代謝的に活性化を受けるといえる。

生体内で生じる活性酸素種の 1 つの標的部位は、細胞膜や細胞小器官などの膜系であろう。連鎖的におこるラジカル反応の生成物のうち過酸化脂質は、生体膜への攻撃性の高い酸化生成物である。リソソームは多数の加水分解酵素を内包する細胞小器官であり、ラジカル種や過酸化物質によるリソソーム膜の脆弱化は、毒性発現につながることも考えられる²³⁻²⁵⁾。

リソソーム画分をクメンヒドロペルオキシドや tert-ブチルヒドロペルオキシドと共に試験管内でインキュベートすると、その $10,000 \times g$ 上清中にあらわれるリソソーム酵素の酸性ホスファターゼ活性が上昇した。トリトン X-100 を添加して可溶化した後で測定した総活性は、過酸化物質の添加により軽度低下した (データ不提示) ことから、この上昇が過酸化物質による直接的な活性化が原因でおこったとは考えがたい。おそらく、リソソーム膜構成脂質に過酸化反応の促進がおこって膜が脆弱化し、内包する酵素の逸脱を招いた可能性が高い。

我々は、アスコルビン酸やエリソルビン酸など水溶性還元性物質がリソソーム酵素遊離を抑制することを既に報告している¹⁶⁾ が、水相領域にあるアスコルビン酸は、 α -トコフェロールなど膜に内在する抗酸化成分の還元にあずかり²⁶⁾、還元型物質の再生により膜を安定化させる可能性がある。逆に、今回の実験においては、クメンヒドロペルオキシドなど外来性の過酸化物質が膜内在性抗酸化性物質を消費し

て、膜脂質の酸化を招いたことも考えられる。リソソーム膜の変質の機序はフラボノイドの作用機序を理解するうえにも必要である。

さて、今回検討した4種のフラボノール類はいずれも、クメンペルオキシドまたは tert-ブチルヒドロペルオキシドの添加によって促進される酵素遊離を有意に抑制した。遊離抑制効果をもたらされる機序として、①フラボノイドと添加した過酸化物が直接反応して連鎖反応を遮断すること、②フラボノイドがリソソーム膜内での脂質過酸化反応を抑制すること、③膜内に存在する抗酸化性物質の保護あるいは再生が起こること、④未知の膜傷害性因子の不活化が起こることなどが考えられるが、フラボノイドと反応する分子種の特定が今後必要となる。また、アグリコンが配糖体よりも強い遊離抑制作用をもつことから、フラボノイドの作用が水相域と脂質相域のいずれでおこなうのかについても考慮しなければならない。

ところで、Decharneux ら¹⁷⁾は、ラット肝リソソーム画分を用いて、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系により発生させた $O_2^{\cdot -}$ による N-アセチルグルコサミニダーゼの遊離に対するフラボノイドの影響を検討している。その結果においても、ルチン、ケルセチン、ケムフェロールは、 10^{-4} M 添加で80%以上の遊離抑制をもたらすことが示されている。Decharneux らはフラボノイドと反応するラジカル種を特定していず、また、フラボノイドの作用を抗酸化性の面にだけ求めるのではなく、膜に内在するリパーゼに対する膜脂質の抵抗性が変化した可能性もあると指摘している。

フラボノイドにはキサンチンオキシダーゼ活性の抑制作用や $O_2^{\cdot -}$ 消去作用があることから、Decharneux らの成績において、フラボノイド存在下ではキサンチンオキシダーゼ活性の抑制のため $O_2^{\cdot -}$ 発生量が元々減少しているうえに $O_2^{\cdot -}$ 消去作用が加わっていると推量され、どれほど膜成分の変化が関与しているか明らかでない。我々の実験結果は、少なくとも、 $O_2^{\cdot -}$ 発生後におこることが予想される膜成分の酸化反応にとまって生じる過酸化物質を、フラボノイドが消去しうることを示している。

フラボノイドの化学構造との関連をみると、フラボノイドのリソソーム酵素遊離抑制作用の強度は、ケルセチン>ケルシトリン>ルチンの順に大きく、3位 OH 基への糖の付加は遊離抑制作用を減弱させた。また、ケムフェロールが過酸化物質添加条件下では、ケルセチンとケルシトリンの中間程

度の遊離抑制作用を示したことからも、3位 OH 基の重要性がうかがえる。この構造が安定な反応中間体をつくることに寄与しているのかもしれないし、あるいは、疎水性の増加により膜に接近しやすくなったことを示しているのかもしれない。

これらの結果から、フラボノイドはキサンチンオキシダーゼ活性を抑制して $O_2^{\cdot -}$ の生成を減少させるが、キサンチンオキシダーゼを用いた酵素的 $O_2^{\cdot -}$ 発生系とフェナジメトサルフェート-NADH を用いた非酵素的 $O_2^{\cdot -}$ 発生系での結果とあわせて考えると、フラボノイドは $O_2^{\cdot -}$ 消去能を有するといえ、配糖体よりもそのアグリコンの方が強い $O_2^{\cdot -}$ 消去能を示した。さらにフラボノール類は過酸化物質添加によるリソソーム酵素の遊離を抑制したことから、フラボノイドは過酸化物質による膜の変質を防ぐことが可能と考えられる。

V. 要 約

フラボノイドの抗酸化性を、 $O_2^{\cdot -}$ 消去作用とリソソーム酵素遊離抑制作用から検討した。

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼを用いた酵素的 $O_2^{\cdot -}$ 発生系およびフェナジメトサルフェート-NADH 系による非酵素的 $O_2^{\cdot -}$ 発生系のいずれにおいても、フラボノール類のケルセチン、ケルシトリン、ルチン及びケムフェロールは、フラバノン類のヘスペレチン、ヘスペリジン、ナリンゲニン及びナリンギンよりも強い $O_2^{\cdot -}$ 消去能を示した。また、アグリコンと配糖体を比較すると、アグリコンのケルセチンにはその配糖体のケルシトリンやルチンよりも強い $O_2^{\cdot -}$ 消去作用がみられた。同様の相異は、ヘスペレチン (アグリコン)>ヘスペリジン (配糖体)、及びナリンゲニン (アグリコン)>ナリンギン (配糖体) においてもみられた。なお、これらのフラボノイドはキサンチンオキシダーゼ活性も阻害したので、酵素的 $O_2^{\cdot -}$ 発生系においては、酵素活性阻害が $O_2^{\cdot -}$ 消去作用に一部寄与している可能性がある。

ddY 系雄性マウス肝から調製したリソソーム画分を用いて、クメンヒドロペルオキシド (1 mM) または tert-ブチルヒドロペルオキシド (10 mM) によって誘起されるリソソーム酵素である酸性ホスファターゼの遊離に対するフラボノイドの影響を検討した。ケルセチンはケルシトリンやルチンよりも酵素遊離抑制作用は強く、ケムフェロールもルチンより強く酵素遊離を抑制した。これらのフラボノイドは活性酸素種を消去することで生体膜を防護

する可能性がある。

謝 辞

本研究の一部は、平成4年度京都女子大学機器備品助成を受けておこなったことを記して謝す。

VI. 引用文献

- 1) N. C. Cook and S. Samman, *J. Nutri. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996)
- 2) W. Bors, W. Heller, C. Michel, and K. Stetmaier, In: *Handbook of Antioxidants* (eds. E. Cadenas and L. Packer), pp. 409-466, Marcel Dekker, New York (1996)
- 3) M. Sano, Y. Takahashi, K. Yoshino, K. Shimoi, Y. Nakamura, I. Tomita, I. Oguni, and H. Konomoto, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1006-1008 (1995)
- 4) M. Sato, N. Ramarathnam, Y. Suzuki, T. Ohkubo, M. Takeuchi, and H. Ochi, *J. Agrc. Food Chem.*, **44**, 37-41 (1996)
- 5) A. A. van der Sluis, M. Dekker, and W. M. F. Jongeu, *Cancer Lett.*, **114**, 107-108 (1997)
- 6) P. C. H. Hollman, J. M. P. van Trijp, M. J. F. Mengelers, J. H. M. de Vries, and M. B. Katan, *Cancer Lett.*, **114**, 139-140 (1997)
- 7) A. Crozier, M. E. J. Lean, M. S. McDnald, and C. Black, *J. Agrc. Food Chem.*, **45**, 590-595 (1997)
- 8) 寺田久屋, 宮部正樹, 食品衛生学雑誌, **34**, 385-391 (1993)
- 9) S. Ruszyk and A. Szent-Györgyi, *Nature*, **138**, 27 (1936)
- 10) M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, and D. Kromhout, *Lancet*, **342**, 1007-1011 (1993)
- 11) S. O. Keli, M. G. L. Hertog, E. J. M. Feskens, and D. Kromhout, *Arch. Intern. Med.*, **156**, 637-642 (1996)
- 12) J. Robak and R. J. Gryglewski, *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 837-841 (1988)
- 13) W. Bors, W. Heller, C. Michel, and M. Saran, *Meth. Enzymol.*, **186**, 343-355 (1990)
- 14) U. Takahama, *Phytochemistry*, **24**, 1443-1446 (1985)
- 15) J. Torel, J. Cillard, and P. Cillard, *Phytochemistry*, **20**, 383-385 (1986)
- 16) 中川一夫, 大場優子, 中川智重子, 本誌, **37**, 9-14 (1982)
- 17) T. Decharneux, F. Dubois, C. Beauloye, S. Wattiaux-De Coninck, and R. Wattiaux, *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1243-1248 (1992)
- 18) M. Iio, A. Moriyama, Y. Matsumoto, N. Takaki, and M. Fukumoto, *Agrc. Biol. Chem.*, **49**, 2173-2176 (1985)
- 19) Y. Ōyanagui, *Anal. Biochem.*, **142**, 290-296 (1984)
- 20) A. J. Barrett and M. F. Heath, In: *Lysosomes, a laboratory handbook* (ed. J. T. Dingle), p. 113, Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1977)
- 21) P. C. H. Hollman, M. G. L. Hertog, and M. B. Katan, *Biochem. Soc. Trans.*, **24**, 785-789 (1996)
- 22) C. Manach, C. Morand, C. Demigné, O. Texier, F. Régéat, and C. Rémésy, *FEBS Lett.*, **409**, 12-16 (1997)
- 23) K.-L. Fong, P. B. McCay, and J. L. Poyer, *J. Biol. Chem.*, **248**, 7792-7797 (1973)
- 24) I. Tog Mak, H. P. Misra, and W. B. Weglicki, *J. Biol. Chem.*, **258**, 13733-13737 (1983)
- 25) K. Ollinger and U. T. Brunk, *Free Rad. Biol. Med.*, **19**, 565-574 (1995)
- 26) G. R. Buettner, *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 535-543 (1993)