

ヒト由来プラセンタエキス中の抗酸化物質に関する研究

2002 年

富樫 眞一

目次

序論	1
略語表	4
第1章 ヒト由来プラセンタエキスの抗酸化活性	
序説	5
第1節 <i>in vitro</i> における HPE の抗酸化活性	6
第2節 <i>in vivo</i> における HPE の抗酸化活性	6
第3節 考察	11
実験の部	12
第2章 HPE 中の抗酸化活性成分（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ウラシル）の精製および同定	
序説	16
第1節 フェニルアラニン、チロシン、ウラシルの精製・同定	17
第2節 トリプトファンの精製・同定	25
第3節 考察	25
実験の部	31
第3章 HPE 中の抗酸化活性成分（Phe、Tyr、Trp、ウラシル）の <i>in vitro</i> における抗酸化作用	
序説	33
第1節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルの HO \cdot 捕捉作用	33
第2節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルの脂質過酸化反応に対する抑制作用	36
第3節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルのタンパク質のカルボニル化に対する抑制作用	36

第4節 考察	36
実験の部	47
第4章 HPE 中の抗酸化活性成分 (Phe、Tyr、Trp、ウラシル) の <i>in vivo</i> における作用	
序説	49
第1節 体重、肝重量比、過酸化脂質量および GSH 量	49
第2節 血清中のトランスアミナーゼ活性、抗酸化酵素活性	51
第3節 考察	54
実験の部	55
第5章 HPE 中の高分子性抗酸化活性成分の精製・同定および作用	
序説	57
第1節 コラーゲンペプチドの精製・同定	58
第2節 コラーゲンの酵素分解による抗酸化活性の上昇	58
第3節 インキュベートによる HPE の抗酸化活性の上昇	63
第4節 考察	63
実験の部	66
結論	68
謝辞	69
発表論文目録	70
引用文献	71

序 論

ヒトをはじめとした好気性生物は、酸素を電子受容体として利用する形式、すなわち呼吸により、生体エネルギーを生産している。ヒトが呼吸で取り込んだ酸素の95%以上はミトコンドリアの電子伝達系で利用されて水に還元されるか、またはミクロソームで水酸化物となる [1]。好気性生物の生存に不可欠な酸素は基底状態では三重項状態 ($^3\text{O}_2$) であり、酸化ポテンシャルが高いにもかかわらず反応性が低いという特徴を持っている。これに対して、体内に取り込まれた酸素の3~5%は、水や水酸化物にまで還元されない中間体であり、より反応性の高い活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) と呼ばれる superoxide (O_2^-)、過酸化水素、hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$)、および一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) となる [2,3]。

ROSは、その殺菌作用が初期免疫過程における異物排除に関与しており、また細胞活動の調節因子となるなど、生体にとって重要な役割を担っている。一方、ROSは高い反応性を有するため、自己の細胞や組織を破壊して様々な疾病の引き金となることがある [4,5]。脂質、核酸、糖質、タンパク質などの多くの生体成分は、ROSにより酸化的修飾や構造の破壊などを受けると機能が低下し、さらには生体にとって好ましくない変化が誘発されることになる。たとえば、細胞膜中の多価不飽和脂肪酸がROSにより酸化されると、脂質過酸化連鎖反応が生じて過酸化脂質が増加・蓄積するため、細胞膜の透過性が変化してその機能が低下する [6]。また、酵素タンパク質のアミノ酸残基がROSにより酸化的修飾を受けた場合には、酵素の不可逆的な不活性化が生じる [4,5]。さらに、ROSにより核酸塩基の修飾および遊離、DNA鎖の切断、およびリボース部位の酸化分解などが生じる [7]。生理活性糖質のROSによる損傷は慢性の疾患や老化などに関連することが示唆されており、たとえば哺乳動物の結合組織における重要な構成高分子であるヒアルロン酸がROSとの反応により分解された場合には、関節の可動性の低下など生理的な変化が惹起されることになる [8]。このようなROSによる生体成分への攻撃、およびこれに伴う生体成分の好ましくない変化は、“酸化ストレス”と称されている。好気性生物はこのような酸化ストレスに対して、superoxide dismutase (SOD)、catalase、および glutathione peroxidase (GPx) などのROS消去酵素、vitamin C、vitamin E、尿酸および glutathione (GSH) などの低分子抗酸化物質、ferritin や transferrin などの金属イオンのキレート化・不活性化タンパ

ク質など、種々の抗酸化防御系を獲得しながら進化し、酸素を生体エネルギーの産生に利用するとともに、酸素による障害から自身を保護し、恒常性を維持してきた [9-15]。しかし、種々の原因により、ROS が生体の持つ消去能力以上に産生された場合、あるいは ROS 消去能が低下した場合には、過剰の ROS による生体成分への攻撃により、様々な疾患が惹起されることとなる。

臨床的には、多くの疾患に ROS が関与すると考えられている。現在では、炎症、アレルギー疾患、糖尿病、ショック、多臓器不全、高血圧、脳神経疾患、眼疾患、心疾患、動脈硬化、呼吸器疾患、消化器疾患、腎疾患および癌などの疾患に、生体の ROS 消去能の低下や ROS 産生の亢進による過剰の ROS が直接または間接的に関与することが明らかとされている [1,4,9,10,12]。そのため、生体成分への攻撃以前に過剰の ROS を消去したり、あるいは ROS 消去能を回復したりすることができれば、ROS が関与する疾患を予防し、さらにはその症状を改善することが可能であると考えられる。このようなことから、生体内での ROS の生成およびその機構を明らかにするとともに、いわゆる“抗酸化物質”により効率的に ROS を消去することによる治療や症状の改善が、種々の疾患において試みられている [4,8,10,11,14,15]。

著者は、生体に安全な抗酸化物質が含有されていると考えられる資源のひとつとして、胎盤に着目した。胎盤は、胚または胎児の組織の一部（胎児性胎盤）と母胎組織の一部（母性胎盤）が密接な関係を保ち、それを介して物質交換が行われる組織複合体である [16]。胎盤の基本機能は胎児と母体の間の物質交換をとりもつことであり、胎児は成育に必要なすべての栄養分を胎盤から受け取る。しかし、胎盤はその単なる中継路ではなく、胎児を保護する選択的、免疫学的バリアーとしても機能する [16]。特に妊娠期間中、ROS は母体だけではなく胎児に対しても多大な健康障害をもたらすと考えられるが、胎盤は ROS の胎児への攻撃を防御する役割を担っていると考えられる [17,18]。すなわち、胎盤で ROS が消去されることにより、感受性の高い胎児の正常な成長と発育が促されることになる [17]。近年、胎盤の ROS に対する防御作用の機構として、胎盤の ROS 消去酵素である SOD、catalase および glutathione reductase (GR) 活性、および低分子抗酸化物質であるビタミン C、GSH 量が妊娠期間中に増大することが報告されている [17,18]。

この胎盤から調製したプラセンタエキス (HPE) と呼ばれる標品は、化粧品原料や医薬品原料として以前から利用されてきたものである。これまで HPE については、

日焼けや色素沈着に対する抑制作用、抗変異原作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、繊維芽細胞の増殖抑制作用などが報告されている [19-23]。この HPE の抑制作用機構や生理活性物質についての解明は十分ではないが、いずれも障害の発症原因に直接または間接的に ROS が関与するものである。しかし、HPE は SOD や catalase などの抗酸化酵素を含有していないことから、強力な活性酸素消去作用を有する物質を含有している可能性がある。HPE は、これまでの研究や臨床的な利用の歴史から、その安全性が十分に検討されている。したがって、酸化ストレスが関与する疾患に対して、安全な抗酸化物質として利用することができると考えられる。しかし、HPE の酸化ストレスに対する効果、生理活性物質および作用機構については明らかにされていない。そこで著者は、HPE の ROS 消去作用や脂質過酸化に対する抑制効果を *in vitro* で確認し [24,25]、さらにその抗酸化作用が *in vivo* でも発揮されることを明らかにした [26]。また、その抗酸化活性成分を分離、精製、および同定することにより、HPE の抗酸化物質としての利用の可能性を示した。

以下、これらの知見について 5 章に分けて論述する。

本文では以下の略語を使用した。

BSA	; bovine serum albumin、ウシ血清アルブミン（タンパク質測定用の標準タンパク）
EDTA	; ethylenediamine tetraacetic acid、二価金属イオンキレート剤
FAB-MS	; fast atom bombardment mass spectrometry、質量分析法
GOT	; glutamic oxaloacetic transaminase、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（肝障害の指標となる酵素）
GPT	; glutamic pyruvic transaminase、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（肝障害の指標となる酵素）
GPx	; glutathione peroxidase、グルタチオンペルオキシダーゼ
GR	; glutathione reductase、グルタチオンレダクターゼ
GSH	; reduced glutathione、還元型グルタチオン
HO·	; hydroxyl radical、ヒドロキシラジカル
HPLC	; high performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー
MDA	; malondialdehyde、マロンジアルデヒド
NADPH	; reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate、補酵素の一種
NBT	; nitro blue tetrazolium、ニトロブルーテトラゾリウム
NMR	; nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴
O ₂ ⁻	; superoxide anion radical、スーパーオキシド
PAGE	; polyacrylamide gel electrophoresis、ポリアクリルアミドゲル電気泳動
Phe	; phenylalanine、フェニルアラニン
HPE	; human placenta extract、ヒト由来プラセンタエキス
ROS	; reactive oxygen species、活性酸素
SDS	; sodium dodecyl sulfate、ドデシル硫酸ナトリウム
SOD	; superoxide dismutase、スーパーオキシドジスムターゼ
TBA	; thiobarbituric acid、チオバルビツール酸
TBARS	; thiobarbituric acid reactive substances、チオバルビツール酸反応性物質（酸化状態を評価する指標）
TCA	; trichloroacetic acid、トリクロロ酢酸
TFA	; trifluoroacetic acid、トリフルオロ酢酸
Trp	; tryptophan、トリプトファン
Tyr	; tyrosine、チロシン

第1章 ヒト由来プラセンタエキスの抗酸化活性

序説

胎盤は妊娠後期において ROS の毒性から胎児を守るため、多くの生理活性物質を含むことが知られている [17,18,27]。ヒト由来プラセンタエキス (HPE) は、ヒト胎盤ホモジネートをプロテアーゼ処理したのち、遠心分離して得られた上清液からエストロゲンやビタミン E 等の脂溶性物質を除去したものであり、医薬品原料や化粧品原料として用いられてきた。

HPE は臨床的には、近視性および老人性脈絡網膜ジストロフィー患者の症状の改善 [27]、肝機能障害、更年期障害、および胃十二指腸潰瘍等の改善 [28] に用いられており、日焼けや色素沈着に対する抑制作用、抗変異原作用、抗炎症作用、抗アレルギー作用、繊維芽細胞の増殖抑制作用を示すことが報告されている [20-22, 27,29,30]。これらの作用に関与する生理活性物質はほとんど明らかにされていないが、抗炎症作用にシアル酸が関与することは明らかにされている [21,22]。著者は HPE が *in vitro* で強い活性酸素消去活性を示すことを認めたが、HPE に含有される抗酸化活性物質を明らかにすることは、ROS が関与する種々の疾患の予防や症状の改善を目的とした HPE の利用という観点から意義深いものであると考えられる。

このような背景の下、著者は HPE の *in vivo* における抗酸化活性を明らかにするために、疾患モデルとしてマウスの急性エタノール肝障害を用いた。マウスにエタノールを経口投与すると、肝臓で GSH の減少および過酸化脂質の増加が認められる。これは、エタノールの代謝過程で ROS が生成されたことによるものであると考えられている [1]。そこで著者は、エタノールによる肝障害に対する HPE の効果を測定した。

本章では、HPE の抗酸化活性について *in vitro* および *in vivo* で検討した。

第1節では、*in vitro* における HPE の抗酸化活性の濃度依存性、および既知の抗酸化物質との比較について、デオキシリボース法 [31] および共役ジエン法 [32] を用いて検討した。

第2節では、エタノールにより誘発される急性肝障害に対する HPE 前投与の効果について検討した。肝障害の指標として、マウスの体重、肝重量比、血清中の glutamate

oxaloacetate transaminase (GOT) および glutamate-pyruvate transaminase (GPT) 活性を測定した。また、酸化ストレスの指標として、肝臓中の GSH 量、肝臓中のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 量、肝サイトソール分画中の抗酸化酵素である SOD、catalase、および GPx 活性をそれぞれ測定した。

第 1 節 *in vitro* における HPE の抗酸化活性

HPE の *in vitro* における抗酸化活性を明らかにするため、共役ジエン法およびデオキシリボース法を用い、次の結果を得た。

1. 共役ジエン法

HPE は Fenton 反応で生じた HO \cdot によるリノール酸の過酸化反応を濃度依存的に抑制した。HPE 0.3 mg/ml の抑制作用は、抗酸化ビタミンであるビタミン E の 0.3 mM (0.13 mg/ml) に相当した (Fig. 1 (A))。

2. デオキシリボース法

HPE は Fenton 反応で生じた HO \cdot によるデオキシリボースの分解を濃度依存的に抑制した。HPE 0.2 mg/ml のラジカル捕捉作用は、既知のラジカル捕捉物質であるマンニトールの 0.5 mM (0.09 mg/ml) およびビタミン C の 0.4 mM (0.07 mg/ml) に相当した (Fig. 1 (B))。

第 2 節 *in vivo* における HPE の抗酸化活性

in vivo における HPE の抗酸化活性を明らかにするため、マウスの急性エタノール肝障害モデルにおける体重、肝重量比、肝臓中の GSH 量、肝臓中の TBARS 量、血清中の GOT および GPT 活性、肝サイトソール分画中の抗酸化酵素活性を測定し、次の結果を得た。

1. 体重、肝重量比

HPE 前投与後にエタノールを投与した群 (Group 4) とエタノール単独投与群

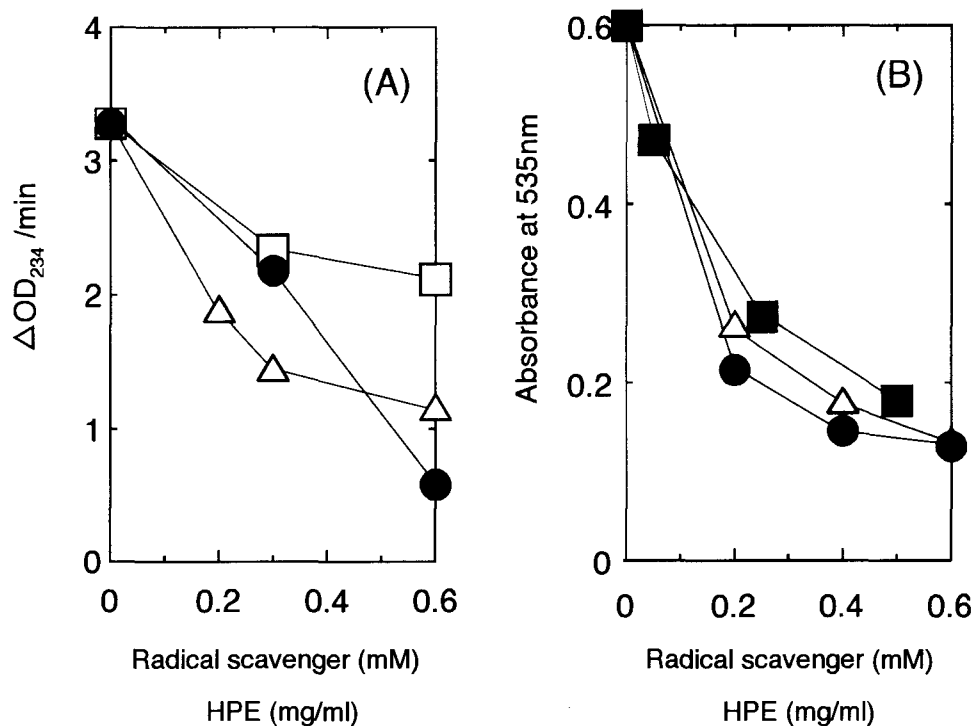


Fig. 1 Antioxidative effects of HPE. (A), Antioxidative effects of HPE (●), tocopherol (□) and ascorbic acid (△) on the conjugated diene production by Fenton reaction. The rate of antioxidative activity at the indicated final concentration is plotted as the reciprocal of the rate of change at A_{234} / min . Rates were measured from 0 to 1 min following the addition of linoleic acid. (B), Antioxidative effects of HPE (●), mannitol (■) and ascorbic acid (△) on the MDA production by Fenton reaction. MDA production was monitored by the measurement of absorbance at 535nm.

(Group 3) の間、および HPE 単独投与群 (Group 2) とコントロール群 (Group 1) の間には、体重の有意な変動は認められなかった (Table 1)。一方、肝重量比 (体重 100 g 当たりの肝重量) は、エタノール単独投与群 (Group 3) ではコントロール群 (Group 1) よりも約 15% 増大した。一方、HPE 前投与群 (Group 4) とエタノール単独投与群 (Group 3) との間に有意な差は認められなかった (Table 1)。

2. 肝臓中の GSH 量

肝臓中の GSH 量は、エタノール単独投与群 (Group 3) ではコントロール群 (Group 1) の約 38% に低減した。HPE 前投与群 (Group 4) では、Group 3 で認められたエタノールによる GSH 量の低減が有意に抑制された (Table 1)。

3. 肝臓中の TBARS 量

肝臓中 TBARS 量は、エタノール単独投与群 (Group 3) ではコントロール群 (Group 1) の約 169% に増大した。HPE 前投与群 (Group 4) では、Group 3 で認められたエタノールによる TBARS 量の増大が有意に抑制された (Table 1)。

4. 血清中の GOT および GPT 活性

血清中の GOT および GPT 活性は、エタノール単独投与群 (Group 3) ではコントロール群 (Group 1) の約 166% および約 350% に増大した。HPE 前投与群 (Group 4) では、Group 3 で認められたエタノールによる GOT および GPT 活性の増大が有意に抑制された (Fig. 2 (A),(B))。

5. 肝サイトソール分画中の抗酸化酵素活性

肝サイトソール分画中の抗酸化酵素活性は、エタノール単独投与群 (Group 3) ではコントロール群 (Group 1) に比べて有意に変動した。HPE 前投与群 (Group 4) では、Group 3 で認められたエタノールによる抗酸化酵素活性の変動は、いずれも抑制された (Fig. 2 (C),(D),(E))。

Table 1 Effects of HPE administration on body weight, liver weight ratio, liver GSH, and liver TBARS of mice suffering from acute alcoholic liver injury.

Group number	Preadministration (p.o.)	EtOH administration (i.p.)	Body weight	Liver weight ratio	Liver GSH	Liver TBARS
			(g)		(μ g/g liver)	
1	Distilled water	-	31.78±0.96 (100)	5.00±0.12 (100)	2183.1±215.7 (100)	4.52±0.39 (100)
2	HPE	-	30.25±0.80 (95)	5.20±0.27 ※ (104)	2453.2±198.3 ※ (112)	4.20±0.59 ※ (93)
3	Distilled water	+	32.64±1.04 (103)	5.76±0.32 # (115)	826.7±72.2 # (38)	7.62±0.20 # (169)
4	HPE	+	30.96±0.71 (97)	5.73±0.22 # (115)	1624.1±254.7 ※ (74)	4.15±0.50 ※ (92)

Pretreatment of HPE was carried out 48 hr, 24 hr, and 15 min before the ethanol administration (3.95 g/kg body weight, i.p.). The data are expressed as means±S.E. of at least 4 mice. Liver weight ratio was calculated as follows: liver weight × 100 / body weight.

#) Significantly different from the Group 1 ($p < 0.05$). ※) Significantly different from the Group 3 ($p < 0.05$).

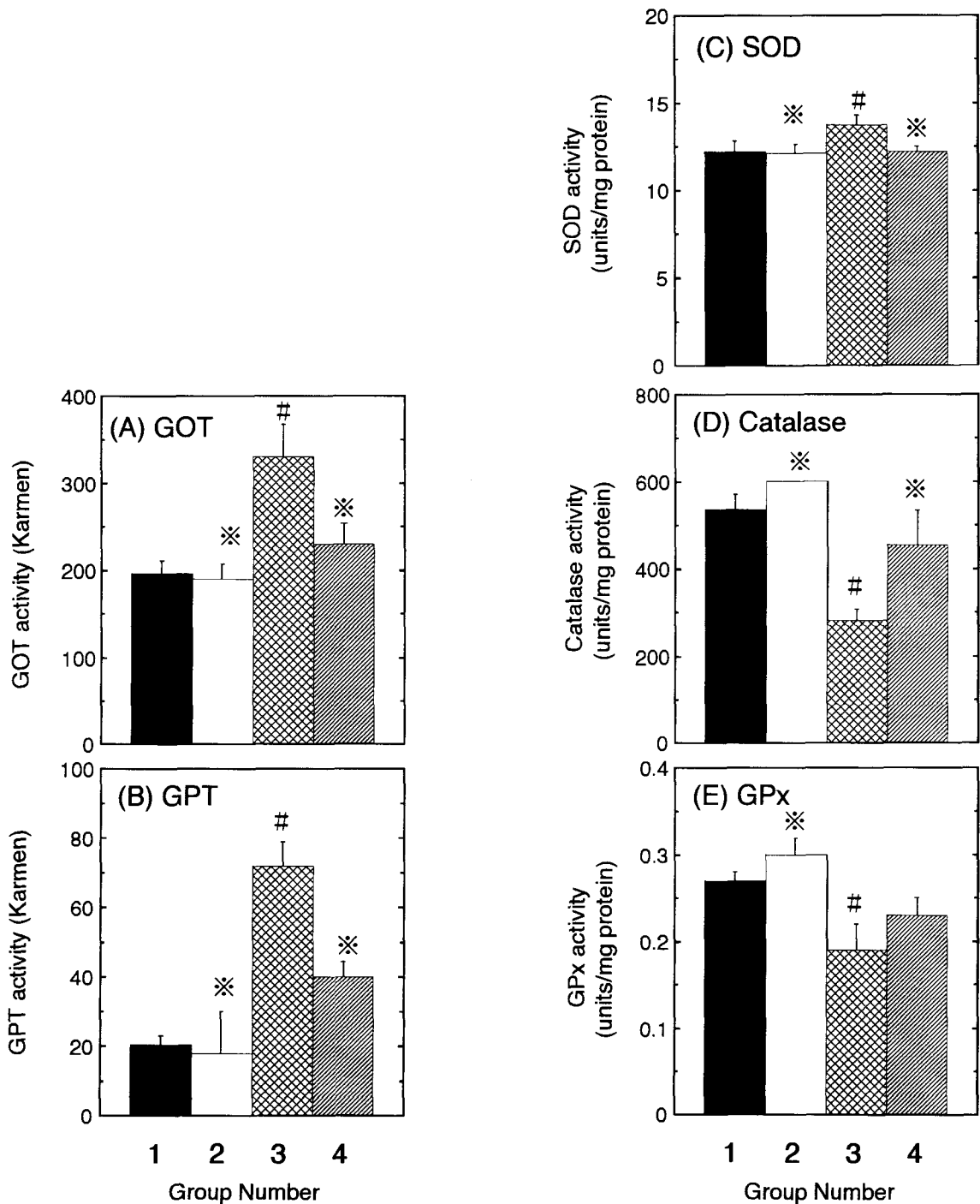


Fig. 2 Effects of HPE administration on GOT and GPT activities in blood serum and SOD, catalase, and GPx activities in liver cytosol of mice suffering from acute alcoholic liver injury. Pretreatment of HPE was carried out 48 hr, 24 hr, and 15 min before ethanol administration (3.95 g/kg body weight, i.p.). The data are expressed as means \pm S.E. of at least 4 mice.

#) Significantly different from the Group 1 ($p < 0.05$). *) Significantly different from the Group 3 ($p < 0.05$).

Group 1 (■): Distilled water (p.o.), Group 2 (□): HPE (p.o.), Group 3 (▣): EtOH (i.p.), Group 4 (▨): EtOH (i.p.) + HPE (p.o.)

第3節 考察

本章では、HPE の *in vitro* および *in vivo* における抗酸化活性について検討した。

第1節では *in vitro* の実験として、HPE の抗酸化活性を共役ジエン法およびデオキシリボース法で検討した。その結果、HPE は両法において濃度依存的に抑制作用を示した。共役ジエン法はリノール酸の過酸化反応による共役ジエンの生成を測定する反応系であることから、脂溶性抗酸化物質の抗酸化活性を測定することができる。また、デオキシリボース法はデオキシリボースの分解により生じたマロンジアルデヒド (MDA) を測定する反応系であることから、水溶性抗酸化物質の抗酸化活性を測定することができる。両測定系で HPE が抑制作用を示したことから、HPE には水溶性および脂溶性の抗酸化物質が含まれている可能性が示唆された。

第2節では HPE の *in vivo* における抗酸化能を明らかにするため、生体内で ROS が関与して誘発される急性エタノール肝障害を利用した。エタノール 86 mmol/kg により誘発される急性肝障害とこれに伴う酸化ストレスに対して HPE を前投与した結果、HPE はエタノールによる肝臓中の GSH 量の減少、TBARS の増加、血清中の GOT および GPT 活性の上昇、肝サイトソール分画中の SOD 活性の上昇、catalase および GPx 活性の低下を、いずれも抑制した。以上の結果は、HPE が *in vivo* においても抗酸化活性を発現することを示すものであり、HPE に含有される抗酸化活性物質は、経口摂取によって生体内に吸収され、抗酸化活性を示すことができるものであると考えられる。

実験の部

第 1 節の実験方法

1. リノール酸ミセル溶液の調製

リノール酸 24 mg に 30 mM 塩化ナトリウム溶液 10 ml および 0.8% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液 10 ml を加えた。この溶液を超音波処理したのち、30 mM 塩化ナトリウム溶液 60 ml を加えて攪拌し、均一なミセル溶液とした [32]。

2. 共役ジエン法

共役ジエン法は、Kharasch と Novak の方法に若干の改変を加えて行った [32]。リノール酸のミセル溶液 2.5 ml、試料溶液 0.1 ml、0.003% 過酸化水素溶液 50 μ l、および 1% 硫酸第一鉄アンモニウム溶液 25 μ l を、25°C に保った 10×10 mm の石英キュベット中に攪拌しながら順番に加えた。硫酸第一鉄アンモニウム添加後の 234 nm における吸光度の増加を分光光度計で 1 分間測定した。

3. デオキシリボース法

デオキシリボース法は、Rice-Evans らの方法 [31] に若干の改変を加えて行った。150 mM 塩化ナトリウム溶液 0.5 ml に、5 mM デオキシリボース溶液 0.2 ml、サンプル 0.15 ml またはコントロールとして蒸留水 0.15 ml、1% 硫酸第一鉄アンモニウム溶液 0.1 ml、および 0.003% 過酸化水素溶液 0.05 ml を加えて攪拌した。この反応溶液に、0.05 M 水酸化ナトリウム溶液に溶解させた 1% (w/v) チオバルビツール酸 (TBA) 溶液 0.5 ml および 2.8% (w/v) トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 0.5 ml を加えた。その混合液を沸騰水浴中で 15 分間加熱したのち直ちに冷却し、535 nm における吸光度を測定した。

第 2 節の実験方法

1. 動物

5 週令の ddY 系雄性マウス (東京実験動物) を、10 匹を 1 群として実験に使用し

た。1週間の予備飼育後、Group 1 および Group 3 には蒸留水 0.3 ml、Group 2 および Group 4 には 10% (w/v) HPE 溶液 0.3 ml を、それぞれ 1 日 1 回、24 時間おきに 3 日間連続して経口投与した。3 回目の投与の 15 分後に、Group 1 および Group 2 には蒸留水 0.3 ml、Group 3 および Group 4 には 50% エタノール 0.3 ml を腹腔内に投与した。エタノールを投与した 24 時間後に屠殺し、血液および肝臓を分取した。

なお、動物の取扱いは、「星薬科大学動物実験指針」に従った。

2. 肝サイトソール画分の調製

肝臓は重量を測定したのち、生理食塩水中、テフロンホモジナイザーを用いて 10% ホモジネート溶液を作成した。このホモジネート溶液について 4°C で、105,000 × g、1 時間遠心分離を行って得た上清を、サイトソール画分として GSH 量および抗酸化酵素活性の測定に使用した。

3. TBARS 量の測定

肝臓組織中の TBARS 量は、Taniguchi らの方法 [33] に従って以下のように測定した。肝臓組織 0.2 g に 0.05 M 塩酸 10 ml を加えてテフロンホモジナイザーを用いてホモジネート溶液を調製し、その 3.0 ml を褐色の共栓試験管に分取して、0.67% チオバルビツール酸溶液 1.0 ml を加えたのち、栓をして沸騰水浴中で 30 分間加熱した。加熱終了後、直ちに試験溶液を冷却し、n-ブタノール・メタノール混液 (85 : 15 v/v) 4.0 ml を加えて約 1 分間激しく振とうしたのち、室温下、700 × g で 10 分間遠心分離して得た n-ブタノール層について、535 nm における吸光度を測定した。TBARS の positive control には、蒸留水 3.0 ml 中に 1,1,3,3-テトラエトキシプロパン 2 ng を添加して同様に操作を行ったものを使用した。

4. GSH 量の測定

上記 2 で調製した肝サイトソール画分の GSH 量は、Newton らの方法 [4] に準じて HPLC を用いて定量した。カラムには LiChrosorb 5C18 (4.6 φ × 150 mm ; ジーエルサイエンス) を用い、溶媒には 0.1 M リン酸ナトリウム / 1% リン酸、流速は 1.0 ml/min とし、溶出液について 217 nm における吸光度をモニターした。

5. 血清中のトランスアミナーゼ活性の測定

分取した血液を室温下で 30 分間静置したのち、室温下、 $1,700 \times g$ で 10 分間遠心分離して分取した上清を、トランスアミナーゼ活性測定用の酵素標品とした。血清中の GOT および GPT 活性は測定キット（和光純薬工業）を使用して測定し、酵素活性は karmen 単位で表した。

6. Cu/Zn-SOD 活性の測定

肝サイトソール画分中の Cu/Zn-SOD 活性は、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法 [35] を用いて以下のように測定した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) 0.12 mM、ウシ血清アルブミン (BSA) 0.15 mg、NBT 0.03 mM、キサントリン 0.12 mM を含む 50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.2) 2.5 ml に、酵素標品 100 μ l および xanthine oxidase 1 unit を添加して 25°C で 20 分間インキュベートした。6 mM 塩化銅 0.1 ml を添加して反応を停止したのち、560 nm における吸光度を測定した。酵素の活性は、試験溶液の吸光度がブランクの 1/2 に減少したときの酵素量を 1 unit として表した。

7. catalase 活性の測定

肝サイトソール画分中の catalase 活性は、Beers らの方法 [36] に従って以下のように測定した。27 mM 過酸化水素 / 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) 3.0 ml を石英セル (10x10mm) に入れ、25°C に保った分光光度計の恒温セルホルダーにセットして、酵素溶液 10 μ l を添加したのち、240 nm における吸光度の減少を 1 分間連続して測定した。酵素の活性は、1 分間に 1 μ mol の過酸化水素を分解する酵素量を 1 unit として表した。

8. GPx 活性の測定

肝サイトソール画分中の GPx 活性は、Lawrence らの方法 [37] に従って以下のように測定した。EDTA 1 mM、アジ化ナトリウム 1 mM、NADPH 0.2 mM および GSH 1 mM を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 2.1 ml を石英セル (10x10 mm) に入れ、25°C に保った分光光度計の恒温セルホルダーにセットしたのち、グルタチオンレダクターゼ 0.3 unit および酵素溶液を添加して 5 分間放置した後、過酸化水素を

0.03 mM となるように添加して、340 nm における吸光度の減少を 5 分間連続して測定した。酵素の活性は、1 分間に 1 μmol の過酸化水素を還元する酵素量を 1 unit として表した。

9. タンパク質濃度の測定

試料溶液のタンパク質濃度は、Lowry らの方法 [38] に従って BSA を標準タンパク質として測定した。

10. 統計処理

測定値間の有意差の検定は Student's *t*-test で行った。

試薬および機器

HPE はスノーデン (株) より提供された HPE 粉末を使用した。NADPH はオリエンタル酵母工業、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン、キサントシン、xanthine oxidase (EC 1.1.3.22)、GSH、glutathione reductase (EC 1.6.4.2) は Sigma 社、その他の試薬は和光純薬工業のものをそれぞれ使用した。分光光度計は日立 U-2000、HPLC は日立 L-6000 型ポンプ、日立 L-4000 型検出器、および日立 D-2500 インテグレーターをそれぞれ使用した。

第 2 章 HPE 中の抗酸化活性成分（フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ウラシル）の精製および同定

序説

ヒト由来プラセンタエキス（HPE）は、美白や保湿作用を持つため化粧品原料として利用されており [21]、また近視性および老人性脈絡網膜ジストロフィー患者の症状の改善 [27]、肝機能障害、更年期障害、および胃十二指腸潰瘍等の改善 [28] を目的とした医薬品としても利用されている。今日までに HPE の抗炎症作用にシアル酸が関与することが明らかにされているが [22]、その他の生理活性成分については明らかにされていない。日本医療情報センター編の医療薬日本医薬品集には、胎盤を処理することによって作られる医薬品として、胎盤加水分解物、胎盤抽出物Ⅰ、胎盤抽出物Ⅱの 3 種類が記載されている [28]。このうち胎盤抽出物Ⅱ（ルチニ社製造）にはヒト胎盤を低温で処理した後、酵素分解処理して得られる抽出画分であり、タンパク質（アルブミン、グロブリン）、アミノ酸（ロイシン、バリン、フェニルアラニン（Phe）、トリプトファン（Trp）等）、酵素（アルカリフォスファターゼ等）、脂質（コレステロール等）、糖質（グルコース、ガラクトース、グルコサミン等）、核酸構成物質（ウラシル、アデニン等）、ミネラル（ナトリウム、カリウム等）、その他（キサンチン等）が含有されている [28]。

第 1 章では、HPE が *in vitro* で強い活性酸素消去作用を示し、また *in vivo* でも、エタノールで誘発される酸化ストレスに対して抑制的に働くことを明らかにした。しかし、含有されている抗酸化物質が同定されていないため、HPE の抗酸化作用やその抗酸化作用の機構についての検討は十分ではない。本章では、HPE に比較的高濃度に含有される抗酸化物質について、Sephadex ゲルを用いたカラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC を用いて HPE から単離・精製し、NMR スペクトルおよび FAB-MS スペクトルを測定して検討した。第 1 節では、HPE をメタノール処理して生じた沈殿を除去し、上清を Sephadex G-50 を用いたカラムクロマトグラフィー、および逆相カラムを用いた HPLC で分画して得られた抗酸化物質について検討した。第 2 節では、HPE について Sephadex G-10 を用いたカラムクロマトグラフィーを行ったのち有機溶媒抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー

および HPLC を用いて精製して得られた抗酸化物質について検討した。

第 1 節 フェニルアラニン、チロシン、ウラシルの精製・同定

HPE に終濃度 40% となるようにメタノールを加えて生じた沈殿を遠心分離して除去し、弱い吸着が生ずる条件下で Sephadex G-50 を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。その際のクロマトグラフを Fig. 3 に示す。強い抗酸化活性が認められた 730~850 ml の溶出画分 (Fig. 3 の C) を分取して減圧濃縮し、HPLC を用いて精製した。HPLC の溶出液について、210 nm における紫外部吸収および抗酸化活性を測定した結果を Fig. 4 に示す。

HPE をメタノール沈殿処理した上清には、約 70% の抗酸化活性が回収された。また、Sephadex G-50 を用いたカラムクロマトグラフィーにおける抗酸化活性の回収率は、カラムに負荷した活性の約 70% であった。HPLC で精製したときの抗酸化活性の回収率は約 90% であった。

Fig. 4 (A) のピーク a~z のうち、比較的強い抗酸化活性が認められたピーク b、h、p および v を分取してリクロマトグラフィーを行い、得られたサンプルについて FAB-MS スペクトル、NMR スペクトルおよび UV スペクトルを測定した結果から、ピーク h、p および v をそれぞれ、ウラシル、チロシン (Tyr) および Phe と同定した [27]。なお、ピーク b は分離が不十分であり、混合物であったことから同定できなかった。得られたサンプルと標準品の FAB-MS スペクトルを Fig. 5、NMR スペクトルを Table 2~7、UV スペクトルを Fig. 6 に示す。

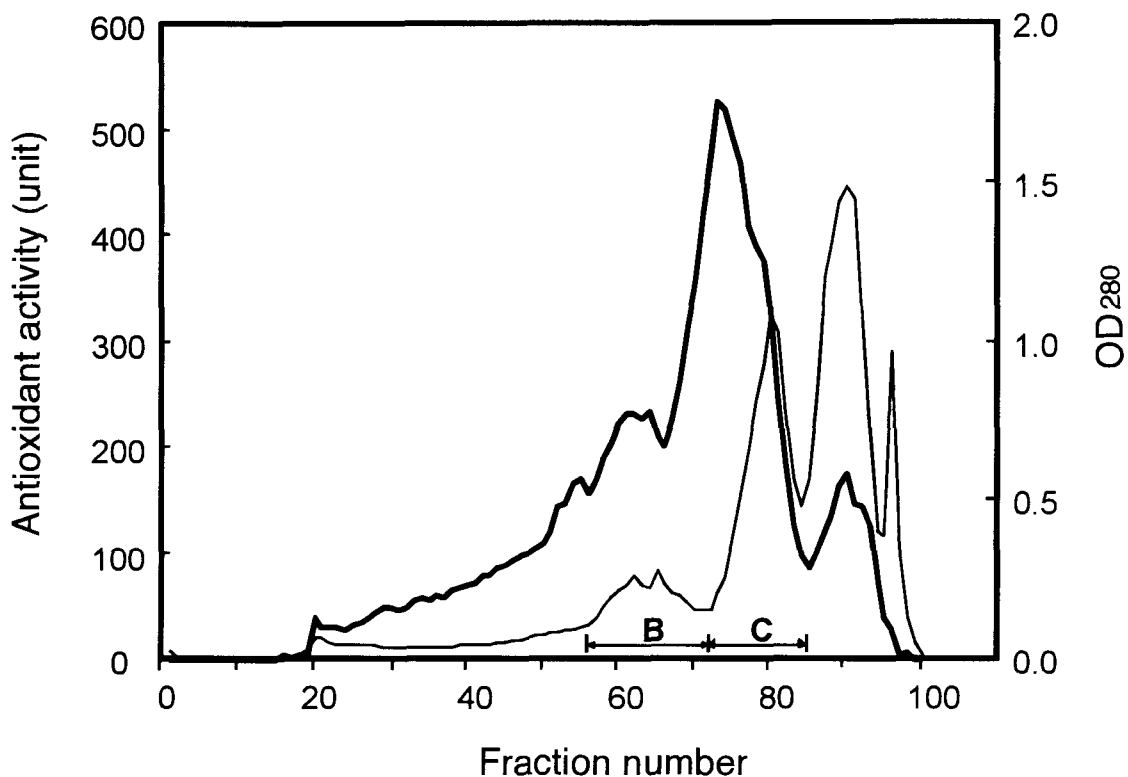


Fig. 3 Sephadex G-50 chromatography of HPE. Supernatant of HPE treated with 40% MeOH was subjected to Sephadex G-50 chromatography. Column size; $850 \times \phi 33$ mm (727 cm^3), eluent; distilled water, flow rate; 30 ml/hr, and sample volume; 10 ml. UV absorbance at 280 nm (—) of each fraction was measured by Hitachi U-2000 spectrometer. Zone B was composed of fractions from No.56 to No.72, and zone C was from No.73 to No.85, respectively. Antioxidant activity (—) is expressed as μmol equivalence of mannitol by the deoxyribose method.

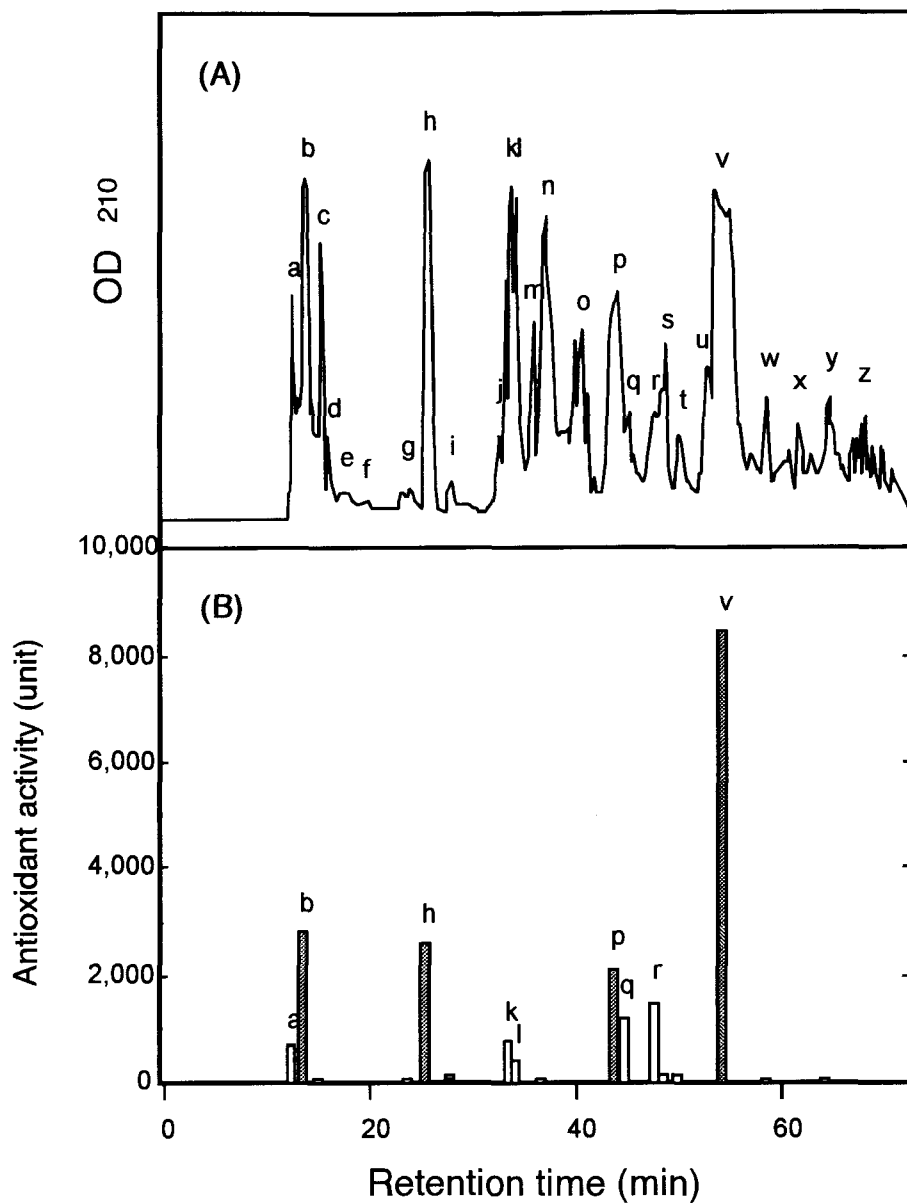


Fig. 4 Separation of antioxidants in HPE by HPLC (A) and antioxidant activities of the peaks (B). Sample derived from zone C fraction in Fig. 3 was subjected to RP-HPLC. Column; ODS Mightysil RP-18 GP (5 μm), column size; 250 \times ϕ 10 mm (19.6 cm^3), eluent; linear gradient of acetonitrile in distilled water (0-40% (v/v)) containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, flow rate; 1.0 ml/min for 60 minutes, and sample volume; 50 μl . UV absorbance at 210 nm of each fraction was measured by the UV detector. Antioxidant activity is expressed as μmol equivalence of mannitol by the deoxyribose method.

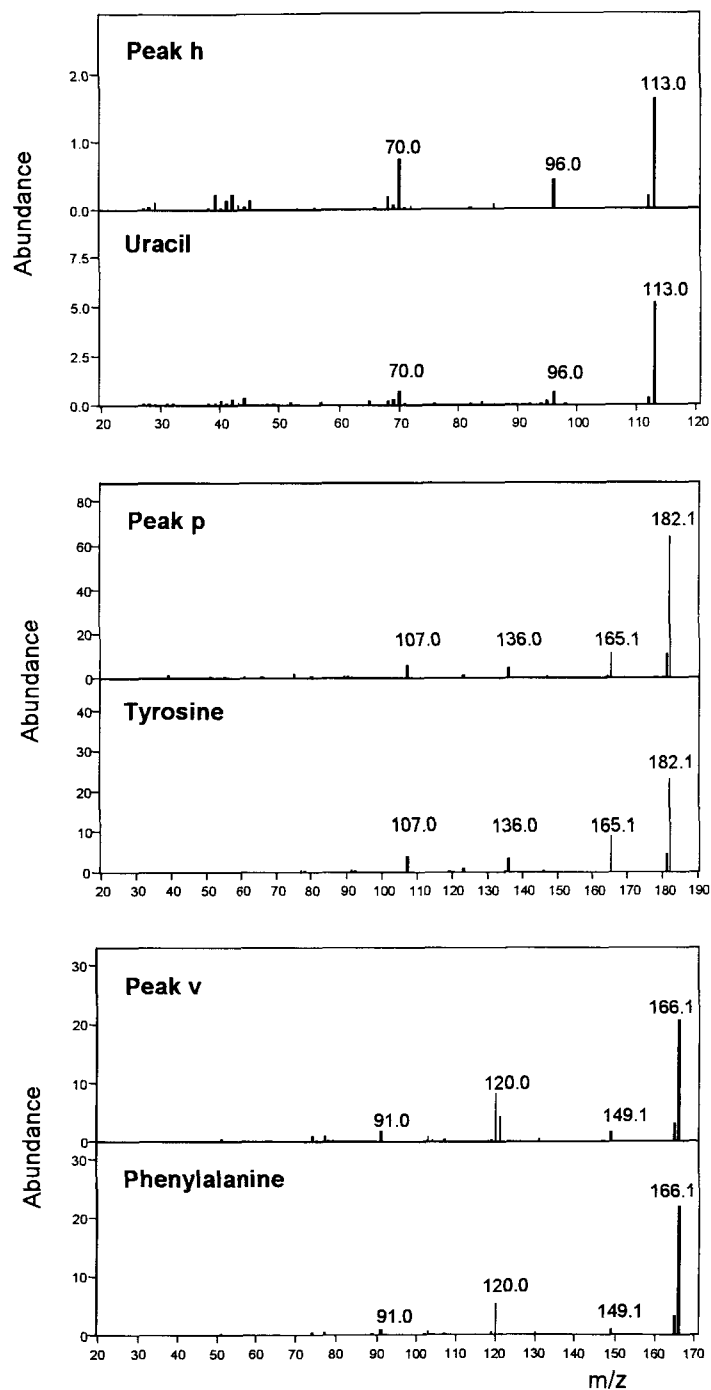


Fig. 5 FAB-MS spectra on linked scan of samples. The FAB-MS spectra of peaks h, p, and v purified by rechromatography were recorded on B/E linked scan on JEOL JMS SX-102A.

Table 2 ¹H-NMR chemical shifts of uracil and peak h (ppm) (coupling constants in parenthesis).

Uracil	Peak h
7.53 (2H, d, J=8 Hz)	7.53 (2H, d, J=8 Hz)
5.80 (2H, d, J=8 Hz)	5.80 (2H, d, J=8 Hz)

Table 3 ¹³C-NMR chemical shifts of uracil and peak h (ppm).

Uracil	Peak h
168.30	168.27
153.23 ^{a)}	Not detected
144.25	144.22
101.87	101.86

a) The intensity of the uracil signal was very weak.

Table 4 ¹H-NMR chemical shifts of tyrosine and peak p (ppm) (coupling constants in parenthesis).

Tyrosine	Peak p
7.18 (2H, d, J=9 Hz)	7.14 (2H, d, J=9 Hz)
6.85 (2H, d, J=9 Hz)	6.82 (2H, d, J=9 Hz)
3.85 (1H, dd, J=8 and 5 Hz)	4.08 (1H, dd, J=8 and 6 Hz)
3.22 (1H, dd, J=15 and 5 Hz)	3.21 (1H, dd, J=14 and 6 Hz)
3.00 (1H, dd, J=15 and 8 Hz)	3.00 (1H, dd, J=14 and 8 Hz)

Table 5 ¹³C-NMR chemical shifts of tyrosine and peak p (ppm).

Tyrosine	Peak p
157.51	157.21
132.43	131.78
128.61	128.82
117.52	116.93
58.23	55.93
37.49	36.94

Table 6 ¹H-NMR chemical shifts of phenylalanine and peak v (ppm) (coupling constants in parenthesis).

Phenylalanine	Peak v
7.31~7.43 (5H, m)	7.02~7.14 (5H, m)
3.99 (1H, dd, J=8 and 5 Hz)	3.88 (1H, dd, J=8 and 5 Hz)
3.29 (2H, dd, J=15 and 5 Hz)	3.03 (2H, dd, J=14 and 5 Hz)
3.12 (2H, dd, J=15 and 8 Hz)	2.88 (2H, dd, J=14 and 8 Hz)

Table 7 ¹³C-NMR chemical shifts of phenylalanine and peak v (ppm).

Phenylalanine	Peak v
173.72	171.40
137.33	135.68
130.41	130.47
129.97	130.12
128.39	128.84
57.60	55.26
38.41	37.38

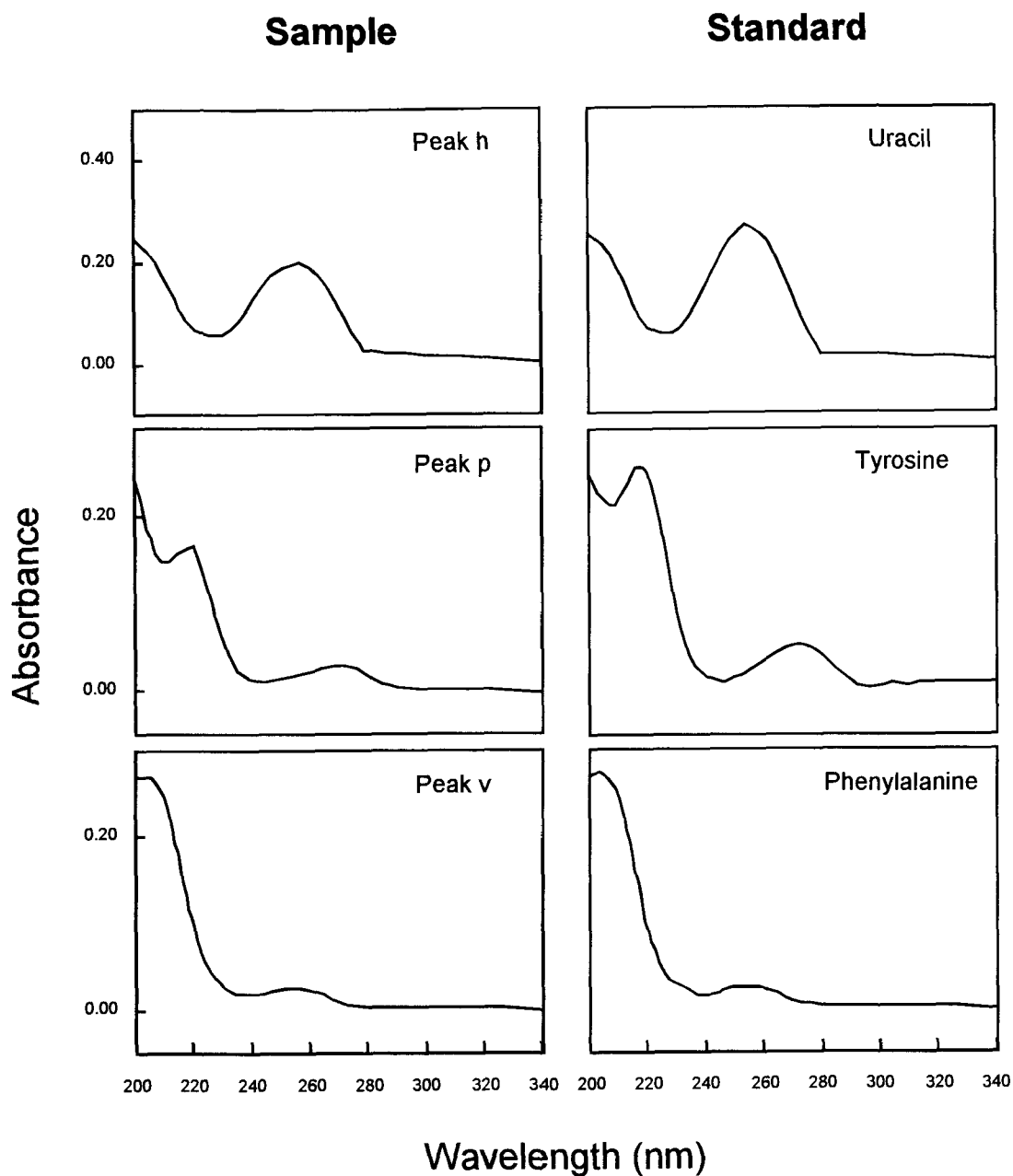


Fig. 6 UV spectra of purified antioxidants (peaks h, p, and v). UV spectra of the samples (rechromatographed peaks h, p, and v) and standards (uracil, tyrosine, and phenylalanine) dissolved in distilled water were measured by Hitachi U-2000 spectrometer.

第 2 節 トリプトファンの精製・同定

第 1 節の精製（溶出液＝蒸留水）では、Sephadex G-50 カラムを用いた場合の抗酸化活性の回収率が 70% であったことから、この精製条件ではカラムに吸着される抗酸化活性成分が存在すると考えた。そこで次に、Sephadex G-50 中に留まった活性について、他の方法を用いて検討した。すなわち、HPE 溶液に対してメタノール沈殿処理を行わずに、吸着作用が Sephadex G-50 と異なる Sephadex G-10 ゲルを用いたカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、第 1 節で同定したウラシル、Tyr、および Phe よりも長い保持時間で溶出する抗酸化活性のピークが認められた (Fig. 7)。その抗酸化活性は、カラムに負荷した活性の約 20% を占めた。そこで、分取したこの活性画分に酢酸エチルおよびイソプロパノール混液 (3:2 v/v) を加え、有機溶媒層を分取してシリカゲルカラムを用いたクロマトグラフィーを行った (Fig. 8)。260 nm における紫外吸収および強い抗酸化活性が認められた 60~100 ml の溶出画分を分取し、HPLC を用いて精製した。このときの溶出結果を Fig. 9 に示す。標準品の Trp と同じ保持時間のピークを分取して NMR スペクトルを測定した結果、この抗酸化物質を Trp と同定した [25]。

第 3 節 考察

本章で精製に用いたフラクション C (Fig. 3 の C) と同じ強い抗酸化活性が認められた Sephadex G-50 を用いたカラムクロマトグラフィーにおける 560~730 ml の溶出画分 (Fig. 3 の B) についても、濃縮し、HPLC を用いて精製した結果、その溶出パターンはピーク h (Fig. 4 (A)) 以外はフラクション C と同じだった。そのため、抗酸化活性成分の精製には Fig. 3 のフラクション C を用いた。

HPE 中の抗酸化物質のうち比較的高濃度に存在する成分について、ゲルろ過、シリカゲルカラムおよび HPLC を用いて単離・精製し、FAB-MS スペクトル、NMR スペクトルおよび UV スペクトルを測定して同定した。その結果、アミノ酸である Phe、Tyr、および Trp と核酸塩基であるウラシルが HPE 中に含有される主要な抗酸化物質であることが明らかとなった。なお、カラムクロマトグラフィーの溶媒に蒸留水を用

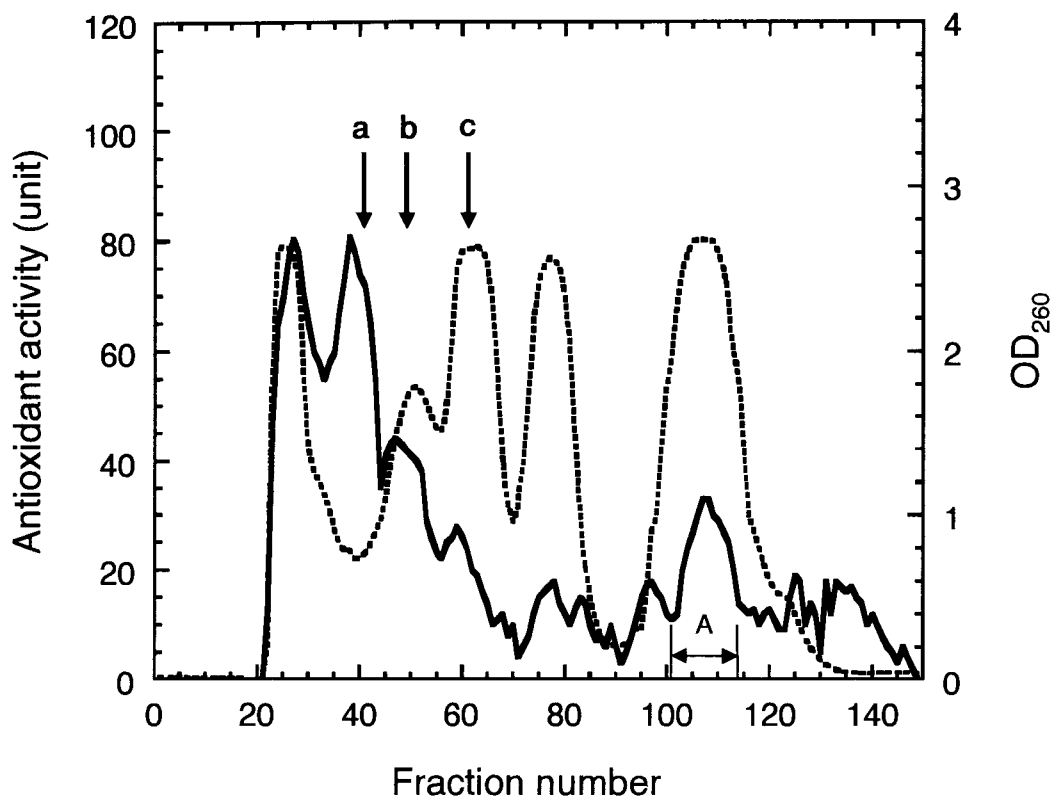


Fig. 7 Sephadex G-10 chromatography of HPE. HPE was subjected to Sephadex G-10 chromatography. Column size; 824 × ϕ 30 mm (582 cm³), eluent; 0.9% NaCl, flow rate; 30 ml/hr, and sample volume; 30 ml. UV absorbance at 260 nm (.....) of each fraction was measured by Hitachi U-2000 spectrometer. Zone A was composed of fractions from No.103 to No.114. Antioxidant activity (—) is expressed as μ mol equivalence of mannitol by the deoxyribose method. Arrows a, b, and c indicate elution position of phenylalanine, tyrosine, and uracil, respectively.

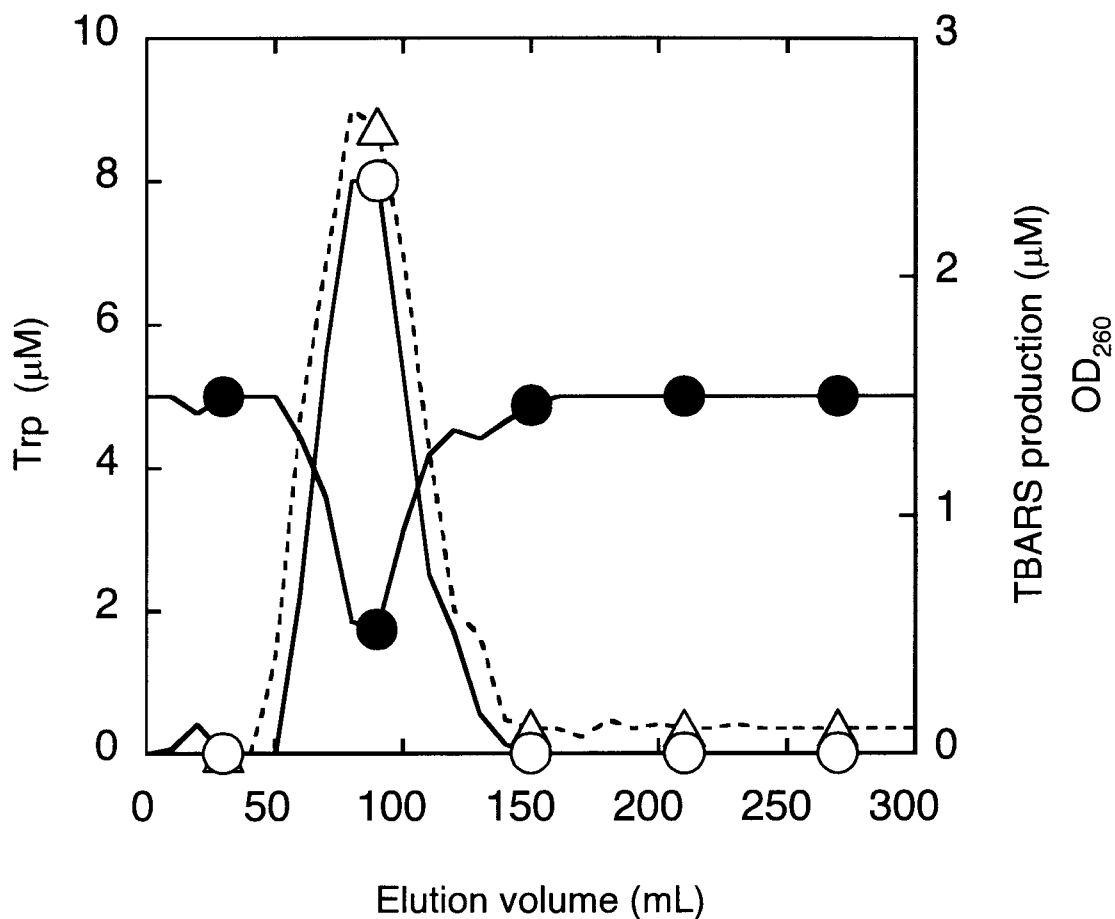


Fig. 8 Elution of antioxidant activity from silicagel column. One volume of fraction A in Fig. 7 was mixed with 2.25 volume of ethyl acetate and 1.5 volume of isopropanol, and resulting organic layer was applied to the silica gel 60 column. Column size; $150 \times \phi 20$ mm (47 cm^3), eluent; ethyl acetate/isopropanol/distilled water (9:6:4), flow rate; 30 ml/hr, and sample volume; 30 ml. Each 10 ml of eluate was collected, and OD_{260} (Δ) was measured. TBARS production (\bullet) and Trp concentration (\circ) was determined by the deoxyribose method and reverse-phase HPLC, respectively.

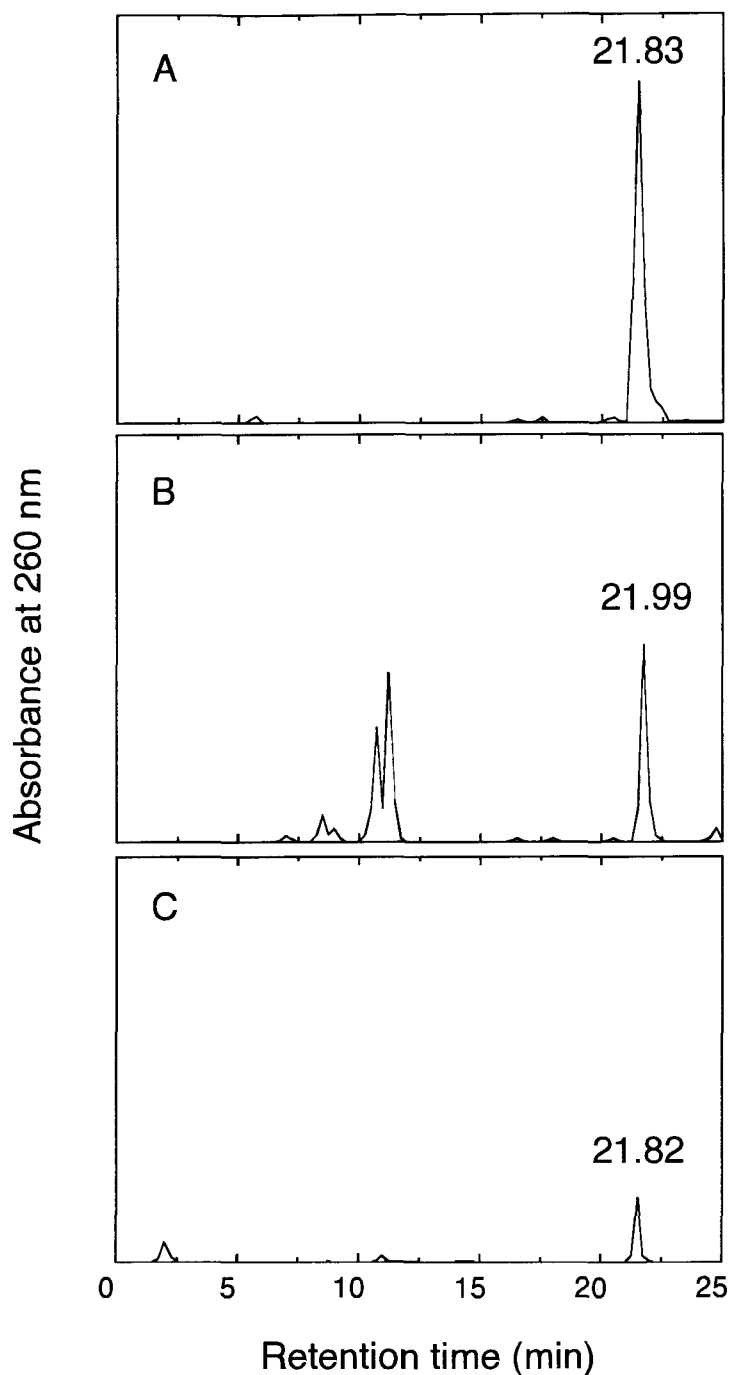


Fig. 9 HPLC chromatogram of the purified antioxidant. The active fractions eluted from silicagel chromatography was applied to RP-HPLC column. Column; LiChrosorb RP18-5, column size; $250 \times \phi 10$ mm (19.6 cm^3), eluent; 10 mM sodium acetate/15% methanol (pH 4.85), and flow rate; 1.0 ml/min. A, B, and C indicate standard Trp, the eluate of silicagel chromatography and the purified antioxidant, respectively.

いることにより、ゲルろ過に基づく分離に加えて弱い吸着作用が生じた結果、分子量の近い抗酸化物質（Phe=165、Tyr=181、ウラシル=112、Trp=204）の分離が良好に行われたものと考えられる。また、各抗酸化物質の 10% HPE 溶液中の濃度について HPLC を用いて定量した結果、Phe=11 mM、Tyr=4.1 mM、Trp=2.8 mM およびウラシル=1.3 mM であることが明らかとなった。

本章で同定した 4 種の物質はいずれも HO \cdot との反応性があり、Table 8 に示すように、その反応速度定数は内因性の抗酸化物質である GSH と同程度である [39–41]。また、本章で同定した各抗酸化物質の 10% HPE 溶液中の濃度がいずれも mM オーダーであることから、各抗酸化物質はいずれも HPE 中の主要な抗酸化物質であり、HPE の抗酸化作用に対する寄与はいずれも大きいものであると考えられる。

Table 8 Rate constants for reaction of hydroxyl radical with Phe, Tyr, Trp, uracil, and glutathione in aqueous solution.

Antioxidant	Rate constant ($M^{-1}s^{-1}$)
Phenylalanine	6.5×10^9
Tyrosine	1.3×10^{10}
Tryptophan	8.5×10^9
Uracil	3.1×10^9
Glutathione	8.8×10^9

実験の部

第 1 節の実験方法

1. 抗酸化活性の測定

第 1 章第 1 節の実験方法に示した方法を用いた。

なお、抗酸化活性 1 unit は、1 μmol のマンニトールが示す値（コントロールの吸光度値 - 1 μmol のマンニトールに基づく吸光度値）と定義した。

2. Phe、Tyr およびウラシルの精製

1) カラムクロマトグラフィー

10% HPE 溶液 6 容量にメタノール 4 容量を加えて混和したのち、4°C の条件下、10,000 \times g で 10 分間遠心分離した上清について、Sephadex G-50 を充填したカラム（33 ϕ \times 850 mm）で蒸留水を溶出溶媒としてクロマトグラフィーを行い、その溶出液を 10 ml ずつ分取した。溶出液の 280 nm における紫外部吸収を測定したのち、上記 1 の方法で抗酸化活性を測定した。

2) HPLC

カラムには関東化学の Mightysil RP-18GP（5 μm -pour size, 10 ϕ \times 250 mm）を使用した。溶出溶媒には 60 分で 0.1% TFA 含有蒸留水から 0.1% TFA 含有 40% アセトニトリルのリニアグラジェントを用いた。流速は 1.0 ml/min に設定し、溶出液について 210 nm における紫外部吸収を測定した。

第 2 節の実験方法

1. Trp の精製

1) Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィー

HPE を Sephadex G-10 を充填したカラム（30 ϕ \times 824 mm）で 0.9% 塩化ナトリウム溶液を溶出溶媒に用いてクロマトグラフィーを行い、その溶出液を 10 ml ずつ分取した。溶出液の 280 nm における紫外部吸収を測定したのち、第 1 章第 1 節の実験方法に示した方法を用いて抗酸化活性を測定した。

2) 抽出

1) で得られた活性画分 (Fig. 7 の A) 1 容量に、酢酸エチル 2.25 容量およびイソプロパノール 1.5 容量を加えて混和したのち、室温条件下、1,600×g で 10 分間遠心分離して上清を分取した。

3) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

2) で得た上清を、Silica gel 60 (70–230 mesh, Merck) を充填したカラム (20 φ × 150 mm) に吸着させ、酢酸エチル : イソプロパノール : 蒸留水 (9 : 6 : 4) 混液で溶出した。溶出液は 10ml ずつ分取し、その 260 nm における紫外部吸収を測定したのち、減圧下で溶媒を除去し、残渣を蒸留水に溶解して、第 1 章第 1 節の実験方法に示した方法を用いて抗酸化活性を測定した。

4) HPLC

カラムには LiChrosorb 5C18 (10 φ × 250 mm ; ジーエルサイエンス) を使用し、溶出溶媒には 0.01 M 酢酸ナトリウム / 15% メタノール (pH 4.85) を用いた。流速 1.0 ml/min で溶出し、溶出液について 260 nm における紫外部吸収を測定した。

試薬および機器

試薬は、第 1 章に示したものを使用した。その他の試薬は和光純薬工業特級を使用した。分光光度計および HPLC は第 1 章に示したものを使用した。また、FAB-MS および NMR の測定には日本電子の JEOL SX-102A および JEOL JMS LA-500 をそれぞれ使用した。

第3章 HPE 中の抗酸化活性成分 (Phe、Tyr、Trp、ウラシル) の *in vitro* における抗酸化作用

序説

第2章で HPE 中の抗酸化物質として同定した Phe、Tyr、Trp およびウラシルは、いずれも Fenton 反応で過酸化水素から生成した HO \cdot を効率よく捕捉する [39–42]。生体内で生成した場合には、HO \cdot はすみやかに生体成分である脂質、糖質、タンパク質および核酸等を酸化して、生体に酸化ストレスを誘発する [4,12,13,15,43–45]。そこで、第2章で同定した各抗酸化物質が酸化ストレス誘発時における生体成分の酸化反応に対して示す効果を、Fenton 反応によるデオキシリボースの分解、Fenton 反応によるリノール酸の過酸化反応、チトクローム P-450 依存性脂質過酸化反応、および Fenton 反応によるラット肝臓の細胞質タンパク質の酸化反応を用いて検討した。

第1節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルの HO \cdot 捕捉作用

1. 抗酸化活性の濃度依存性

Fenton 反応における各抗酸化物質の HO \cdot 捕捉作用について、デオキシリボース法 [31] で測定した結果を Fig. 10 に示す。HO \cdot 捕捉作用は、いずれの抗酸化物質も反応溶液中の濃度に比例した。また、4種のうち Trp が最も大きな HO \cdot 捕捉作用を示した。

2. HPE 中の濃度における各抗酸化物質の HO \cdot 捕捉作用

各抗酸化物質の濃度を HPE 中の濃度と同一に調製し、その HO \cdot 捕捉作用をデオキシリボース法 [31] を用いて測定した。その結果を Fig. 11 に示す。各抗酸化物質の HO \cdot 捕捉作用は、HPE の HO \cdot 捕捉作用を 100% とすると、Phe が 32%、Tyr が 13%、Trp が 12%、ウラシルが 2% であり、HPE の抗酸化活性に対する寄与は Phe が最も大きいことを認めた。これら 4 物質の HO \cdot 捕捉活性の合計は 59% であった。

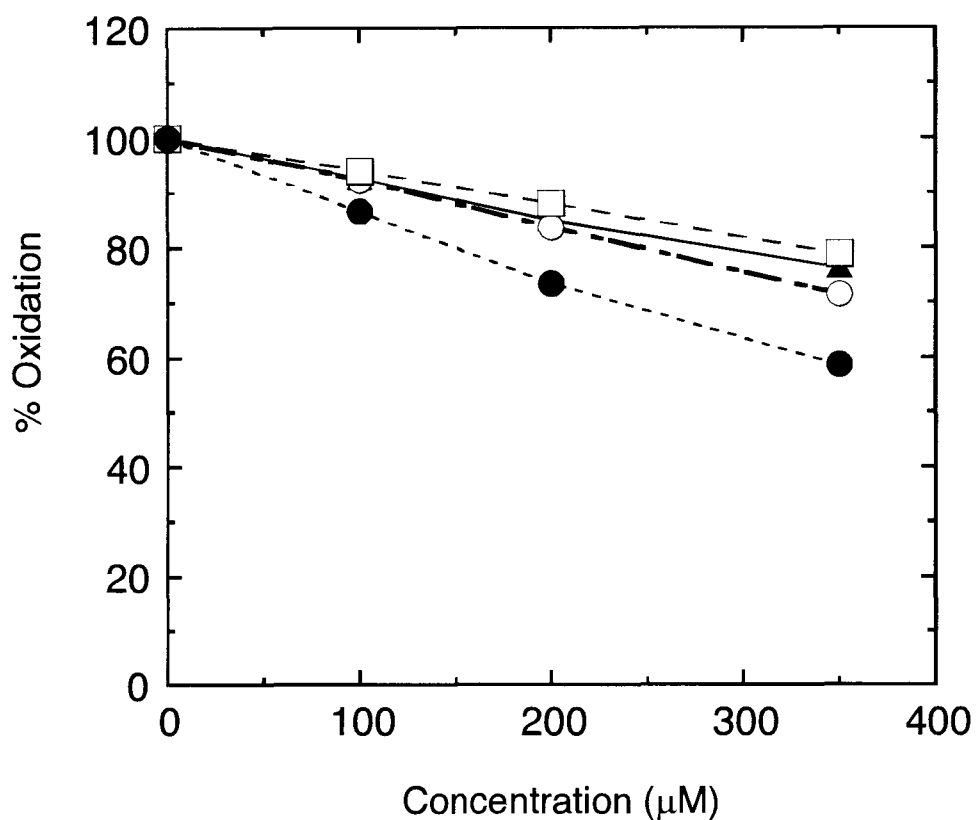


Fig. 10 Dose-dependent effect of antioxidants on the Fenton reaction. Reaction mixture contained 0.15 M NaCl, 1 mM deoxyribose, 2.6 mM ferrous ammonium sulfate and 4.4 mM hydrogen peroxide. Each value is the mean of 3 samples. (▲)Phe, (○)Tyr, (□)Uracil or (●)Trp.

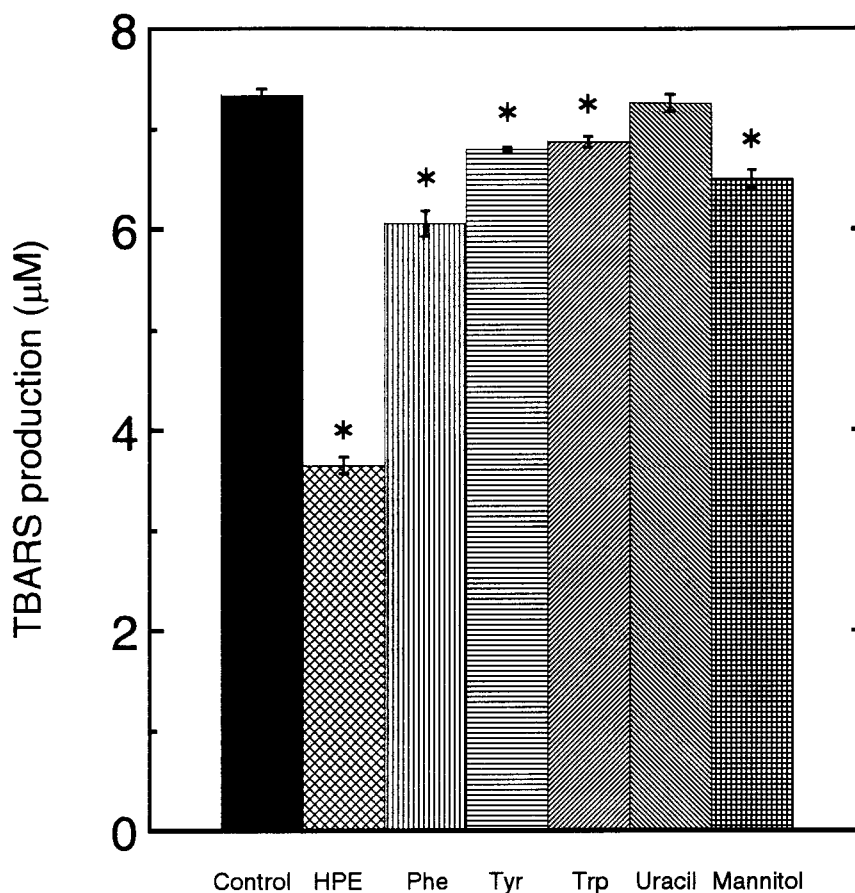


Fig. 11 Effect of antioxidants on the TBARS production by Fenton reaction. Reaction mixture contained 0.15 M NaCl, 1 mM deoxyribose, 2.6 mM ferrous ammonium sulfate and 4.4 mM hydrogen peroxide. Concentrations of antioxidants were as follows : 580 µM Phe, 214 µM Tyr, 139 µM Trp, 61 µM uracil, and 580 µM mannitol. Each value is the mean \pm SD of 3 samples.
 * $p < 0.01$, compared with the control value.

第2節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルの脂質過酸化反応に対する抑制作用

1. チトクローム P-450 依存性脂質過酸化反応

各抗酸化物質の濃度を HPE 中の濃度と同一に調製して、t-ブチルヒドロペルオキシドで惹起されるチトクローム P-450 依存性脂質過酸化反応に対する効果を測定した。その結果を Fig. 12 に示す。各抗酸化物質のチトクローム P-450 依存性脂質過酸化反応に対する抑制作用は、HPE の抑制効果を 100% とすると、Phe が 22%、Tyr が 20%、Trp が 32%、ウラシルが 0% であった。

2. Fenton 反応によるリノール酸の過酸化反応

各抗酸化物質の濃度を HPE 中の濃度と同一に調製し、Fenton 反応によるミセル状リノール酸の過酸化反応に対する効果を検討した。その結果を Fig. 13 に示す。リノール酸の過酸化反応に対する各抗酸化物質の抑制作用は、HPE の抑制作用を 100% とすると、Phe が 17%、Tyr が 11%、Trp が 22%、ウラシルが 16% であった。

第3節 Phe、Tyr、Trp、ウラシルのタンパク質のカルボニル化に対する抑制作用

各抗酸化物質の濃度を HPE 中の濃度と同一に調製し、Fenton 反応によるラット肝臓の細胞質タンパク質の酸化反応に対する抑制作用を検討した。その結果を Fig. 14 に示す。タンパク質の酸化反応に対する各抗酸化物質の抑制作用は、HPE の抑制作用を 100% とすると、Phe が 72%、Tyr が 54%、Trp が 42%、ウラシルが 98% であった。

第4節 考察

第2章で同定した HPE 中の4種の抗酸化物質は、Fig. 10 に示すように、反応溶液中の TBARS の生成を濃度依存的に抑制した。この結果は、4種の抗酸化物質がいずれも HO \cdot 捕捉作用を持つことを示している。また、HO \cdot と各抗酸化物質の反応は擬一次反応で進行すると考えられる。同じ濃度で比較すると、4種の抗酸化物質のうち

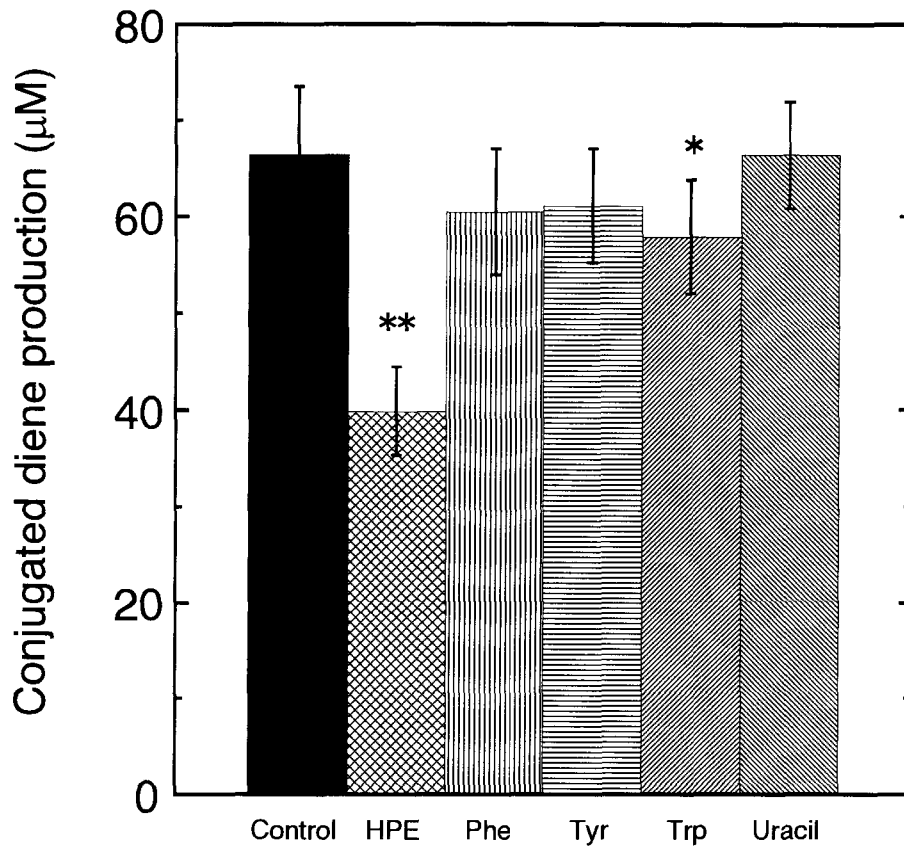


Fig. 12 Effect of antioxidants on the cytochrome P-450-dependent lipid peroxidation. Reaction mixture contained 0.1 M potassium phosphate, microsome (1.0 mg protein) and 1 mM t-butylhydroperoxide. Concentrations of antioxidants were as follows : 116 µM Phe, 42.7 µM Tyr, 27.8 µM Trp, and 12.2 µM uracil. Each value is the mean \pm SD of 3 samples.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the control value.

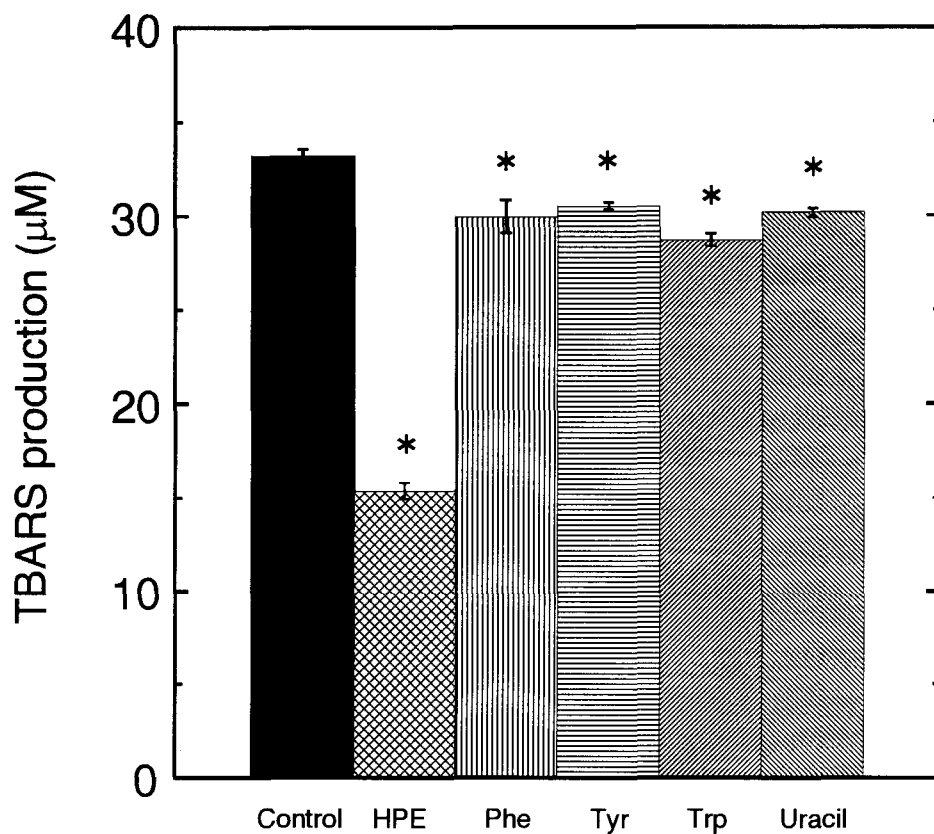


Fig. 13 Effect of antioxidants on the Fenton reaction-induced linoleic acid peroxidation. Reaction mixture contained 26 mM NaCl, 0.1% SDS, 90 mM linoleic acid, 0.2 mM ferrous ammonium sulfate and 14 mM hydrogen peroxide. Concentrations of antioxidants were as follows : 232 µM Phe, 85.3 µM Tyr, 55.6 µM Trp, and 24.4 µM uracil. Each value is the mean \pm SD of 3 samples.
* $p < 0.01$, compared with the control value.

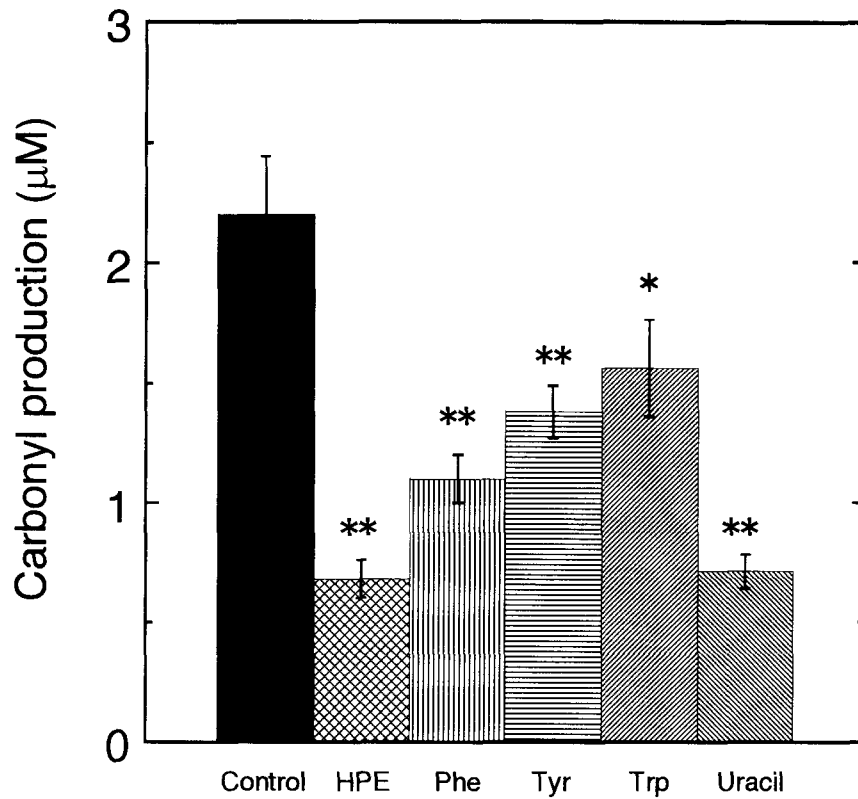


Fig. 14 Effect of antioxidants on the Fenton reaction-induced protein oxidation. Reaction mixture contained 6.2 mg cytosolic protein, 2.6 mM ferrous ammonium sulfate and 0.15 M hydrogen peroxide. Concentrations of antioxidants were as follows : 116 µM Phe, 42.7 µM Tyr, 27.8 µM Trp, and 12.2 µM uracil. Each value is the mean \pm SD of 3 samples.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the control value.

Trp が最も大きな HO・捕捉作用を示した (Fig. 10)。インドール化合物は強い ROS 消去作用を持つことが示唆されていることから、構造中にインドール環を持つ Trp は有効な HO・捕捉剤であると考えられる [46]。

同定した 4 種の物質の HO・捕捉機構を Fig. 15-18 に示す [42,47]。

第 2 章で同定した HPE に含有される Phe、Tyr、Trp、およびウラシルの示す HO・捕捉作用は、第 1 章で述べた HPE の酸化ストレスの誘発に対する抑制作用に関与していると考えられる。また、各抗酸化物質の濃度を HPE 中の濃度と同一に調製した際の酸化ストレスに対する抑制作用は、Fig. 11 に示すように、HPE 中の Phe が最も高濃度であることから、Phe が最も大きかった。したがって、HPE の抗酸化活性に対する寄与は、同定した 4 種の物質のなかでは Phe が最も大きいと考えられる。

t-ブチルヒドロペルオキシドで惹起されるチトクローム P-450 依存性の脂質過酸化反応系では、チトクローム P-450 の存在によって生成した t-ブチルヒドロペルオキシラジカルにより、ミクロソーム分画中の脂質の過酸化が進行する [48,49]。HPE および 4 種の抗酸化物質はチトクローム P-450 の活性には影響を及ぼさないことから、本反応系で脂質過酸化反応が抑制されたのは、反応系に添加した抗酸化物質により、脂質過酸化連鎖反応が抑制されたためであると考えられる。同定した 4 種の抗酸化物質のうち、最も脂溶性の大きい Trp が本反応系で最も顕著な抑制作用を示した。これは、脂質過酸化連鎖反応においては、過酸化脂質ラジカルに対する抗酸化物質の親和性とその抗酸化作用に大きく影響することによるものであると考えられる。また、Phe、Tyr、Trp、およびウラシルが示す脂質過酸化抑制作用の総和が HPE の抑制作用より小さかったことから、HPE 中には Phe、Tyr、Trp、およびウラシル以外に、脂質過酸化連鎖反応に対して抑制効果を示す抗酸化物質が存在する可能性が示唆された。

また、リノール酸の過酸化反応系においても、HPE の抑制効果と比べて 4 種の抗酸化物質の作用は顕著ではなかった。これは前述したように、HPE 中には脂質過酸化反応を強く抑制することができる未同定の抗酸化物質が存在することを示唆するものである。

タンパク質を構成するアミノ酸のアミノ基は、ROS との反応によりカルボニル基になることが知られている。このタンパク質の酸化に基づくカルボニル基の生成は、Fig. 19 に示すように、アミノ酸残基、特にヒスチジン、アルギニン、リジン、プロリンに結合した二価鉄イオンと過酸化水素によるものであることが示唆されている [50,51]。

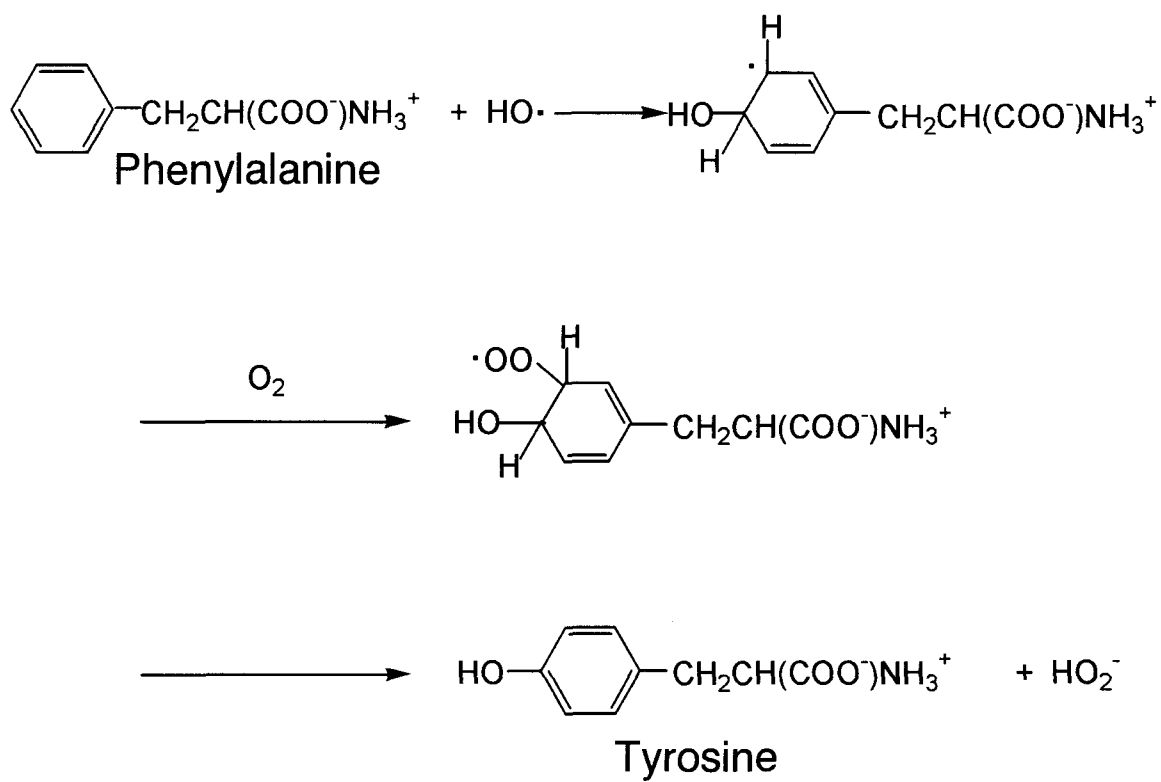


Fig.15 Reaction of phenylalanine with hydroxyl radical.

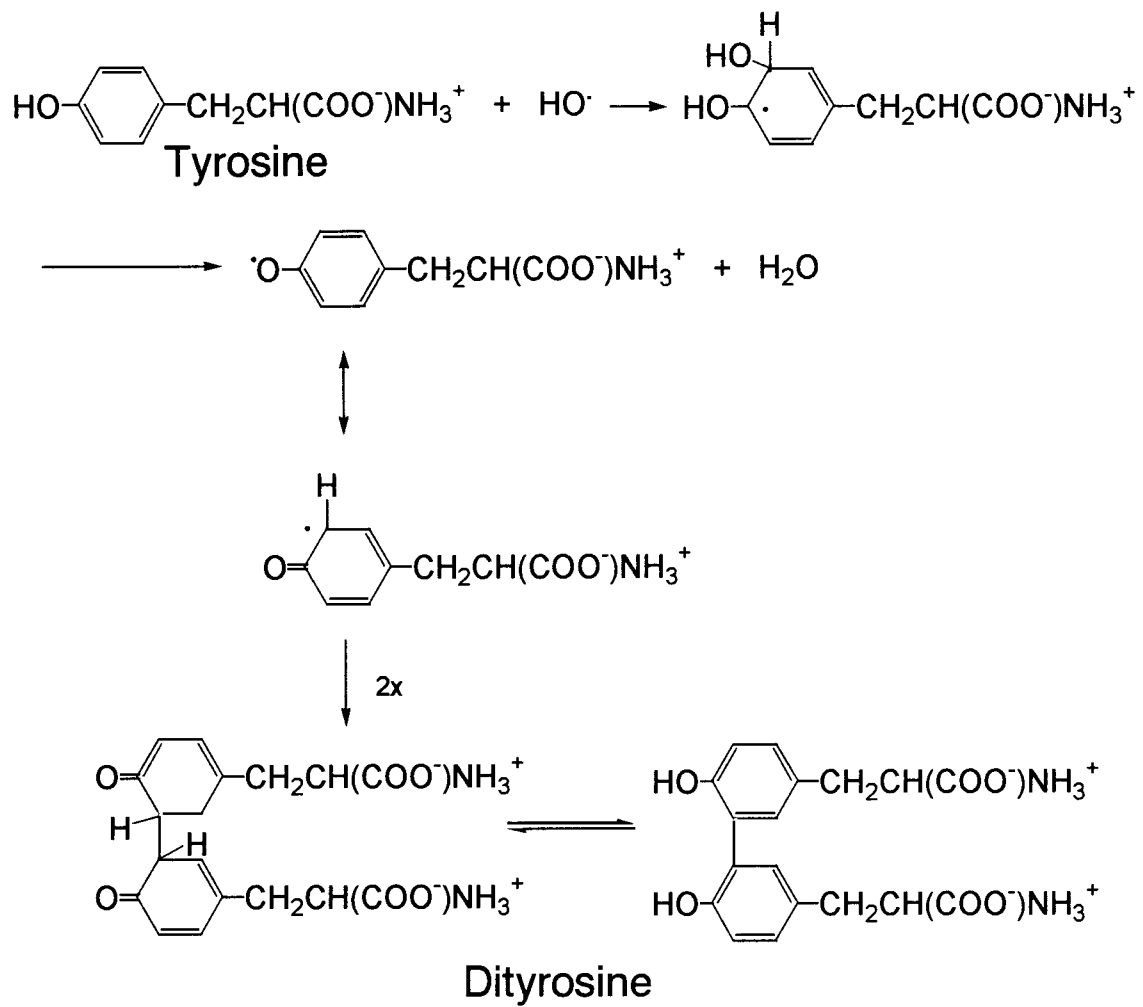


Fig.16 Reaction of tyrosine with hydroxyl radical.

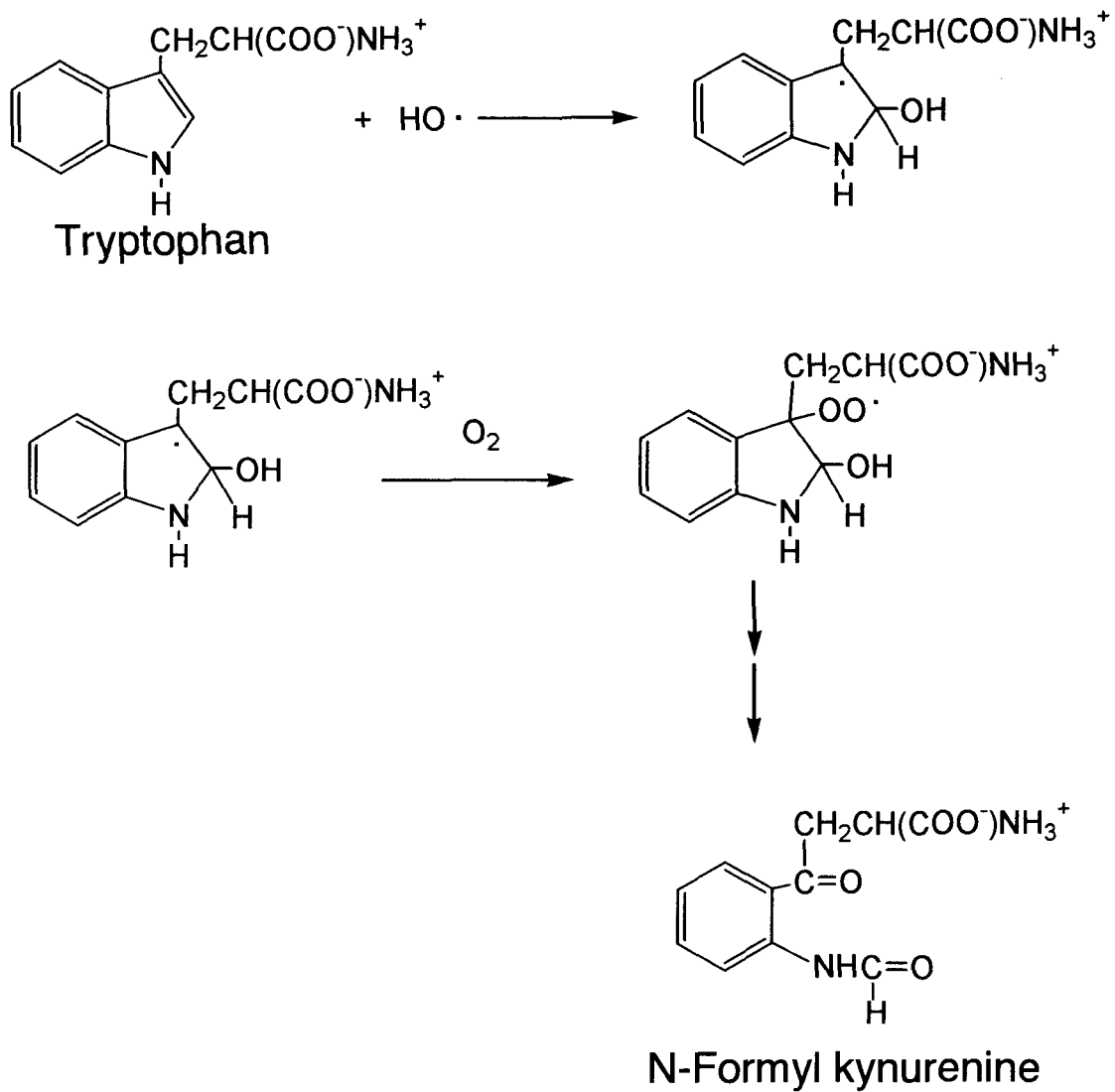


Fig.17 Reaction of tryptophan with hydroxyl radical.

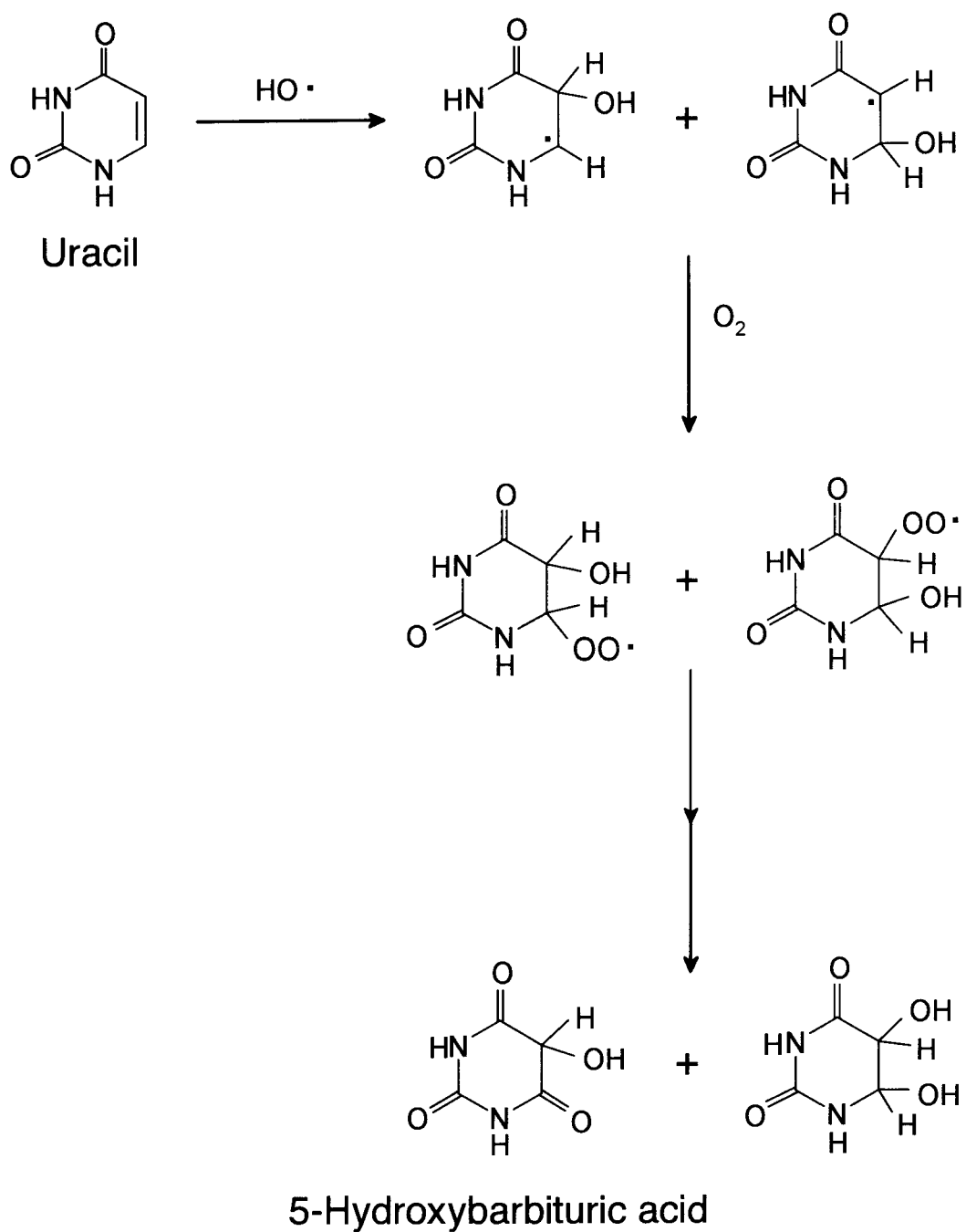


Fig.18 Reaction of uracil with hydroxyl radical.

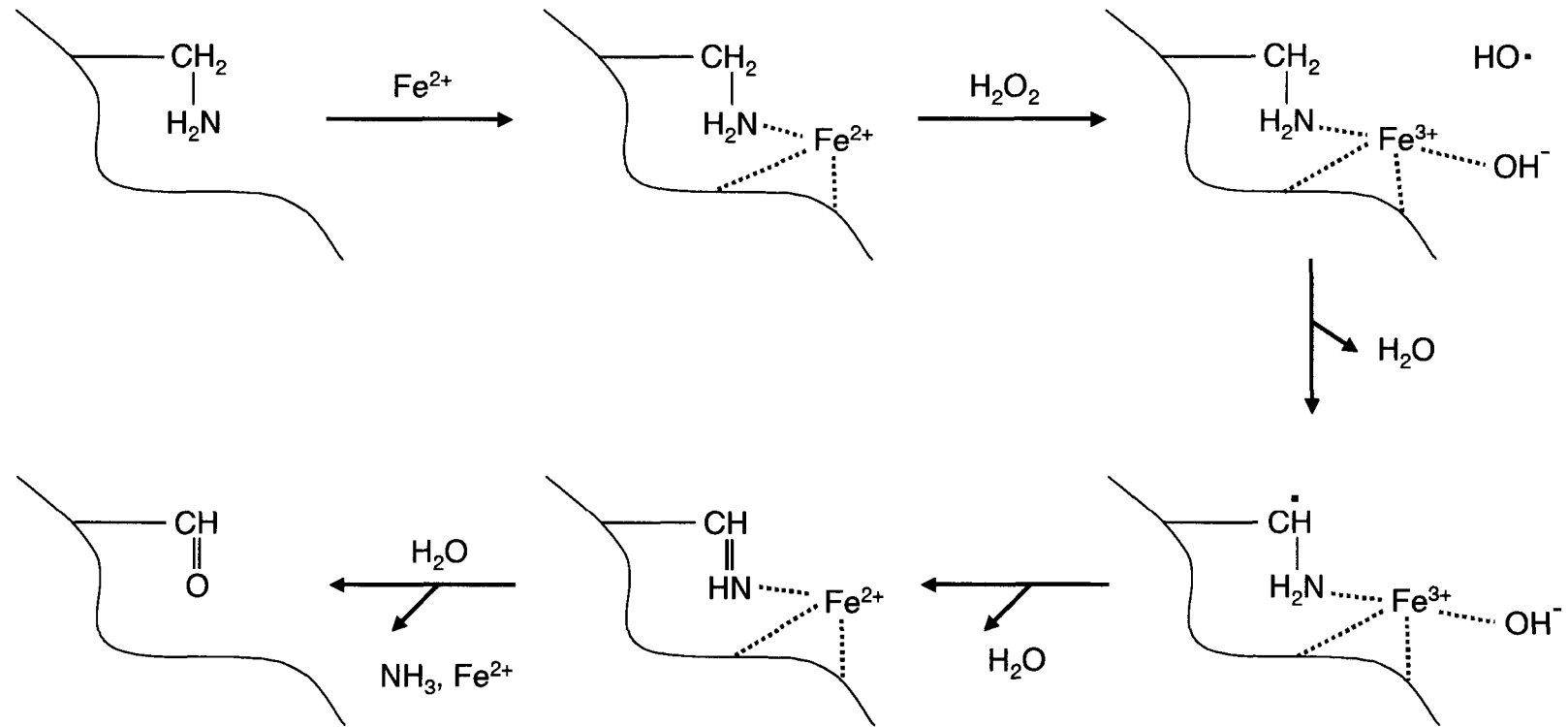


Fig.19 Schematic representation of proposed mechanism for protein oxidation.

従って、タンパク質中のカルボニル基を定量することにより、ROSによるタンパク質の酸化の程度を測定することができる [48,49]。 Fig. 14 に示すように、Fenton 反応によるラット肝臓の細胞質タンパク質の酸化反応に対して、各抗酸化物質はいずれも強い抑制作用を示し、その中では最も水溶性の大きいウラシルで顕著な効果が認められた。また、この抑制効果は第 1 節で述べた HO \cdot 捕捉作用より顕著であった。したがって、同定された HPE 中の 4 種の抗酸化物質は、酸化ストレス時の生体組織タンパク質の酸化に対して顕著な抑制作用を示すと思われる。その機構には HO \cdot の捕捉とともに、タンパク質中のフリーラジカルの捕捉も関与すると考えられる。さらに、各抗酸化物質の効果の総和が HPE の効果を上回ったことから、HPE 中には 4 種の抗酸化物質の抗酸化作用に対して、阻害的に働く因子が存在する可能性が示唆された。

実験の部

第 1 節の実験方法

1. 抗酸化活性の測定

第 1 章第 1 節の実験方法に示した方法を用いた。

第 2 節の実験方法

1. マウス肝臓細胞質画分の調製

第 1 章第 2 節の実験方法に示した方法を用いた。 ddY 系雄性マウスの肝臓を摘出し、生理食塩水中、テフロンホモジナイザーを用いて 10% ホモジネートを作成したのち、4°C で、105,000×g、1 時間遠心分離した上清を細胞質画分として実験に使用した。

2. ラット肝臓ミクロソーム画分の調製

Sprague-Dawley 雄性ラットの肝臓を摘出し、生理食塩水中、テフロンホモジナイザーで 10% ホモジネートを作成したのち、4°C で、9,000×g、30 分間遠心分離して得た上清を、さらに 4°C で、105,000×g、1 時間遠心分離した。その沈殿を生理食塩水中に懸濁したものをミクロソーム画分として実験に使用した。

3. チトクローム P-450 依存性脂質過酸化反応

各抗酸化物質を含有する 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に、ラット肝ミクロソーム画分 (1.0 mg protein) および t-ブチルヒドロペルオキシドを 1 mM となるように加えて全量 1.0 ml としたのち、37°C で 5 分間インキュベートした。インキュベート終了後、15% TCA - 0.375% TBA - 0.25 M 塩酸溶液 2.0 ml を加えて沸騰水浴中で 15 分間加熱したのち、直ちに室温まで冷却し、1,000×g で 10 分間遠心分離して得た上清について 535 nm における吸光度を測定した。生成した TBARS の濃度は分子吸光係数 ($\epsilon_{535} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて算出した [52,53]。

4. リノール酸ミセル溶液の調製

第1章第1節の実験方法に示した方法を用いた。

5. 共役ジエン法

第1章第1節の実験方法に示した方法を用いた。

なお、反応溶液の共役ジエン濃度は分子吸光係数 ($\epsilon_{234} = 2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を用いて算出した [32]。

第3節の実験方法

1. カルボニル化タンパク質の測定

ラット肝臓の細胞質画分 1.0 ml (6.2 mg protein) に硫酸第一鉄アンモニウムおよび過酸化水素をそれぞれ 2.6 mM および 0.15 M となるように加えたのち、10 mM ジニトロフェニルヒドラジン/2.5 M 塩酸溶液 2.0 ml を加え、15 分間おきに攪拌しながら室温下で 1 時間静置した。1 時間後に 20% TCA 溶液 2.5 ml を加えたのち、室温下、1,200 × g で 5 分間遠心分離を行った。分取した沈殿に酢酸エチルおよびエタノール混液 (1 : 1 v/v) 2.0 ml を加えて懸濁したのち、室温下、1,200 × g で 5 分遠心分離して得た沈殿に、6 M 塩酸グアニジン溶液 1.0 ml を加えて 37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート終了後、反応溶液を室温下、1,200 × g で 5 分間遠心分離したのち、その上清について 370 nm の吸光度を測定した。反応溶液中のカルボニル化タンパク質の濃度は以下の式を用いて算出した [54]。

$$C \text{ (nmol/ml)} = OD_{370} \times 45.45$$

試薬および機器

HPE はスノーデン (株)、t-ブチルヒドロペルオキシドは Sigma 社、その他の試薬は和光純薬工業のものをそれぞれ使用した。また、分光光度計は日立 U-2000 型を使用した。

第 4 章 HPE 中の抗酸化活性成分 (Phe、Tyr、Trp、ウラシル) の *in vivo* における作用

序説

急性および慢性のアルコール性肝障害の発生時には、肝臓組織の酸化ストレスが進行し、過酸化脂質の増加や GSH 量の減少などが生じる [55]。エタノールで誘発される肝臓組織の酸化ストレスには、エタノールやその代謝物であるアセトアルデヒドの代謝に伴う ROS の産生量の増加、および肝臓細胞における抗酸化能の低下による細胞内での ROS の増加が寄与する [56]。

著者は第 1 章において、エタノールによる急性肝障害と酸化ストレスの誘発に対して HPE の前投与が抑制的な効果を示すことを、マウスを用いた *in vivo* 実験で明らかにした。また第 2 章において、HPE に含有される 4 種の抗酸化物質を同定し、第 3 章ではその抗酸化作用を比較した。第 4 章では、これらの抗酸化物質をマウスに前投与し、エタノールの投与によって起こる急性肝障害と酸化ストレスの発生に対する各抗酸化物質の効果について検討した。

第 1 節 体重、肝重量比、過酸化脂質量および GSH 量

エタノールおよび 10% HPE 中の濃度に調製した各抗酸化物質を投与したときのマウスの体重、肝重量比、過酸化脂質量および GSH 量を Table 9 に示す。エタノールおよび各抗酸化物質の投与による体重の有意な変動は見られなかった。一方、体重 100 g 当たりの肝重量を表す肝重量比は、エタノールを投与した全ての群で増加したが、エタノール単独投与群の増加に対して、HPE 投与群、Trp 投与群および Tyr 投与群では増加の有意な抑制が認められた。

また、TBARS (MDA nmol) として算出した肝臓組織中の過酸化脂質量は、エタノール単独投与群では対照群の約 2.3 倍に増加し、この増加は各抗酸化物質の投与群ではいずれも有意に抑制された。一方、肝臓組織中の GSH 量はエタノール単独投与群で対照群の約 65% に減少し、これは HPE 投与群、Tyr 投与群およびウラシル投与群では有意に回復したが、他の抗酸化物質投与群では回復は認められなかった。

Table 9 Effects of antioxidants in HPE (uracil, tyrosine, phenylalanine, and tryptophan) on body weight, liver weight ratio, liver GSH, and liver TBARS of mice suffering from acute alcoholic liver injury.

Group number	Preadministration (p.o.)	EtOH administration (i.p.)	Body weight (g)	Liver weight ratio	Liver GSH	Liver TBARS
					(μ g/g liver)	
1	Distilled water (Control)	-	28.3 \pm 0.1 (100)	5.25 \pm 0.36 (100)	599.3 \pm 30.7 (100)	1.63 \pm 0.76 (100)
2	Distilled water	+	27.0 \pm 2.0 (95)	6.53 \pm 0.25# (124)	381.1 \pm 30.7# (64)	3.70 \pm 0.57 # (227)
3	HPE	+	27.7 \pm 3.3 (98)	6.17 \pm 0.07# ※ (118)	583.9 \pm 83.0 ※ (97)	1.50 \pm 0.31 ※ (92)
4	Phe	+	29.6 \pm 2.3 (105)	6.09 \pm 0.41# (116)	454.8 \pm 58.4# (76)	1.93 \pm 0.69 ※ (118)
5	Tyr	+	29.4 \pm 1.6 (104)	5.90 \pm 0.09# ※ (112)	436.4 \pm 40.0# ※ (73)	2.26 \pm 0.73 ※ (139)
6	Trp	+	28.7 \pm 0.3 (101)	5.98 \pm 0.12# ※ (113)	445.6 \pm 89.1# (74)	1.90 \pm 0.46 ※ (117)
7	Uracil	+	26.8 \pm 1.9 (95)	6.61 \pm 0.36# (126)	497.9 \pm 79.9# ※ (83)	2.69 \pm 0.74 # ※ (165)

Pretreatment of HPE was given 48 hr, 24 hr, and 15 min before the ethanol administration (3.95 g/kg body weight, i.p.). The data are expressed as means \pm S.E. of at least 4 mice. Liver weight ratio was calculated as follows: liver weight \times 100/ body weight.

#) Significantly different from the Group 1 ($p < 0.05$).

※) Significantly different from the Group 2 ($p < 0.05$).

第2節 血清中のトランスアミナーゼ活性および抗酸化酵素活性

エタノールおよび各抗酸化物質を投与した場合の、血清中のトランスアミナーゼ活性の変動を Fig. 20 の(A)および(B)に示す。GOT 活性はエタノール単独投与群では対照群の約 2.5 倍に上昇した。この上昇は HPE 投与群では有意に抑制されたが、他の抗酸化物質投与群では抑制は認められなかった。また、GPT 活性はエタノール単独投与群で対照群の約 4.3 倍に上昇し、これは HPE 投与群および Trp 投与群では有意に抑制された。一方、他の抗酸化物質投与群では抑制が認められなかった。

Fig. 20 の(C)に示すように、Cu/Zn-SOD 活性はエタノール単独投与群および Tyr 投与群では対照群に対して上昇したが、他の群では有意な変動は認められなかった。一方、catalase 活性はエタノール単独投与群では対照群の約 56% に低下し、この低下は HPE 投与群では有意に回復したが、他の投与群では有意な回復は認められなかった (Fig. 20 (D))。また、GPx 活性はエタノール単独投与群で対照群の約 35% に低下し、これは HPE 投与群、Phe 投与群、Tyr 投与群およびウラシル投与群で有意に回復したが、Trp 投与群では有意な回復は認められなかった (Fig. 20(E))。

以上のように、4 種の抗酸化物質のうち Trp のみがエタノールの投与による GPT 活性の上昇を有意に抑制した。そこで、Trp 以外の Phe、Tyr、ウラシルの混合溶液 (10% HPE 中の濃度比に合わせたもの) を投与した場合のエタノールによる血清中のトランスアミナーゼ活性の変動に対する効果を測定した (Fig. 21)。その結果、GOT 活性および GPT 活性はエタノール単独投与群で、それぞれ、対照群の約 1.7 倍および 3.5 倍に上昇し、これは HPE 投与群および Phe、Tyr、ウラシルの混合溶液投与群では有意に抑制された。

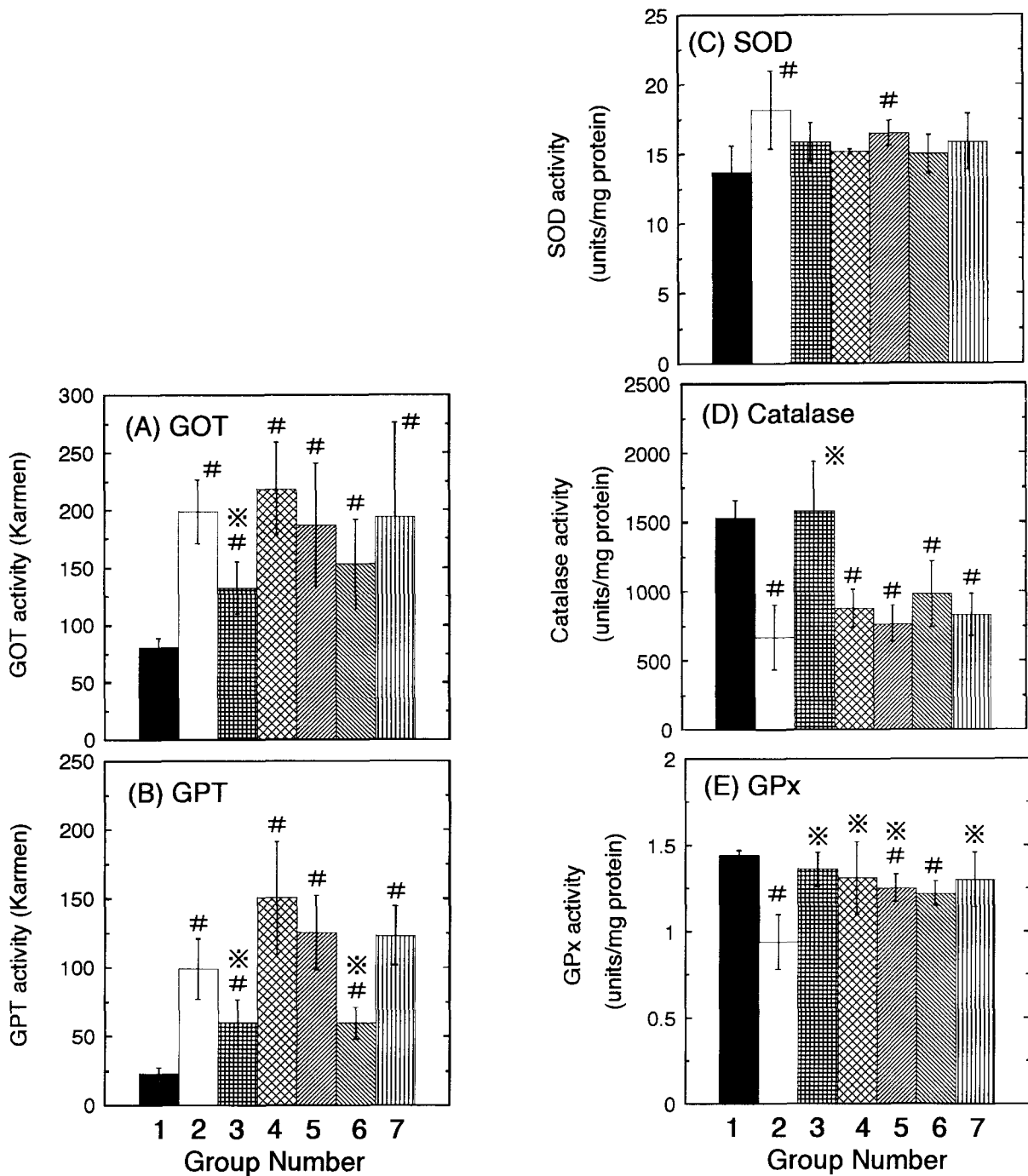


Fig. 20 Effects of Phe, Tyr, Trp, and Uracil on GOT and GPT activities in blood serum and SOD, catalase, and GPx activities in liver cytosol of mice suffering from acute alcoholic liver injury. Pretreatment of HPE was carried out 48 hr, 24 hr, and 15 min before ethanol administration (3.95 g/kg body weight, i.p.). The data are expressed as means \pm S.E. of at least 4 mice.

#) Significantly different from the Group 1 ($p < 0.05$). *) Significantly different from the Group 2 ($p < 0.05$).
 Group 1 (■): Distilled water (p.o.), Group 2 (□): EtOH (i.p.),
 Group 3 (▣): HPE (p.o.) + EtOH (i.p.), Group 4 (▤): Phe (p.o.) + EtOH (i.p.),
 Group 5 (▥): Tyr (p.o.) + EtOH (i.p.), Group 6 (▦): Trp (p.o.) + EtOH (i.p.),
 Group 7 (▧): Uracil (p.o.) + EtOH (i.p.).

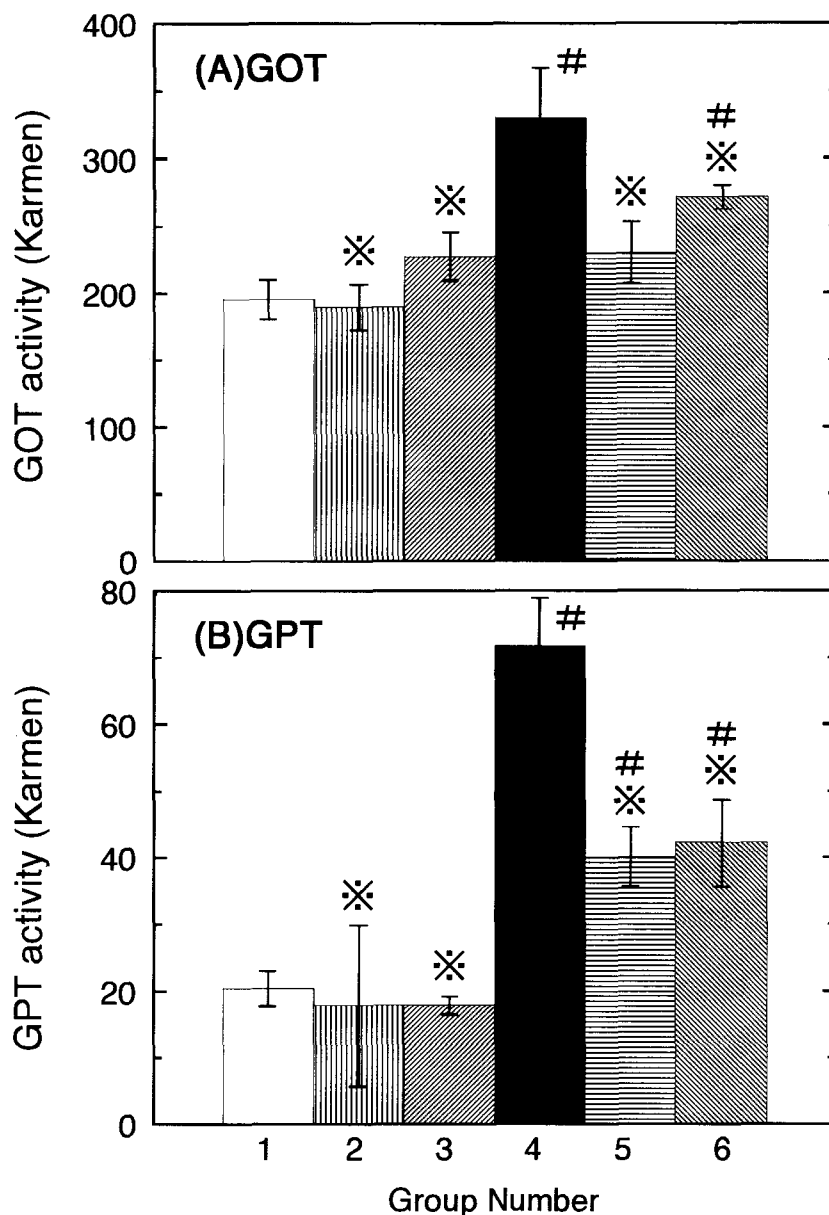


Fig. 21 Effects of HPE and mixture of Phe, Tyr, and Uracil on GOT and GPT activities in blood serum of mice suffering from acute alcoholic liver injury. Mixture contained Phe (110 $\mu\text{mol/kg}$), Tyr (41 $\mu\text{mol/kg}$), and uracil (13 $\mu\text{mol/kg}$). Pretreatment of HPE was carried out 48 hr, 24 hr, and 15 min before ethanol administration (3.95 g/kg body weight, i.p.). The data are expressed as means \pm S.E. of at least 4 mice.

#) Significantly different from the Group 1 ($p < 0.05$). *) Significantly different from the Group 4 ($p < 0.05$).

Group 1 (\square): Distilled water (p.o.), Group 2 (||||): HPE (p.o.), Group 3 (|||||): Mixture (p.o.),
 Group 4 (\blacksquare): EtOH (i.p.), Group 5 (|||||): HPE (p.o.) + EtOH (i.p.),
 Group 6 (|||||): Mixture (p.o.) + EtOH (i.p.).

第3節 考察

エタノール 86 mmol/kg を腹腔内に投与すると、24 時間後に肝障害のパラメーターである肝重量比および血清中のトランスアミナーゼ活性がいずれも増加したことから、急性肝障害が誘発されたことが認められた [57]。また同様に、肝臓組織中の過酸化脂質量の増加および GSH 量の減少が認められたことから、急性肝障害の誘発とともに、肝臓組織に酸化ストレスが生じていることも示唆された [58]。これに対して HPE を前投与した群では、エタノール単独投与群に対して、肝重量比、血清トランスアミナーゼ活性、肝臓組織の過酸化脂質量および GSH 量の変動がいずれも有意に抑制された。以上のことは、エタノールの投与による急性肝障害および酸化ストレスの誘発が、HPE の前投与によって抑制されたことを示すものと考えられる。

一方、HPE 中に含有される各抗酸化物質を前投与した場合にも、エタノールの投与による肝臓組織中の過酸化脂質量および GSH 量の変動がいずれも有意に抑制された。これは、エタノールによる酸化ストレスの誘発に対して、前投与した抗酸化物質が抑制的に働いたことを示すものと考えられる。Trp、Phe、Tyr、ウラシルを単独投与した場合には、Trp 投与群のみが GPT 活性の上昇を有意に抑制した。しかし、Trp を除く Phe、Tyr、ウラシルの混合溶液投与群でも、GOT 活性、および GPT 活性の上昇は有意に抑制された。以上の結果から、本研究で同定した HPE 中に含有される 4 種の抗酸化物質 (Trp、Phe、Tyr、ウラシル) は、エタノールの投与による急性肝障害の誘発に対して、何らかの複合的な作用により抑制作用を示したと考えられる。

Fig. 20 に示すように、エタノール単独投与群 (Group 2) では、細胞内の過酸化水素消去酵素である catalase の活性、および過酸化脂質や過酸化水素など過酸化物質の消去酵素である GPx の活性がいずれも対照群 (Group 1) に比べて低下した。以上の結果から、エタノールの投与による酸化ストレスの誘発機構のひとつは、抗酸化酵素活性の低下による組織細胞内の過酸化水素濃度の上昇であることが示唆された。

エタノールによる GPx 活性の低下に対して、Trp 以外の抗酸化物質を投与した群 (Group 3,4,5,7) では回復が認められた。したがって、本研究で同定した HPE 中の Phe、Tyr、およびウラシルは、いずれもエタノールによる抗酸化酵素活性の低下を抑制して、組織細胞内の過酸化水素濃度の上昇を抑制することにより、酸化ストレスの誘発を抑制したものと考えられる。

実験の部

第 1 節の実験方法

実験動物および飼育条件

5 週齢の ddY 系雄性マウス（東京実験動物）を 1 群 4 匹とし、1 週間予備飼育したのち実験に使用した。抗酸化物質前投与群には、それぞれ、HPE 2 g/kg、Phe 2.32 mmol/kg、Tyr 0.85 mmol/kg、Trp 0.56 mmol/kg、およびウラシル 0.24 mmol/kg を 1 日 1 回、24 時間おきに 3 日間連続して経口投与した。また、Phe、Tyr、およびウラシルの混合液を同様に 3 日間連続して経口投与した。対照群およびエタノール単独投与群には 0.01 M 塩酸溶液 0.3 ml を同様に投与した。各抗酸化物質の 3 回目の投与の 15 分後に対照群を除く各群にエタノール 86 mmol/kg（投与量 0.3 ml）を腹腔内に投与した。対照群にはエタノールのかわりに蒸留水 0.3 ml を腹腔内に投与した。エタノールを投与した 24 時間後に採血し、肝臓を分取した。肝臓はただちに氷冷した生理食塩水中に保存した。

なお、動物の取扱いは、「星薬科大学動物実験指針」に従った。

1. TBARS 量の測定

第 1 章第 2 節の実験方法に示した方法を用いた。

2. 肝サイトソール画分の調製

第 1 章第 2 節の実験方法に示した方法を用いた。

3. GSH 値の測定

第 1 章第 2 節の実験方法に示した方法を用いた。

第 2 節の実験方法

1. 酵素活性測定用試料溶液の調製

第 1 章第 2 節の実験方法に示した方法を用いた。

2. 血清中のトランスアミナーゼ活性の測定

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

3. Cu/Zn-SOD 活性の測定

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

4. カタラーゼ活性の測定

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

5. GPx 活性の測定

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

6. タンパク質含量の測定

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

7. 統計処理

第1章第2節の実験方法に示した方法を用いた。

試薬および機器

HPE はスノーデン（株）、NADPH はオリエンタル酵母工業、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン、キサントシン、xanthine oxidase (EC 1.1.3.22)、GSH、glutathione reductase (EC 1.6.4.2) は Sigma 社、その他の試薬は和光純薬工業のものをそれぞれ使用した。分光光度計は日立 U-2000 型、HPLC は日立 L-6000 ポンプ、L-4000 検出器、D-2500 データ処理装置をそれぞれ使用した。

第5章 HPE 中の高分子性抗酸化活性成分の精製・同定および作用

序説

著者は、第2章で HPE に含有される抗酸化物質として Phe、Tyr、Trp、およびウラシルを同定した。また、第3章および第4章で、それぞれ、*in vitro* および *in vivo* において、Phe、Tyr、Trp、およびウラシルが抗酸化活性を示すことを明らかにした。しかし HPE の HO・捕捉活性に対して、Phe、Tyr、Trp、およびウラシルの合計の HO・捕捉活性が占める割合は 59% であった。さらに、4 種の抗酸化物質の抗酸化活性を HPE と比較した *in vitro* および *in vivo* の実験結果からも、HPE 中には、同定した 4 種の抗酸化物質以外の抗酸化物質が存在すると考えられる。

低分子性の抗酸化活性成分については、主要な成分について精製・同定したと考えられることから、次に、高分子性と考えられる抗酸化成分について検討した。

第1節では、HPE に対して Sephadex G-10 を用いて、弱い吸着が生ずる条件下でクロマトグラフィーを行い、得られた抗酸化活性ピークについて逆相カラムを用いた HPLC を用いて精製した。その結果得られた 6 個の活性ピークについてアミノ酸配列を決定したところ、3 つおきにグリシンが出現する、グリシン-アミノ酸-アミノ酸 (Gly-X-Y) の繰り返し配列を示した。そこで、このアミノ酸配列に対して Blast Search によるホモロジー検索を行った結果、何れもコラーゲン由来のペプチド (コラーゲンペプチド) であることを明らかにした [59-61]。

第2節では、HPE の抗酸化活性に対するコラーゲンペプチドの関与を検討するため、ヒト胎盤由来の type IV コラーゲンをコラーゲナーゼを用いて分解し、その抗酸化活性の変化を調べた。その結果、コラーゲンは分解されることにより抗酸化活性が増大することを明らかにした [61]。

第3節では、HPE 中に存在すると考えられる未分解のコラーゲンの分解に伴う抗酸化活性の変化を検討するため、HPE を -20°C および 30°C で 20 日間インキュベートした場合の抗酸化活性を経時的に測定した。その結果、HPE を 30°C で 20 日間放置インキュベートした場合に、抗酸化活性が約 3 倍に増大することを明らかにした [61]。

第1節 コラーゲンペプチドの精製・同定

HPE 溶液を Sephadex G-10 を用いて、弱い吸着が生ずる条件の下でクロマトグラフィーを行った結果を Fig. 22 に示す。最初に出現する 280 nm に吸収を持つピークには強い抗酸化活性が認められた。この抗酸化活性のピークは、Sephadex G-10 を用いたクロマトグラフィーで溶出した抗酸化活性の約 20% を占めた。この最初の活性ピークの後に出現する主要な 4 つの活性ピークには、すでに同定した Phe、Tyr、Trp、およびウラシルが含まれることを、標準品を負荷することにより確認した。この未同定の抗酸化活性成分が含まれる最初のピークについて HPLC を用いて精製した。HPLC の溶出液について、280 nm における紫外吸収と抗酸化活性を測定した結果を Fig. 23 に示す。なお、Sephadex G-10 を用いたカラムクロマトグラフィーにおける抗酸化活性の回収率は約 100%であった。また、HPLC での活性の回収率は約 50%であった。

HPLC で分取された a~j のピークは、すべて抗酸化活性を示すことが認められた (Fig. 23)。これらのピークを分取してアミノ酸配列を測定した結果、ピーク e~j については、3つおきにグリシンが出現する Gly-X-Y の繰り返し配列が認められ、Blast Search によるホモロジー検索を行ったところ、何れもコラーゲンペプチドであった [59,60]。また、ピーク e~j の物質について電気泳動法を用いて分子量を測定した結果、分子量はいずれも約 25 kDa~43 kDa であった。なお、ピーク a~d に関しては分離が不十分なため混合物の状態であることから、アミノ酸配列を決定することはできなかった。なお、コラーゲンペプチドの抗酸化活性が HPE の活性に占める割合は、約 15% であった。

第2節 コラーゲンの酵素分解による抗酸化活性の上昇

第1節の結果から、コラーゲンの加水分解により抗酸化活性を示すペプチドが生成する可能性があると考えられる。そこで、これを確認するため、ヒト胎盤由来の type IV コラーゲン標準品にコラーゲナーゼを添加し、pH 7.0、37°C の条件下で 2 時間加温した場合の抗酸化活性を経時的に測定した。その結果を Fig. 24 に示す。抗酸化活性は経時的に増加し、30 分加温した場合の抗酸化活性は、コラーゲンの約 13 倍に増

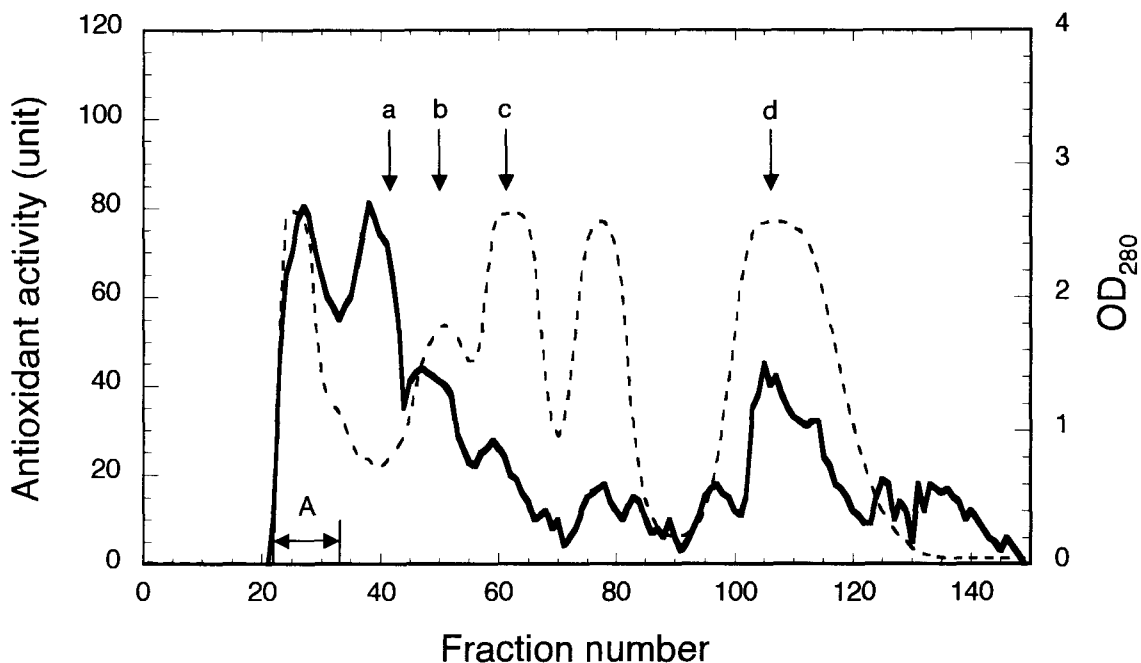


Fig. 22 Sephadex G-10 chromatography of HPE. HPE was subjected to Sephadex G-10 chromatography. Column size; 824 × ϕ 30 mm (582 cm³), eluent; distilled water, flow rate; 30 ml/hr, and sample volume; 30 ml. UV absorbance at 280 nm (-----) of each fraction was measured by Hitachi U-2000 spectrometer. Zone A was composed of fractions from No.23 to No.33. Antioxidant activity (—) is expressed as μ mol equivalence of mannitol by the deoxyribose method. Arrows a, b, c, and d indicate elution position of phenylalanine, tyrosine, uracil, and tryptophan, respectively.

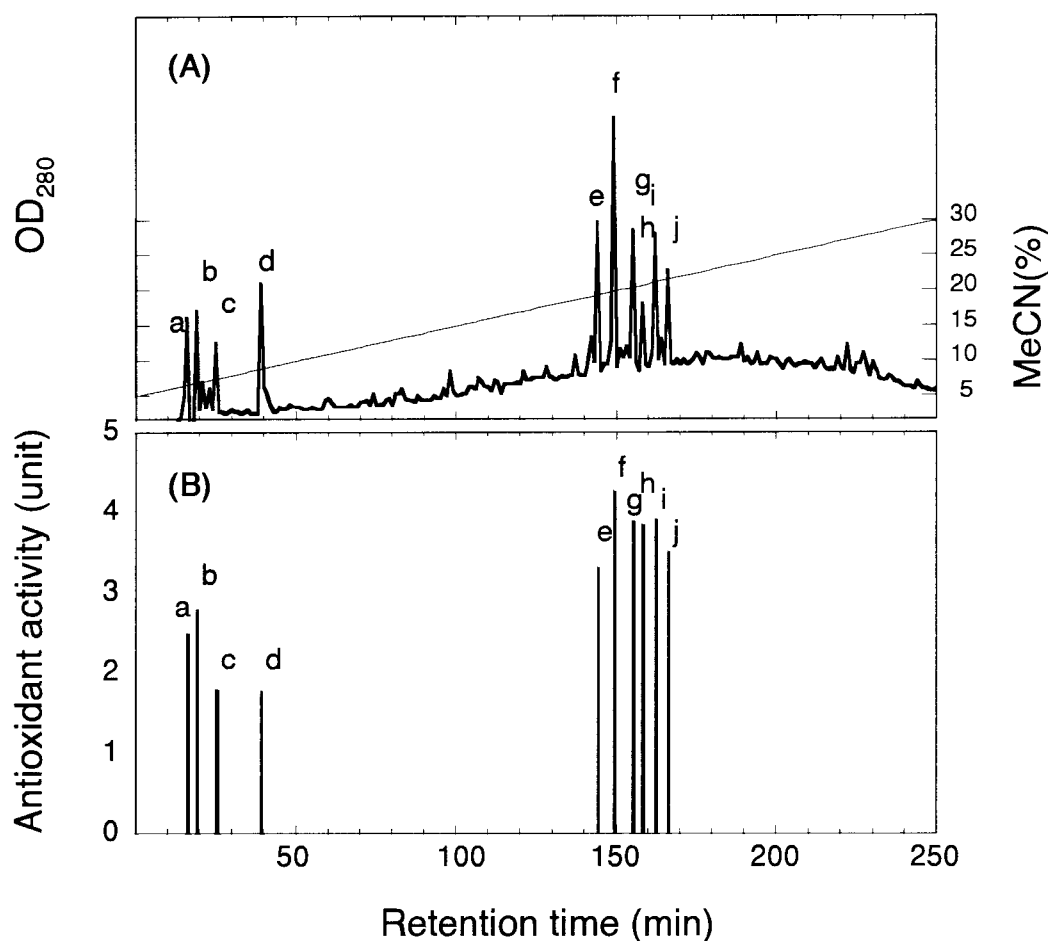


Fig. 23 Separation of antioxidants in HPE by HPLC (A) and antioxidant activity of the peaks (B). Sample derived from zone A fraction in Fig. 22 was subjected to RP-HPLC. Column; ODS Mightysil RP-18 GP (5 μm), column size; $250 \times \phi 10 \text{ mm}$ (19.6 cm^3), eluent; linear gradient of acetonitrile in distilled water (5-30% (v/v)) containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid, flow rate; 1.0 ml/min for 250 minutes, and sample volume; 2 ml. UV absorbance at 280 nm of each fraction was measured by the UV detector. Antioxidant activity is expressed as μmol equivalence of mannitol by the deoxyribose method.

Table 10 Amino acid sequence of antioxidants (peaks e, f, g, h, i, and j) separated by HPLC.

Sample	Residue																Homologue
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Peak e	G	I*	Hyp	G	V	Hyp	G	H*	A*	G	E	Y*	G	A*	Hyp	G	Type IV collagen
Peak f	G	L	Hyp	G	Q	I*	G	A	Hyp	G	A*	Hyp	G	L*	A*	G	Type IV collagen
Peak g	G	A	Hyp*	G	F	Hyp	G	N*	A	G	A*	Hyp*	G	P	A*	G	Type II collagen
Peak h	G	L	Hyp	G	K*	Hyp	G	A*	Hyp	G	A*	Hyp	G	P	A*	G	Type IV collagen
Peak i	G	D	K	G	N*	V*	K*	A*	Hyp	G	V	K*	G	P	A*	G	Type IV collagen
Peak j	G	P	Hyp	G	P	Q*	G	A*	Hyp	G	E*	Hyp*	G	P	Hyp	G	Type V collagen

Amino acid sequence and molecular weight of antioxidants (peaks e, f, g, h, i, and j) separated by HPLC were measured. The homologue sequence reported in this paper are available from computer comparisons using BLAST. The collagen-like glycine repeats are identified. *: Residues that could not agreed with the homologue sequence.

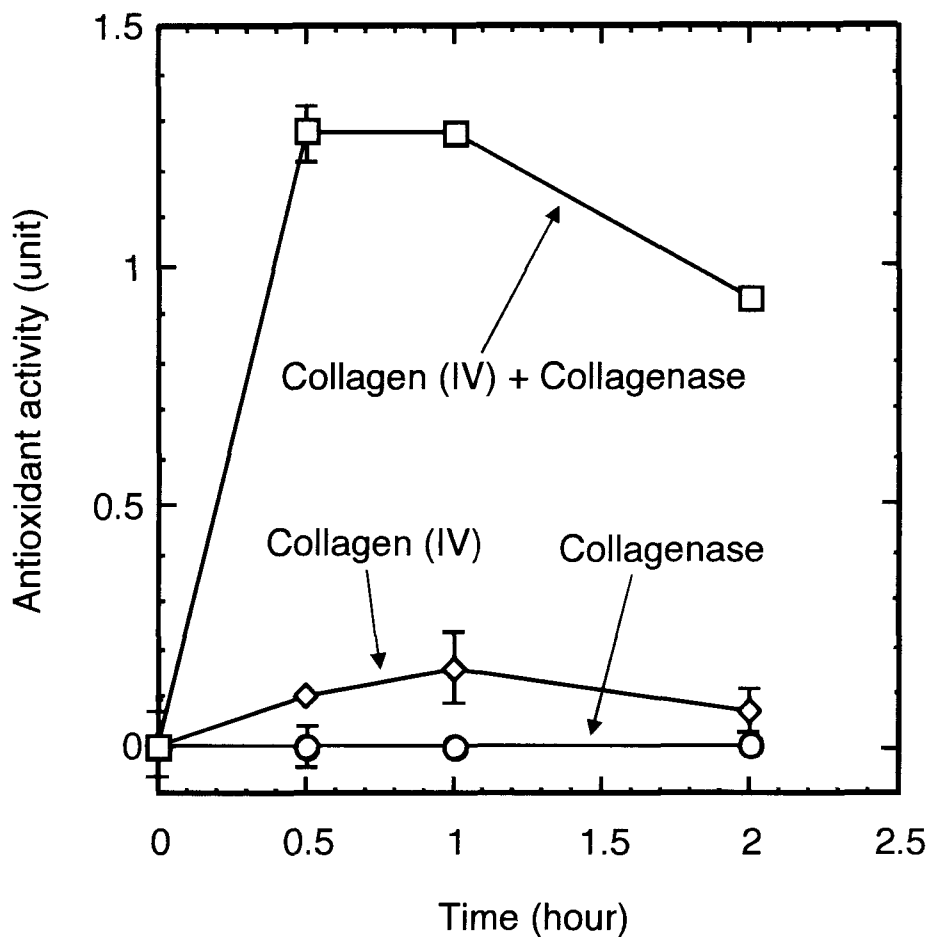


Fig. 24 Effect of collagenase treatment on antioxidant activity of collagen (IV). Type IV collagen (0.4 nmol) alone (\diamond), 0.8 units of *clostridium histolyticum* collagenase alone (\circ), and type IV collagen (0.4 nmol) coexisted with 0.8 units of *clostridium histolyticum* collagenase (\square) were incubated at 37°C at pH 7.0, and at the time indicated, antioxidant activity of the reaction mixture was determined by the deoxyribose method. Antioxidant activity is expressed as μmol equivalence of mannitol. Error bars indicate S.D. for triplicate.

大した [61]。

第3節 インキュベートによる HPE の抗酸化活性の上昇

HPE に含有される成分が、酵素的あるいは物理化学的に分解されて抗酸化活性を示す物質となることを明らかにするため、HPE を -20°C および 30°C で 20 日間インキュベートした際の抗酸化活性を経時的に測定した。その結果、HPE を 30°C でインキュベートした場合には、抗酸化活性が約 3 倍に増大した (Fig. 25)。

第4節 考察

第1節では、HPE 中の未同定の抗酸化物質のうち、比較的高濃度に存在するものについて、弱い吸着が生ずる条件下でカラムクロマトグラフィー、および HPLC を用いて単離・精製し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、分子量が約 25 kDa から 43 kDa の 6 種類のコラーゲンペプチドが抗酸化物質として確認された。このコラーゲンペプチドが抗酸化物質であることを示唆した報告はこれまでになく、著者が最初のものである。

第2節では、コラーゲンがコラーゲナーゼによりペプチドに分解されると、抗酸化活性が増大した。すなわち、コラーゲン自身はほとんど抗酸化活性を示さないが、コラーゲナーゼによりペプチドに分解されると、コラーゲンの抗酸化活性により、反応溶液の抗酸化作用が増加したものと考えられる。また、第3節で認められたインキュベートによる HPE の抗酸化活性の上昇は、HPE に含有される未分解のコラーゲンが、HPE 中に混在するコラーゲナーゼにより分解したか、あるいは 30°C のインキュベートによる物理化学的な影響により分解して、コラーゲンペプチドが生成・増加したためであると考えられる。

コラーゲンの特徴は Gly-X-Y の繰り返し配列であるが、X にプロリン (Pro)、Y にヒドロキシプロリン (Hyp) が高頻度で並んでいる [59,60]。HO \cdot は、コラーゲン中の Pro および Hyp の側鎖 ($-\text{CHRR}'$, R=side chain) や α 炭素 ($-\text{C}(\text{R})(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$, $-\text{C}=\alpha$ -carbon) と反応することが報告されている [62]。したがって、ペプチドが抗酸化作用にはコラーゲン中の Pro および Hyp が関与すると考えられる。コラーゲン

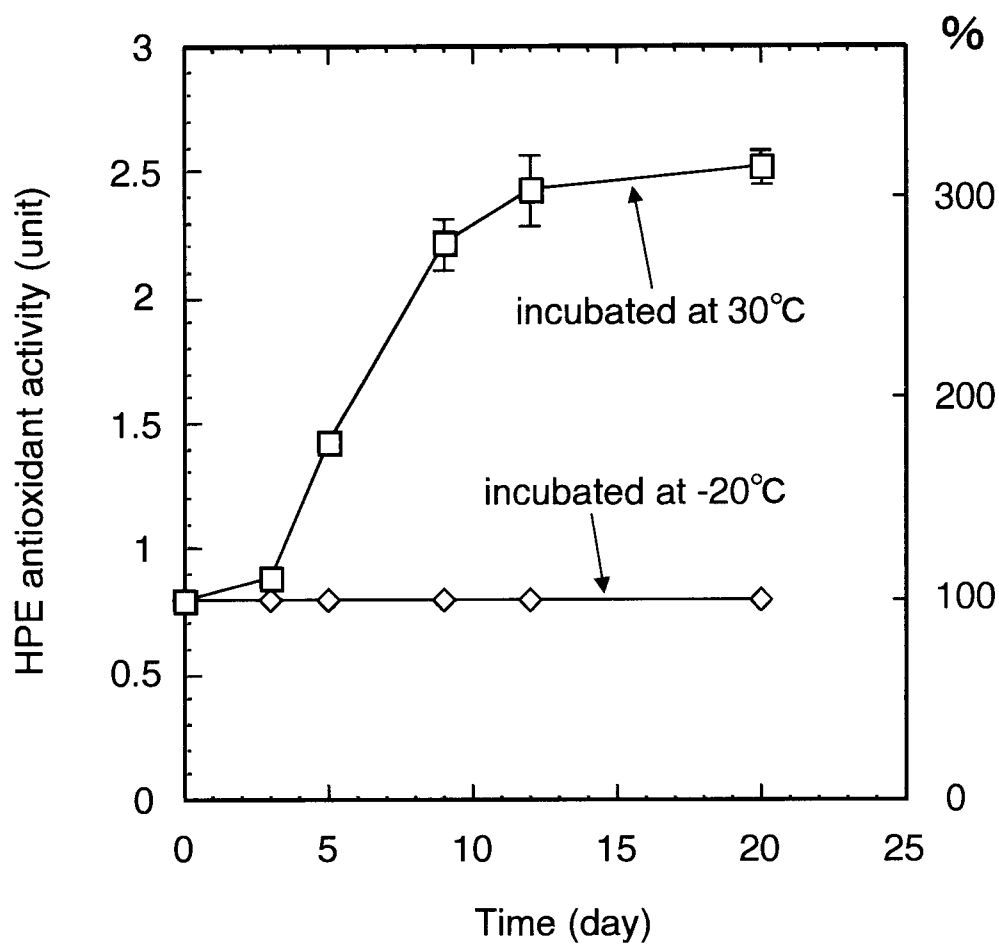


Fig. 25 Increase in antioxidant activity of HPE during the incubation. HPE containing 0.8 units of antioxidant activity was incubated at 30°C (□) or -20°C (◇), and at the time indicated, antioxidant activity of the HPE was determined by the deoxyribose method. Antioxidant activity is expressed as μmol equivalence of mannitol. Error bars indicate S.D. for triplicate.

は、分子量約 10 万のポリペプチド 3 本からなる非水溶性の高分子であり [59,60]、加温あるいは酵素の存在により分解してペプチドとなることが知られている。このコラーゲンペプチドが関節炎やリュウマチの症状を改善することが報告されているが [63,64]、本章の結果から、コラーゲンペプチドの抗炎症作用には、その抗酸化能が寄与していると考えられる。

実験の部

第 1 節の実験方法

1. デオキシリボース法

第 1 章第 1 節の実験方法に示した方法を用いた。

なお、抗酸化活性 1 unit は、1 μmol のマンニトールが示す値（コントロールの吸光度値 - 1 μmol のマンニトールに基づく吸光度値）と定義した。

2. コラーゲンペプチドの精製および同定

1) カラムクロマトグラフィー

HPE 30 ml を Sephadex G-10 を充填したカラム (30 ϕ \times 824 mm, 582 ml) を用いて蒸留水を溶出溶媒としてクロマトグラフィーを行い、溶出液を 10 ml ずつ分取した。溶出液の 280 nm における紫外部吸収を測定したのち、上記 1 の方法で抗酸化活性を測定した。

2) HPLC

カラムには関東化学の Mightysil RP-18GP (5 μm -pour size, 10 ϕ \times 250 mm) を使用した。溶出溶媒には 0.1% TFA 含有 5% アセトニトリルから 0.1% TFA 含有 30% アセトニトリルのリニアグラジェント (250 分) を用い、1.0 ml/min の流速で溶出した。溶出液について、280 nm における吸収を測定した。

3) 分子量の測定

上記の HPLC で得られたサンプルについて、13% SDS-PAGE (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた電気泳動法によって、分子量マーカー (Amersham Pharmacia Biotech) との比較から分子量を測定した。

4) アミノ酸配列の決定

アミノ酸シーケンサーは、自動エドマン分解法を用いた Procise cLC (PE Applied Biosystems) を用いた。また、アミノ酸配列のホモロジー検索にはコンピューター検索ソフトである BLAST を用いた。

第 2 節の実験方法

ヒト胎盤由来の type IV コラーゲン (0.4 nmol) にコラーゲナーゼ (0.8 units) を添加して、pH 7.0、37°C の条件下で 2 時間加温した。反応開始後、0、0.5、1、および 2 hr 後におけるコラーゲン単独、コラーゲン+コラーゲナーゼ、およびコラーゲナーゼ単独の抗酸化活性を、デオキシリボース法を用いて測定した。

第 3 節の実験方法

HPE (抗酸化活性 0.8 units) を -20°C および 30°C でインキュベートし、インキュベート開始後、0、3、5、9、12 および 20 日目の抗酸化活性をデオキシリボース法を用いて測定した。

試薬および機器

ヒト胎盤由来の type IV コラーゲンは Sigma 社製、細菌 (*clostridium histolyticum*) 由来のコラーゲナーゼ (EC 3.4.24.3) は Worthington 社製を使用した。その他の試薬は、和光純薬工業特級を使用した。

結 論

本論文で、著者は以下の知見を得た。

1. HPE が共役ジエン法およびデオキシリボース法で抗酸化作用を示したことから、HPE は *in vitro* で抗酸化作用を示し、また水溶性および脂溶性の抗酸化物質を含有するとが明らかとなった。
2. HPE が、マウスを用いた *in vivo* の系において、ROS が関与するエタノール肝障害時の肝臓中の GSH 量の減少、TBARS の増大、血清中の GOT・GPT 活性の増大、カタラーゼおよび GPx 活性の低減を抑制したことから、HPE は *in vivo* でも抗酸化作用を示すことが明らかとなった。
3. HPE に含有される主要な抗酸化物質として、Phe、Tyr、Trp およびウラシルが同定され、Phe が HPE 溶液の抗酸化能に最も強く寄与していることが明らかとなった。
4. Phe、Tyr、Trp およびウラシルが、単独でマウスに投与した場合でもエタノールにより誘発される肝臓中の過酸化脂質量の増加を抑制し、Phe、Tyr、およびウラシルが、抗酸化酵素である GPx 活性のエタノールによる低下を抑制したことから、エタノールにより誘発される肝臓の酸化ストレスに対する HPE の抑制作用には、抗酸化酵素活性の回復が関与することが明らかとなった。
5. HPE 中の抗酸化物質としてコラーゲンペプチド単離・精製して同定し、さらにコラーゲンのコラーゲナーゼによるペプチドへの分解に伴って抗酸化活性が上昇したことから、コラーゲンの分解によるコラーゲンペプチドが HPE の抗酸化活性に寄与することが明らかとなった。

本研究で得られた結果より、HPE 中の主要な 5 種の抗酸化物質とその抗酸化作用機構の一端が明らかとなった。これは、HPE の抗酸化作用に関する今後の詳細な検討のための基礎的知見を与えるものであり、また、未同定の抗酸化物質や抗肝障害因子の存在の可能性を明らかとしたことは、HPE 中の新たな活性因子を検討する指標のひとつとなるものである。

謝 辞

本研究にあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始ご指導ご鞭撻を賜りました星薬科大学衛生化学教室教授 福井哲也博士に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、終始ご指導ご鞭撻を頂きました星薬科大学衛生化学教室助教授 高橋典子博士、並びに助手 渡辺 聡博士に深く感謝申し上げます。

更に、本研究の遂行にあたり、貴重な助言を頂くと共に解析に御尽力頂いた星薬科大学有機合成化学研究室教授 東山公男博士、星薬科大学薬学教育研究センター薬剤師教育研究部門助教授 嶋原淳博士、長岡工業高等専門学校物質工学科教授 岩間正典博士に深く感謝申し上げます。

また、HPE を提供して頂いたスノーデン（株）に感謝の意を表します。

終わりに臨み、本研究に対し終始ご協力を頂きました星薬科大学衛生化学教室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

発表論文目録

本研究は以下の論文に公表した。

1. Togashi, S., Takahashi, N., Kubo, Y., Shigihara, A., Higashiyama, K., Watanabe, S. and Fukui, T. (2000) Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts. *J. Health Sci.*, **46 (2)**, 117-125.
2. Watanabe, S., Togashi, S., Takahashi, N. and Fukui, T. (2002) L-Tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 36-39.
3. Togashi, S., Takahashi, N., Watanabe, S., Ishiguro, A. and Fukui, T. (2000) Suppressive effects of uracil, tyrosine, and phenylalanine contained in human-placenta extract on acute ethanol-induced liver injury in mice. *J. Health Sci.*, **46 (2)**, 126-131.
4. Togashi, S., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K. and Fukui, T. (2002) Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta*, **23 (6)**, 497-502.

引用文献

1. 谷口直之, 遠藤 猛, “酸化ストレス・レドックスの生化学,”谷口直之, 淀井淳司編、共立出版, 東京, 2000, pp.1-11.
2. 井上正康, “活性酸素と医食同源,”井上正康編, 共立出版, 東京, 1996, pp.1-13.
3. Cilento, G. and Adam, W. (1995) From free radicals to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 103-114.
4. Vendemiale, G., Grattagliano, I. and Altomare, E. (1999) An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, **29**, 49-55.
5. Kukreja, R.C. and Hess, M.L. (1992) The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc. Res.*, **26**, 641-655.
6. Rikans, L.E. and Hornbrook, K.R. (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1362**, 116-127.
7. Halliwell, B. (1998) Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radic. Res.*, **29**, 469-486.
8. Sato, H., Ide, H., Fukushima, T., Tabata, M., Sekine, F., Kobayashi, K., Negishi, M. and Niwa, Y. (1988) Antioxidant activity of synovial fluid, hyaluronic acid, and two subcomponents of hyaluronic acid. Synovial fluid scavenging effect is enhanced in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.*, **31**, 63-71.
9. de Groot, H. (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology*, **41**, 328-332.
10. Halliwell, B. (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.*, **1**, 358-364.
11. Halliwell, B. (1989) Tell me about free radicals, doctor: a review. *J. R. Soc. Med.*, **82**, 747-752.
12. Halliwell, B. (1989) Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.*,

- 70**, 737-757.
13. Halliwell, B. (1989) Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta. Neurol. Scand. Suppl.*, **126**, 23-33.
 14. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **280**, 1-8.
 15. Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am. J. Med.*, **91**, 14S-22S.
 16. Herrera, E. (2000) Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **54 Suppl. 1**, S47-51.
 17. Qanungo, S. and Mukherjea, M. (2000) Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues. *Mol. Cell Biochem.*, **215**, 11-19.
 18. Qanungo, S., Sen, A. and Mukherjea, M. (1999) Antioxidant status and lipid peroxidation in human fetoplacental unit. *Clin. Chim. Acta.*, **285**, 1-12.
 19. 小田切優樹, 内山成人, 今井輝子, 内村順茂 (1987) Indomethacin 潰瘍に対する人胎盤抽出液(PLP 注)の効果. *応用薬理*, **33**, 621-629.
 20. 伊藤泰美, 松田良蔵, 西崎郁夫 (1988) プラセンタエキス中の活性成分の検討. *粧技誌*, **22**, 109-117.
 21. 伊藤泰美 (1990) プラセンタの機能と美白効果. *フレグランスジャーナル*, **6**, 67-71.
 22. 伊藤泰美, 松田良蔵, 西崎郁夫 (1990) プラセンタエキス中の活性成分の検討 (第II報)ーデキストラン、ヒスタミン、ブラジキニンおよびアラキドン酸誘発浮腫に対するプラセンタエキスの影響ー. *粧技誌*, **23**, 267-271.
 23. 波多江慎吉, 三島豊 (1990) 胎盤抽出液のメラニン生成抑制作用. *フレグランスジャーナル*, **6**, 105-108.
 24. Togashi, S., Takahashi, N., Kubo, Y., Shigihara, A., Higashiyama, K., Watanabe, S. and Fukui, T. (2000) Purification and identification of antioxidant substances

- in human-placenta extracts. *J. Health Sci.*, **46**, 117-25.
25. Watanabe, S., Togashi, S., Takahashi, N. and Fukui, T. (2002) L-Tryptophan as an antioxidant in human placenta extract. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **48**, 36-39.
 26. Togashi, S., Takahashi, N., Watanabe, S., Ishiguro, A. and Fukui, T. (2000) Suppressive effects of uracil, tyrosine, and phenylalanine contained in human-placenta extract on acute ethanol-induced liver injury in mice. *J. Health Sci.*, **46**, 126-131.
 27. Giroto, G. and Malinverni, W. (1982) Use of placental extract for the treatment of myopic and senile chorio-retinal dystrophies. *Int. J. Tissue React*, **4**, 169-172.
 28. 日本医薬情報センター編, “医療薬日本医薬品,” 薬業時報社, 東京, 2000, pp.798-799.
 29. Banerjee, K., Bharadwaj, D., Ghosh, D.P. and Hati, R.N. (1990) Effect of human placental extract 'Placentrex' on experimental inflammation. *Indian Med. Gaz.*, **124**, 243-244.
 30. 丹羽鞠負 (1988) 皮膚組織賦活化因子の検討—細胞膜レベルでの酵素活性および生理活性物質の影響を中心に—. フレグランスジャーナル, **16**, 30-40.
 31. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. and Symons, M.C.R. (1991) Techniques in free radical research. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.*, Vol. 22, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 78-81.
 32. Kharasch, E.D. and Novak, R.F. (1985) Mitoxantrone and ametantrone inhibit hydroperoxide-dependent initiation and propagation reactions in fatty acid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, **260**, 10645-10652.
 33. Taniguchi, M. and Hara, T. (1983) Effects of riboflavin and selenium deficiencies on glutathione and its relating enzyme activities with respect to lipid peroxide content of rat livers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 283-292.
 34. Newton, G.L., Dorian, R. and Fahey, R.C. (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **114**, 383-387.
 35. Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **44**,

- 276-287.
36. Beers, R.F., Jr. and Sizer, I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, **195**, 133-140.
 37. Lawrence, R.A. and Burk, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-958.
 38. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 39. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.*, **307**, 108-112.
 40. Davies, M.J. and Dean, R.T. (1997) *Radical-Mediated Protein Oxidation*, Oxford University Press, New York, pp.44-45.
 41. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) The Chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, pp.55-60.
 42. 二木鋭雄, “活性酸素,” 八木國夫, 中野稔監修, 医歯薬出版, 東京, 1987, pp.9.
 43. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. and Aruoma, O.I. (1987) The Deoxyribose Method: a simple "Test-Tube" assay for determination of rate constants of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.*, **165**, 215-219.
 44. Halliwell, B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.*, **31**, 261-272.
 45. Mylonas, C. and Kouretas, D. (1999) Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, **13**, 295-309.
 46. Poeggeler, B., Pappolla, M.A., Hardeland, R., Rassoulpour, A., Hodgkins, P.S., Guidetti, P. and Schwarcz, R. (1999) Indole-3-propionate: a potent hydroxyl radical scavenger in rat brain. *Brain Res.*, **815**, 382-388.
 47. Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T. and Symons, M.C.R. (1991) Techniques in free radical research. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 22, Elsevier Press, Amsterdam, pp. 41-44.

48. Cadenas, E. and Sies, H. (1982) Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. Relation to microsomal hemoproteins, oxygen dependence, and lipid peroxidation. *Eur. J. Biochem.*, **124**, 349-356.
49. Minotti, G. (1989) tert-Butyl hydroperoxide-dependent microsomal release of iron and lipid peroxidation. II. Evidence for the involvement of nonheme, nonferritin iron in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **273**, 144-147.
50. Stadtman, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.*, **9**, 315-325.
51. Stadtman, E.R. (1992) Protein oxidation and aging. *Science*, **257**, 1220-1224.
52. Davis, J.B. and Bowyer, D.E. (1989) Macrophages modify beta-VLDL by proteolysis and enhance subsequent lipid accumulation in arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **77**, 203-208.
53. Fraga, C.G., Leibovitz, B.E. and Tappel, A.L. (1988) Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic. Biol. Med.*, **4**, 155-161.
54. Reznick, A.Z. and Packer, L. (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, **233**, 357-363.
55. Shaw, S., Rubin, K.P. and Lieber, C.S. (1983) Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. Evidence of lipid peroxidation. *Dig. Dis. Sci.*, **28**, 585-589.
56. Boveris, A., Fraga, C.G., Varsavsky, A.I. and Koch, O.R. (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.*, **227**, 534-41.
57. Kitajima, S., Ogawa, N. and Ariyoshi, T. (1994) Protective effect of Trionyx carapax on CCl₄-induced hepatic injury is mediated by uracil. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **84**, 203-22..
58. Harkany, T., Sasvari, M. and Nyakas, C. (1997) Chronic ethanol

- ingestion-induced changes in open-field behavior and oxidative stress in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **58**, 195-201.
59. Gross, J. (1974) Collagen biology: structure, degradation, and disease. *Harvey Lect.*, **68**, 351-432.
 60. Miller, E.J. and Gay, S. (1982) Collagen: an overview. *Methods Enzymol.*, **82**, 3-32.
 61. Togashi, S., Takahashi, N., Iwama, M., Watanabe, S., Tamagawa, K. and Fukui, T. (2002) Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta*, **23**, 497-502.
 62. Hawkins, C.L. and Davies, M.J. (1997) Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage? *Biochim. Biophys. Acta.*, **1360**, 84-96.
 63. Moskowitz, R.W. (2000) Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis Rheum.*, **30**, 87-99.
 64. Trentham, D.E., Dynesius-Trentham, R.A., Orav, E.J., Combitchi, D., Lorenzo, C., Sewell, K.L., Hafler, D.A. and Weiner, H.L. (1993) Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*, **261**, 1727-1730.