

放射線全身照射に伴うマウス血清と癌部局所照射に
伴う担癌マウス血清の脂質過酸化物
(TBA 反応陽性物質)並びに脂肪酸組成の変動

山本 剛 禧

Lipid Peroxides (TBA reactive substances) and Fatty Acid Compositions
in Mouse Serum with Whole-body Irradiation
and in Tumor-bearing Mouse Serum with Local Irradiation

Goki YAMAMOTO

Effects of irradiation on lipid peroxides of mouse serum, Ehrlich solid tumor-bearing mouse serum, which tumor cells were transplanted to the leg, and its tumor tissue were studied by a thiobarbituric acid (TBA) color reaction in the acetic acid condition with (Fe-TBA value) or without (TBA value) ferrous ammonium sulfate. TBA reactive substances were calculated into the amount of malondialdehyde. Besides, fatty acid and lipid compositions were analyzed as a substrates. Irradiated samples were isolated at 3 days after irradiations.

The TBA value of normal mouse serum was expressed 17nmol/ml of serum, and Fe-TBA value gave 2.4-fold of the TBA value. Although an increase of TBA value was not observed by whole-body irradiation, a significant increase of Fe-TBA value was measured, indicating 2.5-fold at 10Gy exposure compared with the normal Fe-TBA value, and 5.5-fold with the TBA value. The TBA value of tumor-bearing mouse serum was 14nmol/ml as a low rate to that of normal serum, but the Fe-TBA value gave same magnification of that of normal one. The TBA value of tumor-bearing mouse serum was not changed by the local irradiation to the tumor region of leg, but the Fe-TBA value was increased 2.8 and 4.4 times at 10Gy and 20Gy exposures, respectively, comparing with the non-irradiated one, and 7.7 and 10.5 times with the TBA value, respectively. The TBA value of solid tumor homogenate exhibited 1.16nmol/mg of protein, and the Fe-TBA value pointed out 5 times as much as the TBA value. Both values slightly increased by the irradiation. These facts suggest that a shift of TBA value of serum hard to get, but Fe-TBA value of serum distinctly increases by the irradiation.

The fatty acid composition of mouse serum lipids showed an increment of relative percentages of linoleic and arachidonic acids by the whole-body irradiation. The relative percentage of fatty acid composition of lipids from solid tumor-bearing mouse serum was similar tendency to that of normal one, and the local exposure to the tumor part was not affected the each percentage. The percentage of high unsaturated fatty acid of tumor lipids similar to that of serum lipids, and a decrease of the percentage of arachidonic acid was accounted by the irradiation. In relative percentages of lipid compositions, the percentage of cholesterol of serum lipids increased by the whole-body irradiation, and that of phospholipid fraction was not changed. In the case of tumor-bearing mouse serum lipids, an increment of the percentage of cholesterol was obtained as compared with that of normal serum lipids, and this percentage decreased by the local irradiation to tumor part with an increment of the percentage of phospholipid. The percentage of phospholipid in tumor lipids had decreased by the irradiation. The facts suggest that a cause of the increased Fe-TBA value of tumor-bearing mouse serum by the irradiation to tumor is due to the release of peroxidizable phospholipid into serum from the damaged membranes of tumor cells at large doses to exposure.

Key Words : Lipid peroxides, Irradiation, Mouse serum,
Tumor-bearing mouse serum, Fatty acid composition.

はじめに

高級不飽和脂肪酸の過酸化反応は病理学的、毒物学的に興味をもたれている^{1), 2)}が、種々の疾患の直接の原因が臓器や組織における過酸化脂質による障害にもとづく可能性が指摘され、臨床的に血清過酸化脂質の変動が注目されている。生体内でみられる過酸化脂質の生成、分解、生成阻止は何れも多元的に行われていると考えられるが^{3), 4)}、血清脂質過酸化物は過酸化を起こしやすい体内状態の指標として討論されており、これには基質脂質の不飽和度、抗酸化剤の量、抗酸化と酸化促進の全酵素活性等が含まれる。過酸化脂質は体内各組織の至るところで発生しうが、その作用の一部が少なくとも細胞の膜の障害と密接に結びついており、過酸化脂質の変動は組織の代謝、膜の変化を示す指標の可能性が示唆されている⁵⁾。血清は組織や細胞からの物質の出入りに直接関与する標品として、血清脂質過酸化物は細胞膜の障害を反映する臨床化学的指標となりうる可能性を考えた。多くの疾患について、血清脂質過酸化物量の指標としてTBA反応物質(TBARS)を示すTBA値の変動が報告されている⁶⁾が、血清TBA値の高低と疾患本体との関係は更に究明される必要がある。

放射線照射による酸化的障害として脂質過酸化反応が誘起されるが⁷⁾⁻¹⁰⁾、全身照射により臓器組織および血清に過酸化脂質の増加がみられている。しかし、臓器組織の放射線障害と血清過酸化脂質両者間の相互関係は明らかでなく、又、臨床がん放射線治療時の血清過酸化脂質に関する報告は少ない。婦人科癌患者において放射線治療前中後の血清TBA値の検討が報告され¹¹⁾、病期との関連を示唆するとともに放治中に若干のTBA値の上昇をみているが、照射による変動は明らかでない。

脂質過酸化物は動物に注射されたとき細胞毒として働き¹²⁾、放射線障害類似の効果が指摘されている¹³⁾。この点からも放射線照射に伴う過酸化脂質の変動は臨床的にも重要である。本文では、放射線照射と血清過酸化脂質の変動の関係を更に究明する目的で、全身照射並びにEhrlich固

型担癌(大腿部)マウスの癌部局所照射に伴う血清過酸化脂質の変動を相対的にTBA値、Fe-TBA値として検討し、基質としての脂肪酸並びに脂質組成を分析した。その結果、Fe-TBA値が細胞障害の指標となりうる可能性が得られたので報告する。

実験材料及び方法

1 実験動物：ICR系マウス(雄)を購入し、固形飼料(MF：オリエンタル酵母社製)で飼育、体重40g前後のものを実験に供した。
2 実験対象群：次の各群について、一組5匹で実験を行い、X線照射後三日目のものを照射群(X-3D)とした。

- 1) 正常マウス群血清。
- 2) 放射線全身照射(2, 4, 6, 8, 10Gy)群血清。
- 3) Ehrlich腹水癌細胞を右大腿部へ接種し、固型癌を形成させた。腫留の直径がおよそ1cm大になった担癌マウス群血清。
- 4) 同固型癌部に対して局所的に放射線照射(10, 20Gy)した照射群血清。
- 5) 固型癌組織並びにその照射(20Gy)群。

3 放射線照射方法：東芝製KXC-19型深部治療用X線発生装置を用いてX線を照射した。照射条件は管電圧200kVp、管電流25mA、濾過板0.5mm Cu + 0.5mm Al、FSD 50cmで、線量率46R/minに設定した。

4 血清の分離：各マウスをエーテル麻酔後、頸動脈切断により採血、遠心分離し、血清を採取した。

5 脂質過酸化物(TBA値、Fe-TBA値)の測定：TBA(チオバルビツール酸)による発色測定を酢酸酸性下、次ぎの如く施行した。ねじ蓋付き試験管に血清0.2mlを採り生理食塩水3.8mlを加え、4mlとし、0.67% TBA試薬(氷酢酸を使用直前に等量混和し調整)を加え、計5mlとし混和した。これを沸騰水中で60分間加熱発色させた後、直ちに氷水中で冷却、40%三塩化酢酸を1ml加え混和、2,500rpm、10分間遠心し、上清を得た。その上清について532nmと600nmにおける吸光度を分光光度計(島津製、UV-200)で測定した。

TBA 値は OD_{532nm} から OD_{600nm} を差し引いた吸光度から、血清 μL 当り、また mg 蛋白質質量当りとして、吸光度¹⁴⁾よりマロンジアルデヒド(MDA)に換算し TBA 反応陽性物質(TBARS)として算出した。

他方、同様に二価鉄存在下の加熱発色を行い、各吸光度を測定し、算出、Fe-TBA 値として評価した。二価鉄は硫酸第一鉄アンモニウム(終末 0.1 mM 、使用直前調整)を用いた。

固型癌組織の TBA 反応は、生理食塩水中でホモジナイズしたものを蛋白質質量 2 - 3 mg を用いて上記同様施行した。

6 蛋白質の定量：牛血清アルブミン(Armour Laboratories, F-V)を標準としてビュレット法¹⁵⁾により測定した。

7 脂質の抽出：Forch らの方法¹⁶⁾に準じて各標品より脂質を抽出した。共栓目盛り付き試験官に血清 0.2 mL をとり、クロロホルム：メタノール(2 : 1, v/v)を加え 20 mL とし、激しく混和後、一日以上冷暗所に保置した。濾紙にて濾過、その濾液に対し 0.2 倍量の 0.73% 塩化ナトリウム液を重層、静置、一日後に水層を吸引除去、無水硫酸ソーダを加え脱水、濾紙にて濾過、濾液を窒素ガス下で低温加熱、蒸発せしめ、残渣を総脂質として分離した。

8 脂肪酸の分析：脂質を Stoffel らの方法¹⁷⁾に準じて 5% 塩酸メタノールを用いてメチルエステル化したのち、その脂肪酸エステルを常法に従って n-ヘキサンで抽出濃縮し、ガスクロマトグラフィー(島津製, GC-4B)に積分計(ITG-2A,

IDC-2A)を接続したものを用い、20% DEGS-1% リン酸カラムで分析した。計測された主ピークについて相対的脂肪酸組成比を算出した。

9 脂質組成の分析：薄層クロマトグラフィーで分画した。シリカゲル G (Merk) 薄層を調整し、活性化後、総脂質を塗布、単純脂質分画展開溶媒として、n-ヘキサン：エチルエーテル：酢酸(53 : 7 : 0.66v/v/v)を使用、展開した。乾燥後、沃度ガスにて発色、濃度計量したのち、分画抽出、重クロム酸酸化法¹⁸⁾にて定量、算定し、相対値を求めた。

結 果

TBA 値、Fe-TBA 値の測定条件：本測定条件での TBA 発色に対する反応時間の影響は、TBA 値については 60 分まで直線的に増加し、その後の反応時間延長でさらに増加が認められた。Fe-TBA 値は 60 分まで曲線的に増加し、その後の発色はみられず、用いた Fe 量での誘導は 60 分値で十分と考えた。このことから測定値は 60 分加温反応値を用いた。

正常マウス血清過酸化脂質量の全身照射に伴う変化(表 1)：

本測定条件での正常マウス血清の TBA 値は、MDA 換算平均値として 17 nmol/mL が示された。これに対し、Fe-TBA 値は平均値として 40 nmol/mL が得られ、TBA 値の 2.3 倍であった。

全身照射群の TBA 値は線量依存による変化は認められなかったが、Fe-TBA 値は照射線量の増加に伴って、より増加の傾向がみられ、致死線量

Table 1. Lipid peroxides (TBA, Fe-TBA value) in serum from mouse 3 days after whole-body irradiation in different single doses. TBA color reactions were carried out in 0.2 mL of serum per 5 mL of the acetic acid condition with or without 0.1 mM Ferrous ion in boiling-bath for 60min.

Dose (Gy)	nmoles TBARS/ mL		Protein (g/ dL)	nmoles TBARS/ mg	
	TBA	Fe-TBA		TBA	Fe-TBA
Non	17.69 \pm 2.27	40.56 \pm 5.00	8.1 \pm 0.5	0.218 \pm 0.028	0.500 \pm 0.077
2	17.82 \pm 2.13	39.06 \pm 11.60	7.9 \pm 0.3	0.224 \pm 0.026	0.494 \pm 0.147
4	18.85 \pm 1.78	48.27 \pm 10.40	7.7 \pm 0.6	0.244 \pm 0.027	0.628 \pm 0.134
6	17.69 \pm 0.55	48.72 \pm 12.95	7.9 \pm 0.9	0.224 \pm 0.007	0.610 \pm 0.167
8	18.84 \pm 0.94	55.38 \pm 15.52	7.3 \pm 0.5	0.256 \pm 0.013	0.756 \pm 0.212
10	17.19 \pm 1.10	100.51 \pm 16.38	7.0 \pm 0.3	0.244 \pm 0.019	1.436 \pm 0.231

では明らかな増量が認められた。10Gy 照射の平均値で、Fe-TBA 値は対照 TBA 値の $\text{m}\ell$ 当たりで5.8倍であった。又、正常群の Fe-TBA 値に対し、 $\text{m}\ell$ 当たり2.5倍値が得られた。

一方、照射後の血清蛋白質量は線量増加に伴って減少がみられたので、蛋白質量 mg 当たりの各 TBA, Fe-TBA 値を算出し、癌細胞のそれとの比較に用いた。全身照射 10Gy 群の Fe-TBA 値の mg 当たりの増加率は非照射 Fe-TBA 値に対して2.9倍、対照 TBA 値に対して5.9倍と計算された。

担癌マウス血清過酸化脂質量の癌部局所照射に伴う変化(表2)：

担癌マウス血清の TBA 値は平均値として $15\text{nmol}/\text{m}\ell$ が得られ、正常マウスのそれより低値(0.83倍)であったが有意差は得られなかった。Fe-TBA 値の平均値は $35\text{nmol}/\text{m}\ell$ が得られ、同様低値(0.87倍)であったが TBA 値の2.4倍値が得られ、正常群と同様の倍率が得られた。10, 20Gy の癌部局照射により担癌血清 TBA 値の変化は全身照射同様有意差は得られなかったが、Fe-TBA 値では個体差はあるものの明らかな増加が認められ、担癌血清 Fe-TBA 値に対して 10Gy 照射群で $\text{m}\ell$ 当たり2.8倍、 mg 当たりで2.9倍、20Gy 照射群でそれぞれ4.4倍、3.3倍値が得られた。又、対照 TBA 値に対して Fe-TBA 値は 10Gy 照射群

で7.7倍、20Gy 照射群で10.5倍であった。

固型癌細胞組織の過酸化脂質量(表3)：

固型癌部組織モホジネートの TBA 値は蛋白質 当たり平均 $1.1\text{nmol}/\text{mg}$ 、Fe-TBA 値は平均 $5.8\text{nmol}/\text{mg}$ が得られ、Fe-TBA 値は TBA 値の 5倍が示され、血清のそれより高倍率であった。癌局所 20Gy 照射後 3 日目の癌部組織平均 TBA 値は1.3倍、平均 Fe-TBA 値は1.1倍が得られ、若干の増加が示された。

癌細胞のみの過酸化脂質をみるため、腫瘍形成に用いた腹水癌細胞の TBA 値、Fe-TBA 値を測定した。生食洗浄後の腹水癌細胞の TBA 値は平均 $0.231\text{nmol}/\text{mg}$ が得られ、血清のそれと同程度であった。しかし、Fe-TBA 値は平均 $4.045\text{nmol}/\text{mg}$ と TBA 値に対して、固型癌での 5倍に対し、17倍の高値が得られ、癌細胞の感受性が高いことが示された。

固型癌部と腹水細胞との TBA 値に 5 倍の差がみられたので、大腿筋肉の過酸化脂質を測定した。TBA 値は $0.603/\text{mg}$ と固型癌部と腹水細胞の中間値が得られ、Fe-TBA 値は $2.494/\text{mg}$ で TBA 値の 4 倍になった。これらのことから固型癌組織では、より高 TBARS の存在もしくは鉄様誘導物質の存在が示唆される。

以上、全身照射(10Gy)血清、癌部(20Gy)照射

Table 2. Lipid peroxides (TBA, Fe-TBA value) in serum from mouse bearing Ehrlich solid tumor 3 days after single irradiations (10Gy, 20Gy) at the tumor region of leg.

Dose (Gy)	nmol TBARS/ $\text{m}\ell$		Protein (g/d ℓ)	nmol TBARS/mg	
	TBA	Fe-TBA		TBA	Fe-TBA
non	14.74 ± 1.61	35.13 ± 5.54	7.5 ± 0.5	0.197 ± 0.022	0.468 ± 0.073
10	12.83 ± 1.27	98.58 ± 47.01	7.2 ± 0.5	0.178 ± 0.018	1.396 ± 0.653
20	14.62 ± 2.20	153.38 ± 78.92	7.6 ± 0.9	0.192 ± 0.029	2.018 ± 1.038

Table 3. Change in lipid peroxides (TBA, Fe-TBA value) of Ehrlich solid tumor 3 days after 20Gy irradiation.

	nmol TBARS/mg Protein			
	TBA		Fe-TBA	
	Control	X-3D	Control	X-3D
Solid tumor	1.160 ± 0.359	1.494 ± 0.359	5.801 ± 1.340	6.448 ± 1.417
Ascites cells	0.231 ± 0.103		4.045 ± 0.429	
Muscle	0.603 ± 0.026		2.494 ± 0.564	

血清と同癌部の TBA 値, Fe-TBA 値の変化を平均値で比較すれば, 各分画の TBA 値は照射に伴って変化はみられなかったが, Fe-TBA 値は明らかな増加が示され, 癌部局所照射による担癌血清の Fe-TBA 値の増加は癌部 Fe-TBA 値の高値から細胞代謝による影響が考えられる。

鉄が TBA 反応中に脂質過酸化物の崩壊を促進するとの報告がみられる^{19),20)}。Fe-TBA 値は TBA 発色時間が高温60分のため, 本測定条件下で発色時間中の二価鉄による脂質過酸化反応が誘導されている可能性が考えられるので, 基質となる脂肪酸の組成分析を試みた。

照射に伴う脂肪酸組成の変動(表4) :

全身照射に伴う血清の不飽和脂肪酸の組成比の変動として, オレイン酸(C_{18:1})の減少とアラキドン酸(C_{20:4})の増加が線量依存的に認められ, 表4に10Gyの結果を示す。リノール酸(C_{18:2})

の増減傾向は示されなかった。

担癌血清の脂肪酸組成は正常血清の組成と同じ相対比が得られた。癌部局所(20Gy)照射に伴う担癌血清の脂肪酸組成比の変動は全身照射時の変動と異なった傾向が伺われ, オレイン酸の僅かな増加, アラキドン酸の僅かな減少が平均値で示された。

癌部組織の脂肪酸組成は血清の組成と比較して, パルミチン酸(C_{16:0})の低率, ステアリン酸(C_{18:0})の高率と飽和脂肪酸の相違が認められたが, 不飽和脂肪酸ではリノール酸の低下傾向が示された。癌部組織の照射後における不飽和脂肪酸組成比の変動傾向は担癌血清の変動と同傾向が示された。

脂質過酸化反応の基質とされるリノール酸は各標品で照射後増加の傾向が伺われ, アラキドン酸では全身照射で明らかな増加, 癌部照射で血清,

Table 4. Changes in fatty acid composition of serum lipids from normal and Ehrlich solid tumor-bearing mice, and solid tumor 3 days after irradiation. Normal mice were irradiated whole-body 10Gy and solid tumor-bearing mice were 20Gy in the tumor region of leg.

	Relative percentage of fatty acid composition					
	Normal serum		Tumor-bearing serum		Solid tumor	
	Control	X-3D	Control	X-3D	Control	X-3D
C _{16:0}	30.8±6.1	31.3±2.0	31.1±3.9	30.2±5.8	23.8±0.7	24.4±0.7
C _{18:0}	9.9±2.3	10.5±1.4	10.0±1.4	9.3±5.8	18.8±0.7	16.7±2.4
C _{18:1}	21.3±1.2	14.4±0.9	20.0±1.5	22.3±2.8	21.8±1.2	23.8±3.4
C _{18:2}	28.9±5.8	30.3±4.5	29.3±3.6	30.2±7.2	25.4±0.7	26.4±0.6
C _{20:4}	9.0±1.5	13.5±1.6	9.6±1.9	8.0±2.5	10.3±0.8	8.6±1.5

Table 5. Changes in lipid composition of serum lipids from normal and Ehrlich solid tumor-bearing mice, and solid tumor 3 days after irradiation. Normal mice were irradiated whole-body 10Gy and solid tumor bearing mice were 20Gy in the tumor region of leg.

	Relative percentage of lipid composition					
	Normal serum		Tumor-bearing serum		Solid tumor	
	Control	X-3D	Control	X-3D	Control	X-3D
PL	30.3±5.3	31.5±1.8	26.9±3.1	30.2±9.9	18.9±1.5	13.4±1.5
Ch	13.8±0.5	11.5±2.0	14.5±4.5	13.6±1.8	26.3±4.1	21.8±3.6
FFA	13.6±2.5	10.2±2.2	12.2±2.2	11.7±0.1	18.1±1.5	14.2±1.0
TG	15.6±2.3	15.3±1.0	12.2±2.2	19.3±1.0	19.8±2.4	33.9±3.5
ChE	26.7±0.1	31.5±1.8	34.3±5.7	25.2±5.2	16.9±1.7	16.8±0.4

PL : phospholipid, Ch : cholesterol, FFA : free fatty acid, TG : triglyceride, ChE : cholesterol ester

癌部共に減少傾向が示された。PI (peroxidizability index) 値²¹⁾は全身照射群でアラキドン酸の増加に伴い増加が、担癌血清、固型癌部では照射に伴い減少が計算された。

照射に伴う脂質組成の変動(表5)：

全身照射(10Gy)に伴う血清脂質相対比の変化はコレステロールの増加が著しく、リン脂質は非照射群と同比が示された。これに対し担癌血清では正常群に比しリン脂質比の減少、コレステロールエステル比の増加がみられ、癌部20Gy照射に伴ってリン脂質比の増加とコレステロールエステル比の減少がみられた。癌組織では、リン脂質比、コレステロールエステル比が血清のそれより低比でみられ、照射(20Gy)によってリン脂質比の減少がみられたがコレステロールエステル比は変わらず、トリグリセリド比の増加がみられた。

考 按

TBA 値の解釈についてはさまざまな疑義がだされているにもかかわらず過酸化脂質の定量に広く用いられており、特に医学・生物学領域の研究においては生体内脂質過酸化に関する報告の基礎となっている²²⁾。本実験で用いた酢酸酸性下のTBA発色反応によるマウス(ICR)血清TBA値は17nmol/mlが得られたが、マウス(ddy)において八木法^{23), 24)}による8.5nmol/mlの報告²⁵⁾に対して倍値を示し、より高値であった。TBA法は脂質過酸化物に対し非常に感度の良い方法があるが、その特性は低いとされているので、反応条件の差に起因すると考えられる。放射線全身照射の結果、照射後三日目のTBA値に線量に依存した変化はみられなかったが、二価鉄添加のFe-TBA値は高線量照射で明かな増加が認められた。TBA値の上昇は過酸化脂質の増加や脂質過酸化能の亢進を定量的に反映するものではなく²⁶⁾、又、TBA発色反応は脂質過酸化物の実体を示さず、むしろ、その条件下における自動酸化能を表しているとすれば、鉄添加による60分間の酸化能を表していると云える。相対的にせよ、全身照射に伴い二価鉄により誘導分解しやすい基質としての脂質、脂質過酸化物の増加を意味していると考え

えられる。全身放射線照射後、経日的なラット肝ミトコンドリアの二価鉄誘導の脂質過酸化反応の変化は一過性にみられ三日目が最大でその後回復されていることから²⁷⁾、本実験では照射後三日目を照射群としたが今後経時的な変化の追求が要求される。

TBA 値を反映する原因の一つとして脂質の構成脂肪酸の変化が考えられる。全身照射後、基質とされる高級不飽和脂肪酸の増加が総脂質で若干ながら認められ、PI 値も上昇が計算された。全身照射後、血清コレステロールエステル比の増加がみられたが、ラットで全身照射による血清総脂質量の増加は総コレステロールの増加が原因であり、特にコレステロールエステルの脂肪酸分析相対比で高率の高級不飽和脂肪酸が認められている²⁸⁾ので、マウスでも同傾向が示されるとすれば、コレステロールエステルの増加が鉄感受性基質の増加原因と考えられる。

他方、担癌血清のTBA値は、有意ではないが、正常マウス血清TBA値に比し低値が得られたが、Fe-TBA値の増加率は同様であった。癌部局所照射に伴い、全身照射同様TBA値の変化はみられなかったが、Fe-TBA値は線量依存的に増加が認められた。高線量照射により癌細胞の損傷に伴い、癌組織のリン脂質比の減少、担癌血清のリン脂質比の増加がみられたが、担癌血清総脂質の脂肪酸分析では非照射群との間に高級不飽和脂肪酸比に差はみられなかった。PI値とTBA値は正の相関を示す報告²⁹⁾もみられるが、PI値も担癌血清では局所照射により若干ながらも低値が計算された。このことから、基質としての不飽和脂肪酸値は担癌血清Fe-TBA値の局所照射による上昇と相関を示さないことが示唆され、基質となる脂質の質的な変化が考えられる。

生体における初期過酸化脂質(LOOH)からの連鎖分解反応に重要な反応は遷移金属イオンによるレドクス分解であると報告されている³⁰⁾。反応系にLOOHがあらかじめ存在していれば、遷移金属イオンによるレドクス分解で生じる脂質ラジカルLO・やLOO・が更に脂質過酸化反応の引き金となり連鎖反応が進むと考えられているが、

LOOH と鉄イオンの存在下で生体物質が酸化分解されることもみられている^{31),32)}。組織ホモジネートの脂質過酸化反応においては内在性の鉄が触媒作用を示す唯一の金属との考えもあり^{33),34)}、臓器ホモジネート、ミトコンドリアの脂質過酸化反応の二価鉄イオンによる誘導は放射線照射により促進がみられる^{9),27)}ことから、癌部放射線照射に伴う血清 Fe-TBA 値の上昇は、高線量の放射線で誘起され、代謝によって血清に逸脱された過酸化脂質若しくは過酸化反応が容易な基質の TBARS への分解が TBA 加温反応中に促進されていることによるものかもしれない。

鉄イオンによる脂質過酸化反応の開始反応に一定量比の三価鉄と二価鉄を同時に必要とすると報告されているが³⁵⁾⁻³⁸⁾、そのメカニズムは明かでない。生体内脂質過酸化反応に関与する真の活性酸素種の実体はもとより、何種類の分子種が関与するかも不明であるが、OH ラジカルや鉄・酸素複合体³⁹⁾にせよ、或いは LOOH のレドクス分解にせよ鉄イオンが重要な役割を果たすことは疑いなく⁴⁰⁾⁻⁴²⁾、鉄関与の脂質過酸化物並びに脂質過酸化反応は更に究明が必要である。

血清 TBA 値測定時鉄添加の報告は少ない。肝炎患者において、三価鉄添加の効果(八木法)は正常者の鉄による増加率よりも急性肝炎では低く、激症肝炎ではみられなかったと報告⁴³⁾されている。本実験では血清全体を材料としており、又、TBA 発色反応中、鉄添加の方法で全ての脂質過酸化物が崩壊するか否か不明であり、又遊離してくる MDA の量は過酸化物に対して加えられた鉄イオン量にも左右される。更に MDA 以外に生じる他のアルデヒド類も TBA と反応して反応産物を生じる可能性もあるが、酸性溶液中のアルデヒドはその測定を妨害しないことも報告されている⁴⁴⁾。TBA 法では揮発性の反応産物が消失のため脂質過酸化物を低く見積もる恐れもある⁴⁴⁾。シアル酸、プロスタグランチン、トロンボキサン、など多くのものが TBA と反応するため⁴⁾、血清の脂質過酸化物を測定する際は当然問題となる。このような観点のもと血清における Fe-TBA 値について、更に研究が望まれる。

要 約

放射線照射に伴うマウス血清、大腿に移植形成させた Ehrlich 固定癌担癌マウス血清並びにその固型癌部組織の過酸化脂質の変化を酢酸酸性下、チオバルビツル酸発色法(TBA 値)及び二価鉄添加発色法(Fe-TBA 値)で測定し、チオバルビツル酸反応陽性物質(TBARS)としてマロンジアルデヒド(MDA)に換算し評価した。合わせて過酸化反応基質としての脂肪酸組成と脂質組成を解析した。

正常マウス血清の TBA 値は本条件下で 17nmol MDA/ml 値が得られ、Fe-TBA 値は TBA 値の 2.4 倍が得られた。

全身照射による TBA 値の増加はみられなかったが、Fe-TBA 値は半致死線量以上で明らかな増加がみられ、10Gy 照射群で正常血清 Fe-TBA 値の 2.5 倍、TBA 値に対し 5.5 倍が示された。

担癌マウス血清の TBA 値は 14nmol/ml で若干正常値に比し低値が得られたが、Fe-TBA 値正常同様の倍率 2.5 倍値が示された。

担癌マウス血清の TBA 値は癌部 10、20Gy 局所照射により変化はみられなかったものの、Fe-TBA 値は線量依存的に著しい増加がみられ、10Gy で対照値の 2.8 倍、20Gy で 4.4 倍値、TBA 値に対し各 7.7 倍、10.5 倍が得られた。

固型癌部組織の TBA 値は蛋白質当り 1.16nmol/mg が測定され、Fe-TBA 値は TBA 値の 5 倍であった。癌部照射で TBA 値、Fe-TBA 値とも若干の増加がみられた。

これらのことから放射線照射により TBA 値の変化はみられ難いが Fe-TBA 値は増加することが示唆される。

血清脂肪酸組成比では、全身照射によりリノール酸、アラキドン酸の増加がみられた。担癌血清脂肪酸組成比は正常のそれと同様であり、局所 20Gy 照射で変化はみられなかった。癌部組織の脂肪酸組成比においては、高級不飽和脂肪酸比は血清のそれと大差なかったが飽和脂肪酸比の変化が得られた。局所照射によりアラキドン酸比の減少がみられた。

脂質組成比では、全身照射により血清のコレス

テロールエステル比の増加がみられたがリン脂質比は変化がみられなかった。担癌血清では正常に比し、コレステロールエステル比の増加がみられたが、局所照射により減少し、リン脂質比の増加が得られた。癌部組織の脂質組成比では照射によりリン脂質比の減少とトリグリセリド比の増加がみられた。

これらのことから癌部局所照射により脂質過酸化反応の主たる基質としての過酸化物を含む細胞膜成分リン脂質の血清への流出が示唆され、これが癌部局所照射に伴う血清 Fe-TBA 値増加の一原因と考えられる。

謝 辞

本実験は岡山大学医学部放射線医学教室で行った。御援助を賜った教室関係者一同に深く感謝致します。

文 献

- 1) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, 1985
- 2) Harton, A. A. and Fairhurst, S. : CRC Crit. Rev. Toxicol., 18 : 27-79, 1987
- 3) 金田尚志, 植田伸夫編集: 過酸化脂質実験法, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1983
- 4) Kappus, H. : 脂質過酸化反応—その分子論的メカニズムと生物学的意義. “活性酸素と疾患” (Oxidative Stress, H. Sies ed.), 井上正康監訳, 学会出版センター, 東京, 281-322頁, 1987
- 5) 五島雄一郎: 過酸化脂質の臨床的意義. “過酸化脂質と疾患”, 八木国夫, 五島雄一郎編集, 医学書院, 東京, 133-146頁, 1981
- 6) 吉川敏一: 過酸化脂質と病態 2. 疾患. “過酸化脂質と生体”, 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 289-313頁, 1985
- 7) 中沢 透: 過酸化脂質と環境因子 5. 放射線. “過酸化脂質と生体”, 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著, 学会出版センター, 東京, 399-426頁, 1985
- 8) Horgan, V. J. and Philpot, J. St. L. : Attempted estimation of organic peroxides in X-irradiated mice. Brit. J. Radiol., 27 : 63-72, 1954
- 9) 渡辺節生: ラット臓器の脂質過酸化反応におよぼす放射線照射の影響. 岡山医学会雑誌, 85 : 129-136頁, 1973
- 10) 羽井佐芳男: 血清脂質過酸化物の生成に及ぼす放射線照射の影響. 岡山医学会雑誌, 87 : 637-644頁, 1975
- 11) 羽井佐芳男: 血清脂質過酸化物の生成に及ぼす放射線照射の影響—臨床例 (子宮頸癌症例) についての検討. 岡山医学会雑誌, 88 : 163-167頁, 1976
- 12) Horgan, V. J., Philpot, J. St. L., Porter, B. W. and Roodyn, D. B. : Toxicity of autooxidized squalene and linoleic of simpler peroxides, in relation of radiation. Biochem. J., 67 : 551-558, 1957
- 13) Latarjet, R. : Effects of radiation and peroxides on viral and bacterial functions linked to DNA specificity. In Ionizing Radiation and Cell Metabolism, Ciba Found. Symp, pp275-297, 1956
- 14) Sinnhuber, R. O. and Yu, T. G. : 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. Food Technol., 12 : 9-12, 1958
- 15) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. : Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem., 177 : 751-766, 1949
- 16) Folch, P. J., Lees, M. and Stanly, G. H. S. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226 : 497-509, 1957
- 17) Stoffel, E. C. and Ahrens, E. M. : Analysis of long chain fatty acids by gasliquid chromatography. Micro-method for preparation of methyl esters. Anal. Chem., 31 : 307-308, 1959
- 18) Skipski, V. P. and Barclay, M. : Thin-layer chromatography of lipids. Methods in Enzymology, Lowenstein, J. M. ed, Vol XIV, Academic Press, New York and London, pp530-598, 1969
- 19) Asakawa, T. and Matusita, S. : Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. Lipids., 14 : 401-405, 1979
- 20) Asakawa, T. and Matusita, S. : Thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides under anaerobic conditions. Agric. Biol. Chem., 45 : 453-457, 1981
- 21) Witting, L. A. and Horwitt, M. K. : Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency induced creatinuria. J. Nutr., 82 : 19-25, 1964
- 22) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝編著: 過酸化脂質と生体, 学会出版センター, 東京, 1985
- 23) Yagi, K. : Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In lipid peroxides in Biology and Medicine, Yagi, K. ed., Academic press, New York, pp223-242, 1982
- 24) Yagi, K. : A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochemical Medicine., 15 : 212-216, 1976
- 25) Nakakimura, H., Kakimoto, M., Wada, S. and Mizuno, K. : Studies on lipid peroxidation in biological sys-

- tems. I. Effects of various factors on lipid peroxide level in blood. *Chem. Pharm. Bull.*, 28 : 2101-2104, 1980
- 26) 松尾光芳：過酸化脂質と生理的因子 5. 老化. “過酸化脂質と生体”, 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝 編著, 学会出版センター, 東京, 191-209頁, 1985
- 27) 若林 弘：X線全身照射のラット肝ミトコンドリアにおける脂質過酸化反応に関する研究 1 X線全身照射にともなうラット肝ミトコンドリアの Fe^{++} 誘導脂質過酸化反応の変動について. *岡山医学会雑誌*, 88 : 185-196, 1976
- 28) 大橋 茂：放射線全身照射にともなうラット血清脂質分画の変動—コレステロール値と分画脂酸構成について. *岡山医学会雑誌*, 91 : 241-250, 1978
- 29) 嵯峨井勝：過酸化脂質と生理的因子 3. 種差および系統差. “過酸化脂質と生体”, 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝 編著, 学会出版センター, 東京, 145-170頁, 1985
- 30) O'Brein, P. J. : Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles. *Can. J. Biochem.*, 47 : 485-492, 1969
- 31) Watabe, T., Isobe, M. and Tsubaki, A. : Epoxidation of cholesterol by hepatic microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Commun.*, 108 : 724-730, 1982
- 32) Watabe, T., Tsubaki, A., Isobe, M., Ozawa, N. and Hiratuka, A. : A mechanism for epoxidation of cholesterol by hepatic microsomal lipid hydroperoxides. *Biochim. Biophys. Acta.*, 795 : 60-66, 1984
- 33) Barber, A. A. : Lipid peroxidation in rat tissue homogenates; Interaction of iron and ascorbic acid as the normal catalytic mechanism. *Lipids.*, 1 : 146-151, 1966
- 34) Wills, E. D. : Lipid peroxide formation in microsomes; The role of non-hem iron. *Biochem. J.*, 113 : 325-332, 1969
- 35) 橋本啓二：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究 2 二価鉄誘導脂質過酸化反応における誘導 (lag) の二価鉄の消長による解析. *岡山医学会雑誌*, 94 : 359-368, 1982
- 36) 森本節夫：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究 1 全身照射ラット肝ミトコンドリアの二価鉄誘導脂質過酸化反応における誘導時間の解析. *岡山医学会雑誌*, 97 : 201-209, 1985
- 37) Braugher, J. M., Daucan, L. A. and Chase, R. L. : The involvement of iron in lipid peroxidation. Importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J. Biol. Chem.*, 261 : 10282-10289, 1986
- 38) Minotti, G. and Aust, S. D. : The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen. *J. Biol. Chem.*, 262 : 1098-1104, 1987
- 39) Stubbe, J. and Kozarich, J. W. : Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.*, 87 : 1107-1136, 1987
- 40) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219 : 1-14, 1984
- 41) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine : Some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 246 : 501-514, 1986
- 42) 寺尾純二：活性酸素との反応性, 脂質. 蛋白質核酸酵素, 33 : 3060-3066, 1988
- 43) 末松俊彦, 阿部 裕：肝疾患 B. 化学面. “過酸化脂質と疾患”, 八木国夫, 五島雄一郎編集, 医学書院, 東京, 172-180頁, 1981
- 44) Esterbauer, H. : Aldehydic products of lipid peroxidation. In *Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer*, McBrien, D. C. H. and Slater, T. F. eds., Academic Press, New York and London, pp101-128, 1982

(1990年10月30日受理)