

チオバルビツール酸法による血清過酸化脂質の測定： 比色法と蛍光法の比較並びに二価鉄の影響

山本 剛 禧

Measurement of Serum Lipid Peroxides used Thiobarbituric Acid Method : Colorimetric and Fluorometric Assays and Effect of Ferrous Ion

Goki YAMAMOTO

Serum lipid peroxides were measured by a thiobarbituric acid (TBA) method. TBA color reactions carried out under the conditions with acetic acid (TBA-AA) or hydrochloric acid (TBA-HCl) systems, and then TBA value was detected by colorimetric ([OD]) and fluorometric ([FR]) measurements. Effects of ferrous ion, ferric ion and EDTA on the both systems were examined.

Equal TBA value dependent upon concentrations of MDA (tetraethoxypropane) were obtained on both systems detected by [OD], but the relative fluorescence of TBA-AA system was higher than that of TBA-HCl system. Fluorometric determination was suitable for low TBA value, and colorimetric one was for high TBA value. Good correlation between TBA[OD] values and TBA[FR] values of serum from patients was estimated, but it was suggested that effects of serum substance were differ on the both systems.

Effects of iron on TBA-AA and TBA-HCl systems were different significantly, particularly high Fe-TBA values obtained from TBA-AA system in the presence of ferrous ion. The fact suggests that serum lipid peroxidation is induced by ferrous ion during a heating of TBA color reaction. Same effect of ferric ion in TBA-AA system was observed. The increment of TBA values by ferrous and ferric ions was inhibited by a addition of EDTA. It was considered that the difference effect of iron on the both systems was due to pH and acetic acid concentration.

The relationship of TBA values and Fe-TBA values of serum from patients was no correlated, and the various inhibition ratios of EDTA for the TBA value was calculated. It is suggested that Fe-TBA value is possible to determine the qualitative difference of serum lipid peroxides.

Key words : Serum Lipid Peroxides, Thiobarbituric Acid, Ferrous Ion

はじめに

種々の疾患との関連で脂質過酸化あるいは過酸化脂質の関与が明らかにされ、臨床分野を中心に興味もたれている^{1),2)}。試料中の過酸化脂質の定量あるいは脂質過酸化反応曲線を得るための定量は、それぞれの試料に適した方法が報告されている^{3),4)}が、中でも過酸化脂質が分解して生じるマロンジアルデヒド(MDA)が酸性下でチオバルビツール酸(TBA)と反応してできる赤色(TBA値)を

定量するTBA法が多用されている。TBA法を用いて、組織あるいは細胞オーガネラでの過酸化脂質の測定は比色法⁵⁾、血清中の過酸化脂質などの微量を測定する場合は蛍光法⁶⁾が行われているが、主として前者では塩酸酸性条件下、後者では酢酸酸性条件下で測定されている。しかし、その酸性条件も標品に適した多様の報告^{7),8)}がみられ、発色反応時間などから絶対値ではなく、それらの値は対照、実験群の相対値として比較解釈されてい

る^{1),2)}が、健康正常者の血清過酸化脂質の測定例では比色法の方が高めに判定されている⁴⁾。

本論では患者血清を用いて同一試料で比色法と蛍光法の測定を行い、その比較ならびに相関を求めるとともに、放射線照射マウス血清での脂質過酸化物の定量における TBA 値測定で二価鉄存在下の TBA 発色に興味ある知見がえられたことから⁹⁾、二、三価鉄の影響を検討した。

実験材料及び方法

1. 血清：低値から高値の TBA 値を得るため、冷凍保存の患者血清を用いた。年齢範囲 2~74 才の男女で、疾患分類は行っていない。
2. 試薬：市販の特級試薬を用いた。TBA 試薬液 (0.67% TBA, 50% 酢酸) は使用直前混合調剤し、また二価鉄 (Fe⁺⁺) は硫酸第一鉄アンモニウムを使用直前に溶解使用した。三価鉄 (Fe⁺⁺⁺) は硫酸第二鉄アンモニウムを使用した。
3. TBA 発色反応：
 - 1) 酢酸酸性下の反応 (TBA-AA 系と略)：標準の反応系として、予備実験の検討結果より、血清 0.1ml/系を採用した。ねじ蓋付き試験管に血清を採り蒸留水を加え計 4 ml とし、これに TBA 試薬液 1 ml を添加混合、密栓し、96°C の温浴で 60 分間加熱発色させたのち、氷水で急冷した。これに 40% 三塩化酢酸 (TCA) を 1 ml 加え混和、3000rpm で遠沈し、計 6 ml 反応液の上清を得た。
 - 2) 塩酸酸性下の反応 (TBA-HCl 系と略)：
 - 1) の TBA 試薬液に換え、5N 塩酸 0.5ml, 1.34% TBA 0.5ml を順次加え混合、発色反応を行った。
 - 3) Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺ は TBA 液混合前に添加、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は Fe 添加前に添加混合した。
4. TBA 値の測定：MDA の標準液として 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane malonaldehyde tetraethyl acetal を用いた。
 - 1) 比色法：発色後の遠心上清について、OD_{532nm} 及び OD_{600nm} を島津分光光度計 (UV-200) で測定し、OD_{532nm} から OD_{600nm} を除した吸光度を OD (532) とした。OD (532) からの MDA への換算は分子吸光係数¹⁰⁾を用い、TBA 値とした。TBA 値は TBA[OD] 値、Fe⁺⁺ 添加の TBA 値は Fe-TBA[OD] 値と略する。
 - 2) 蛍光法：比色法で測定のもの、同じ標品について励起光 (EX_{515nm}) による蛍光 (EM_{556nm}) の相対的蛍光値を日立蛍光分光光度計 (F-2000) で測定した。MDA 量は MDA 標準液の検量線より求め、TBA 値とした。TBA 値は TBA[FR] 値、二価鉄添加の TBA 値は Fe-TBA[FR] 値と略する。
5. TBA 反応の pH 依存性：血清 0.1ml に蒸留水 0.9ml を加え、それに種々の pH に調整した 0.2M 酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (終末濃度 0.14M) 3.5ml, TBA (1.34%) 液 0.5ml の混合後の pH を pH メーター (IWAKI GLASS pH/ion meter 225) で再測定し、加熱、TBA 値、Fe-TBA 値を定量した。反応前後の pH に変化はみられなかった。
6. 血清脂質過酸化物の測定方法で多用されている蛍光法 (八木法)⁶⁾ はリンタングステン酸 (PTA) 沈殿物を用いている。八木法に準じた PTA 蛋白沈殿物、並びに本論で蛋白沈澱に用いた TCA 沈殿物について、Fe⁺⁺, EDTA の影響を検討した。前者は、血清 0.1ml に対し 12N 硫酸 4.4ml, 10% PTA 0.5ml を加え混合、20 分室温放置後、3000rpm 15 分遠心、その沈殿物を再度硫酸 PTA 液で洗浄、遠心、沈殿物 (PTA-ppt) を検査に供した。後者は、血清 0.1ml, 蒸留水 3.9ml に 40% TCA 1 ml を加え混合、同様遠心、再度洗浄して遠心、その沈殿物 (TCA-ppt) を実験に供した。各沈殿物を蒸留水で溶解、TBA 試薬液 1 ml を加えて計 5 ml とし加熱した。冷却後、40% TCA 1 ml を加え混和、遠心、その上清の TBA 値を測定した。

結 果

1. TBA 発色反応時間の検討 (図 1)：
 - 1) 標準 MDA の温浴中の反応時間を検討した。TBA-AA 系と TBA-HCl 系での一次反

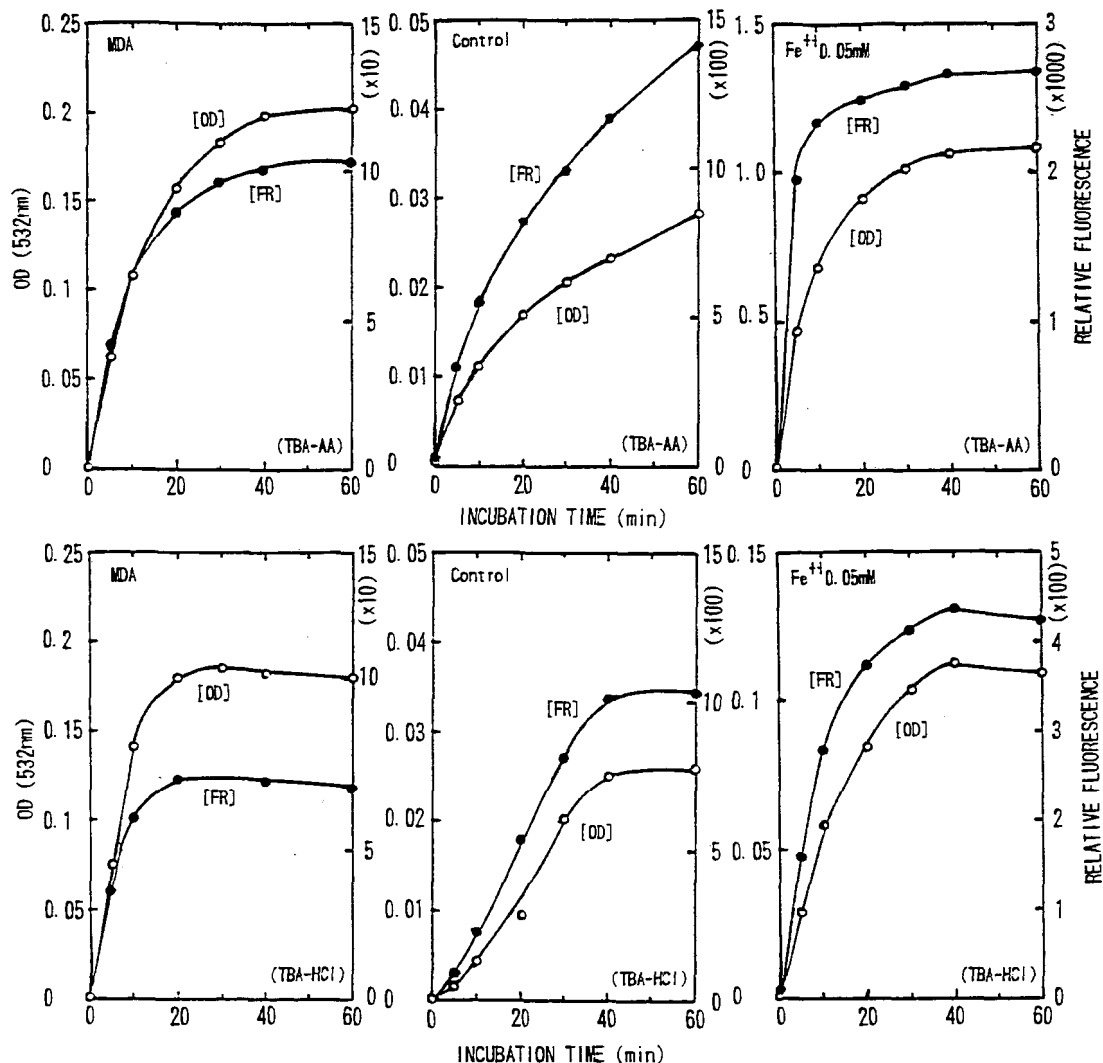


Fig. 1. TBA color reaction time curves of MDA, serum (0.1ml) with or without ferrous ion (0.05mM) under the conditions of TBA-AA and TBA-HCl system. Same samples were detected by colorimetric [OD] and fluorometric [FR] measurements.

応は同じ速度の立ち上がりが見られたが、プラトーに達するのは TBA-HCl 系の方が早く 20 分でプラトーに達したが、TBA-AA 系では 40 分を要した。

2) 血清 (0.1ml/系) での TBA-AA 系の発色は早い発色がみられるものの 60 分でも発色が徐々に継続増加しプラトーに達せず、TBA-HCl 系では初期反応はゆるやかなもの 40 分でプラトーに達した。

3) 血清 (0.1ml/系) の Fe⁺⁺ (0.05mM) 存在下の発色は TBA-AA 系では急な反応がみられ、著しい発色が示され、40 分でプラトーに達し、TBA-HCl 系でも発色量は少ない (1/10) ものの同様の時間経過がみられた。また、高濃度の Fe 存在下で発色反応では誘導時間 (lag) がみられた。

以上の結果から、標準反応系では十分の発色を得るため、正確に 60 分値を測定した。

2. MDA 標準液の検量線 (図 2) :

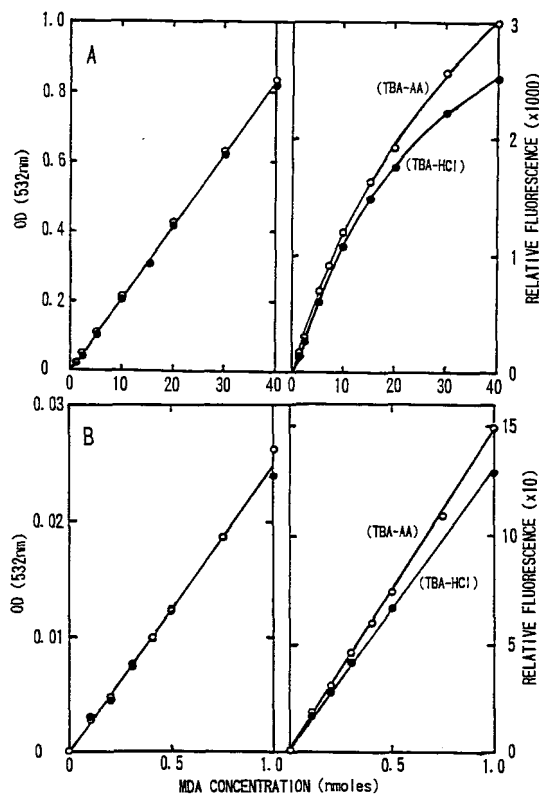


Fig. 2. Working curves of TBA color reactions of MDA depend on concentrations under the condition of TBA-AA and TBA-HCl systems. A is high concentration curves and B is low concentration curves in the both systems. ○; [OD], ●; [FR]

- 1) 高MDA濃度の標準検量線 (図 2 A) : TBA-AA 及び TBA-HCl 系 (測定時 6 ml) の MDA (~40nmol) の検量線は [OD] 値については両系で同一検量直線が得られた。しかし, [FR] 値では用いた分光計では上に凸の曲線が得られ, その蛍光度は TBA-AA 系の方が高値を示した。また, MDA 濃度から得られた OD 値は分子吸光係数からの計算値 (TBA [OD] 値) に対しては 80% であったので, 以後の TBA [OD] 値は TBA [FR] 値より高値に計算される。
- 2) 低MDA濃度の標準検量線 (図 2 B) :

MDA (~1 nmol) の検量線を求めた結果, TBA-AA, TBA-HCl 両系で TBA [OD] 値, TBA [FR] 値とも直線が得られ, 低 MDA でも定量可能なことが示され, TBA-HCl 系では TBA [FR] 値では検量値がより確実に得られるのに対し, TBA [OD] 値では分光計の精度の関係もありより不安定であった。

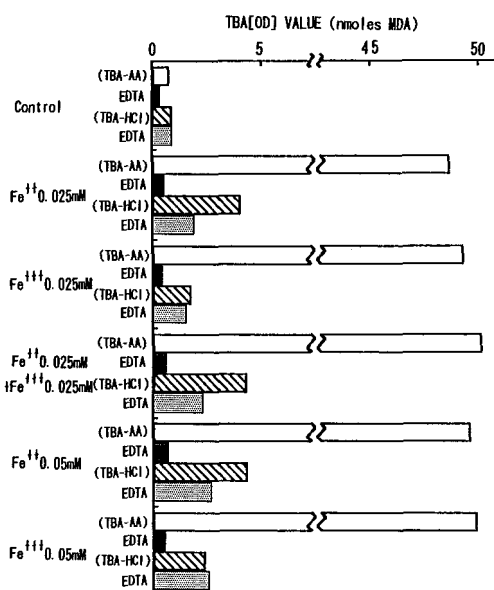
3. Fe^{++} 及び Fe^{+++} の影響 (図 3) :

Fig. 3. Effects of ferrous ion and ferric ion with or without EDTA, under the conditions of TBA-AA and TBA-HCl systems.

- 1) 血清 (0.1ml/系) の TBA-AA, TBA-HCl 両系の TBA 値, Fe-TBA 値とそれらに及ぼす EDTA の効果を検討した。

TBA-AA 系の対照 TBA 値は EDTA (0.1 mM) 添加で減少がみられたのに対し, TBA-HCl 系での TBA 値は TBA-AA 系より若干の高値が認められ, EDTA の抑制効果はみられなかった。

Fe^{++} 0.025mM, 0.05mM 各存在下の加熱で TBA-AA 系では著しい Fe-TBA 値が得られ, 両濃度で同値であったのに対し, TBA-HCl 系では Fe-TBA 値の増加は少なく

TBA-AA 系値の 1/10 程度であった。また、EDTA によって TBA-AA 系ではその増加がほとんど対照値まで抑えられたのに対し、TBA-HCl 系では約半分程度しか抑制されず、 $Fe^{++}0.05mM$ ではより抑制が少なかった。

$Fe^{+++}0.025mM$, $0.05mM$ 各存在下で、TBA-AA 系では Fe^{++} 添加 (Fe-TBA) 値と同高値の TBA 値が得られ、EDTA で同様抑制されたが、TBA-HCl 系では同濃度の Fe^{++} の (Fe-TBA) 値より増加率は少なく半量程度であり、両系で差がみられ、しかも $0.025mM$ 存在下よりも $0.05mM$ 存在下で増加し濃度依存がみられた。これらの増加に対し、EDTA の抑制はみられ難かった。

$Fe^{++}0.025mM + Fe^{+++}0.025mM$ 計 $0.05mM$ 存在下の TBA-AA 系の TBA 値は $Fe^{++}0.025mM$, $0.05mM$ の各 TBA 値と同じ量的傾向が示されたが、TBA-HCl 系での EDTA 効果は $0.025mM$ と $0.05mM$ の中間値であった。

- 2) 上記のごとく TBA-AA 系では Fe^{++} , Fe^{+++} とも著しい Fe-TBA 値が示され、また $Fe 0.025mM$, $0.05mM$ 両濃度で同じ値が得

られたことから、Fe 濃度変化による Fe-TBA 値 (血清 $0.1ml/系$) を測定した (図 4)。 $Fe^{++}0.01mM-0.015mM$ (血清標品の違いによる) まで緩やかな増加がみられ、 $0.02mM$ で急激な増加が測定され、 $0.05mM$ まで同じ値が得られた。また、 Fe^{+++} 濃度関係も Fe^{++} と全く同値同傾向が示された。

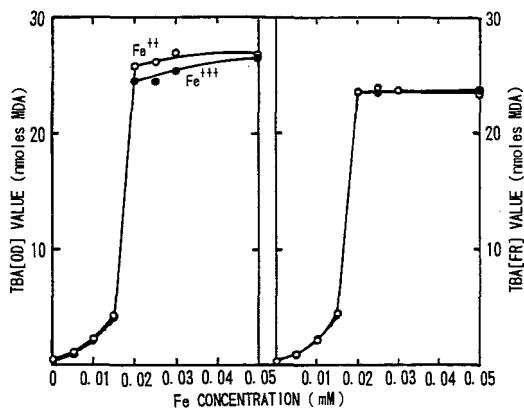


Fig. 4. TBA values dependent on the concentrations of ferrous and ferric ions. Right curves are [OD] and left curves are [FR]. ○; ferrous ion, ●; ferric ion

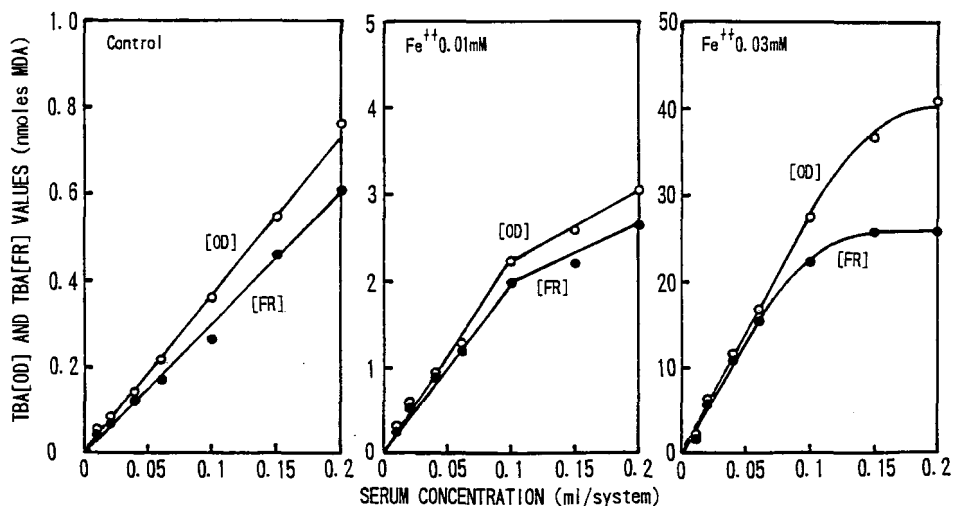


Fig. 5. Curves of TBA [OD] values and TBA [FR] values of dependent on the concentrations of serum under the condition of TBA-AA system in the absence or presence of ferrous ion. ○; [OD], ●; [FR]

4. TBA-AA系における血清量に及ぼす Fe^{++} の影響(図5):

図4で血清量と Fe 濃度との関連が示唆されたので、対照、 $Fe^{++}0.01mM$ と $0.03mM$ で血清濃度(0.01ml-0.2ml/反応系)の依存関係を求めた。対照のTBA値はTBA[OD]、TBA[FR]両値で血清濃度に依存して直線的に増加したが、 $Fe^{++}0.01mM$ 存在下では血清0.1ml迄は濃度依存的に直線的に増加し、それ以上の血清濃度では緩やかな増加で二相性の曲線が得られた。 $Fe^{++}0.03mM$ 存在下でも、 $Fe^{++}0.01mM$ 添加の Fe -TBA[OD]値の10倍以上の Fe -TBA[OD]値が得られたものの同様の傾向がみられ、高血清濃度(0.15, 0.2ml/系)の Fe -TBA[FR]値では Fe -TBA[OD]値に比して低値が示された。

5. TBA-AA系に及ぼすpHの影響:

対照血清のTBA-AA系のTBA[OD]値はTBA-HCl系のTBA[OD]値より低値がみられ、また、TBA-AA系での Fe 添加で著しい Fe -TBA[OD]値が示されたが、標準MDAでは両系とも同値が測定された。このことから、TBA発色反応中の脂質過酸化反応のpH依存性を酢酸ナトリウム-HCl緩衝液で検討した。反応液のpHは加温前後で計測されたが変化はみられなかった。

用いた対照血清のTBA値はpH1以下での方

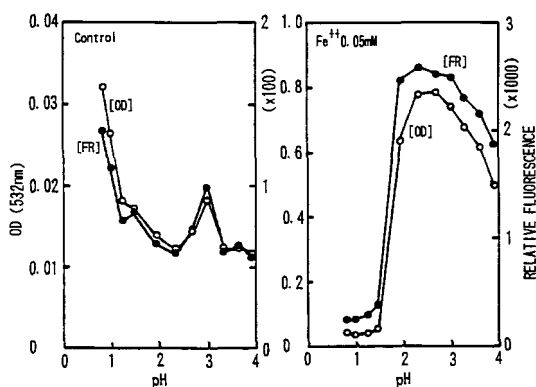


Fig. 6. Effect of PH on the TBA color reactions, of serum with or without ferrous ions under the condition of TBA-AA system. The solutions were buffered by sodium acetic acid-HCl system.

がpH3のピークより高値がみられた(図6)。しかし、 $Fe(0.05mM)$ 添加群ではpH2-3で著しいTBA値が示された(図6)。標準MDAでは測定されたpH内で同一値が得られた。

6. 酢酸緩衝液での Fe -TBA値より同時測定の標準反応液(pH2.5)での Fe -TBA値の方が高値を示した(図6の結果と同時測定で[OD]0.97)ので、 Fe 誘導脂質過酸化反応のTBA-AA系での酢酸濃度の影響をみた(図7)。標準TBA-AA系(酢酸終末濃度10%, 1.75M)に対し、TBA[OD]値は酢酸低濃度(0.63%, 0.109M)で32%の低下がみられたのに対し、 Fe -TBA[OD]値は70%の低下が

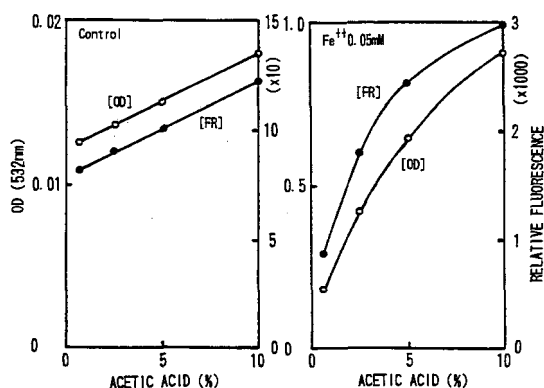


Fig. 7. Effects of the various concentrations of acetic acid.

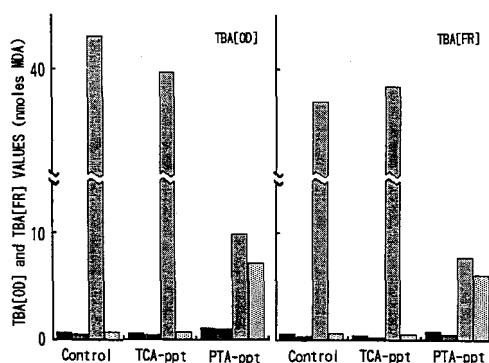


Fig. 8. TBA values of serum from the preparations of TCA precipitation and PTA precipitation. Bar is TBA value, TBA value with EDTA, Fe -TBA value and Fe -TBA value with EDTA in order.

Measurement of serum Lipid Peroxides

Table 1. Data of various TBA values (lipid peroxides) obtained from the experimented human sera.

	TBA VALUES (nmoles MDA/system)				+EDTA	
	TBA[OD]	Fe-TBA[OD]	TBA[FR]	Fe-TBA[FR]	TBA[FR]	Fe-TBA[FR]
	N	66	66	66	68	26
Maximum	1.31	56.92	1.18	27.08	0.53	0.82
Minimum	0.14	12.92	0.18	13.29	0.13	0.40
Average	0.60	34.61	0.48	23.33	0.26	0.53
SD	0.28	11.05	0.25	3.28	0.10	0.12

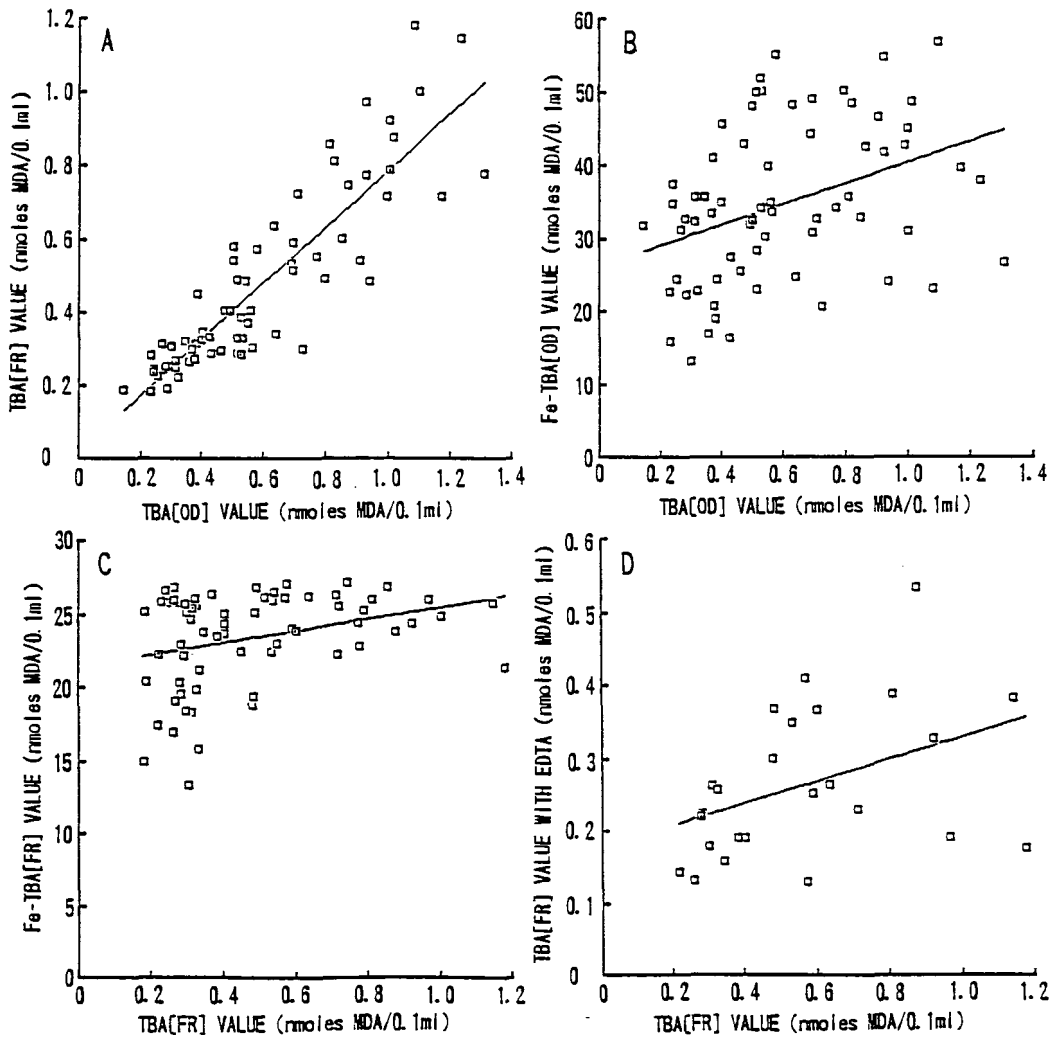


Fig. 9. Correlations among the various TBA values.

みられ、酢酸濃度が影響することが示された。pHは酢酸低濃度の方が高かった(～pH3.1)。

7. TCA, PTA 蛋白沈殿物での TBA-AA 系の TBA 値に及ぼす Fe⁺⁺, EDTA の影響 (図 8) : TCA-ppt の TBA 値, Fe-TBA 値は標準対照反応後の TBA 値, Fe-TBA 値に近似し, EDTA の抑制効果も同じとみられた。しかし, PTA-ppt の TBA 値は対照より高値を, また, EDTA の抑制効果はほとんどみられず, さらに Fe-TBA 値は 1/4 の低値がみられ, EDTA の抑制効果も僅かであった。

8. TBA[OD]値, TBA[FR]値, Fe-TBA[OD]値, Fe-TBA[FR]間の相関(図 9) : 検査に供した患者血清標品の数 (N), 各測定 TBA 値の最高値, 最低値, 平均値を表 1 に示した。

TBA[OD]値, TBA[FR]値の相関 (N=66) は $r=0.878$ の相関係数を得た ($Y=0.018+0.772X$) (図 9 A)。TBA[OD]値と Fe-TBA[OD]値については (図 9 B), 各測定範囲の TBA[OD]値に対して Fe-TBA[OD]間に数倍の相違がみられ比例関係は認められなかった ($r=0.375$)。Fe-TBA[OD]値と Fe-TBA[FR]値間では相関係数 ($r=0.764$) が示されたが, 高 Fe-TBA[OD]値 (40nmol/system) 以上ではより低値 (25nmol/system) の同じ程度の [FR] 値が得られた。このような測定結果は, TBA[FR]値と Fe-TBA[FR]値の関係 ($r=0.314$) (図 9 C) においてもみられ, Fe-TBA[OD]値のように分散がみられなかった。発色反応標準系における EDTA の影響を低 TBA 値領域なので [FR] 値で測定したが発色抑制率に相違がみられ, TBA[FR]値との相関 (図 9 D) は得られなかった ($r=0.413$)。

考 按

健康正常者の TBA 法による血清過酸化脂質の測定法例¹¹⁾で, 蛍光法では血清 20 μ l を用い 2.67 ± 0.89 MDA nmol/ml¹²⁾, 比色法では血清 0.3ml を用い 3.18 ± 0.91 nmol/ml⁹⁾ が例示され, 若干の相違が示されている。TBA は MDA 以外の物質にも反応することが知られており, 呈色夾雑物質を除去, もしくは無視できるよう検討され, 前者で

は PTA 沈殿物を用い夾雑物質を含んだ可溶性部分を除去し⁹⁾酢酸酸性下で, 後者では血清試料を塩酸濃度を調製することで夾雑物質の呈色度は無視できる⁹⁾とし塩酸酸性下で加熱発色させている。本論ではこれらに準ずる方法で, 夾雑物質の効果, 過酸化脂質由来の TBA 反応物質がタンパク質に結合して存在するか, 水溶性部分に存在するかの問題も含めて¹¹⁾血清 0.1ml を標準反応系 (TBA-AA系, TBA-HCl系) とし, 比色法 (TBA[OD]) と蛍光法 (TBA[FR]) の比較ならびに両系における Fe⁺⁺の影響を検討した。

TBA 発色反応加熱時間は研究者によって異なっている。一般に TBA 反応は完全なプラトーに達せず, 加熱時間とともに徐々に増加するとされている¹¹⁾。本実験条件各系の反応時間の検討を行った結果 (図 1), 標準 MDA での反応, Fe⁺⁺存在下の血清での反応は時間の差こそあれプラトーが得られたが, 血清の TBA-AA 系ではプラトーに達せず徐々に増加がみられ酸化反応が継続していると考えられ, 夾雑物質による酸化誘導の可能性があり, Fe⁺⁺添加で著しい TBA 値が得られたのも, Fe⁺⁺誘導の脂質過酸化反応が誘起されたものとみられる。Fe 存在下の反応プラトーを考慮して各系の標準反応時間として 60 分値を使用した。

MDA の検量線 (図 2) について TBA-AA 系, TBA-HCl 系で [OD] 値は同一直線が得られたことは両系で MDA と TBA の縮合物 (赤色物質) 形成に差がないことが明らかにされたが, [FR] 値は両系で異なり, Ex_{515nm} による Em_{556nm} 発生量に差がみられ溶液条件の違いが影響することが明らかとなったが, 蛍光極大のピークのシフトはみられなかった。MDA (～10nmol/系) では [FR] 値は直線を示すので低 TBA 値の測定には測定数値の関係からも [OD] より [FR] が優れている, 高 TBA 値の測定は [OD] が適していると判定した。

著者はミトコンドリアの Fe 誘導脂質過酸化反応を誘導時間の変化で研究しているが^{13), 14)}, TBA 反応は HCl-TCA 酸性条件を使用している。もし TBA 加熱反応中に誘導が促進されれば, 実験は測定できない。また, 前報⁹⁾で放射線照射マウス血清で Fe-TBA 値 (TBA-AA 系) に差をみたが, 血

清脂質過酸化に対する Fe 効果は明らかでない。図 3 で用いた血清の TBA-AA 系での TBA[OD] 値は 0.77nmol/系を示し、異常値の範囲にはいるが、Fe⁺⁺、Fe⁺⁺⁺添加群では 50nmol の著しい増加がみられ、EDTA 添加でその増加が対照 TBA 値以下まで抑制された。血清 TBA 値も EDTA 添加で 50% の抑制が認められたことから、TBA-AA 系では夾雑物質による誘導が考えられ、更に Fe は二価、三価に関係なく Fe 誘導の脂質過酸化反応が誘起されることが明らかとなった。血清中に TBA-AA 系中で活性をもつ Fe⁺⁺⁺から Fe⁺⁺への還元因子の存在が示唆される。これに対し、TBA-HCl 系では TBA[OD] 値は 0.96 nmol/系であり、TBA-AA 系より若干高めに計測され、EDTA 添加でも殆ど抑制が観察されず、Fe⁺⁺-TBA[OD] 値では 4 nmol/系と TBA-AA 系より 1/10 程度の誘起しか認められず、EDTA の効果も 53% しか示されなかった。さらに、TBA-HCl 系では Fe⁺⁺⁺添加ではより誘導が少なく (0.05mM で 2.42nmol/系)、EDTA 添加で抑制は認めなかった。TBA-HCl 系では Fe⁺⁺と Fe⁺⁺⁺の影響が異なることが明らかであり、Fe⁺⁺の酸化活性が異なることが示唆されると共に、内在物質の TBA-AA 系とは異なった影響が考えられる。ミトコンドリアの TBA-HCl-TCA 系では Fe⁺⁺⁺誘導はみられないのみならず¹¹⁾TBA 値は Fe⁺⁺のある程度の酸化が起これなければ計測されない¹⁵⁾。TBA-AA、TBA-HCl 両系の違いによる Fe 誘導率の違いの原因として pH と酸濃度の影響が考えられる。

TBA-AA 系で著しい Fe 誘導がみられたことから、内在性(夾雑物)の抗酸化効果あるいは金属キレート効果を考慮して Fe 濃度依存性を検討した(図 3)。Fe⁺⁺存在下、Fe⁺⁺⁺存在下とも同様の TBA 値曲線が得られたが、0.1ml 血清に対し Fe⁺⁺0.01mM では若干の誘導がみられたのに対し Fe⁺⁺0.02mM では急激な発色が測定され、濃度増加でも同一量 TBA 値が計測されたことから、Fe 低濃度存在下の測定は内在性要因との拮抗関係が示唆され、Fe 高濃度の存在下では過酸化脂質量だけでなく、過酸化反応を起こし得る基質量を

Fe-TBA 値は示していると考えられる。このことはまた血清過酸化脂質の測定に対して内在性の誘起因子の存在を、EDTA の効果からも、考慮する必要が要求される。

血清過酸化脂質の本態は組織内の膜成分の構成要素としての多価不飽和脂肪酸が活性酸素あるいは遊離基によって変性されて生じたヒドロペルオキシド、エンドペルオキシドあるいはその類縁物質として組織より血中に放出されたものと考えられ、また血清過酸化脂質は、血清脂質のいずれとも相関関係を示さず、血清脂質とは独立した臨床的指標と考えられている¹²⁾。しかし、Fe⁺⁺⁺添加で見かけ上の測定値増加、EDTA 添加で見かけ上の測定値減少がみられ、試料血清の質的な差を示唆している報告¹³⁾がみられるが、本実験でみられた高 TBA 値は報告されていない。

内在因子の関連が示唆されたので低 Fe 濃度と高濃度の二者で血清量 (0.01-0.2ml/系) の依存を検討した(図 4)。TBA 値は対照血清では血清量に依存して直線がみられ、Fe 添加群では 0.1ml/系までは血清量依存直線関係が認められたが、それ以上の血清量では血清中に含まれる抑制物質と Fe 濃度の関連が示唆される。Fe⁺⁺0.03mM 添加では、図 4 の結果から 0.1ml/系では最高の TBA 値が得られると考えられるので 0.2ml/系ではそれを得るのに Fe 量が不十分とみられ内在物質との関連がこのことから示唆される。これらの結果から標準 5 ml 反応系は血清量 0.1ml、Fe⁺⁺量 0.05mM を用いた。

図 3 より、TBA-AA 系、TBA-HCl 系で対照血清の TBA 値に差がみられたが、MDA の発色では両系で同一であったことから、この差は過酸化物の MDA への分解過程に由来すると考えた。TBA 反応の至適 pH は 3.5 付近とされている¹¹⁾ので pH 依存性を酢酸ナトリウム緩衝液で検討した(図 6)結果、対照に用いた血清 TBA 値は pH 3 にピークがみられたものの pH 1 付近のほうが TBA 値は高値を示した。Fe-TBA 値では pH 1 付近では低値で、著しいピーク値が pH 2~3 の範囲に示された。TBA-AA、TBA-HCl 両系の TBA 値、Fe-TBA 値の違いの原因として pH が誘導反

応に関与していると考えられる。更に同時測定された標準 TBA-AA 系での TBA 値は高値を示したことから酢酸濃度の影響をみたが、TBA 値は酢酸濃度に依存した直線関係が認められ、Fe-TBA 値では数倍の差がみられた。酢酸の極性溶媒作用としての疎水性構造の解体作用¹⁷⁾が脂質過酸化反応の促進に関与していると思われる。

本実験で TBA-AA 系では TBA 発色反応中に Fe 誘導脂質過酸化反応が血清濃度に関与して極端に促進されることが認められたが、多くの酢酸酸性下の血清脂質過酸化定量、また、Fe, EDTA の影響の報告は PTA 沈澱蛋白を用いる方法で TBA 発色に関する夾雑物質の除去を行っている^{3),6)}。TCA-ppt, PTA-ppt での TBA-AA 系での比較の結果、TCA-ppt では対照血清の TBA 値、Fe-TBA 値と殆ど同値、さらに EDTA の抑制効果も同結果を得た。しかし、PTA-ppt では高めの TBA 値が得られ、それに対する EDTA の抑制効果は認めがたく、また Fe-TBA 値は対照の 1/4 以下で EDTA の抑制率も少なく計測された。これらのことから、PTA 沈澱によって除去された夾雑物質の中に、抗酸化作用物質や Fe 誘導脂質過酸化反応の促進に関連する物質が PTA 可溶性の成分に含まれていることが考えられるが、それらの物質は TCA 酸不溶性であることになり今後の研究に興味がある。

TBA-AA 系における同一反応試料の TBA [OD] 値、TBA [FR] 値間で良い相関 ($r=0.88$) (図 9 A) が得られたが、試料によってはかなりの測定値の違いがみられ、特に蛍光測定に夾雑物質の関与、分光計の条件など改良の余地があると判断した。このことは図 9 B の TBA [FR] 値と Fe-TBA [FR] 値の相関関係から指摘され、TBA [FR] 値 0.5nmol/系以上では Fe-TBA [FR] 値約 25nmol/系が計測され、TBA [OD] 値との関係で図 5 C と同様に相関がなく計測の限度を示すのかもしれない。しかし MDA の検量線では計測検量されている。蛍光法は微量の TBA 値検出に、分光法は高濃度の TBA 値計測に適しているが、影響因子は両者で異なると考えられる。

放射線照射マウスでは TBA 値に対照、照射群

に有意の差がなかったにもかかわらず、Fe-TBA 値に有意の差を認めた⁹⁾。患者血清について TBA 値と Fe-TBA 値の相関 (図 9 B) を求めた結果、TBA [OD] 値に対して Fe-TBA [OD] 値は数倍の幅で誘起され、誘導率の違いが明らかとなった。EDTA 添加での TBA 値についても抑制率の相違がみられた (図 9 D)。これらのことから、基質としての脂質、EDTA 様物質、Fe 様誘起物質等血清含有物質の作用を含めて個々の血清過酸化脂質ならびに内在物質に何らかの質的な相違があるものと考えられ、疾患との関係を追求することが要求される。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 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) 福沢健治，寺尾純二：脂質過酸化実験法。広川書店，東京，1990
- 5) 内藤周幸，山中健：日本老年医学雑誌，15：187-191，1978
- 6) Yagi, K.: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15: 212-216, 1976
- 7) Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310, 1978
- 8) Hunter, F.E.J., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.*, 238: 828-835, 1963
- 9) 山本剛禧：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質 (TBA 反応陽性物質) 並びに脂肪酸組成の変動。岡大医短紀要，1：29-37，1990
- 10) Sinnhuber, R.O. and Yu, T.C.: 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol.*, 12: 9-12, 1958
- 11) 島崎弘幸：生体内過酸化脂質の測定。A. TBA. 過酸化脂質実験法；金田尚志，植田伸夫編集，医歯薬出版株式会社，東京，80-89頁，1983
- 12) 秦霞哉：高脂血症と血清過酸化脂質。過酸化脂質と疾患；八木国夫，五島雄一郎編集，医学書院，東京，155

-164頁, 1981

- 13) Utumi, K. and Yamamoto, G.: Failure of Fe⁺⁺-induced lipid peroxidation and swelling in the mitochondria isolated from ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 105: 368-371, 1965
- 14) Yamamoto, G., Tanabe, M., Wakabayasi, H., Hasimoto, G. and Yamamoto, M.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria 1. Effect of inorganic phosphate. *Acta Med. Okayama*, 28: 299-310, 1974
- 15) 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期(lag)の二価鉄の消長による解析。岡山医学会雑誌, 94: 359-368, 1982
- 16) 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
- 17) 野島庄七, 永井克孝: 脂質。朝倉書店, 東京, 1967

要 約

患者血清を試料に脂質過酸化物を TBA 法を用い、酢酸酸性下(TBA-AA系)、塩酸酸性下(TBA-HCl系)で加熱反応させ、比色法(TBA[OD]値)と蛍光法(TBA[FR]値)で計測した。併せて Fe⁺⁺(Fe-TBA値), Fe⁺⁺⁺, EDTA の影響を検討した。

両系において MDA の検量を行った結果、TBA[OD]値は同一数値が得られたが、TBA[FR]値は異なって示された。低 TBA 値では蛍光法が、高 TBA 値では比色法が適している結果をみた。しかし、患者血清の定量からは TBA[OD]値、TBA[FR]値で良い相関は得られたものの、両測定方法に關与する血清内在因子の影響は異なることが示唆された。

TBA-AA, TBA-HCl 両系に対する Fe の影響は異なり、特に TBA-AA 系では著しい Fe-TBA 値が得られ、Fe 誘導脂質過酸化反応が加熱発色反応中に誘起されていることが示されたが、EDTA 添加でその誘導は抑制された。また、TBA-AA 系では Fe⁺⁺, Fe⁺⁺⁺で同様の影響がみられたが、TBA-HCl 系では異なった影響がみられた。両系の TBA 値、Fe-TBA 値の相違の原因として pH、酢酸の影響が考えられた。

患者血清で TBA 値と Fe-TBA 値に相関は得られず、Fe⁺⁺誘導反応に相違がみられ、また、EDTA の抑制作用も血清試料で異なることから、Fe-TBA 値で血清の質的な相違が計測できる可能性が示唆された。

(1991年11月5日受理)