

細胞培養における二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究： 細胞生残率と血清脂質過酸化物に対する二価鉄と三価鉄の影響

山本剛禧

Ferrous Iron-induced Lipid Peroxidation in Cell Culture : Effects of Ferrous and Ferric Irons on Cell Survival and Serum Lipid Peroxide

Goki YAMAMOTO

Cell killing activities of ferrous and ferric irons (Fe^{2+} , Fe^{3+}) in cultured 3T3 cells were investigated by the colony forming method in the culture medium containing 10% calf serum. In the colony forming method, small isolated colonies are seen in the dish which are the resulted of individual cells having undergone a series of cell divisions. Survival curve for Fe^{2+} -induced loss of reproductive capacity (cell death) in 3T3 cells, showed a shoulder at low concentrations and only became exponential at high concentrations. Cells affected at 0.05mM Fe^{2+} underwent apparently normal cell divisions, but at a much slower rate than the control. Survival rate at 0.5mM Fe^{2+} , which iron was added after seeding cells (added group), showed 0.75%, but that at 0.5mM Fe^{3+} did 19.3%. From the determination of Fe^{2+} content carried out by the colorimetric method used N-PSAP, the oxidation of Fe^{2+} was seen rapidly after adding Fe^{2+} into the culture medium. In the cases of cells seeded 3 hours after adding Fe^{2+} or Fe^{3+} (preadded group), the survival rates showed much lower than those of the added groups, that is 55% at 0.5mM Fe^{2+} and 89% at 0.5mM Fe^{3+} . The facts suggest that the radical reactions initiated by the oxidation of Fe^{2+} under the presence of cells, occurred just after adding Fe^{2+} , play a crucial role in the damages on the adhesion of cells onto the dish and the following proliferation of cells.

Serum lipid peroxides, as thiobarbituric acid reactive substances (TBA value), of the final cultured medium at colony counting time were measured. In the Fe^{2+} added group, the TBA values more increased in proportion to the added concentrations of Fe^{2+} , whereas in the Fe^{3+} added group, the increments of TBA values were very slightly and not to be depended on the concentrations. Furthermore, the TBA values of the Fe^{2+} or Fe^{3+} preadded groups were estimated as well as those of the added groups, respectively. The facts suggest that serum lipid peroxides induced by Fe^{2+} have little effect on the proliferation capacity of cells in the level of cell culture.

Key Words : Cell Survival, Ferrous and Ferric Irons, Serum Lipid Peroxide

はじめに

生体系における脂質過酸化反応の開始に鉄イオンは重要な役割を果たしている^{1)~3)}。また、ラジカル反応に基づく膜の酸化的障害の指標として、逆に種々の疾患の直接の原因が臓器・組織への過酸化脂質の障害による可能性が考えられ、臨床的に血清過酸化脂質の変動が討論されている⁴⁾。

前報⁵⁾で、培養細胞を実験材料にして、二価鉄(Fe^{2+})の細胞に与える影響を Fe^{2+} 誘導脂質過酸

化反応との関係から究明する目的で、細胞と倍地に用いられる仔牛血清の Fe^{2+} 誘導の脂質過酸化物の測定がチオバルビツール酸 (TBA) 法で可能であるかどうかを検討した。その結果、細胞の Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応並びに培養液血清の Fe^{2+} 誘導脂質過酸化物の相対的な量的変化の定量が、呈色反応中の Fe^{2+} の影響をエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 添加で抑制することにより、可能であることを明かにした。本報では、 Fe^{2+} の

殺細胞効果を Fe^{2+} 濃度応答生残率曲線で追求するとともに、終末培地の血清脂質過酸化値を測定し、相関関係を検討した。併せて Fe^{2+} の培地中での消長を測定するとともに、三価鉄 (Fe^{3+}) の影響を比較検討した結果について報告する。

実験材料及び方法

1. 細胞及び培養法

細胞はマウス線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を用いて実験を行った。培養法は10%仔牛血清加ダルベッコ変法イーグル培地 5 ml, 60mm ϕ 培養ディッシュを用い、前報⁵⁾の培養条件に従った。細胞 10^5 個を播種後、2日目の細胞を集め、単細胞化⁵⁾したものを実験に供した。

2. Fe^{2+} 及び Fe^{3+} 処理

Fe^{2+} は硫酸第一鉄アンモニウム、 Fe^{3+} は硫酸第二鉄アンモニウムを使用し、いずれも使用前に蒸留水に溶解し、濃度調整し、各ディッシュ当り 10 μ l を添加し、終末濃度とした。生残率曲線は次の2群について実験した。

1) 細胞播種直後に Fe 添加した群 (添加群)

2) 培養液に Fe 添加後 3 時間目に細胞を播種した群 (前添加群)

3. 増殖曲線

細胞を 10^5 個播種し、5日目まで、培養液を交換せず、培養し増殖曲線を求めた。各ディッシュ3個について、培養液を交換したのち、トリブシンで単細胞化⁵⁾、細胞を計数し、平均した。また、 Fe^{2+} 0.05mM 添加群での増殖曲線を求めた。

4. 生残率の測定

コロニー形成法にて判定した。細胞数100個を分散播種し、8日目に10%ホルマリン固定、10%ギムザ染色後、30個以上の細胞数を含むコロニー数を数え、無処理対照細胞のコロニー数で除し、生残率を算出した。各実験群3個のディッシュを用い、血清 Lot 番号の異なる3標品について実験し、その平均値で生残率曲線を描いた。

5. 細胞及び培養液の脂質過酸化物の測定

脂質過酸化物は、前報⁵⁾に従って、TBA 法を用い、酢酸酸性条件での発色反応後の蛍光法で、TBA 反応物質をマロンジアルデヒド (MDA) 量

として検量し、TBA 値として表した。

1) 細胞 10^5 個を播種後、3日目、6日目で各ディッシュ毎に細胞を集め、リン酸緩衝塩類液 (PBS)⁵⁾ で洗浄後、PBS に浮遊し、TBA 値を測定した。また、その時点の各ディッシュの培養液 0.5ml を用い、三塩化酢酸 (TCA) 沈殿法⁵⁾ で得られた蛋白沈殿物について TBA 発色反応を行い、TBA 値を求めた。両測定は EDTA (1 mM), Fe^{2+} (0.05mM) の有無で発色を行い、対照, EDTA, Fe^{2+} , EDTA- Fe^{2+} 群の TBA 値を比較した。

2) 生残率を求めた終末の培養液について、遠心 (3000rpm, 10分) 後、その上清 0.5ml について、TCA 沈殿物を分画し、各ディッシュの血清 TBA 値を測定した。EDTA (1 mM) の発色時の有無で、TBA 値, EDTA-TBA 値として比較した。

6. Fe^{2+} の定量

ドータイト試薬 2-Nitroso-5-(N-propyl-N-sulfopropylamino)phenolhydrochloride (N-PSA P) を用いて定量した⁶⁾。試薬 34mg を 1 N 塩酸 10 ml に溶かし、蒸留水を加えて 100ml とし、原液 (1 mM) とした。

1) 使用前に試薬原液 0.5ml, 0.2M 磷酸緩衝液 (pH7.0) 2.5ml, 1 N 水酸化ナトリウム 0.6ml に蒸留水を加えて計 4 ml とし、これに試料液 1 ml を加え混合、N-PSAP · Fe^{2+} 錯体の吸収波長 752 nm の吸光度を分光光度計 (島津 UV-200) で計測した。基準検量線は蒸留水に溶解した各濃度の Fe^{2+} を用い、その 2 ml に 40% TCA 0.5ml を加えた 1 ml を試料液として求めた。同様培養液に TCA を加え、 Fe^{2+} を添加、遠心し、その上清 1 ml を用いて検量した。

2) 培養液を 37°C で保温し、 Fe^{2+} 0.1mM を添加し、経時的に (5, 10, 15, 20, 30秒, 1, 2, 3, 5, 10, 60, 120, 180分) その 2 ml を 0.5ml の 40% TCA にすばやく混合、反応を停止、遠心したのち、上清について上記同様検量し、 Fe^{2+} の酸化度をみた。零時は TCA 添加後 Fe^{2+} の添加で検量した。また、アスコルビン酸 (1 mM) を含む培養液についても検量を行った。

結 果

1. 細胞並びに培養液血清 TBA 値の変化：

本実験における通常培養において、 10^5 個の細胞を播種後、培養液を交換しないとき、培養液中の血清 TBA 値⁹⁾の変化は、表 1 に示すように、液量当り順次減少する傾向が認められ、6 日目の平均 TBA 値でも 65% 値を示した。EDTA 添加発色での TBA 値でも 6 日目の平均値で 60% 値に減少し

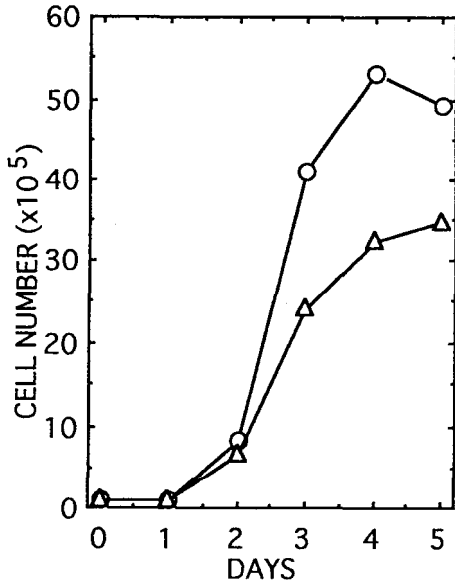


Fig. 1. Proliferation curves of cultured 3T3 cells. The cells (9×10^4) in 5ml of culture medium were seeded onto the culture dish (60mm ϕ). Fe²⁺ (0.05mM in final) was added immediately after seeding cells.
○; control, △; with Fe²⁺.

た。しかし Fe²⁺添加発色での TBA 値では差がみられず、EDTA-Fe²⁺添加発色での TBA 値は同様減少 (平均値で 63% 値) がみられた。一方細胞では、対数増殖期細胞 (3 日目) の TBA 値、EDTA 添加発色の TBA 値に比べ、プラト一期細胞 (6 日目) のそれら TBA 値はより高値が示された。さらに Fe²⁺添加発色の TBA 値でも高値がみられたが、EDTA-Fe²⁺添加発色での TBA 値では有意の差はみられなかった。

2. 増殖曲線：

ディッシュ (60mm ϕ) に 0.9×10^5 個の細胞播種後の通常培養における細胞の分裂増殖は、対照群で、培養液を交換しないとき、図 1 に示すように、24 時間後では 1.24 倍で 2 日後対数増殖期がみられ、4 日でプラト一期が観察された。2 日目から 3 日目での対数増殖期の倍加時間は 10.3 時間であった。Fe²⁺ (0.05mM) 添加群では 1 日目で 1.17 倍と対照に対して細胞数が少なく、その後の増殖能にも抑制がみられ、2 日目から 3 日目にかけての倍加時間は 12.6 時間が計算された。

3. Fe²⁺の定量：

Fe による過酸化脂質反応の開始には Fe²⁺-Fe³⁺の量的関係が検討されている^{3),7)-9)}ことから、培養液中の Fe²⁺の酸化度合をみる目的で Fe²⁺の定量を試みた。図 2 に示すように、N-PSAP を用いる本測定条件で、培養液中と蒸留・脱イオン水中の Fe²⁺の定量から得られる両検量線は同じ直線を描くことから、血清を含む培養液標品中の Fe²⁺の定量は可能である。

Table 1. TBA values of serum in the cultured medium and 3T3 cells. Cells (10^5) in the 5ml of culture medium (contained 10% calf serum) were pipetted onto the culture dish (60mm ϕ). TBA color reactions with or without Fe²⁺ and EDTA were carried out using the TCA precipitates from 0.5ml of culture medium and all cells of one dish (n=9). EDTA (1mM) and Fe²⁺ (0.05mM) were added before adding the TBA color reagents.

	TBA Value (nmolesMDA)					
	Day-0	Culture medium (/ml)			Cells (/mg protein)	
		Day-3	Day-6	Day-6	Day-3	Day-6
None	0.55±0.13	0.51±0.28	0.36±0.05	0.53±0.12	0.83±0.17	
EDTA	0.32±0.05	0.28±0.03	0.19±0.02	0.24±0.05	0.28±0.08	
Fe ²⁺	21.57±1.25	23.50±2.07	22.95±2.81	4.07±1.12	5.04±0.74	
EDTA, Fe ²⁺	0.63±0.21	0.49±0.10	0.40±0.04	0.99±0.17	1.05±0.20	

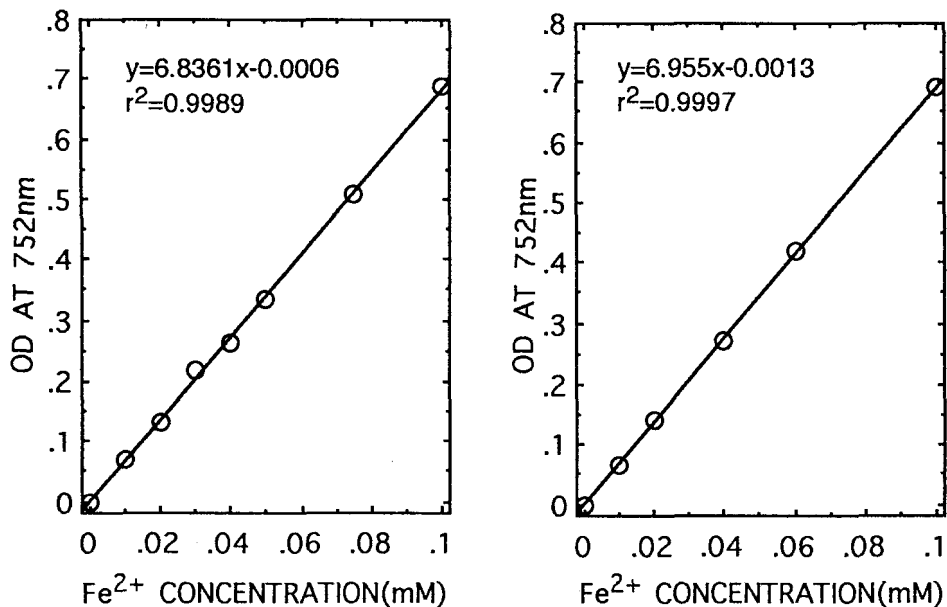


Fig. 2. Working curve obtained from the solutions containing various concentrations of Fe^{2+} by means of the colorimetric determination used N-PSAP.
 Left ; Fe^{2+} in culture medium, right : Fe^{2+} in distilled-deionized water.

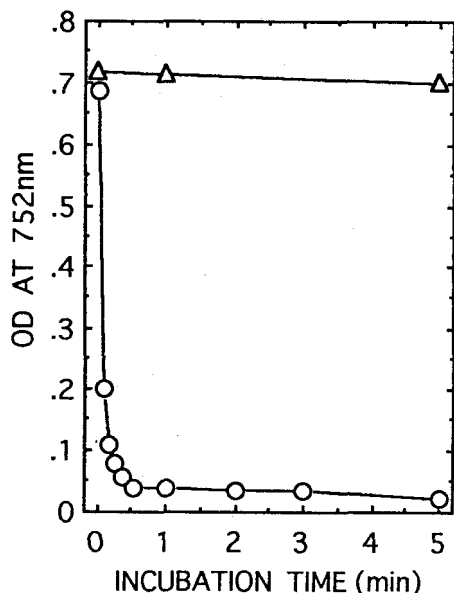


Fig. 3. Oxidation rates of Fe^{2+} added into culture medium incubated at $37^{\circ}C$.
 ○ ; control (Fe^{2+} 0.1mM), △ ; in the presence of ascorbic acid (1mM).

$37^{\circ}C$ で培養液を加温し、 $0.1mM Fe^{2+}$ 添加後の自動酸化を含む酸化度を測定したが、図3に示すように、添加後30秒でODは0.04 ($6\mu M$)を示し、添加後直ちに酸化することが示され、以後60、120、180分ではODでそれぞれ0.022 ($3.3\mu M$)、0.02 ($3\mu M$)、0.01 ($1.6\mu M$)とさらに Fe^{2+} の減少が測定された。ちなみにアスコルビン酸 (1mM) 存在下では短時間内での Fe^{2+} の急激な酸化は抑えられた(図3)。アスコルビン酸添加における零時のODの増加がみられ、その増加量0.027 ($4\mu M$)は実験に用いた血清を含む培養液中のFe量を示すものと考えた。

4. 生残率曲線 :

Fe^{2+} 及び Fe^{3+} 各濃度における殺細胞効果を生残率曲線として図4、5に示す。各コロニーの大きさに差がみられ、 Fe^{2+} 濃度に依存して小さく観察され増殖阻害が認められた。 Fe^{2+} 添加群の生残率曲線は低濃度で肩をもち、高濃度で指数型となる曲線が描かれた。放射線生物学で常用されるパラメーターを用いると、およそ平均致死濃度 (D_{01} , 曲線の直線部分の勾配部分で生残率を37%に減少

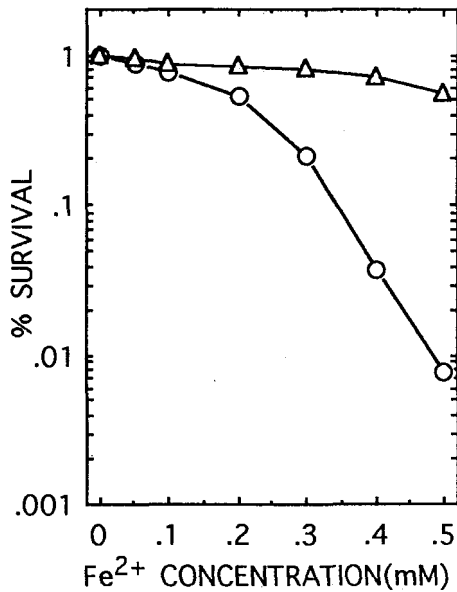


Fig. 4. Percent survival curves of 3T3 cells responded concentrations of Fe^{2+} .

○; Fe^{2+} was added immediately after seeding cells, △; cells were seeded 3 hours after adding Fe^{2+} .

さす濃度)は0.06mM, 準しきい値 (D_q , 曲線の指数部分が100%生残率と交わる点の濃度)は0.2 mM, 37%生残率濃度 (D_{37})は0.26mMと計算された。これに対し Fe^{2+} 前添加群では殺細胞効果は著しく減少し, 0.5mMでの生残率は添加群の0.75%に対し前添加群で55%が示された。また, 増殖曲線(図1)で阻害のみられた Fe^{2+} 0.05mM添加群での生残率は87.3%で前添加群では95%が得られた。

一方, Fe^{3+} は添加と同時に難溶性の水酸化鉄を形成¹⁰⁾し沈殿または浮遊物として観察されたが, Fe^{2+} 添加の場合よりも各々致死効果は減少し(図5), その生残率は0.5mMの添加で19.3%, 前添加で89%が得られた。

5. 生残率判定時のFeを含む培養液の血清TBA値:

添加群での最終培養液のTBA値を図6に示す。 Fe^{2+} 濃度に依存して血清TBA値の上昇がみられ, EDTA添加発色でのEDTA-TBA値も同じ傾向が認められた。血清のLot番号の異なる3標品に

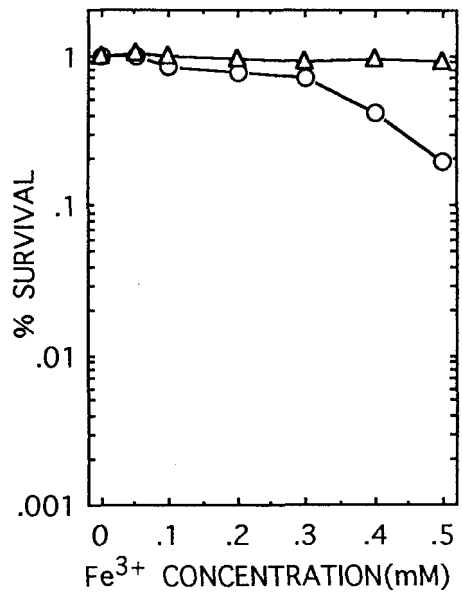


Fig. 5. Percent survival curves of 3T3 cells responded concentrations of Fe^{3+} .

○; Fe^{3+} was added immediately after seeding cells, △; cells were seeded 3 hours after adding Fe^{3+} .

ついて検討したが, 生残率測定では問題とならなかったにもかかわらず, 各組のTBA値に差がみられ, EDTAによる発色阻害度合は異なり, 平均値での阻害率は各実験濃度で40%前後が計算された。しかし, 各組(n=21)でのTBA値とEDTA-TBA値との相関は0.922, 0.947, 0.975を示し, Fe^{2+} 濃度に依存した相対的なTBA値, EDTA-TBA値の変化は平行していると考えられる。

一方, Fe^{3+} 添加群の最終培養液のTBA値では, 図7に示すように, 対照に比して増加は少なく, Fe^{3+} 濃度依存差もみられなかった。EDTA-TBA値は平均して88%値を示した。

Fe^{2+} , Fe^{3+} の両前添加群のTBA値並びにEDTA-TBA値は添加群のそれらと同じ傾向値を示し, 添加群との差はみられなかった。

考 察

Feはヒドロキシラジカルや他の活性酸素種を産生する反応において重要な役割をもち, 結果として脂質過酸化反応を誘起し生体分子の破壊をも

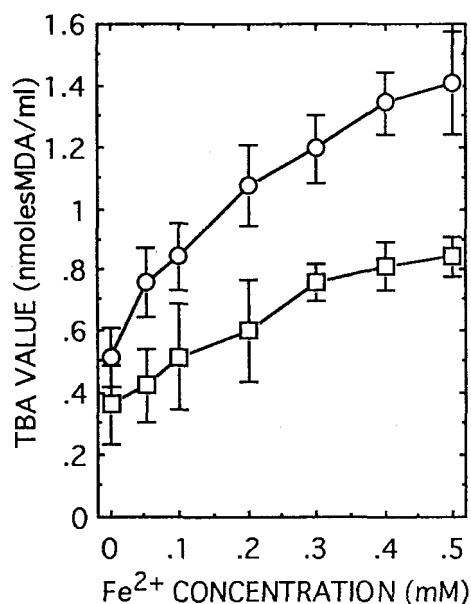


Fig. 6. TBA and EDTA-TBA values of the cultured medium containing various concentrations of Fe^{2+} at the time of colony counting. Calf sera from 3 different lot numbers were used, and the averages of values were obtained in $n=9$ (3×3) experiments.
○; TBA values, □; EDTA-TBA values.

たらず¹¹⁾。しかし Fe の生体内での傷害作用機序について不明の点が多い。動物実験では単なる鉄剤投与では臓器実質細胞に移行し難いとされ、鉄ニトリロ三酢酸 (Fe^{3+} -NTA) を用いて鉄過剰症モデルが研究されているが、 Fe^{3+} -NTA 投与のラット肝で脂質過酸化がみられ、Fe によるラジカル産生による障害と考えられている¹²⁾。 Fe^{3+} -NTA は培養肝細胞 (RL-34) の増殖を抑制し、高濃度では癌化を誘発している¹²⁾。リポソームを用いた脂質過酸化反応で Fe^{2+} 錯体は反応を誘起するが Fe^{3+} 錯体ではみられず、NTA 錯体でも同様で、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 両錯体間で異なった活性酸素産生機序が考えられている¹³⁾。また、種々の Fe^{2+} 錯体でミクロソームの脂質過酸化反応は異なる¹⁴⁾ことや、溶液中での Fe^{3+} 錯体のもつラジカルを誘導する“free” iron レベルが問題とする報告^{15),16)}もみられる。

細胞培養で、細胞並びに培養液血清の両者で起

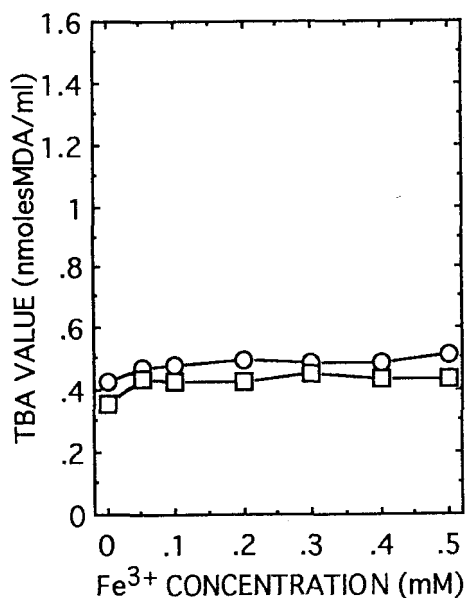


Fig. 7. TBA and EDTA-TBA values of the cultured medium containing various concentration of Fe^{3+} at the time of colony counting.
○; TBA values, □; EDTA-TBA values.

こり得る Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応⁵⁾の相互関係を得るために、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} による殺細胞効果と培養液の血清 TBA 値を検討した。通常培養法で、培養液を交換せず培養したとき、血清の TBA 値、EDTA-TBA 値は培養液の変化に伴って減少傾向がみられ、逆に増殖対数期の細胞に比べてプラトー期の細胞では TBA 値、EDTA-TBA 値は増加傾向がみられたが、細胞の老化、血清過酸化脂質の細胞への取り込み、TCA 蛋白沈澱物への脂質過酸化物の未回収等原因が示唆され、更に検討を要する。

Fe の殺細胞効果をコロニー法で検討した結果は興味ある知見を示した。細胞を播種後の Fe^{2+} 添加群での高濃度 (0.5mM) の殺細胞効果 (生残率 0.75%) は Fe^{3+} 添加群 (生残率 19.3%) に比べて著しく、更に Fe^{2+} 添加後 3 時間目で細胞を播種した前添加群では著しい殺細胞効果はみられず (生残率 55%)、 Fe^{3+} 前添加群でもより低率 (生残率 87.3%) を示した。このことは Fe^{2+} 、 Fe^{3+} とも添加直後の培養液構成物質との接触反応によって急速に生ずる化学反応物質が直接作用として短時間

内に細胞に障害を与えていることを示唆する。 Fe^{2+} は培養液へ添加後急速に酸化することが示されたが、単に pH のための自動酸化だけでなく鉄-酸素複合体^{16),17)}、培養液構成物質との複合体形成¹⁸⁾によって、活性酸素種の発生がみられ、そのラジカル反応の際に細胞が存在することが重要な要因と考えられる。すなわち浮遊状態の細胞がラジカルの標的となることが必要であり、その結果脂質過酸化反応による細胞膜障害⁹⁾が起り、ディッシュ面への接着阻害とともにその後の細胞増殖能にも影響し致死に至らしめると考えられる。 Fe^{3+} 添加群でも培養液との接触で直ちに起こるレドクス反応による Fe^{2+} の発生が重要と考えられる。またその後の培養中のレドクス反応によるラジカル発生によって細胞は傷害をうけることは増殖曲線から伺えられるが、生残率曲線で肩 (D_0 値 0.2 mM) がみられたことから生じた傷害は亜致死傷害とみられ、細胞は修復しようと考えられる。 D_0 値がおよそ $60\mu M$ と、 Fe^{2+} に対して 3T3 細胞の高感受性が示されたが今後の研究の指標となるだろう。コロニー法では Fe 濃度に応答した間期死、増殖死の結果が示されるが、細胞生残率は添加後短時間にみられるラジカル反応とそして Fe の存在で起こるだろう酸化還元に伴うラジカル反応の二つの作用機序による細胞障害の結果を示すものと考えられる。

終末培養液に存在する血清の TBA 値は Fe^{2+} 添加群と前添加群で、生残率に差がみられるにもかかわらず、 Fe^{2+} 濃度に依存して増加はみられたものの、同じ量的範囲を示した。また Fe^{3+} 添加群でもかなりの致死率が得られたにもかかわらず、血清 TBA 値の増加は極めて少なく濃度依存も見られなかった。これらのことは血清脂質過酸化物による細胞傷害は細胞培養での生残率判定で示される致死効果に対して影響を及ぼしていない可能性が示唆される。細胞傷害に伴うだろう細胞の脂質過酸化物ならびに血清脂質過酸化物の変化を含めて、細胞増殖との相関は更なる究明が必要である。

ま と め

細胞培養レベルでの Fe^{2+} 、 Fe^{3+} の細胞殺効果をマウス由来の 3T3 細胞を用いて、コロニー法で生残率曲線として検討した。 Fe^{2+} を細胞播種後直ちに添加した群 (添加群) では低濃度で肩をもつ指数型曲線が得られ、実験した高濃度 (0.5mM) での生残率は 0.75% であった。 Fe^{3+} 添加群では 0.5 mM で 19.3% の生残率を示し、 Fe^{2+} の細胞殺作用の著しいことが明かとなった。 Fe^{2+} を定量した結果、 Fe^{2+} は培養液に添加後直ちに酸化されることが示された。 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} を培養液に添加 3 時間後、細胞を播種した場合 (前添加群) では添加群より著しい殺細胞効果の減少がみられ、0.5mM での生残率は Fe^{2+} で 55%、 Fe^{3+} で 89% を示した。これらのことから、 Fe^{2+} 添加時の即時の酸化反応に伴うラジカルが直接的に細胞に障害を与え、細胞のディッシュ面への接着並びにその後の細胞増殖に重大な影響を及ぼすことが示唆された。

コロニー判定時の最終培養液の血清脂質過酸化物を TBA 値として測定した。 Fe^{2+} 添加群では Fe^{2+} 濃度に依存して増加がみとめられたが、 Fe^{3+} 添加群ではごく僅かの増加がみられたものの濃度依存は認められなかった。しかも前添加群でそれぞれ添加群と同じ傾向値がみられたことから、培養液血清の Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応は細胞の増殖能力に大きな影響を及ぼさないことが示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) Golberg L., Marti L. E., Batchelor A.: Biochemical changes in the tissue of animals injected with iron. 3. Lipid peroxidation. *Biochem. J.* 83 : 291-298, 1962.
- 3) Minotti G., Aust S. D.: The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*. 44 : 191-208, 1987.
- 4) Yagi K.: Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lipids*. 45 : 337-351, 1987.
- 5) 山本剛禧: 細胞培養における二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究: 基礎的検討. 岡大医短紀要. 3 : 49-53, 1992.

- 6) 橋本啓二：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究 1 二価鉄誘導脂質過酸化反応溶液中の二価鉄の定量。岡山医学会雑誌。94：349-357, 1982.
- 7) 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.
- 8) Braugher J. M., Daucan L. A., 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.
- 9) Minotti G., 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.
- 10) May P. M., Williams D. R.: The inorganic chemistry of iron metabolism. Jacob A., Worwood M. (ed.): *Iron in biochemistry and medicine II*. Academic Press, London and New York. 1-28, 1980.
- 11) Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219 : 1-14, 1984.
- 12) Awai M.: Pathogenesis and mechanism of iron overload: Ferric nitrilotriacetate, hemosiderin, active oxygen, and carcinogenesis. *Jpn. J. Clin. Hematol.* 30 : 1115-1127, 1989.
- 13) Fukuzawa K., Fujii T., Mukai K.: Peroxide-dependent and -independent lipid peroxidations catalyzed by chelated iron. *Arch. Biochem. Biophys.* 290 : 489-96, 1991.
- 14) Puntarulo S., Cederbaum A. I.: Comparison of the ability of ferric complexes to catalyzed microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation, and hydroxyl radical generation. *Arch. Biochem Biophys.* 264 : 482-491, 1988.
- 15) Liu M., Okada S., Kawabata T.: Radical-promoting "free" iron level in the serum of rats treated with ferric nitrilotriacetate: Comparison with other chelate complexes. *Acta Med. Okayama.* 45 : 401-408, 1991.
- 16) Goddard J. G., Sweeney G. D.: Delayed, ferrous iron-dependent peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 259 : 372-381, 1987.
- 17) 八木国夫, 五島雄一郎 (編) : 過酸化脂質と疾患. 医学書院, 東京. 12-19, 1981.
- 18) Rief D. W., Schbert J., Aust A. D.: Iron release from ferritin and lipid peroxidation by radiolytically generated reducing radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 264 : 238-243, 1988.