

二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究

第 二 編

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 誘導時間に及ぼすリン酸, アスコルビン酸の効果

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 青野 要教授)

森 本 節 夫

(昭和60年2月6日受稿)

Key words : lipid peroxidation,
mitochondria, ferrous ion,
phosphate, ascorbic acid.

緒 言

ミトコンドリア膜は、生体膜としては特異な構造をもつが、脂質の二重層を構成するリン脂質は不飽和脂肪酸を多く含んでいる^{1,2)}。生体膜になんらかの障害が加えられたとき、不飽和脂肪酸が過酸化を受け、生成した過酸化脂質が周囲に存在する蛋白質を変性させたり、細胞の機能低下をもたらす³⁾が、これらの反応機構については不明な点が多い。

著者は、全身照射ラット肝より分離されたミトコンドリアを用いて二価鉄(Fe(II))誘導脂質過酸化反応を調べ、照射群では対照(非照射)に比して誘導時間(lag)の短縮とTBA反応物質生成の増加を観察したが、同時に測定を行った溶液中のFe(II)の変化は、脂質過酸化反応(TBA値)曲線と相対的な減少曲線を得た⁴⁾。

Fe(II)誘導脂質過酸化反応に伴う誘導時間については、三価鉄(Fe(III))の存在下^{5,6)}、又、リン酸(Pi)の存在下でもlagの短縮がみられることが報告されている⁷⁾。しかし、アスコルビン酸(Asc)誘導脂質過酸化反応においては、Piによるlagの延長がみられることが報告されており^{7,8)}、各種条件下でのミトコンドリアの脂質過酸化反応のlagは変化がみられている。

本論では、放射線照射後認められたlagの変化⁴⁾と比較するため、ラット肝ミトコンドリア

(RLM)のFe(II)誘導脂質過酸化反応に対するPi, Ascの影響について、Fe(II)の消長の面より解析を試みた。

実験材料及び方法

(1) 実験動物: 市販の呑竜系ラット(8~12 W)を使用した。飼料は市販の固形飼料(MF)を与えた。

(2) 実験試薬: Fe(II)としては、硫酸第一鉄アンモニウム(片山化学, 特級)を実験添加直前に蒸留水に溶解して用いた。Ascは片山化学製特級を、Piはリン酸二水素カリウム(特級)をpH7.4に調製し用いた。

(3) 実験方法: ラットよりのRLMの分離調整は前報に従った⁴⁾。

脂質過酸化物の測定(TBA反応)と反応液中のFe(II)の定量(Nitroso-PSAP法⁹⁾)は、前報の如く行った⁴⁾。反応液としてはKT液(0.15M KCl, 0.01M Tris-Cl buffer, pH7.4)を用い、反応温度は25℃で行った。RLMは0.5 mg/mlの蛋白量で実験し、反応液2mlよりのTBA値(測定液3.25mlのOD_{532nm})、反応液0.8mlよりのFe(II)値(測定液5 mlのOD_{752nm})を求めた⁴⁾。蛋白量の定量はBuret法¹⁰⁾で測定した。

結 果

実験1. RLMのKT反応液中におけるFe

(II)誘導脂質過酸化反応：Fe(II)(0.05mM)の添加に伴う TBA 値の変化は、測定開始後30分の lag のち急激な上昇 (burst) がみられ、60分で一定値に達した(図1, a)。これに対し

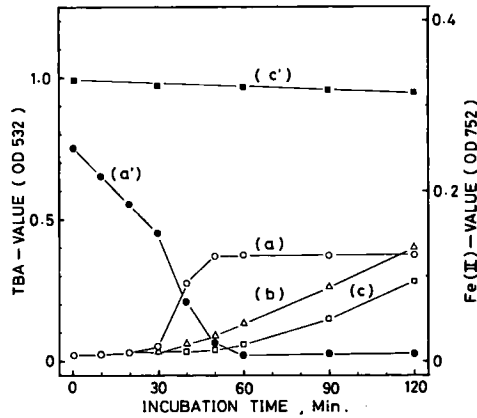


Fig. 1. Effect of ascorbic acid in the absence of phosphate on ferrous ion-induced mitochondrial lipid peroxidation.

TBA-value: ○—○, 0.05mM Fe(II); △—△, 0.5mM ascorbic acid; □—□, Fe(II) with ascorbic acid. Fe(II)-value: ●—●, Fe(II); ■—■, Fe(II) with ascorbic acid.

反応液中に添加した Fe(II)の濃度変化すなわち Fe(II) 値の変化(図1, a')は、添加後漸次減少し、30分より、より急激な減少がみられたのち60分にて基底値を示し、TBA 値の増加と Fe(II)値の減少の間に相対的変化がみられた。

実験2. RLMのKT反応液中におけるAsc誘導脂質過酸化反応：Asc(0.5mM)の添加によって測定開始された反応におけるTBA値の変化は、lag30分後徐々に増加し、測定時間内(120分)では常に増加が示された(図1, b)。

実験3. Fe(II)及びAsc共存下の脂質過酸化反応：Asc(0.5mM)添加後直ちにFe(II)(0.05mM)を添加し測定開始された反応は、実験1, 2よりもlagが長く、その後TBA値は漸次増加した(図1, c)。Fe(II)(実験1)及びAsc(実験2)でみられた脂質過酸化反応に伴う各TBA値に比較して、TBA値は低値を示す時間的増加がみられた。Fe(II)値は、全標品採取後一斉定量を試みたが、反応期間中ほとんど変化はみられなかった(図1, c')。

実験4. Pi存在下のFe(II)誘導脂質過酸化

反応：Pi(2mM)存在下のFe(II)(0.05mM)添加で得られたTBA値曲線はlagがほとんどみられず、最高値に達した後、漸次減少した(図2, a)。Fe(II)値は添加後急激な減少をみせた(図2, a')、実験1と比較し、lagの短縮と最高TBA値の増加及びFe(II)の減少速度促進が著明であった。この際、TBA値とFe(II)値について、実験1と同様相対的変化がみられた。

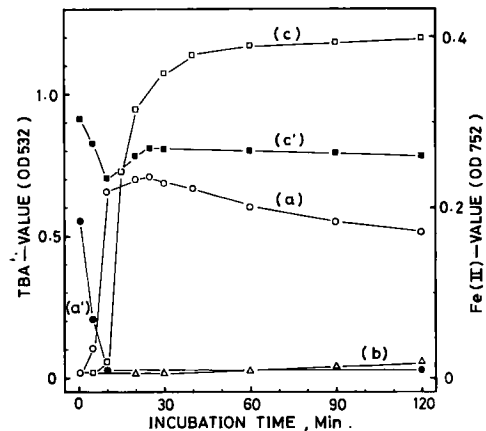


Fig. 2. Effect of ascorbic acid in the presence of phosphate on ferrous ion-induced mitochondrial lipid peroxidation.

TBA-value and Fe(II)-value: Same condition in Fig. 1.

実験5. Pi存在下のAscによる脂質過酸化反応：反応測定時間内(120分)でのAsc(0.5mM)添加によるTBA値の増加はごくわずかであり(図2, b)、実験2(図1, b)の結果と比較し、Piの著しい反応抑制作用がみられた。

実験6. Pi存在下のFe(II)、Asc共存による脂質過酸化反応：三者共存下の反応は、Asc不存在下のTBA値(実験4)と比較し、わずかのlagがみられた後、著しいTBA値の上昇が示され一定値に達した(図2, c)。得られた最高TBA値はFe(II)単独(図1, a)のその3.15倍であった。三者共存下におけるFe(II)値(標本採取後の一斉定量)は、一時減少がみられた後増加し一定値に達し、その後ごく僅かの減少継続が示された(図2, c')。この初期Fe(II)減少時間は、lag時間とほぼ一致が認められた。更に、三者共存下の反応は、Asc存在下のFe(II)誘導脂質過酸化反応(図1, c)と比

較して著しく促進された。しかし反応開始30分後のFe(II)の減少値はわずかであり、反応液中のFe(II)量は多かった。

脂質過酸化反応後のFe(II)の一斉定量は、実験1～6とも反応停止標品採取後、長時間水冷にて保置後行ったため、AscによるFe(II)への還元を考えると、経時時点における真のFe(II)値を示していない可能性があるため、次の実験を行った。

実験7. 実験6(図2, c')における同条件、即ちRLMを含む反応液に、Pi(2mM)、Asc(0.5mM)及びFe(II)(0.05mM)を順次継続して添加し、反応開始後それぞれ5, 10, 15, 20, 25, 30及び60分時の反応液を水冷TCA液に分注し反応を止め、直ちに遠沈5分行い、反応停止後各々のFe(II)濃度測定までの経過時間を10分とした。このときのFe(II)値の割合を図3に示す。この測定条件下でのFe(II)値の減少は15分値までみられ、55%以上の減少が測定され、実験6の反応時にみられたFe(II)値の減少(23%)より更にFe(II)値の減少がみられた。最低値以後わずかに上昇がみられたのち、Fe(II)値は、ほぼ一定状態が得られ、実験6と同様の变化傾向がみられたが、水冷保置中のAscの還元度合を実験濃度に関連して考慮しなければならないことを示す。この点を確認するため次の実験を行った。

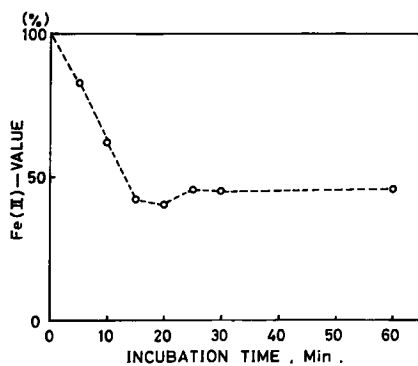


Fig. 3. Change of Fe(II)-value in mitochondrial peroxidation. The Fe(II)(0.05mM) added was measured in the KT-medium involved phosphate(2mM) and ascorbic acid(0.5mM).

実験8. 図3の30分後のFe(II)減少時にTCA液添加により反応を停止させたのち、こ

の時間を0分(45%)として、水冷下におけるFe(II)の変動を経時的に150分追った。各時の測定までの経過時間は10分である。この結果(図4), TCA存在下でFe(II)への変換が徐々に起っており、120分後では72%になった。

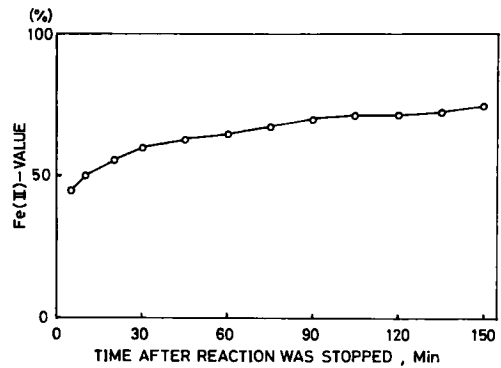


Fig. 4. The reduction of Fe(II) under the keeping condition. Peroxidation was stopped by addition of TCA and then samples were kept in ice-cold water. Initial Fe(II)-value was obtained at 30 minutes after peroxidation.

一方、RLMを含まない反応液において、TCA液中のAscの還元力をみるため、水中及び室温にて同濃度のFe(III)を添加し、Fe(II)への経時的变化及びリン酸添加時のFe(III)の変化を調べたが、これらの条件下では直ちにFe(II)への100%の還元がみられた。

考 察

生体膜における脂質過酸化物の形成には種々の機構が考えられ^{3,11-13)}、金属特に鉄の関与が重要であるとされている^{14,15)}が不明の点も多い。著者の教室では一連の二価鉄(Fe(II))誘導脂質過酸化反応の解析を行なっており^{6-8,16-18)}、著者は先にX線全身照射後のRLMにおいては非照射のものに比してlagの短縮とTBA値の増加を認め、反応が起り易くなっていることを明らかにした⁴⁾。特にこのlagの短縮は反応液内のFe(II)の減少と相関し、照射RLMでFe(II)の減少(酸化過程)を促進する因子の存在を示唆した⁴⁾。しかし、この因子の本体は明らかでない。

RLMでみられるFe(II)誘導脂質過酸化反応

(in vitro) の lag は、種々の条件下で変化がみられるが^{5,7,17)}、その際の Fe(II) の動向は分っていない。本論文ではその反応を、Pi 及び Asc の存在下で、Fe(II) の消長面より検討した。

RLM の Fe(II) 誘導脂質過酸化反応は、TBA 値曲線において、添加された Fe(II) の量に応じて一定の lag をもつシグモイド曲線を描く。Fe(II) の濃度が高ければ lag は延長される^{4,5,7)}。この時、lag と Fe(II) 値の変化(減少)は相対的であり、添加 Fe(II) 量に対して Fe(II) のある減少度合即ち相対量(比)(約1/3に減少)が著しい TBA 反応物質生成 (burst) 開始に必要である^{4,6)}。Fe(II) 減少曲線は溶液中の Fe(II) 自動酸化曲線からみて RLM で促進がみられたが⁴⁾、burst のときには Fe(II) 減少が更に促進される。TBA 値曲線と Fe(II) 値曲線の相対関係については更に詳細な研究が要求される。

Fe(II) 一定濃度条件下、Pi 存在で認められた lag の短縮は Fe(II) 減少率の促進を伴った。Pi は、Fe(II) とキレートすることにより、Fe(II) 減少を速め lag の短縮に寄与していると思われる。

脂質の自動酸化機構(開始、連鎖拡大、停止)による過酸化脂質の生成は脂肪酸ラジカルの生成に始まり、分子状酸素の吸収によって過酸化物が形成される^{3,13)}。本実験の場合、直接的には Fe(II) と膜脂質、Fe(II) と酸素との相互作用を考慮しなければならない。鉄の関与する脂質過酸化反応機構は、種々の条件下で、hydroxy radical, superoxide, singlet oxygen 等の活性酸素の関与が考えられているが^{15,19,20,21)}、開始剤としてはこれらの活性酸素は関係なく^{22,23)} 鉄-酸素分子複合体(perferryl ion) が重要であるとされる^{14,15,23-27)}。Pi (低濃度) 存在下高 TBA 値が得られたことは、単に Pi が Fe(II) 減少度合即ち相対量(比)に関係するだけでなく、膜脂質を含めた酸素複合体形成に関与しているのかもしれない。RLM の Fe(II) 誘導反応における酸素の吸収は、lag 時に若干の促進がみられ、burst 時に更に促進される⁷⁾ ことから lag 時の活性化酸素が脂肪酸ラジカルの発生に寄与していると思われる。Pi は lag 時の酸素消費を促進する⁷⁾。又、本実験系における EDTA の

効果は、添加時で、著しい TBA 反応物生成時 (burst) 中でも TBA 値を停止させる^{6,7)} ことから、Fe(III) が TBA 反応物生成に関係しており^{28,29)}、Fe(III) 錯体を含めて考慮しなければならない¹⁴⁾。何れにせよ、RLM 存在下、膜基質を含めたこれら複合体形成の平衡関係がより保たれている時間が lag と考えられるが、burst (TBA 反応生成物急増) の起因は明らかでない。ある一定量の過酸化物形成が連鎖反応機構に必要とされているが^{13,30,31)}、Fe の場合、もし Fe(II)-活性化酸素当量で一定の過酸化物が生じるとすれば、Fe(II) 高濃度の方が lag が長い⁴⁾ ことから、形成過酸化量は起因とは考え難い。

更に Pi 存在下で TBA 値が最高に達してから減少がみられることは、TBA 反応物の消去を考えねばならない。TBA 反応物の主役は過酸化物からの二次産物、マロンジアルデヒド(MDA)^{32,33)} とされる。RLM には MDA を消去する防御能力がある³⁴⁾。しかし TBA 反応物質は単に MDA を意味するのではなく、鉄・Pi-酸素・膜脂質四者間の分解過程産物を考慮しなければならない。MDA は脂質からの TBA 反応物の一部であり³⁵⁾、又、TBA 反応物は過酸化による脂質分解量の一部を示すとの報告³⁶⁾ もみられる。

Asc 誘導脂質過酸化反応曲線は burst はみられず緩やかに上昇した。RLM の同反応は非酵素的反応と云われるが³⁷⁾、その反応では鉄イオンの存在が必要との報告もみられ²⁶⁾、RLM 内在の鉄イオンとの関連から反応が促進されるとも考えられる¹²⁾。しかし、抽出した脂質の Asc 単独による反応もみられる³⁸⁾ ことから、Asc の酸化によるそれ自身のラジカル (tri-oxo radical³⁹⁾) を含めて、そのラジカル反応には絶対的に金属は必要でなく、その反応開始機構は Fe(II) のそれと異なると考えられる。Pi 存在下の Asc 誘導脂質過酸化反応において lag の延長がみられることは、Pi が単に抗酸化剤として働いていると考えられている⁴⁰⁾。Pi は RLM の膨潤をおこす⁴⁰⁾ ことから、Pi の Fe(II) 並びに Asc 誘導の反応に対する相反する効果は、膜構築の変化が関係していると考えられる。このことは Asc による反応は RLM においては熱処理した

方が起こり易いこと^{7,8)}, 膜溶解剤処理で促進がみられること⁴¹⁾, 又, 脂質単独よりも蛋白脂質複合体の方が反応が著しいこと⁴²⁾などからも示唆される。

Asc 存在下の Fe(II)誘導脂質過酸化反応において得られた結果では, 溶液中の Fe(II) の減少はほとんど見られず, TBA 反応物生成も Asc 単独によるそれよりも低かった。Fe(II)-Asc 系は過酸化反応の適当なモデルとして利用されている^{21,34)}。この場合, Fe 濃度は低く(例えば Asc 0.1mM に対して Fe 5 μ M), lag は認めていない。本論で実験された Fe(II)と Asc 濃度では, Asc は Fe(III)を Fe(II)に還元する。両者共存の場合, 夫々の反応が相殺され, Fe(II)誘導反応からみれば著しく抑制されている。Fe(II)誘導反応には Fe(II)減少の相対量がないと TBA 値の burst が得られないことから, Fe(II)の減少が抑えられることにより過酸化反応は阻害されると考えた。逆に Asc 反応からみれば大量の Fe(II)は抗酸化剤といえ, 先の Pi 共々 Asc 反応の基質としての膜構築との関係が考慮される。Asc 反応はその濃度が高いほど速く誘起される⁷⁾ことから Fe(II)の還元に Asc が供用され, 過酸化反応に対応する Asc 濃度減少が単に原因となって抑制されていると思われる。

本実験で用いられた濃度の Fe(II), Asc 両添加により抑えられた脂質過酸化反応において, Pi 共存では著しい lag の短縮と高 TBA 値がみられた。この時, Fe(II), Pi 共存反応に比して lag は長いものの, その lag に相応して Fe(II)の早期減少がみられた。実験に用いられた三者濃度間では, Asc は Fe(III)を Pi 存在下でも還元し得るが, RLM 存在下では, Fe と Pi の作用の方が Asc による還元速度より速いことが示され, Fe(II)減少が TBA 反応生成 burst に必要な相対量(比)まで達しているとみられる。この系における脂質過酸化反応の主役は Fe(II)であり, 酸素複合体を加味しなければならない²⁴⁾。且つ, Asc の還元による Fe(II)の増加が高 TBA 値の誘因になっていると考えられる。Fe(II)の減少度合で示される burst 誘起の非酵素的反応機構については Pi の関与を含めて, 各

錯体形成等に関する詳細な研究が更に要求される。

結 論

ラット肝ミトコンドリア(RLM)における二価鉄(Fe(II))誘導脂質過酸化反応に対するリン酸(Pi), アスコルビン酸(Asc)の影響について, 一定条件(RLM 0.5mg/ml, Fe(II) 0.05 mM, Pi 2mM, Asc 0.5mM)のもとに, TBA 値及び溶液中の Fe(II)の濃度の変化(Fe(II)値)を測定し, 次の結果を得た。

1) Fe(II)誘導脂質過酸化反応では, TBA 値の増加曲線と Fe(II)値の減少曲線の間に相対的变化がみられた。即ち, Fe(II)値が減少しある一定量比(約1/3に減少)になるまで反応の lag があり, その後 Fe(II)の減少促進と著しい TBA 値の上昇(burst)がみられた。

2) Asc 誘導脂質過酸化反応では, lag の後, 緩徐な TBA 値の増加が示された。

3) Fe(II), Asc 共存下における反応では, 1), 2)の場合よりも lag が長く, TBA 値のより緩徐な増加が示され, また Fe(II)値の減少はみられなかった。

4) Pi 存在下の Fe(II)誘導反応では, 1)のそれに比し, lag の短縮と最高 TBA 値の増加が認められるとともに, Fe(II)の減少速度の促進がみられた。

5) Pi 存在下の Asc 誘導反応では, TBA 値の増加はごく僅かであり, Pi の反応抑制作用がみられた。

6) Fe(II), Asc, Pi 共存による反応では, 4)と比較し, わずかの lag の遅延がみられたものの TBA 値の著しい上昇が示され, 一定値に達した。その最高 TBA 値は 1) に比して 3 倍量を呈した。Fe(II)値は一時減少がみられた後, 増加し, 更に一定の減少継続が示された。しかし, lag 内における Fe(II)値初期の減少度合は, TBA 値(burst)に必要な相対量(比)に達していることが示された。

以上の結果に基づき, Fe(II)の関与する過酸化反応について考察したが, Fe(II)の減少度合と TBA 反応物生成機構の関連については更に詳細な研究が要求される。

謝 辞

稿を終わるに当り、御懇切なる御指導御校閲を頂いた青野要教授に深甚なる謝意を表します。又、直

接実験の御指導を頂いた山本剛禧博士、御援助を戴いた平木祥夫助教及び放射線医学教室の各位に深謝いたします。

文 献

1. 小倉良平：ミトコンドリア，“過酸化脂質と疾患”（八木国夫，五島雄一郎編集），医学書院，pp. 49—55，1981.
2. 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。第二編，脂質ならびに脂肪酸組成の変動と抽出脂質の Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応について，岡山医学会雑誌，**88**，197—207，1976.
3. 八木国夫，五島雄一郎編集：“過酸化脂質と疾患”，医学書院，1981.
4. 森本節夫：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究。第一編，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.
5. Hunter, F.E. Jr., 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.
6. 橋本啓二：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究。第二編，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.
7. Yamamoto, G., Tanabe, M., Wakabayashi, H. and Yamamoto, M.: Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria. I. Effect of inorganic phosphate. *Acta Med. Okayama* **28**, 229—310, 1974.
8. 橋本郷之助，山本道夫，田辺正忠，青野 要，山本剛禧：ラット腹水肝癌細胞 (AH 130) 並びにそのミトコンドリアにおける二価鉄およびアスコルビン酸誘導脂質過酸化反応に及ぼすリン酸の効果。岡山医学会雑誌，**88**，931—939，1976.
9. 橋本啓二：二価鉄誘導脂質過酸化反応に関する研究。第一編，二価鉄誘導脂質過酸化反応液中の二価鉄の定量。岡山医学会雑誌，**94**，349—357，1982.
10. Gornall, A.G., Bardawill, C.G. and David, M.M.: Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem.* **177**, 751—766, 1949.
11. Pederson, T.C. and Aust, S.D.: The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **52**, 1071—1078, 1973.
12. Kaschnitz, R.M. and Hatefi, Y.: Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer proteins as initiators of lipid autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 292—304, 1975.
13. 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，1983.
14. Bucher, J.R., Tien, M. and Aust, S.D.: The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **111**, 777—784, 1983.
15. 中野 稔：酸素の活性化，“過酸化脂質と疾患”（八木国夫，五島雄一郎編集），医学書院，pp. 12—19，1981.
16. Utsumi, K., Yamamoto, G. and Inaba, K.: Failure of Fe^{2+} induced lipid peroxidation and swelling in the mitochondria isolated from ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **105**, 368—371, 1965.
17. Utsumi, K., Yamamoto, G., Yamamoto, M. and Tanabe, M.: Effect of x-ray irradiation on the

- lipid peroxidation and swelling of mitochondrial induced by ferrous ions. *Nippon Acta Radiol.* **26**, 345—350, 1966.
18. 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。第一編。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.
 19. 二木鋭雄：脂質過酸化の化学（反応論）。“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, pp. 9—19, 1983.
 20. King, M.M., Lai, E.K. and McCay, P.B.: Singlet oxygen production associated with enzyme-catalysed lipid peroxidation in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **250**, 6496—6502, 1975.
 21. Pederson, T.C. and Aust, S.D.: The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **385**, 232—241, 1975.
 22. Fukuzawa, K., Chida, H., Tokumura, A., and Tsukatani, H.: Antioxidative effect of α -tocopherol incorporation into lecithin liposomes on ascorbic acid- Fe^{++} -induced lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 173—180, 1981.
 23. Gutteridge, J.M.C.: The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS (Fed. Eur. Biol. Soc.) Lett.* **150**, 454—458, 1982.
 24. Sugioka, K., Nakano, H., Nakano, M., Kubota, S. and Ikegami, Y.: Generation of hydroxyl radicals during the enzymatic reductions of the Fe^{3+} -ADP-Phosphate-Adriamycin and Fe^{3+} -ADP-EDTA systems. Less involvement of hydroxyl radical and a great importance of proposed perferryl ion complexes in lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **753**, 411—421, 1983.
 25. Hamilton, G.A.: Oxidation by molecular oxygen. II. The oxygen atom transfer mechanism for mixed-function oxidases and model for mixed function oxidases. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 3391—3392, 1965.
 26. Hochstein, P., Nordenbrand, K. and Ernster, L.: Evidence for the involvement of iron in the ADP-activated peroxidation of lipids in microsomes and mitochondria. *Biochem. Biophys. Res Comm.* **14**, 323—328, 1964.
 27. Svingen, B.A., Buege, J.A., O'Neal, F.O. and Aust, S.D.: The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **254**, 5892—5899, 1979.
 28. Will, E.D.: The effect of inorganic iron on the thiobarbituric acid method for the determination of lipid peroxides. *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 475—477, 1964.
 29. Asakawa, T. and Matsusita, S.: Thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides. *Lipids* **14**, 401—406, 1979.
 30. Aust, S.D. and Svingen, B.A.: The role of iron in enzymic lipid peroxidation. In *Free Radical in Biology*. (Ed. W.A. Pryor) Vol. 5, pp. 1—28, 1982.
 31. Kharasch, M.S., Arimoto, F.S. and Nudenberg, W.: The chemistry of hydroperoxides. X. The addition of free alkoxy radicals to conjugated systems. *J. Org. Chem.* **16**, 1556—1565, 1951.
 32. Dahle, L.K., Hill, E.G. and Holman, R.T.: The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 253—261, 1962.
 33. Pryor, W.A., Stanley, J.P. and Blair, E.: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids; II A suggested mechanism for the formation of TBA reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids* **11**, 370—379, 1976.
 34. Smith, L. and Packer, L.: Aldehyde oxidation in rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*

- 148, 270—276, 1972.
35. Frankel, E.N. and Neff, W.E.: Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products. *Biochim. Biophys. Acta* **754**, 264—270, 1983.
 36. Kunimoto, M., Inoue, K. and Nojima, S.: Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **646**, 169—178, 1981.
 37. Ottolenghi, A.: Interaction of ascorbic acid on mitochondrial lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **79**, 355—363, 1959.
 38. 山本剛禧, 森本節夫, 橋本啓二, 若林寿生, 林 英博, 青野 要: 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の促進. 日本医学放射線学会雑誌, 臨時増刊号 43, 165, 1983.
 39. Schuler, R.H.: Oxidation of ascorbate anion by electron transfer to phenoxyl radicals. *Radiat. Res.* **69**, 417—433, 1977.
 40. Hunter, F.E., Scott, A., Hoffsten, P.E., Guerra, F., Weinstein, J., Schneider, A., Schutz, B., Fink, J., Ford, L. and Smith, E.: Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **239**, 604—613, 1964.
 41. 福沢健治: 細胞下レベルにおけるビタミン E の作用—生体膜の構造と機能に対する作用を中心として—. *ビタミン* **50**, 47—59, 1976.
 42. Victoria, E.J. and Barber, A.A.: Peroxidation of microsomal membrane protein-lipid complexes. *Lipids* **4**, 582—588, 1969.

Ferrous ion-induced lipid peroxidation**Part II. Effects of phosphate and ascorbic acid on the induction period (lag) of ferrous ion-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria****Setsuo MORIMOTO**

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. K. Aono)

The effects of phosphate (Pi) and ascorbic acid on Fe(II)-induced lipid peroxidation were studied in rat liver mitochondria (RLM) at 25 °C. The examination was conducted with RLM at a concentration of 0.5 mg protein/ml, 0.05 mM Fe(II), 2 mM Pi and 0.5 mM ascorbic acid. Peroxidation was detected by the thiobarbituric acid reaction (TBA-value), and the concentration of Fe(II) in the reaction mixture was determined simultaneously by the Nitroso-PSAP method.

Fe(II)-induced peroxidation had a lag period followed by a burst in the TBA-value and then held a moderate level. A slow decrease in Fe(II) content was observed during the lag period which was followed by a greater decrease that paralleled the burst in the TBA-value. The Fe(II) concentration at the initiation of the burst was one-third of the added Fe(II) concentration. The ascorbic acid-induced peroxidation had a lag period accompanied by a slow increase in the TBA-value. The Fe(II)·ascorbic acid-induced peroxidation had a longer lag period than the ascorbic acid-induced one. The TBA-value increased more slowly, and the Fe(II) concentration was not reduced in this case. Peroxidation induced by Fe(II)·Pi had a shorter lag period and a greater TBA value than that by Fe(II). The Fe(II) content was reduced more rapidly with Fe(II)·Pi than with Fe(II) only. Ascorbic acid·Pi-induced peroxidation showed an elongated lag period compared with ascorbic acid only, and the TBA-value increased more slowly. Fe(II)·Pi·ascorbic acid-induced peroxidation had a slightly longer lag period than the peroxidation induced by Fe(II)·Pi, and had the highest TBA-value. Fe(II) content was reduced during the lag period, and then increased. Other experiments under this condition indicated that the rate of Fe(II) content reached the optimum level needed for the initiation of burst peroxidation.