

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

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 山本道夫教授)

橋 本 啓 二

(昭和56年12月9日受稿)

Key words: ミトコンドリア脂質
脂質過酸化反応, 鉄

結 言

近年脂質過酸化反応は生体膜の機能と構造の両面から、生体内における種々の重要な役割が注目されている^{1)~10)}。著者の教室では、放射線障害の観点より組織、オトガネラにおける脂質過酸化反応に関する研究が続けられ^{9)~12)}、特にミトコンドリアにおける二価鉄 (Fe(II)) 誘導脂質過酸化反応は、脂質過酸化反応機構の解析の一助として究明されている^{9)~13)}。ミトコンドリアにおける Fe(II) 誘導脂質過酸化反応は、鉄濃度に応じて誘導期 (lag) が存在する^{13)~15)}が、ミトコンドリアより抽出された脂質においても、ある条件下ではミトコンドリアのそれと同様に、誘導期 (lag) がみられることがわかった。

著者は、第一編で Fe(II) 誘導脂質過酸化反応溶液中の Fe(II) 濃度が、三価鉄 (Fe(III)) の共存下でも選択的に定量可能であることを明告にした¹⁶⁾。そこで第二編ではその事実をもとにし、ラット肝ミトコンドリアから抽出した脂質を用いて、Fe(II) 誘導脂質過酸化反応における Fe(II) の経時的消長と lag との関係について、経時的実験を行ない、その結果をもとに脂質過酸化反応開始のメカニズムについて考察したので報告する。

材料及び実験方法

材料

動物: 市販のオリエンタル固型飼料 (MF) を用いて飼育した呑竜系ラット 8-12週令を使用した。

試薬: Fe(II) は硫酸第一鉄アンモニウム (片山化学工業KK) を用いた。チオバルビツール酸ソーダ (TBA) は (半井化学薬品KK製) を又、Fe(II) 呈色試薬としては Nitroso-PSAP (2-nitroso-5-N-propyl-N-sulfopropylamino phenolhydrochloride, ドータイト試薬, 和光純薬工業KK) その他の試薬は特級, 水は蒸溜脱イオン水を用いた。

方法

肝ミトコンドリアの分離: ラット肝ミトコンドリアは Hogeboom の方法に準じて分離した¹³⁾。

脂質の抽出: 分離したミトコンドリアから Folch らの方法に準じて脂質を抽出した¹⁷⁾。抽出後蒸発乾固した総脂質試料に 99.5% エタノールを加え、テフロンホモゲナイザーを用いて溶解、冷凍室に保存し実験に供した。

脂質過酸化反応の測定: 脂質過酸化反応は 25℃ で Fe(II) 濃度 0.05 mM を用いて誘導した。実験は次の反応系について施行した。即ち i) KT 液 (0.15 M KCl, 0.01 M Tris-HCl 緩衝液, PH 7.4) での反応を基準に K-リン酸 (PH 7.4)

2 mM 存在下での反応, ii) KP 液(0.15M KCl, 0.01 M Na-K-リン酸緩衝液)で PH 7.4 と 6.0 での反応, iii) KT 液で Fe(III) が 0.1 mM (最終濃度) 存在する条件での反応, iv) KT 液で Fe(II) 濃度を 0.1 mM (最終濃度) にしての反応, v) KT 液で脂質過酸化反応の経時測定中に EDTA (0.5 mM) を加えた条件下での反応, の 5 系である。

前もって 25°C に保った各反応液 39.8 ml に脂質 (4 mg/ml) 0.1 ml を加えて 10 分間温置したのち, Fe(II) 溶液 0.1 ml を加え, 総量 40 ml として反応測定を開始した。経時的にその 2.0 ml を採取し, 氷冷反応停止液 (40% 三塩化酢酸 (TCA) 0.5 ml) に加え水中に保存した。各経時標品採取後 TBA 反応分析では更に 5 N HCl 0.25 ml と 2% TBA 0.5 ml ずつ加え混合し, 沸騰水中で 15 分間処理した後, 冷却, 遠沈し, その上清について, 島津分光光度計 (UV200) を用いて 532 nm と 600 nm の吸光度を測定し, TBA 値は OD 532-OD 600 で示した。

脂質過酸化反応液中の Fe(II) 濃度の測定: TBA 値測定と同一反応系で同時操作を行ない, 経時的に 2.0 ml を採取し, 反応停止液 (40% TCA 0.5 ml) を加え遠心し, その上清を標品とし, 第一報の方法により測定した¹⁶⁾。即ち 1 mM Nitroso-PSAP 0.5 ml, 0.2 M リン酸緩衝液 2.5 ml, 1 N NaOH 0.6 ml, 水 0.4 ml を, この順に加え 4 ml そし, それを A 液とする。上記の標品から 1 ml をとり, それを A 液に加え総量 5 ml とし, すばやく混和し, 752 nm で OD 測定を行ない Fe-値とした。

実験結果

反応系 i) での Fe(II) の減少のし方を図 1 に, Fe(II) の減少と TBA 値の関係を図 2 に示す。反応系 ii), iii), iv) での Fe(II) の変化と TBA 値の関係をそれぞれ図 3, 4, 5 に示す。反応系 v) での Fe(II) の変化と EDTA を加えた時期ならびに TBA 値の変化を図 6 に示す。

KT 液中 (基質不添加) では Fe(II) では Fe(II) の減少が認められた。(図 1) Fe(II) 添加混合直後より Fe(II) の著明な減少がみられ, その後漸減し一定値を示した。一方リン酸の存

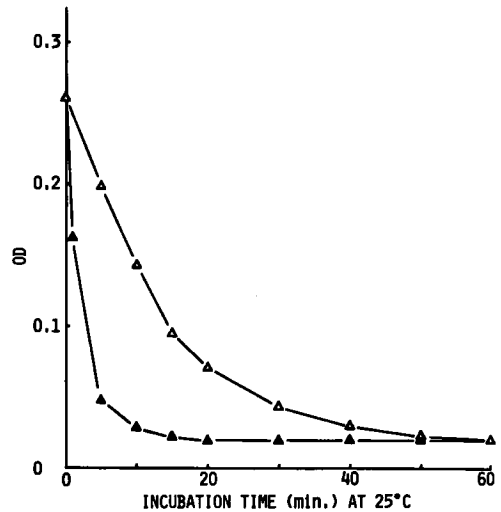


Fig. 1. Fe(II) consumption in the medium of 0.15M KCl-0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4), with (▲—▲) or without (△—△) Pi

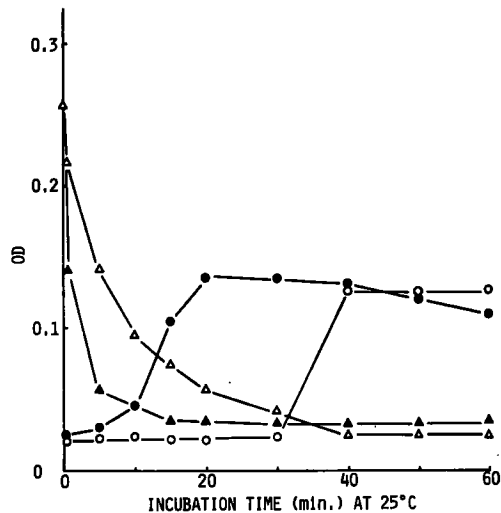


Fig. 2. Effect of Pi on consumption of Fe(II) and peroxidation of mitochondrial lipid under the condition with or without Pi. The incubations carried out in 0.15M KCl-0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4) with or without 2mM Pi (PH 7.4). Fe(II)-value and TBA-value are expressed as ▲—▲ and ●—● with Pi, and △—△ and ○—○ without Pi, respectively.

在下では、Fe(II) は非添加の場合よりも急激な減少を示し、その後漸減し、一定値を示した。

脂質量10 μ g/mlを用いての脂質過酸化反応において(図2) Fe(II) 減少に伴う TBA 値の変化をみると、KT 液中では、混合30分後に Fe(II) 濃度が OD 0.04 と 15% に低下するまでは TBA 値の上昇はほとんどみられず、その後30分後から40分後にかけて、急激な上昇がみられ、40分後以降では一定値を示した。これに対し、図2に示す如くリン酸の存在下では、Fe(II) の減少は脂質存在下でも急激な曲線として示され、これに伴って Fe(II) 濃度が約15%に低下する混合後5分までは TBA 値はわずかな上昇にとどまったが5分後から20分後にかけて TBA 値の急激な上昇、即ち lag の短縮が認められ、20分後のピークはその後わずかに漸減がみられた。Fe(II) 単独、Fe(II) とリン酸の共存下いずれでも、Fe(II) 濃度が同程度(約15%) になってから、急激な TBA 値の上昇がみられ、その立ち上がりは同程度であり、最高 TBA 値にも有意差はみられなかった。

反応系 ii) での 0.01M リン酸緩衝液中での脂質過酸化反応と Fe(II) 濃度変化(図3)では、

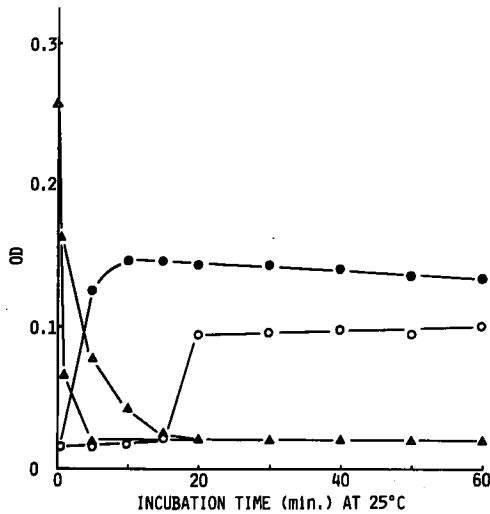


Fig. 3. Consumption of Fe(II) and peroxidations of mitochondrial lipid under the conditions of 0.15M KCl-10mM Pi-buffer. Fe(II)-value and TBA-value are expressed as \blacktriangle - \blacktriangle and \bullet - \bullet at pH 7.4, and \triangle - \triangle and \circ - \circ at pH 6.0, respectively.

PH 7.4では混合直後より Fe(II) の著明な減少がみられ、5分後には約8%に減少し、その後一定値をとった。これに対して TBA 値の変化は、混合直後より lag がほとんどみられず TBA 値の急激な上昇がみられ、10分後にピークに達

し、以後わずかに漸減した。一方 PH 6.0 系では、Fe(II) は混合直後より著明に減少するものの、その程度は PH 7.4 にみられるほど急激ではなく、15分後に約10%に減少しその後わずかに減少し一定値をとった。この Fe(II) の減少に伴う TBA 値の変化は、混合15分後までほとんどみられず、15分~20分後にかけて急激な上昇がみられ、20分後以降はわずかに漸増するものの、ほぼ一定の値を示した。又、最高 TBA 値は PH によって異なることが認められた。

Fe(III) 存在下、反応系 iii) の Fe(II) 脂質過酸化反応と Fe(II) の消長(図4)では、Fe(III) 存在条件での Fe(II) は混合直後より著明

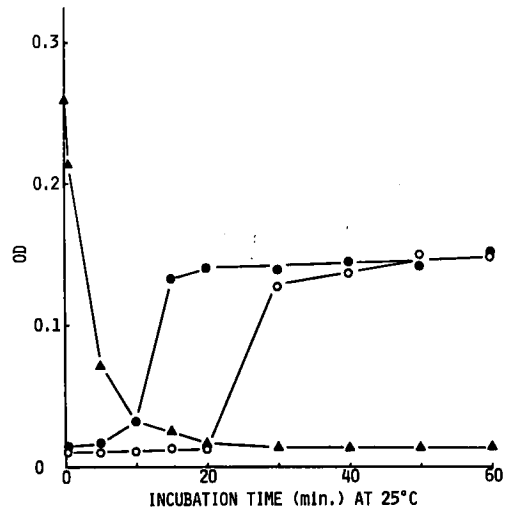


Fig. 4. Effect of Fe(III) on consumption of Fe(II) and peroxidation of mitochondrial lipid. Measurement started by addition of Fe(II) (0.05mM) immediately after the addition of Fe(III) (0.1mM) in 0.15 M KCl-0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4). Fe(II)-value and TBA-value are expressed as \blacktriangle - \blacktriangle and \bullet - \bullet in the presence of Fe(III). TBA-value of control is \circ - \circ .

に減少し5分後に27%に、10分後には12%に、20分後には8%になり、以下わずかに漸減し一

定値をとった。Fe(II)の減少に伴うTBA値の変化は、混合5分後からわずかな上昇がみられ、10分から15分にかけて急激な上昇がみられたが、対照としてのFe(II)単独系では、混合20分後まで変化がみられず、20分から30分にかけて急激な上昇がみられ、Fe(III)によるlagの短縮が明らかに認められた。最高TBA値は、両者とも同じであった。

Fe(II)濃度(0.05mM)を高濃度(0.1mM)にして、誘起した反応(反応系iv)での結果(図5)では、Fe(II)値は、混合直後から減少し、

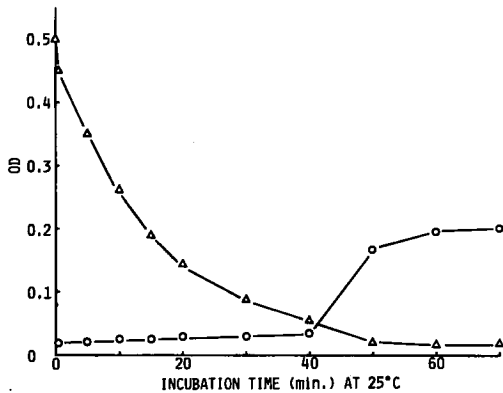


Fig. 5. Fe(II) (0.1mM)-induced mitochondrial lipid peroxidation (○—○), accompanied with Fe(II) consumption (△—△), in 0.15M KCl-0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4).

40分で12%, 50分で5%に減少した。これに対してTBA値も混合40分後まではほとんど上昇はみられず、40分から50分で著明な上昇がみられ、その後一定の値を示した。反応系i)と対比して明らかに、Fe(II)濃度の上昇にともなうlagの延長が認められ、それがFe(II)の消費と関連があることが示された。

Fe(II)誘導脂質過酸化反応時のEDTAによる反応停止実験(反応系v)曲線(図6)では、Fe(II)のみでは(反応系i)と同じ、混合直後よりFe(II)の著明な減少がみられ、それに伴い15分から20分後にかけてTBA値の急激な上昇と、20分後のTBA値の漸増がみられた。混合後10分、すなわちTBA値の上昇の全くみられない誘導期中にEDTAを加えると、それ

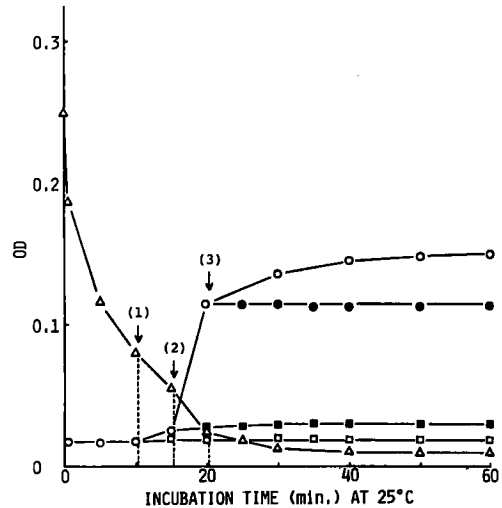


Fig. 6. Effect of EDTA on Fe(II)-induced peroxidation of mitochondrial lipid. EDTA (0.5 mM) are added at incubation time shown in Fig. by arrow. Fe(II)-value of control is expressed by △—△ and those after additions of EDTA immediately down to zero TBA-value of control is ○—○, and that after first, second and third addition of EDTA are □—□, ■—■ and ●—●, respectively.

以後のTBA値の上昇はみられなかった。TBA値が、誘導期の終わりでわずかな上昇がみられ、急激な上昇のみられる直前にEDTAを加えると、TBA値はほとんど上昇がみられず、以後の急激な上昇は全くみられなかった。誘導反応開始後20分、すなわち、TBA値の急激な上昇が終わり漸増期へ移行する時にEDTAを加えると、それ以後のTBA値の変化はみられなかった。これらのことから、反応がどのStageであろうと、EDTAを加えるとTBA値は、その時の値のまま一定値をとり、変化はみられないことが示されたが、Fe(II)値は、三実験群ともEDTAの添加と同時に0値を記録した。

考 察

脂質過酸化反応の生成物は、マロンジアルデヒド(MDA)とされ^{18)~20)}、このMDAがTBAと結合発色するといわれており²¹⁾、最近脂質過酸化物の定量としてのTBA反応は、生成され

たMDA量としてのその妥当性が再考慮されているが、少なくともTBAと反応する物質を過酸化脂質としてTBA分析法は常用されている。

脂質過酸化反応の機構は脂質の自動酸化の研究により論議され明らかにされて来た^{18)~20)}、脂質過酸化反応は各種の基質、反応を促進する物質、及び反応を阻害する物質即ち抗酸化物質の有無について、反応過程が討論されている^{9),22)~28)}。更に、生体膜においては、TBA発色を利用して、NADPH依存^{29),30)}、super oxide依存^{31)~34)}等の酵素的反応や、ADP-Fe誘導³⁵⁾、アスコルビン酸誘導³⁶⁾、Fe(II)誘導^{14),37)}等の非酵素的反応による脂質過酸化反応が知られており、その反応過程について研究が続けられていて、いずれの反応でも、微量ではあるが、鉄がその反応に必須であるとされている^{28),38)~40)}。

本実験では、ミトコンドリアのFe(II)誘導脂質過酸化反応を例にとり、単純化の目的でミトコンドリアから抽出した脂質において、脂質過酸化反応の検討を行なった。

今までミトコンドリアのFe(II)誘導脂質過酸化反応についての解析に関する研究は多いが^{9),12)~15),20),37),42)}、その反応機構については不明の点も多い。その反応は熱処理したミトコンドリアにおいてもみられることから、主として非酵素的反応と考えられている^{13),14)}。もちろん、膜におけるFe(II)誘導脂質過酸化反応は酵素的要因を考慮しなければならない¹⁰⁾。

ミトコンドリアの脂質過酸化反応には、誘導時間(lag)が認められlagの有無について多くの報告がなされている^{43)~45)}。油脂の自動酸化においてもlagはその特徴とされ⁴⁶⁾、lagの延長、短縮は過酸化反応の活性の度合をあらわしているものと考えられ⁹⁾、その短縮は反応の促進とみることができる。又、lag内に起る変化が連鎖反応の重要な因子を握っていると考えられ¹⁰⁾、lagの起因を究明することは、脂質過酸化反応の機構の解析につながると思える。

本実験では、種々の条件下いずれにでもFe(II)減少中にはTBAの発色はみられずlagとして観察され、Fe(II)濃度が十分に減少してから、TBA値の急激な上昇がみられた。このことから、Fe(II)変化中のFe、並びに中間生成

物の挙動及びその中間生成物からのMDAまでの分解の二段階の反応形式を考えなくてはならない⁴⁷⁾。又、反応途中でFeの強力なキレート剤であるEDTAを加えると、それが反応過程のどの段階であっても、それ以後のTBA値の増加はみられなかったことから、MDA形成にはFe(II)の変化のみでなくFe(III)が必要なことが示唆される。

Tappelらによると⁴⁸⁾金属イオンと脂肪酸による脂質過酸化反応式(レドックス反応)(1)(2)

$$\text{ROOH} + \text{M}^{+n} \rightarrow \text{RO}\cdot + \text{OH}^- + \text{M}^{+(n+1)} \quad (1)$$

$$\text{ROOH} + \text{M}^{+(nH)} \rightarrow \text{ROO}\cdot + \text{H}^+ + \text{M}^{+n} \quad (2)$$
 のうち、アスコルビン酸誘導の脂質過酸化反応ではリノール酸やアラキドン酸が自動酸化をおこしペンタンになることから、その際(2)式が優位に進行すると報告している。しかし、レドックス反応(1)又は(2)、又は両者のうちどれが優先的に起こるかは、金属触媒の種類に依存し、その周囲環境に左右されるといわれている⁴⁶⁾。空气中(O₂存在下)では、Fe(II)が強力な還元剤であるため(1)の反応が(2)の反応よりもはるかに優先するとされている⁴⁶⁾。いずれにせよこれらの反応開始が起こった後は一連の自動酸化反応過程が続くはずである。

脂質の自動酸化では、諸種の説が論ぜられている^{21),46),49),50)}が、一般的にその反応は次の4つの連鎖過程に分けられている⁵⁰⁾。

第一過程：反応の開始

(基質脂質RHより遊離基の生成)

第二過程：ヒドロペルオキシドの連鎖生成

(過酸化物価の上昇)

第三過程：ヒドロペルオキシドの分解

(過酸化物価の減少とカルボニル価の上昇)

第四過程：反応の終結

(二量体の生成による分子量の増加)

本実験を中心に考えると、lag期は第一過程に相当し、TBA値は脂質過酸化反応における分解物である、カルボニル即ちMDAを測定しているため、第三過程に相当している。Fe(II)量の減少はlag期間中にみられることから、少なくとも基質に(1)(2)の反応のいずれにせよ遊離基の生成が継続進行していると思われるがlag中はこの基質ラジカルの生成のみに、とどまっ

ていることが示唆される。

一方、抽出脂質の Fe(II) 誘導脂質過酸化反応をオキシメーターで酸素の消費を測定すると lag 中僅かの酸素消費がみられたのち、MDA 形成の際に急激な酸素消費がみとめられる。(未発表) ミトコンドリアにおいても同様、酸素の消費と MDA の形成が時間的に一致している¹⁵⁾。このことから、第二段階の反応は、一部分は lag にあるとしても、大部分は、第三段階の反応と同時に進行していると考えてよい。

これらのことを基準に考えれば、本実験の結果は主として第一過程と第三過程を表しているが、加えられた Fe(II) が Fe(III) にほとんど変化しきらないと TBA 値が上昇しないことから、特に実験 2 で示された如く、Fe(II) 高濃度では Fe(II) の減少がアルカリ溶液 (PH 7.4) における Fe(II) の自動酸化、もしくは基質としての脂質との反応によるとしても、時間的に遅くなるため lag が延長されている。これらのことから、ラジカル発生の第一過程の反応と次の過程との連鎖反応において、Fe(II) 減少変化に伴う何らかの反応が強いポテンシャルをもって、第二、第三過程の反応 (MDA の形成) を阻止している可能性がある。

更にリン酸存在下の Fe(II) 誘導脂質過酸化反応では、lag の短縮がみられ、又、リン酸存在下の急激な TBA 値増加時の Fe(II) の最終量には対照に比して有意差がみられず、反対の lag はリン酸の有無にかかわらず Fe(II) が一定濃度に低下するまでみられた。リン酸による lag の短縮は高濃度で著明であったが、TBA 値はリン酸の有無や濃度による影響はみられなかった。これらの結果は、ミトコンドリアにおいての報告^{12),13)}と一致しているが、リン酸は Fe(II) の変化を促進する結果 lag の短縮をきたすものと考えられる。又、リン酸存在下の反応は PH によって影響を受けたがいずれの場合も、Fe(II) の減少と lag の相関は同じ傾向が認められた。

lag と Fe(II) 濃度の関係は更に詳細な Fe(II) 濃度の定量が求められ、Fe(III) との量的関係を考慮する¹⁴⁾とともに反応式を含めて種々の点より究明が必要である。

結 論

ラット肝ミトコンドリアより抽出した脂質で、Fe(II) 誘導脂質過酸化反応を、TBA 反応によって測定し、同時に反応溶液中の Fe(II) 濃度を定量し、その消長と反応における lag との関係について考察した。

- 1) ミトコンドリアより抽出した脂質においても、ミトコンドリアと同様に Fe(II) 誘導脂質過酸化反応では、反応の初期に lag がみられる。
- 2) 反応溶液中の Fe(II) 濃度が微量にならないと TBA 発色はみられず、それまでは lag が観察される。
- 3) リン酸による lag の変化は PH によって異なり、又、リン酸存在下での lag の短縮が認められたが、いずれの場合も 2) と同様の Fe(II) 濃度と lag の関係が認められた。
- 4) EDTA を反応途中で添加すると、Fe(II) は 0 値を示し、それ以後の TBA 値には変動がみられない。
- 5) 鉄は主として Fe(II) として、一部は Fe(III) として反応開始、ならびに一連の連鎖反応に関与していると思われるが、Fe(II) の存在は、MDA の形成に阻害的に働くことにより lag を維持し、又、MDA 形成に Fe(III) として関与していると思われる。
- 6) これらの実験結果をもとにして、Fe(II) 誘導脂質過酸化反応の初期のメカニズムに討論を加えた。

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、山本道夫教授、並びに直接実験の御指導を頂いた、山本剛禧博士、及び放射線医学教室の各位に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. Packer, L. and Smith, J.R.: Extension of the lifespan of cultured normal human diploid cells by vitamin E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 4763—4767, 1974.
2. Harman, D.: Free radical theory of aging; Effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF, mice, *J. Gerontol.* **23**, 476—482, 1968.
3. Barbar, A.A. and Bernheim, F.: Lipid peroxidation; its measurement, occurrence and significance in animal tissues, *Adv. Geront. Res.* **2**, 355—403, 1967.
4. Wills, E.D.: Effect of unsaturated fatty acids and their peroxides on enzymes, *Biochem. Pharmacol.* **7**, 7—16, 1961.
5. Packer, L., Deamer, D.W. and Meath, R.L.: Regulation and deterioration of structure in membrane, *Adv. Geront. Res.* **2**, 77—120, 1967.
6. Cortes, R. and Privett, O.S.: Toxicity of fatty ozonides and peroxides. *Lipids.* **7**, 715—721, 1972.
7. Wills, E.D., and Wilkinson, A.E.: The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. *Radiat. Res.* **31**, 732—747, 1967.
8. Horgan, V.J., Philpot, J.S., Porter, B.W. and Roddyn, D.S.: Toxicity of autoxidized squaleus as and linoleic acid, and of simpler peroxides, in relation to toxicity of radiation. *Biochem. J.* **67**, 551—558, 1957.
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—150，1973.
10. 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，岡山医学会雑誌，**88**，185—196，1976.
11. 青野 要，山本道夫，飯田莊介，内海耕悟：放射線障害におけるスーパーオキシド生成系 (O_2^-) とスーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) 及びビタミンEの関与に関する考察，岡山医学会雑誌，**90**，1297—1308，1978.
12. 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.
13. G. Yamamoto, M. Tanabe, H. Wakabayashi, G. Hashimoto, and M. Yamamoto: Studies on ferrous ion induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria, I. Effect of inorganic phosphate, *Acta Med. Okayama.* **28**, 299—310, 1974.
14. F. Edmund Hunter, Jr., J.M. Gebicki, P.E. Hoffsten, J. Weinstein, and A. Scott: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. chem.* **238**, 828—835, 1963.
15. K. Utsumi, G. Yamamoto, and K. Inada: Failure of Fe^{2+} -induced lipid peroxidation and swelling in the mitochondria isolated from ascites tumor cells. *Biochim, Biophys. Acta.* **105**, 368—371, 1965.
16. 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，投稿中。
17. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* **226**, 497—509, 1957.
18. 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.
19. Saslaw, L.D., and Waravdeker, V.S.: Behavior of unsaturated fatty acid in the thiobarbituric acid test often radiolysis. *Radiat. Res.* **24**, 375—389, 1965.

20. E.D. Wills: The effect of inorganic iron on the determination of lipid peroxides. *Biochim, Biophys. Acta.* **84**, 475—477, 1964.
21. 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕悟: ミトコンドリア(南江堂), 1971.
22. Recknagel, R.O.: Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **19**, 145—208, 1967.
23. DiLuzio, N.R. and Hartman, A.D.: Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver, *Fed. Proc.* **26**, 1436—1442, 1967.
24. Thiele, E.H. and Huff J.W.: Lipid peroxide production and inhibition by tumor mitochondria, *Arch. Biochem, Biophys.* **88**, 208—211, 1960.
25. Utsumi, K., Yamamoto, G., Yamamoto, M. and Tanabe, M.: Effect of x-ray irradiation on the lipid peroxidation and swelling of mitochondria induced by ferrous ions. *Nippon Acta Radiol.* **26**, 345—350, 1966.
26. Patton, S: Malonaldehyde, Lipid oxidation, and the thiobarbituric acid test. *J. Am. Oil chem. Soc.* **51**, 114, 1974.
27. 西風桂子: 腹水癌細胞のエネルギー代謝に関する研究, 岡山医学会雑誌, **78**, 633—654, 1966.
28. Wills, E.D.: Mechanism of lipid peroxide formation in tissues role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **98**, 238—251, 1965.
29. May, M.E. and Mc Cay P.B.: Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **243**, 2288—2305, 1968.
30. Pfeifer, P.M. and Mc Cay P.B.: Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids.
VI. Structural changes in mitochondria associated with inactivation of electron transport activity. *J. Biol. chem.* **247**, 6763—6769, 1972.
31. Zimmermann, R., Flohe, L., Wester, U. and Hartmann, H.J.: Inhibition of lipid peroxidation in isolated inner membrane of rat liver mitochondria by superoxide dismutase, *FEBS, (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **29**, 117—120, 1973.
32. R.M. Kaschnitz and Y. Hatefi: Lipid oxidation in biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **171**, 292—304, 1975.
33. E.W. Kellogg, III and I. Fridovich: Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. chem.* **250**, 8812—8817, 1975.
34. Tyler, D.D.: Role of superoxide radicals in the lipid peroxidation of intracellular membranes, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* **51**, 180—183, 1975.
35. Kuo-Lan Fang, Paul B. Mc Cay and J. Lee Poyer: Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. chem.* **248**, 7792—7797, 1973.
36. F.E. Hunter, Jr., A. Scott, P.E. Hoffsten, F. Guerra, J. Weinstein, A. Schneider, B. Schutz, J. Fink, L. Ford, and E. Smith: Studies on the mechanism of ascorbate-induced swelling and lysis of isolated liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **239**, 604—613, 1964.
37. R.C. Mc Knight, F.E. Hunter, Jr., and W.H. Oehlert: mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. *J. Biol. Chem.* **240**, 3439—3446, 1965.
38. 山本剛禧, 田辺正忠, 若林 弘, 橋本郷之助, 山本道夫: ラット肝ミトコンドリア脂質過酸化反応におけるリン酸の関与, 生化学, **44**, 526, 1972.
39. Fortney, S.R. and Lynn, W.S.Jr.: Role of ascorbate and cysteine on swelling and lipid peroxidation in

- rat liver mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* **104**, 241—247, 1964.
40. M. Margaret King, Edward K. Lai, and Paul B. Mc Cay: Singlet oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes, *J. Biol. Chem.* **250**, 6495—6502, 1975.
 41. G. Yamamoto, M. Tanabe, G. Hashimoto and M. Yamamoto, : Studies on ferrous ion induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria.
II. Relationship to incubation temperature. *Acta Med. Okayama.* **30**, 291—301, 1976.
 42. E.D. Wills: Effect of iron overload on lipid peroxide formation and oxidative demethylation by the liver endoplasmic reticulum. *Biochem. Pharmacol.* **21**, 239—247, 1972.
 43. Recknagel, R.O., and Ghoshal, A.K.,: Lipoperoxidation as a vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity, *Lab. Invest.* **15**, 132—146, 1966.
 44. Bieri, J. G., and Anderson, H.A.: Peroxidation of lipids in tissue homogenates as related to vitamin E. *Arch. Biochem. Biophys.* **90**, 105—110, 1960.
 45. Tappel, A.L., and Zalkin, H.: Inhibition of lipide peroxidation in mitochondria by vitamin E. *Arch. Biochem. Biophys.* **80**, 333—336, 1959.
 46. Reich, L. and Stivala S.S.: 自動酸化 (松崎 啓, 大沢善次郎共訳, 丸善). 1972.
 47. T.C. Pederson and S.D. Aust: The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 1071—1079, 1973.
 48. Erich E. Dumelin and Al. L. Tappel: Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polyunsaturated fatty acid and Decomposition of preformed hydroperoxides, *Lipid.* **12**, 894—900, 1977.
 49. 日本生化学会編 生化学実験講座3 脂質の化学 (東京化学同人K.K.) 1974.
 50. 金田尚志: 食品と過酸化脂質, 最新医学, **33**, 677—681, 1978.

Studies on ferrous ion-induced lipid peroxidation**Part II****Analysis of the induction period (lag) of
ferrous ion-induced lipid peroxidation****Keizi HASHIMOTO****Department of Radiation Medicine, Okayama University****Medical School, Okayama, Japan****(Director: Prof. M. Yamamoto)**

The author measured simultaneously Fe(II)-induced peroxidation of lipid extracted from rat liver mitochondria by the TBA method and the concentration of Fe(II) added to the medium quantitatively using Nitroso-PSAP reagent.

1) An induction period (lag) at the early phase of the reaction of Fe(II)-induced lipid peroxidation was observed as well as in mitochondria.

2) After most of the Fe(II) concentration had decreased, the TBA-value, after lag-time, increased sharply.

3) Phosphate added to the medium shortened the lag-time. The lag-time in the presence of phosphate varied with the concentration and pH. However, in each case, there was a correlation between the decrement of Fe(II) concentration and the length of lag time as described above.

4) By adding EDTA for various reaction times, Fe was chelated immediately, then the TBA value did not increase.

5) The results suggest: iron interacted with the chain reaction of lipid peroxidation, mainly as Fe(II) and/or partially Fe(III); Fe(II) maintains the lag as a inhibitory action to the resolution into malondialdehyde(MDA) from lipid peroxide; Fe(III) was required for the formation of MDA.

6) Using these results, the author discussed the mechanisms of Fe(II)-induced lipid peroxidation.