

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

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

（研究生）若 林 弘

（昭和50年11月21日受稿）

はじめに

生体内脂質過酸化反応は生体膜における種々の機能の調節ならびにその構築機構の代謝回転と密接な関係があることが明らかにされつつある¹⁾。脂質過酸化反応は胎児組織²⁾、小腸³⁾、骨髄⁴⁾、再生肝⁵⁾、癌細胞^{6) 7) 8) 9) 10)}など幼若な細胞や分裂の盛んな細胞では極めて弱い¹¹⁾か又は欠損し細胞分裂制御機構との関連が検討されており¹²⁾、細胞の代謝調節に重要な因子であることが予想され細胞の老化との関係が考えられている^{13) 14)}。放射線で誘起されるラジカル反応が脂質過酸化反応を通じて生体膜構築成分である脂質タンパク複合体のリン脂質構造に変化を起し、生体膜を損傷することにより細胞代謝に影響を及ぼす^{15) 16)}ことは必然の事項と考えられる。放射線の生体に吸収された僅かのエネルギー線量と生体組織を障害した大きさ（例えば細胞死）を比較考察したとき、両者間の不一致を解明するものは現在何も存在していないと云っても過言ではないが放射線に対する細胞組織の感受性は核酸の代謝レベルや正常の条件でのこれら細胞組織の調節機構の程度に応じて増大しているともいえる。放射線による生体内酸化が放射線の生物学的作用の基盤になりうる可能性があるとの考えから、その予想されうる各種生体内酸化^{17) 18)}の一員としての脂質過酸化反応が生体の調節機構を通じて放射線障害の一因となりうることは必然であらう。

事実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¹⁹⁾放射線障害類似の効果を示す^{18) 19) 20) 21)}その機構は明らかでないが過酸化物が種々の酵素に対して阻害効果を示す²²⁾ことから放射線の生体における作用機序を考えると、放射線にともなう脂質

過酸化反応の研究は重要な課題である。

放射線全身照射にともなう生体組織における脂質過酸化物の生成については相反する報告がみられる。Horgan ら²³⁾はマウス組織における脂質過酸化物生成増加はみられないとし、一方 Zhulanova ら²⁴⁾は脾脂質に、又 Furnica ら²⁵⁾は脳脾肝においてその増大を認めている。又全身照射後哺乳動物臓器における脂質過酸化物の増加を測定可能な程度の効果を得るためには、核酸やタンパク質のin vitro照射でその効果を認知するような場合と同様に数千 R の高線量が必要なようである^{26) 27)}。しかしながら一般に正常組織には脂質過酸化物は存在しないのが普通である²⁸⁾が、組織ホモジネートや細胞分画をin vitroで好氣的に温置すると脂質過酸化物の生成が認められる^{29) 30) 31)}。そして放射線照射動物の組織に脂質過酸化物の生成促進が証明され^{31) 4) 23) 26) 29) 32)}又動物組織より分離された脂質³³⁾、組織ホモジネート³⁴⁾、組織分画成分³⁵⁾への放射線照射は脂質過酸化物の生成を促進することが明らかにされて来た。

このように放射線照射にともなう脂質過酸化物の生成は多くの場合温置における脂質過酸化物生成能を中心として検討されている。この観点から最近致死線量若しくはそれ以下の線量の放射線全身照射にともなう臓器における脂質過酸化能の変動について Ichi ら³⁶⁾はラットについて肝における上昇を除いてごく僅かと報告し、Dawes ら³⁷⁾はマウス臓器において肝ホモジネートで照射後3日目までそれが最高値を示すことを報告している。教室の渡辺³⁸⁾は放射線全身照射後の48時間目のラット臓器ホモジネートの脂質過酸化反応について研究しているが、ホモジネートのまゝの温置では短時間内ごく僅かの脂質過酸化反

応の促進がみられるが、Fe⁺添加の温置においてはより著しい反応の促進がみられ、放射線照射にともなう脂質過酸化能の変化は拡大観察されることを明らかにし、又肝においてのみ線量依存性がみられることを報告している。

しかし生体膜における非酵素的並びに酵素依存の脂質過酸化反応の機構は充分明らかでなく、ホモジネートレベルでは多くの因子が関与していることは明らかでありより簡易な細胞画分系での研究が望まれる。生体膜としてのミトコンドリアは種々の呼吸酵素と電子伝達中間体が配列し、電子伝達中に起るラジカル反応はミトコンドリア膜構成脂質の過酸化

反応を誘起するのに極めて都合がよい³⁹⁾ミトコンドリアの脂質過酸化反応の研究はその形態的变化との関連において主として行はれている^{40) 41) 42) 43)}がミトコンドリア膜には脂質過酸化反応の基質と目される高級不飽和脂肪酸^{23) 38) 44) 45)}含量が高く⁴⁶⁾又ミトコンドリアの機能とこれらリン脂質の密接な関係がみられ⁴⁷⁾生体膜脂質過酸化反応の機構を解明する上に好的材料と考えた。以上の観点より第一編では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検討し、第二編では構成脂肪酸の変動並びに抽出脂質画分の過酸化反応を究明した。

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

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

（研究生）若 林 弘

緒 言

放射線によるミトコンドリアの変化は非常に鋭敏に反応するといわれる⁴⁸⁾形態学的にも放射線による膨潤、クリステの破壊像が観察されている⁴⁹⁾これらの変化は放射線特有のものとして一般的な変化と区別することが出来ないが、しかしミトコンドリアはその脂質の除去に際して電子伝達は抵抗性を示し、リン酸化能は感受性を示すことが明らかにされており⁵⁰⁾このような感受性の差はミトコンドリアにおける呼吸機能への放射線の阻害作用にもみられる⁵¹⁾点からもミトコンドリアの構造と機能に関して放射線による脂質の動態は注目される。

Noyesら⁵²⁾は肝当りミトコンドリアの数を調べ照射後初期にその減少がみられ再び回復するという一過性の影響を観察した。同様にHallら⁵³⁾は酸化的リン酸化能においても一過性の阻害がみられることを報告している。しかし肝のミトコンドリアに対する放射線の効果は結果が両立しており、阻害を認めるもの^{54) 55)}不変というもの^{56) 57)}とがある。

放射線照射にともなうこのような相異なる結果は実験条件の差とも考えられるが、著者は全身照射ラ

ット肝よりミトコンドリアを分離しその過酸化反応を教室の渡辺⁵⁸⁾が拡大観察されたとしたFe⁺誘導反応において経日的に解析し肝ホモジネートレベルの変化が一分画であるミトコンドリアにおいても同様観察しうるかどうかを通じて、放射線の脂質過酸化反応におよぼす効果を更に究明すると共にミトコンドリアの脂質過酸化反応機構の解析を試みた。ミトコンドリアの脂質過酸化反応に対する放射線の影響についての若干の報告^{59) 60)}がみられるが詳細はまだ明らかでない。

本編では放射線全身照射にともなうFe⁺誘導脂質過酸化反応の変動についてえられた結果を報告する。

材料および実験方法

- (1) 実験動物：市販のOriental Co. 製MF固型飼料と水とを自由に與えて飼育した呑竜系ラット8～12週令を使用した。一部の実験においては動物の個体差をより少くする意味で各群は同胎のラットを用い比較検討したがその詳細は各実験において附記する。
- (2) 放射線照射条件：東芝製KXC 19型深部X線治療装置を用いて照射を行った。照射は管電圧200kVp、

管電流25 mA, 濾過板0.5 mm Cu + 0.5 mm Al, 焦点皮膚間距離50 cm, 線量率76 R/min の条件で行った。

(3) ラット肝ミトコンドリア (以下 RLM と略) の分離: RLM の分離は Hogeboom-Schneider 法⁴¹⁾ に準じて次の如く行った。即ちラットを断頭放血後すみやかに開腹し肝を摘出し、直ちに冷却した0.25 M ショ糖, 0.003 M トリス-塩酸, 0.0002 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), pH 7.4 (以下 STE 液と略) に入れ細切洗滌した。分離過程はことわりのない限り総て 0°~4 °C の条件下で行った。使用した蒸留水は脱イオンして用いた。又経時の変化を観察する実験においては RLM を同一条件下同時に分離し又同時に反応を測定するため各群の各ラットに日を異にして照射したものについて各々別の遠心管で同時遠心分離を行った。細切した肝はその10倍量の STE 液とともにルーズな Potter 型ガラスホモゲナイザーにて軽くホモジネートした後テフロンホモゲナイザーで上下1回宛ホモジネートした。

次いでホモジネートを100 xg 10分間遠心した。未分解の細胞残渣, 核, 血球等を除きその上清液を等量の0.34 M ショ糖, 0.003 M トリス-塩酸, pH 7.4 液に重層し700 xg 10分間遠心した。遠心後上層液のみ集め5,000 xg 10分間遠心した。この遠心により生じた中間層 (fluffy-layer) はマイクロソーム等の混入を防ぐ目的で上層液と共に取り除き残った RLM 層に STE 液を加え駒込ピペットにて攪拌洗滌し再度5,000 xg 10分間遠心した。RLM は再び0.25 M ショ糖, 0.003 M トリス-塩酸, pH 7.4 (以下 ST 液と略) 中で攪拌洗滌したのち遠心した。反応測定開始直前に RLM は更に大量の0.15 M 塩化カリ, 0.01 M トリス-塩酸, pH 7.4 (以下 KT 液と略) にて洗滌し同液に浮遊させ実験に供した。

(4) RLM のタンパク量の測定: RLM のタンパク量は牛血清アルブミン (Armour Laboratories, Fraction V) を標準としてビユーレット法⁴²⁾ によって測定した。

(5) 脂質過酸化反応の測定: 脂質過酸化反応の測定は生成されたマロンジアルデヒド (以下 MA と略) をチオバルビツール酸 (以下 TBA と略) 法によって測定した。この場合 Hunter の方法⁴³⁾ に準じて行った。又同時実験においては同一タンパク量のミトコンドリアを含む反応液 (KT 液) を10分間37°C で前もって温置したのち Fe²⁺ (硫酸オ-鉄アンモニウム, 片山化学特級, 使用前に蒸留水に溶解) を添加

することによって反応の測定を開始し, 経時的に反応を停止して TBA 法にて TBA 値を測定した。即ち2 ml の反応液に対して0.5 ml の40%三塩化酢酸 (以下 TCA 液と略) と0.25 ml の5 N 塩酸と0.5 ml の2% TBA 液とを混和, 沸騰水中で10分間加温し, 急冷後遠心して得た上澄液について532 nm と600 nm の吸光度を島津分光光度計 (UV-200型) で測定した。TBA 値は532 nm の吸光度より600 nm の吸光度を差し引いた OD を1 mg タンパク量当りとして換算したものである。MA の定量は分子吸光系数 $E_{532} = 1.56 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ mole}^{-1}$ を用いて TBA 値より計算した。

(6) 酸化的リン酸化能の測定: 非照射および照射後3日目のラット肝より各々同時に分離したミトコンドリア (塩化カリ液にて洗滌前) を ST 液に攪拌したものについて酸素消費を Bioxygraph (給水化学研究所製) を用いて測定した。反応液として0.15 M ショ糖, 0.02 M 塩化カリ, 0.003 M 硫酸マグネシウム, 0.003 M 磷酸カリ, 0.01 M トリス-塩酸, pH 7.6 を用いた。RLM は4 mg タンパク量を用い全量2 ml で25°C で測定した。各呼吸基質添加後 ADP 100 μM を添加して ADP/0 比および呼吸調節能³⁹⁾ を算出した。呼吸基質としてはコハク酸, グルタミン酸, イソクエン酸, (各々3 mM), アスコルビン酸 (1 mM)-TMPD (0.1 mM) を用いた。

実験結果

(1) X線照射にともなう体重の変化: 脂質過酸化反応は食餌の影響によって変化する³⁸⁾ が, 放射線照射後のラットは当然栄養不全の状態が予想される。この栄養状態を推定するため体重の変化を観察した。実験ラット (250~260g) 2.5ヶ月令の体重の変化は非照射群では実験期間中の9日間で約10%の体重の増加が認められた。これに対して半致死線量と考えられる650 R を全身照射したラット群では実験期間中照射後3日目に最大の減少がみられ, その後徐々に体重が増し照射前に比して9日目で僅かながら増加が認められたが, その増加は対照に比べてより少ないものであった。その経日の変化の一例を図1に示す。以上のことは本実験群においても栄養不全の状態を一応考慮する必要がある。

(2) X線照射にともなう体重に対する肝湿重量の変化: 体重の変化に比しての肝湿重量の変化をみるために一実験当り同性6匹宛使用し, 個体差をより少なくする目的で2~2.5ヶ月令の同胎のものを用いて

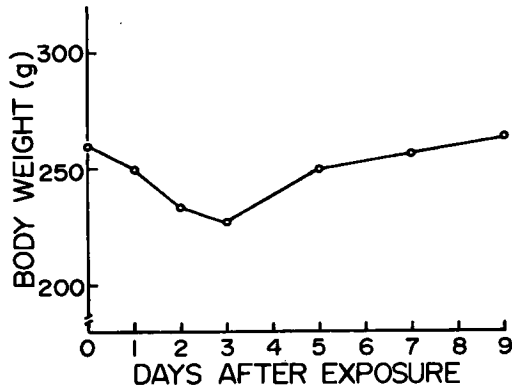


Fig. 1 Typical change of body weight of rat after irradiation at 650R.

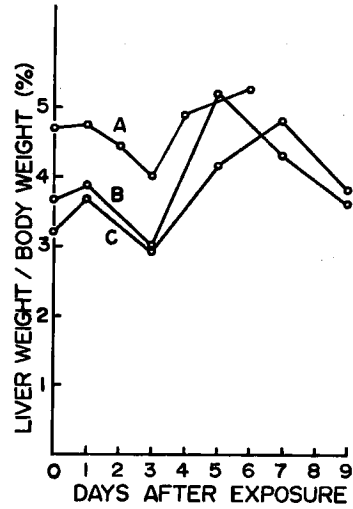


Fig. 2 Changes of liver-weight per body-weight of rats after irradiation at 650R. A(brothers), B(brothers) and C(sisters) were 250-260g, 215-225g and 150-160g of body weight on the day before exposure, respectively.

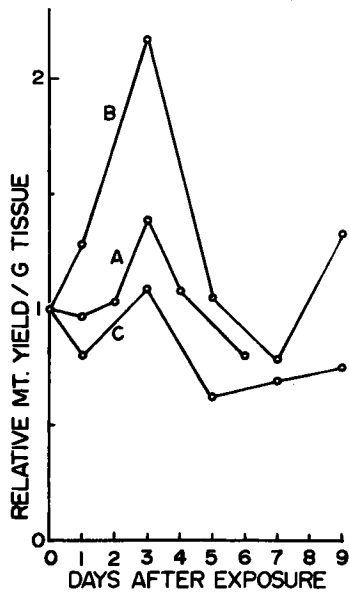


Fig. 3 Relative mitochondrial yield per g of wet weight of livers various days after exposure at 650R. A, B and C are same groups in Fig. 2. Mitochondrial preparations were carried out in simultaneous procedures as described in "Materials and Methods". Recoveries of control mitochondrial amount in A, B and C groups were 8 mg, 11mg and 23mg from g of tissues, respectively.

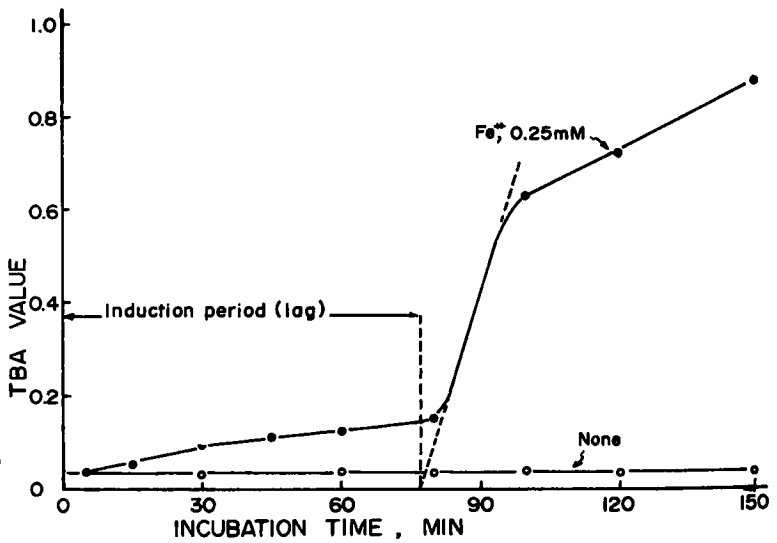


Fig. 4 Reaction curve of mitochondrial lipid peroxidation induced by ferrous ion (0.25mM) in the incubation mixture composed of 0.5mg of mitochondrial protein per ml, 0.15M KCl and 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, at 37°C. Lag of the induction period was calculated as mentioned in Fig.

肝湿重量の測定を行った。実験開始時の体重はA群♂250~260g, B群♂215~225g, C群♀150~160gであり、実験開始時の体重差があまりないものを使用した。各群それぞれ650R照射後の肝湿重量対体重の比は1日目に若干増加し、3日目において最も減少する傾向がみられた(図2)。この3日目の減少はその後増加回復がみられ照射前よりかえってその重量比が増し、その後照射1週間経過後再度重量比の減少が観察された。これらの結果より推察すると1日目は体重の変化が先行し、3日目では体重よりも肝重量の変化が著しく、又体重に先行して肝重量が変化することを示すものと考えられる。このように全身照射によって肝は著しく変動することが観察される。

(3) X線照射ラットよりの肝湿重量当りのRLMの回収率：上記のような肝重量の変化にともなってRLMの変化をみるためRLMを一定条件において分離収集した。勿論肝よりの全RLMを回収したわけではないが本実験におけるRLM分離条件下の回収率をみると、各実験群において肝湿重量当りのRLMの回収率はそれぞれ異なり、照射後3日目の回収率が最大の傾向を示し、その後その回収率は減少し、非照射の回収率よりも悪かった(図3)。以上の結果から肝重量の変化に比してRLM量はあまり変化してないかもしくはRLMのタンパク量の増加が考えられる。

(4) Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応における誘導時間(lag)について：全身照射後経日的に分離されたRLMの Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応を調べるにあたり、図4は Fe^{2+} (0.25mM)によって誘導された脂質過酸化反応により生成された脂質過酸化物を反応時間についてTBA値としてあらわした反応曲線である。 Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応においてはlagがみられる⁶⁾が使用した Fe^{2+} 濃度はより高濃度のためそのlagがかなり長い。 Fe^{2+} 無添加のものではこの反応測定中はTBA値の変化はほとんどみられなかった。この場合 Fe^{2+} 添加後図の如くゆるやかなTBA値の上昇の後(約70分後)急激な上昇(MA生成率)がみられその後ゆるやかになった。この結果よりlagの長さを図4に示す如く計算した。

(5) X線照射にともなうRLMの Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応の変動：650R全身照射したラット肝より分離したミトコンドリアにおいてその経日的変化を検討する目的で同一条件下別個に経日的に照射しRLM

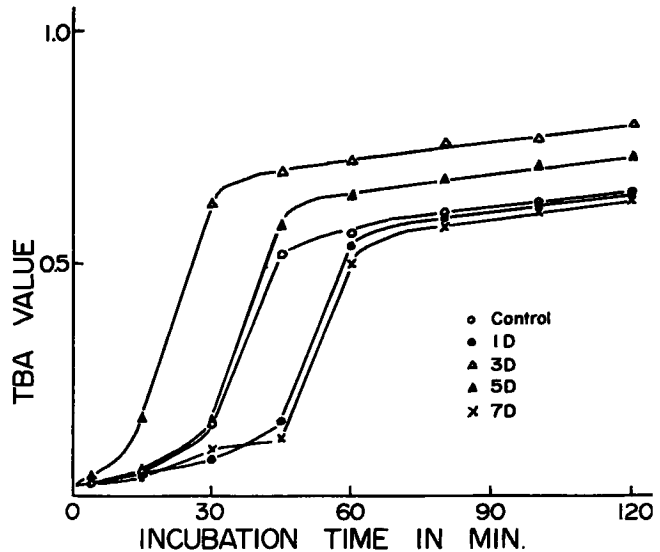


Fig. 5 Ferrous ion (0.05mM)-induced lipid peroxidation of mitochondria prepared from livers of rats on the 1st(1D), 3rd(3D), 5th(5D), and 7th day(7D) after whole-body irradiation at 650R, and of non-irradiated (control) rats. Incubation were carried out in KT-medium at 37°C.

の分離を同時に行い実験に供した。図5に示す如く Fe^{2+} (0.05mM)誘導の脂質過酸化反応はlagの変動とTBA値の上昇が観察された。本実験群(図5)について照射後1日目のRLMの反応活性は対照に比してlagの遅延傾向がみられたが、最終TBA値はあまり変化がみられなかった。このように照射後短時間内での反応においてはlagの遅延傾向が数多く観察された。3日目ではlagの著しい短縮がみられ且TBA値の上昇も対照より高値が観察された。これらの現象はその後日時をおいてlagが遅延しTBA値の上昇率も下降した。全般的にみてそれぞれのRLMの脂質過酸化反応における急激なTBA値の上昇率(MA生成率立ち上り)はほとんど同じ傾向(図5)であって対照との比較はさらに詳細な実験を要するものとする。

(6) Lagの長さとの関係：以上のように Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応における照射の影響はlag及びTBA値の変化として認められるが Fe^{2+} (0.1mM)誘導の脂質過酸化反応における反応開始後100分のTBA値とlagを図6に示す。

前実験と同様の傾向を示し、照射後3日目のものでlagの短縮とTBA値の高値がえられた。このよ

うに lag の長さの変化と TBA 値の変化とは逆比例の関係が認められる。この反応曲線より観察されるように TBA 値の差はその測定時により種々の値を示すことから放射線の効果を観察する場合 TBA 値の変化よりもむしろ lag の変化によってその効果を

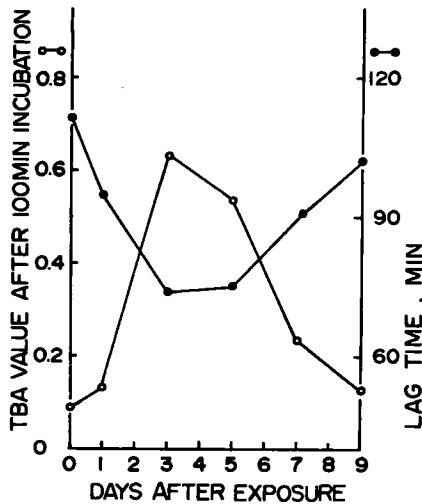


Fig. 6 Ferrous ion (0.1mM)-induced lipid peroxidations of mitochondria prepared from rat livers at various days after whole-body at 650R. TBA values (o-o) were measured at 100min after incubation in KT-medium at 37°C, and the lag (●-●) of induction period was calculated from reaction curve as mentioned in Fig. 4.

みる方がより明瞭に表現できるものと考えた。

(7) TBA 値と X 線量との関係：650R 照射により経時的に全身照射の効果が現われることからこれらの変化が果して放射線依存性があるかどうかを明らかにするため全身照射線量にともなう Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応の変動を照射後 3 日目のラット肝より分離したミトコンドリアを用いて検討した。 Fe^{2+} 誘導脂質過酸化反応は lag を有するためどれくらいの反応時間で TBA 値を測定するかによってかなりの量的変化が結果される。図 7 は Fe^{2+} (0.25mM) によって 45 分間に生成された MA を TBA 値で表わしたものであるが線量の増加に従って TBA 値の増加が明らかに認められる。

(8) Lag と X 線量の関係：上述の如く lag の変化がより X 線の効果を量的に表わしていることから照射後 3 日目の RLM について lag の測定を行った。 Fe^{2+} 誘起の脂質過酸化反応における lag の長さはリン酸

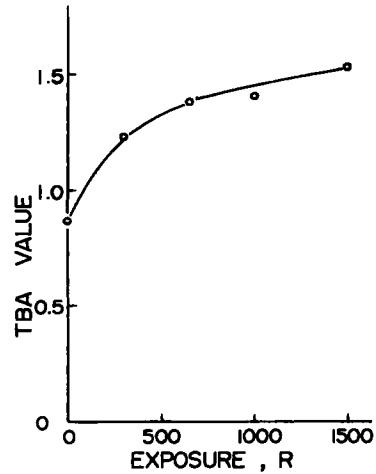


Fig. 7 Dose responsibility of ferrous ion-induced lipid peroxidation of mitochondria prepared from rat livers on the 3rd day after whole-body irradiation. Incubations were carried out at 37°C in KT-medium, and the reaction started by addition of Fe^{2+} (0.25mM), then stopped at 45min.

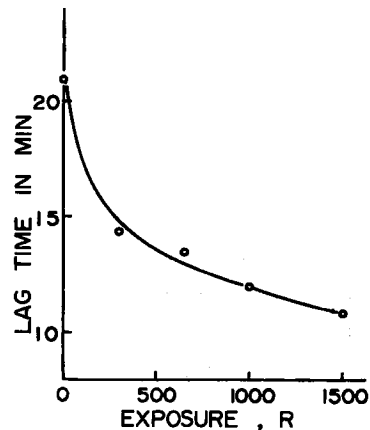


Fig. 8 Lag of the induction period of Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in mitochondria prepared from rat livers on the 3rd day after whole-body irradiation at various doses. Incubations were carried out at 37°C in KT-medium containing 2mMPi, and 0.25mM Fe^{2+} was used.

の存在下その濃度に依存して短縮されることが明らかにされている。図 8 の結果は図 7 の結果に比して lag が短いのはリン酸 (2mM) 存在下で測定時間をより短くしたためである。この条件で種々の線量照射後 3 日目の RLM について lag を測定した結果、線量の増加にともなって lag の短縮が認められた

(図8). この場合も TBA 値と lag の短縮について逆比例の関係が認められる.

(9) MA 生成率と X 線量の関係: 図4 図5 にみられる如く Fe²⁺添加後 lag の後急激な TBA 値の上昇がみられる. 同一線量での経日的標品においてはその上昇率の変化がみられず(図5), その比較は短間隔の測定を要する. この点に留意してこの上昇時の MA の時間当りの生成量を照射後3日目の RLM について検討したところ, 図9 に示す如く線量増加にともなって MA 生成率は高く線量依存性が認められた.

(10) 酸化的リン酸化能におよぼす影響: 最近の報告によれば全身照射の肝ミトコンドリアの酸化的リン酸化能に対する効果は一過性の活性の低下がみられている^{5,6,9} 上記のように3日目の脂質過酸化反応に対する X 線の効果がみられることから, 本実験の分離条件下でのミトコンドリアについて各呼吸基質存在下の酸化的リン酸化能を650 R 全身照射後3日目のものについて対照と比較検討した. 表1 に示す如く

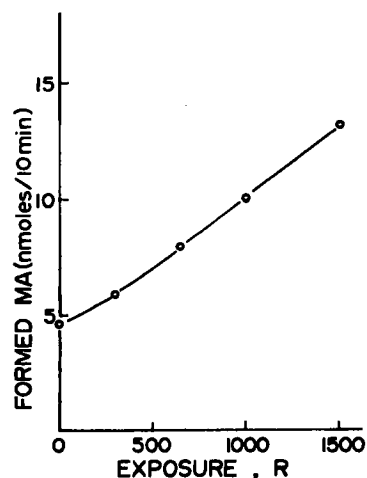


Fig. 9 Rates of malondialdehyde(MA) formation during Fe²⁺ (0.25mM)-induced lipid peroxidation in mitochondria prepared from rat livers on the 3rd day after whole-body irradiation at various doses. Rates of the rapid formation after the lag period were measured in KT-medium at 37°C.

Table 1. Oxidative phosphorylation in mitochondria prepared from livers of control and irradiated rats with various substrates. Incubation systems were composed of 2 mg of mitochondrial protein per ml, 0.15M sucrose, 0.02M KCl, 0.003M MgSO₄, 0.003M KH₂PO₄, and 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.6. All incubations were carried out at 25°C in a system of 2 ml, and oxygen uptake was measured by Bioxygraph. X-3 D mitochondria were isolated from rat on the 3rd day after irradiation at 650 R.

Substrate	Control-Mt		X-3 D-Mt	
	Respiratory control	ADP/O	Respiratory control	ADP/O
Succinate (3 mM)	2.30	1.95	2.86	1.91
Glutamate (3 mM)	2.78	2.75	3.00	2.90
Isocitrate (3 mM)	2.80	3.28	2.68	3.39
Ascorbate-TMPD (1 mM-0.1 mM)	1.25	1.65	1.33	1.69

コハク酸, グルタミン酸, イソクエン酸, アスコルビン酸-TMPD 各基質下の呼吸調節能ならびに ADP/O 比は対照のそれに比して有意の差はみられなかった. このことは脂質過酸化能の上昇がみられる照射後3日目の RLM において呼吸活性は正常と変わらないことを示す.

考 察

RLM の Fe²⁺誘導脂質過酸化反応は X 線650R 照射にともない一過性に照射後3日目にその反応活性の促進がみられる結果をえた. そしてその促進は線量

依存性が認められることから照射効果による変化と考えられる. Dawes ら²¹⁾ もマウス肝ホモジネートで照射後脂質過酸化物生成は3日目で最高値になることを報告している. 本実験において全身照射後三日目にラット肝重量の減少が認められるにもかかわらずミトコンドリアの収量は増加がみられたが, それらが経日的変化をみせることから肝ともども一構成物質たるミトコンドリアにおいても照射による生理的変化がみられることを示す. 照射による栄養不全は体重の変化からも予想され飢餓にともなう脂質過酸化反応の促進も考えられるが, 教室の渡辺²²⁾ は肝ホ

モジネートについて飢餓の効果はごく僅かで放射線による反応の上昇が著しいことをみている。Noyesら⁵²⁾はX線1,000R照射後肝当りのミトコンドリアの数は15分で正常値の60%に減少し6時間で回復がみられ、これが48時間値まで同数であったことを報告している。このことからミトコンドリアは一過性に放射線障害を受けるがすぐに正常に回復する能力があることが示唆されるが、本実験においても時間の差こそあれこのような回復能力が考えられ、肝重量とミトコンドリア収量との関係からミトコンドリアの回復が肝全体の回復よりも先行することを示唆する。Yagoら⁵³⁾はラット腎ミトコンドリアの *in vivo* レベルの形態的考察より1,500R照射後3日目でその数が2倍になることからミトコンドリアの増殖を示唆している。Zichaら⁶¹⁾は1,400R全身照射のラット肝より分離したミトコンドリアを温置するとその脂質過酸化生成は直後ならびに6時間まで促進がみられ12時間で正常値にもどることを報告している。本実験において1日目のFe²⁺誘導脂質過酸化反応は逆に低下して観察される場合が多かった。ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化能は短時間内に低下することが観察されている^{58),59)}が機能の低下は本反応を低下させるかもしれない。このことは照射後3日目のミトコンドリアについての酸化的リン酸化能において正常なミトコンドリアとの間に差はみられないことから予想される。ミトコンドリアにおけるFe²⁺誘導脂質過酸化反応はその機構の詳細について明らかにされていないが、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る⁶⁴⁾。正常なミトコンドリアにおいて0°Cで反応の増大がみられる^{40),64)}ことから非酵素的反応の可能性がある。又Fe²⁺添加によってその反応のlagが短縮される⁴⁰⁾ことからミトコンドリアにおける酸化還元反応が脂質過酸化反応に関連していることは否定できない。ミトコンドリアからチトクロムCを抽出するとそのミトコンドリアでは過酸化反応がみられない報告⁶⁴⁾もあり、又ビタミンE欠動物のミトコンドリアにおいては呼吸の際脂質過酸化物の生成されることが報告⁶⁵⁾されており過酸化反応が電子伝達系と関係を有することが考えられている。分離したミトコンドリアへの放射線照射で脂質過酸化生成の増大がみられている¹⁴⁾が、酸化的リン酸化においては20 kRまで変化がなく100~200 kRで阻害がみられるといわれる⁶¹⁾。しかし全身照射においてはミトコンドリアの酸化的リン酸化能

は減少するものと理解され、呼吸リン酸化 site 別の放射線効果も報告がみられ、特に site III がダメージを受ける^{61),70)}とされている。site III のチトクロム酸化酵素は分離後他の呼吸酵素に比してより脂質過酸化物が生成されるという報告⁷¹⁾もあり、このことから放射線誘起の脂質過酸化反応がミトコンドリアの呼吸活性と関連することが示唆される。しかし本実験でのアスコルビン酸-TMPD系における呼吸能に対照と照射後3日目のものとで差はみられなかった。

最近 Utsumi⁵⁸⁾及び Kawasaki⁵⁹⁾はラット肝ミトコンドリアについて全身照射後コハク酸基質下の酸化的リン酸化能は照射後短時間(3~6時間)で活性低下を示すこと、24時間値では正常値にもどることを報告し、あわせてFe²⁺+Fe³⁺誘導脂質過酸化反応は照射群で促進がみられるものの24時間で最高に達し48時間で正常値にもどることを観察し脂質過酸化反応とリン酸化能との時間的ずれを報告している。いずれの場合も一過性的変化として観察されるが、本実験の脂質過酸化反応の照射後の変化との時間的差は誘起剤として用いた金属の差及び照射条件等実験条件の差に起因するのかもしれない。

脂質過酸化反応の解析は基質として的高级不飽和脂肪酸の量的ならびに質的変動と内在する誘起因子、阻害因子(抗酸化剤)との三点より主として行われている。放射線照射にともなう生体内脂質過酸化反応は直接基質に放射線誘起のラジカルが反応するかどうか問題であるが、Wills⁷²⁾はその可能性は少ないとみている。しかし以上の三点にからんで①生体膜の脂質が照射のため変化しより過酸化に感受性を有するようになる、②構造の変化(conformational change)によって脂質が触媒され易くなる、③照射により生体膜を過酸化反応より保護していた抗酸化物が破壊されて反応が促進され易くなる、等の可能性が考えられる。構成脂肪酸の照射による変動は臓器レベルで種々の報告^{27),73)}もみられ、生体内抗酸化変動についても報告^{28),37)}があるが、ミトコンドリアレベルでの照射にともなう変化^{58),74)}の可能性については更に検討を要する。

脂質過酸化反応におけるlagは油脂の自動酸化においてもその特徴とされ、その機構について種々考察されている⁷⁵⁾が、lagの短縮は脂質過酸化反応の促進とみることが出来る。本実験の照射効果としてlagの短縮が線量依存的にみられ且その時脂質過酸化物生成量が増大することもみられた。最近脂質過

酸化物の定量としての TBA 反応は生成された MA 量としてのその妥当性が再考慮されている⁷⁶⁾が, 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, 今後この lag の起因を究明することが脂質過酸化反応の機構の解析につながるとともに放射線の生体膜障害の研究にも役立つものと考えられる。

生体内脂質過酸化反応については最近ミトコンドリアにおいても NADPH 依存⁷⁷⁾ super oxide radical 依存⁷⁸⁾ のものが発見され注目されている。しかしいづれの場合も微量とはいえ鉄はその反応に必須のものであり, 鉄イオンが反応における重要な要素を握っていると考えられ, 本実験での Fe²⁺誘導脂質過酸化反応の放射線による変化は単に非酵素的な反応だけではなく, 酵素的に起りうる反応にも関連があるものと考えられる。又本実験の結果からミトコンドリアの機能が構造に先立って回復していることも考えられ, 照射にともなう脂質過酸化反応の促進は膜回復に際して一つの活性として一過性に現われているのかもしれない。これらの点については更に究明されなければならない。

結 論

生体膜における放射線効果の研究の一環として又脂質過酸化反応機構解析のため RLM における Fe²⁺誘導脂質過酸化反応に及ぼす X 線全身照射の影響を追求し次の如き結果を得た。

1) 650R 全身照射後経日的(1~9日)にミトコン

ドリアを分離し脂質過酸化生成能を TBA 値を指標として測定した結果照射後3日目のミトコンドリアにおいて反応活性の促進の最高値がみられた。この促進は lag の短縮とタンパク量当りの TBA 値の上昇の両者より明らかにされた。この反応の促進は一過性でその後漸次低下した。

2) 反応の最高値がえられた3日目において体重の低下がみられ更に体重当りの肝重量の低下と肝重量当りのミトコンドリアの収量の増加がみられた。これらの変化も TBA 値と平行し一過性にみられた。

3) 照射にともなう lag の短縮, TBA 値の上昇, 反応速度の上昇について線量依存の関係がえられた。

4) 照射後3日目のミトコンドリアの各呼吸基質存在下の酸化的リン酸化能は非照射のそれと比較して有意の差はみられなかった。このことは構造よりも機能が優先して回復することも考えられる。

5) これらの結果より照射にともなう Fe²⁺誘導脂質過酸化反応の促進変化は照射により起る要因によってもたらされることが明らかでありその要因について若干の考察を行った。

謝 辞

稿を終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。

本実験論文の要旨は第33回日医放学会(昭和49年4月)において発表した。

文 献

- 1) Packer, L., Deamer, D.W. and Heath, R.L.: Adv. Geront. Res., 2, 77, 1967.
- 2) Cole, B.T.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 93, 290, 1956.
- 3) Ottolenghi, A. and Bernheim, F.: Radiat. Res., 12, 371, 1960.
- 4) Bernheim, F., Ottolenghi, A. and Wilbur, K.M.: Rad. Res., 4, 132, 1956.
- 5) Walfson, N., Wilbur, K.M. and Bernheim, F.: Exptl. Cell Res., 10, 556, 1956.
- 6) Shuster, C.W.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 90, 423, 1955.
- 7) Thiele, E.H. and Haff, J.W.: Arch. Biochem, Biophys., 88, 208, 1960.
- 8) Ohnishi, T.: Gann, 46, 233, 1958.
- 9) Lack, E.D.: Arch. Biochem, Biophys., 115, 332, 1966.
- 10) Utsumi, K., Kanemasa, Y., Yoshioka, T. and Oda, T.: Life Sciences, 9, 473, 1970.
- 11) Barber, A.A. and Bernheim, F.: Adv. Geront. Res., 2, 355, 1967.

- 12) Kawashima, S.: Nagoya J. Med. Sci., **32**, 303, 1970.
- 13) Wills, E.D.: Int. J. Radiat. Biol., **17**, 217, 1971.
- 14) Wills, E.D. and Wilkinson, A.E.: Int. J. Radiat. Biol., **17**, 229, 1970.
- 15) Tappel, A.L.: Fed. Proc., **24**, 73, 1965.
- 16) Harman, D.: J. Gerontol., **23**, 476, 1968.
- 17) Horgan, V.J., Philpot, J. St. L., Porter, B.W. and Roodyn, P.B.: Biochem. J., **67**, 551, 1957.
- 18) Latarjet, R.: Ciba Foundation Symposium on Ionising Radiations and Cell Metabolism (London, Churchill), p275, 1956.
- 19) Wyss, O., Wiesen, C. and Scheiberger, G.E.: Radiat. Res. Suppl., **3**, 184, 1963.
- 20) Philpot, J. St. L. and Roodyn, D.B.: Int. J. Radiat. Biol., **1**, 372, 1959.
- 21) 山本道夫:細胞化学シンポジウム, **9**, 141, 1959.
- 22) Wills, E.D.: Biochem. Pharmacol., **7**, 7, 1961.
- 23) Horgan, V.J. and Philpot, J. St. L.: Int. J. Radiat. Biol., **5**, 167, 1962.
- 24) Zhulanova, Z.I. and Romantsev, E.F.: Biochem. J.: **102**, 23, 1966.
- 25) Furnica, M. and Danicel, M.: Fiziologia Norm. Patol., **14**, 173, 1968.
- 26) Glavind, J., Hausen, L. and Faber, M.: Int. J. Radiat. Biol., **9**, 409, 1965.
- 27) Streffer, C:放射線生化学(山田, 大山共訳, 図書出版社,)東京, 1969.
- 28) 松平寛通:放射線細胞生物学(菅原, 山田, 江上, 堀川編, 朝倉書店), 東京, p147, 1968.
- 29) Bernheim, F.: Radiat. Res. Suppl., **3**, 17, 1963.
- 30) Barber, A.A.: Radiat. Res. Suppl., **3**, 33, 1963.
- 31) Bernheim, F., Bernheim, M.L.C. and Wilbur, K.M.: J. Biol. Chem., **174**, 257, 1948.
- 32) Myers, D.K. and Bide, R.W.: Radiat. Res., **27**, 250, 1966.
- 33) Wills, E.D. and Rotbalt, J.: Int. J. Radiat. Biol., **8**, 551, 1964.
- 34) Barber, A.A. and Wilbur, K.M.: Radiat. Res., **10**, 167, 1959.
- 35) Wills, E.D. and Wilkinson, A.E.: Radiat. Res., **31**, 732, 1967.
- 36) Ichii, S., Yago, N., Omata, S. and Kobayashi, S.: J. Radiat. Res., **9**, 85, 1968.
- 37) Dawes, E.A. and Wills, E.D.: Int. J. Radiat. Biol., **22**, 23, 1972.
- 38) 渡辺節生:岡山医学会雑誌, **85**, 129, 1973.
- 39) 小沢高将, 浅井淳平, 内海耕造:ミトコンドリア(南江堂), 東京, 1971.
- 40) Hunter, F.E.Jr., Gebricki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: J. Biol. Chem., **283**, 828, 1963.
- 41) Hunter, F.E. Jr., Scott, A. Hoffsten, P.E., Guerra, F., Weinstein, J., Schneider, A., Schutz, B., Lillian, F. and Snieth, E.: J. Biol. Chem., **239**, 604, 1964.
- 42) Fortney, S.R. and Lynn, W.S.Jr.: Arch. Biochem. Biophys., **104**, 241, 1964.
- 43) Utsumi, K. and Yamamoto, G.: Biochim. Biochys. Acta, **105**, 368, 1965.
- 44) Dahle, L.K., Hill, E.G. and Hollman, R.T.: Arch. Biochem. Biophys., **98**, 253, 1962.
- 45) Niehaus, W.G. and Samuelsson, B.: Eurp. J. Biochem., **2**, 126, 1968.
- 46) Getz, G.S., Stirpe, B.F., Notton, B.M. and Renshaw, A.: Biochem. J., **83**, 181, 1962.
- 47) Kagawa, Y., Kandrach, A. and Racker, E.: J. Biol. Chem., **248**, 676, 1973.
- 48) Scherer, E. and Stolle, F.: Strahlentherapie, **93**, 317, 1954.
- 49) Braum, H.: Strahlentherapie, **133**, 412, 1967.
- 50) Breierley, G.P., Merola, A.J. and Fleischer, R.: Biochim. Biophys. Acta, **64**, 218, 1962.
- 51) Clarke, J.D. and Lang, J.: Radiat. Res., **24**, 142, 1965.

- 52) Noyes, P. and Smith, R.E.: *Exptl. Cell Res.*, **16**, 15, 1959.
- 53) Hall, J.C., Goldstein, A.L. and Sonnenblick, B.B.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1137, 1963.
- 54) Fritz-Niggli, H. and Bühner, G.: *Röfo*, **92**, 343, 1960.
- 55) Benjamin, T.L. and Yost, H.T.: *Radiat. Res.*, **12**, 613, 1960.
- 56) Scaife, J.F. and Hill, B.: *Can. J. Biochem, Physiol.* **40**, 1025, 1962.
- 57) Scaife, J.F. and Hill, B.: *Can. J. Biochem, Physiol.* **41**, 1223, 1963.
- 58) Utumi, K., Yamamoto, G., Yamamoto, M. and Tanabe, M.: *Nippon Acta Radiol.*, **26**, 345, 1966.
- 59) Kawasaki, S.: *J. Radiat. Res.*, **6**, 111, 1965.
- 60) 浦上博之: *岡山医学会雑誌*, **76**, 13, 1964.
- 61) Hogeboom, G.H.: *Methods in Enzymology* (ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Academic Press Inc.), New York and London, Vol. 1, p16, 1955.
- 62) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and Daud, M.M.: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751, 1949.
- 63) Sinnhuber, R.O. and Yu, T.C.: *Food Technol.*, **12**, 9, 1958.
- 64) Yamamoto, G., Tanabe, M., Wakabayashi, H., Hashimoto, G. and Yamamoto M.: *Acta Med. Okayama*, **28**, 299, 1974.
- 65) Yago, N., Sekiyama, S., Kurokawa, H., Iwai, Y., Sato, F. and Shiragai, A.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 1, 1972.
- 66) Zicha, K., Lejsek, K., Benes, J. and Dienstbier, E.: *Experientia*, **22**, 712, 1966.
- 67) Scott, A.A. and Hunter, F.E.: *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, **11**, 461, 1963.
- 68) Corwin, L.M. and Schwarz, K.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 3387, 1960.
- 69) Yost, M.T., Robson, H.H. and Yost, H.T.: *Radiat. Res.* **32**, 187, 1967.
- 70) Alexauder, K.C., Aiyar, A.S. and Sreenivasan, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **283**, 206, 1972.
- 71) Hatefi, Y. and Haustein, W.G.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 73, 1970.
- 72) Wills, E.D.: *Int. J. Radiat. Res.*, **17**, 217, 1970.
- 73) 渡辺節生: *岡山医学会雑誌*, **85**, 137, 1973.
- 74) Natario, A., Slauerio, G.P.E. and Pallavicini, E.B.: *Panminerva Medica*, **10**, 31, 1968.
- 75) Reich, L. and Stivala, S.S.: *自働酸化* (松崎, 大沢共訳, 丸善), 東京, 1972.
- 76) Patton, S.: *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **51**, 114, 1974.
- 77) Pfeifer, P.M. and McCay, P.B.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 6763, 1972.
- 78) Tyler, D.D.: *FEBS Letters*, **51**, 180, 1975.

Studies on the lipid peroxidation in mitochondria of
x-ray whole body irradiated rat liver
I. Change of Fe^{++} -induced lipid peroxidation of mitochondria
isolated from rat liver after irradiation

Hiroshi WAKABAYASHI

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. M. Yamamoto)

Lipid peroxidation of biomembrane is important in terms of the mechanism which are involved in the regulation and deterioration of their structure. To elucidate the behavior of lipid peroxidation in biomembrane after x-ray irradiation, the lipid peroxidation induced by Fe^{++} in mitochondria after whole body irradiation was investigated, and the results are presented as follows.

- (1) Mitochondria were isolated from rat liver with the passage of day after 650 R irradiation, and the change of Fe^{++} -induced lipid peroxidation was estimated by the TBA assay. Rates of the lipid peroxidation increased after irradiation and reached a maximum 3 days after irradiation, which was shown by shortening the lag of induction period and by the increase of TBA value per mg of protein. The increment of the activity was temporary and then the activity returned.
- (2) On the 3rd day after irradiation, the rat was more light in weight, and the wet weight of liver per body weight and the yield of mitochondria per tissue equivalent were increased temporarily in parallel with the change of the TBA value.
- (3) The shortening lag period and the high rate of TBA value depend on the dose of whole body irradiation.
- (4) The activity of oxidative phosphorylation of the mitochondria on the 3rd day after irradiation did not differ as compared with that of normal mitochondria.
- (5) These results suggest that the change of Fe^{++} -induced lipid peroxidation of mitochondria after whole body irradiation is due to the irradiation. The factors in regulating the rate of lipid peroxidation were discussed.