

ラットの被過酸化性における性差 (第2報)

— 各組織における過酸化脂質の生成と

α -トコフェロール量, チトクロム P-450 活性 —

村上 亜由美, 内田 三香子

松浦 寿喜, 市川 富夫

(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

Sex Difference of Sensitivity to Peroxidation in Rats. II

The Formation of Lipid Peroxide, α -tocopherol Content and Chitochrome P-450 Activities in Tissue.

Ayumi Murakami, Mikako Uchida, Toshiki Matsuura, Tomio Ichikawa

Department of Food Science and Nutrition,

School of Human Environmental Sciences,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan.

In order to know Sex difference of sensitivity to peroxidation, we investigated α -tocopherol content, chitochrome P-450 activities and thiobarbitic acid reacting substance (TBARS) for enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation.

Female was more sensitive to peroxidation under enzymatic lipid peroxidation than male in liver Ms and kidney Ms. Male was more sensitive to peroxidation under enzymatic lipid peroxidation than female in kidney Mt.

Female was more sensitive to peroxidation under non-enzymatic lipid peroxidation than male in liver Mt and liver Ms. Male was more sensitive to peroxidation under non-enzymatic lipid peroxidation than female in kidney Mt and kidney Ms.

There was no sex difference of sensitivity to peroxidation in heart Mt and heart Ms.

緒 言

組織の障害は、そこにおける過酸化脂質生成と大きな関係のあることが知られている。また、生体内過酸化生成系、分解系ともに性差のあることが知られており、過酸化脂質による障害にも性差のあることが予想される。

我々は前報において、組織過酸化脂質生成の基盤である雌雄ラットの肝臓、腎臓、心臓におけるミトコンドリア (Mt) とマイクロソーム (Ms) の脂肪酸組成を分析したところ、いくつかの組織の画分で性差が認められ

た。

そこで、本研究ではさらに脂質の被過酸化性の性差について検討するため、生体抗酸化剤であり¹⁾、生体膜を物理的に安定化する作用ももつ²⁾ α -トコフェロールと、薬物代謝以外に NADPH とともに脂質の過酸化を促進することが明らかにされている³⁾チトクロム P-450 活性を測定した。さらに、生体内での過酸化脂質の生成が、 Fe^{3+} のような金属イオンの存在下で、Ms の NADPH, チトクロム P-450 レダクターゼやキサンチンオキシダーゼによって触媒される酵素反応に共役したものと、金属イオン (Fe^{2+} など) とア

スコルビン酸などによって誘導される非酵素的なものに大別される³⁾ことから、NADPHまたは鉄-アスコルビン酸(Fe-AsA)を加えて、インキュベートしたときのチオバルビツール酸反応物(TBARS)を測定することにより、酵素的および非酵素的な脂質の過酸化について調べた。

実験方法

1 飼料

オリエンタル酵母KK製の標準試料MFを与えた。飼料と水は自由摂取とした。

2 実験動物および飼育方法

SD種ラット、4週齢の雄6匹、雌6匹を日本クレアKKより購入した。

飼育槽の温度は $23 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、湿度は $55 \pm 7\%$ 、明暗サイクルは12時間(明期8:00am~8:00pm)とし、3週間飼育した。

ネンブータル麻酔下で、腹部大動脈より脱血し、肝臓、腎臓、心臓を摘出した。臓器は、実験に用いるまで -20°C で冷凍保存した。

3 MtおよびMsの調整⁴⁾

操作中の脂質の酸化をできるだけ防ぐために、試料を氷で常に低温に保ちながら処理した。

臓器1g当たり9mlのホモジナイズ液(0.25Mショ糖溶液:3mMトリス-塩酸緩衝液(pH 7.4):0.1mMEDTA, 1:1:1)を加え、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーですりつぶした。

ホモジネートを700gで10分間遠心し、上清をさらに、7000gで10分間遠心した。沈殿はMt画分とし、その上清をさらに、105,000gで60分間遠心分離した沈殿をMs画分とした。

4 α -トコフェロールの測定

MtまたはMsけん濁液に、ピロガロール・エタノール溶液、内部標準として2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル6ヒドロシクロマン・エタノール溶液、水酸化カリウムを加え、 70°C で60分間ケン化した。冷却し、エチルアセート:ヘキサン(1:9)混液で激しく攪拌した後、遠心分離した。上層を窒素ガス下、 40°C でエバポレートし、ヘキサンで適当な濃度に希釈して、HPLC分析を行った⁵⁾。

HPLC装置は、TOSOH CCPS、検出器は、TOSOH FS-8010 Fluorescence detector (Ex 298nm, Em

325nm)、記録装置は、System instruments Co. Chromatocorder21を用いた。カラムは、TOSOH TSKgel Silica-60 4.6ID \times 250mm、移動層は、ヘキサン:イソプロピルアルコール:酢酸(1000:6:5)、流速は、1.0ml/minとした。

5 チトクロムP-450活性の測定

アニリンヒドロキシラーゼ活性は、p位の水酸化によって生じるp-アミノフェノールをインドフェノール法⁶⁾により定量して求めた。すなわち、MtまたはMsけん濁液に、EDTA:リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)混液(1:2)、反応基質(塩酸アニリン)、水を加えた。さらに、NADPH反応系(NADP, グルコース-6-リン酸, グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの塩化マグネシウム溶液)を加え、 37°C で15分間インキュベートし、反応させた。トリクロロ酢酸を加えて、反応を停止させ、遠心分離した。上清に、炭酸ナトリウムとフェノールを加え、 37°C で30分間インキュベートした後、青色の発色の吸光度(630nm)を測定した。このとき、酵素活性測定用(試料)、基質中に微量に含まれている代謝物補正用、一定量の代謝産物(p-アミノフェノール)を加えた検量線作成用の試験液についても測定し、測定値の補正を行った。

アミノピリンN-デメチラーゼ活性は、脱メチル化を受けて、生成したホルムアルデヒドをNash法⁷⁾で測定した。反応基質(アミノピリン)を加え、アニリンヒドロキシラーゼ活性と同様の操作を行い、黄色の発色の吸光度(412nm)を測定した。検量線作成には、モノメチルジメチルヒダントインを用いた。Nash試薬は、酢酸アンモニウム(150g/l)、アセチルアセトン(2ml/l)、酢酸(3ml/l)となるよう調整し、1週間以内に使用した。

6 酵素的および非酵素的酸化によるTBARSの測定

Fe-AsAによる脂質過酸化は、MtまたはMsけん濁液(2.5mg protein/ml)に、終濃度として50mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)、40 μ M ADP、20 μ M FeCl₃、450 μ M AsAを加えた。 37°C でインキュベートし、0, 15, 30, 60, 120, 180分後のTBARSを測定した⁸⁾。

NADPHによる脂質過酸化は、MtまたはMsけん濁液(1.5mg protein/ml)に、終濃度として20mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)、40 μ M NADPH、20mM ニコチンアミド、90mM塩化カリウムを加えた。 37°C でインキュベートし、0, 5, 10, 15分後の

TBARS を測定した⁹⁾。

TBARS の測定は、Ohkawa 法を改変した方法^{10), 11)}を用いた。

すなわち、試料液に、酢酸緩衝液 (pH3.5)、SDS 溶液、BHT 溶液、水を加え均一化した液に、TBA 試薬を加えた。再現性を高めるために、5℃ で 60 分間冷却した後、100℃ で 60 分間加熱した。水とブタノール：ピリジン (15:1) 混液で激しく攪拌した後、遠心分離し、上澄液の蛍光強度 (Ex 515nm, Em 553nm) を測定した。このとき、試料けん濁液にかえて水を加えたもので対照をとり補正した。また、標準試料として、テトラエトキシプロパンを用いた¹²⁾。

7 その他

タンパク質の測定は Lowry 法¹³⁾を、脂質量の測定は Folch 法¹⁴⁾で抽出した後、重量を測定した。

統計処理は、各測定値の雌雄を比較する場合は、F 検定により等分散と判定されたとき T 検定で、等分散でないときは、Mann-Whitney 検定を行った。

結果

1 各組織 Mt, Ms の α -トコフェロール量

肝臓では Mt, Ms とも雌の方が有意に高かった。(table 1.)

腎臓では Mt は雌が高い傾向があり、Ms は雄が有意に高かった。

心臓では Mt, Ms とも雌が高い傾向があった。

以上の結果は、前報で不飽和指数が高かった方が、 α -トコフェロール含量も高く、生体内での抗酸化機構の一つとして適応していることが示唆された。

2 各組織 Mt, Ms のチトクロム P-450 活性

肝臓では Mt は、アニリンヒドロキシラーゼ活性、アミノピリン N-デメチラーゼ活性とも雌の方が有意に高いか、高い傾向にあった。(table 2.)

肝臓 Ms では、チトクロム P-450 活性は雄の方が、高いことが報告されている¹⁵⁾が、今回の結果はこれと一致した。

腎臓では Mt は、雌の方が、有意に高いか、高い傾向があった。Ms は、アニリンヒドロキシラーゼ活性

Table 1. α -tocopherol content of mitochondria and microsome in organs.

Organ	Mitochondria		Microsome	
	Male	Female	Male	Female
Liver	1.202±0.288	1.957±0.718*	1.023±0.203	2.313±0.315**
Kidney	1.842±0.228	3.253±2.159	3.667±1.220	2.488±0.182*
Heart	0.922±0.473	1.240±0.547	1.080±0.229	1.410±0.920

Values are means±S.D. of 6 rats.
** p<0.01 vs.male *p<0.05 vs.male

Table 2. Cytochrome P-450 activities of mitochondria and microsome in organs.

Organ	Enzyme	Mitochondria		Microsome	
		Male	Female	Male	Female
Liver	AHA	0.107±0.038	0.175±0.017**	0.753±0.124	0.490±0.057**
	ANDA	2.220±0.532	2.470±0.640	11.218±1.881	6.041±2.484**
Kidney	AHA	0.016±0.004	0.029±0.009*	0.043±0.010	0.066±0.018*
	ANDA	0.413±0.145	0.677±0.614	2.252±1.915	0.582±0.261
Heart	AHA	ND	ND	ND	ND
	ANDA	ND	ND	ND	ND

AHA: Aniline hydroxylase activity, ANDA:Aminopyrine N-demethylase activity
Values are means±S.D. of 6 rats. **p<0.01 vs.male *p<0.05 vs.male
ND: not detected

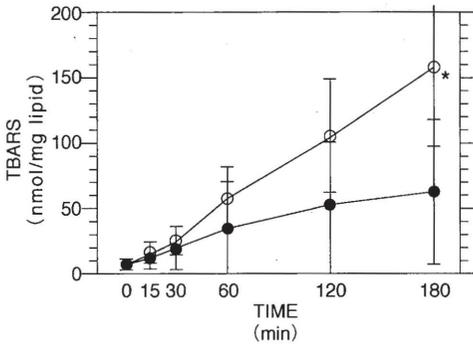


Fig. 1. TBARS in liver mitochondria incubated with Fe-Ascorbic acid.

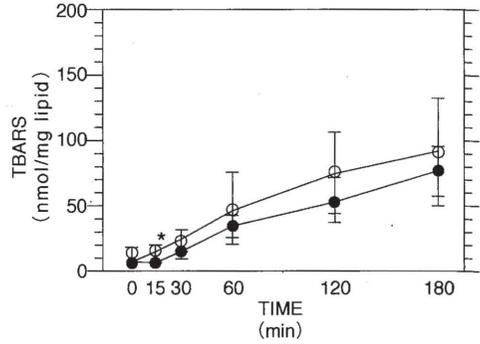


Fig. 2. TBARS in liver microsomes incubated with Fe-Ascorbic acid.

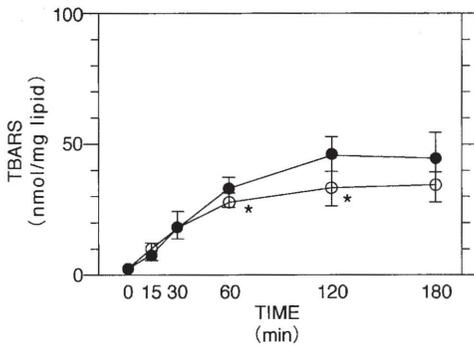


Fig. 3. TBARS in kidney mitochondria incubated with Fe-Ascorbic acid.

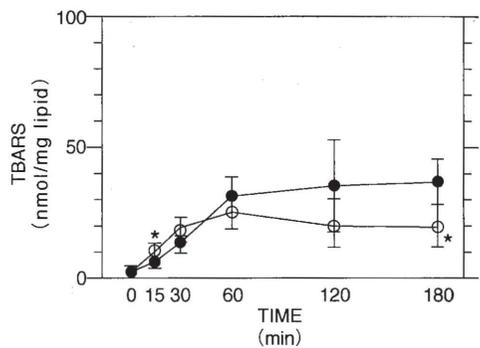


Fig. 4. TBARS in kidney microsomes incubated with Fe-Ascorbic acid.

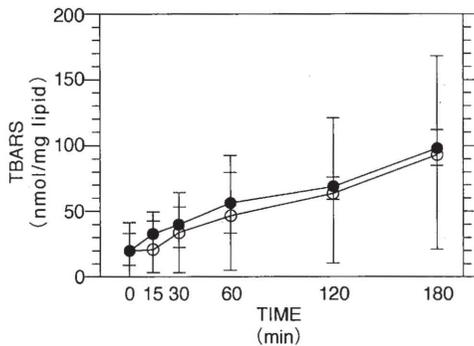


Fig. 5. TBARS in heart mitochondria incubated with Fe-Ascorbic acid.

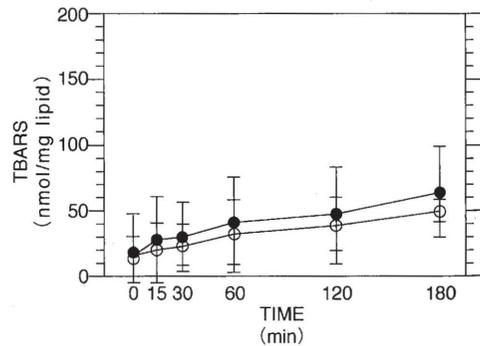


Fig. 6. TBARS in heart microsomes incubated with Fe-Ascorbic acid.

● Male, ○Female

Values are means \pm S.D. of 6 rats.

* $p < 0.05$ vs. Male

は雄が有意に高く、アミノピリン N-デメチラーゼ活性は雄が高い傾向にあった。

心臓は、Mt, Ms の両活性とも測定感度以下であった。

3 NADPH による脂質過酸化

肝臓 Mt では、雌雄とも NADPH による TBARS の増加はほとんど認められなかった。

肝臓 Ms では、0分から15分後までの TBARS の増加はごくわずかであったが、5, 10, 15分後に有意に雌が高くなった ($p < 0.05$)。

腎臓 Mt では、雌雄とも0分から5分後での TBARS の急な増加がみられ、5分から15分後の増加は緩やかであるが、10, 15分後で有意に雌が高くなった ($p < 0.05$)。

腎臓 Ms では、雌雄とも0分から15分後までの TBARS の増加はごくわずかであったが、5, 10, 15分後に有意に雌が高くなった ($p < 0.05$)。

心臓では、チトクロム P-450 活性が測定感度以下であったことより、NADPH による脂質過酸化の実験は行わなかった。

4 Fe-AsA による脂質過酸化

肝臓 Mt では、30分以後雌で TBARS が急激に増加し、180分後には有意に雌が高くなった。(fig. 1.)

肝臓 Ms では、雌がやや高い傾向を示した。(fig. 2.)

腎臓 Mt では、60, 120, 180分後には有意に雌が高くなった。(fig. 3.)

腎臓 Ms では、180分後には有意に雌が高くなった。(fig. 4.)

心臓では、Mt, Ms とも経時的な TBARS の増加がみられたが、性差は認められなかった。(fig. 5., fig. 6.)

考 察

1 肝臓

Mt では、鉄イオン、ヘムタンパク、アスコルビン酸などのフリーラジカルのイニシエーターによって脂質過酸化が促進される非酵素的な反応が主で、NADPH, チトクロム P-450 レダクターゼを必要とする酵素的な反応はほとんど行われないと考えられている^{16), 17)}が、今回の結果でも、雌雄とも NADPH による TBARS の増加はほとんど認められなかった。

雄ラット肝の Mt において、Fe-AsA によって、TBARS は顕著に高くなること、同時に、リノール酸

(18:2), アラキドン酸(20:4), DHA(22:6)の多価不飽和脂肪酸の減少がみられ、Mt の脂質構造の変化や、機能の低下を招くという報告があり¹⁸⁾、今回も 20:4, 22:6 などの含量が高かった雌でより TBARS の増加がみられたのであろう。また、Mt の膜は、外膜と内膜を形成しており、どちらも多価不飽和脂肪酸 18:2, 20:4, 22:6 の割合に大きな差はない¹⁹⁾が、Fe-AsA による脂質過酸化の促進をしているときに、Mt の主として外膜に結合しているホスホリパーゼ A₂ (PLase A₂) が活性化されること、また内膜に結合していると思われる Mg²⁺-AT Pase も活性化されることが示されており^{20), 21)}、PLase A₂ によって Mt の膜リン脂質から不飽和脂肪酸が遊離して、機能の低下が起こる可能性が考えられている。

以上より、Mt では非酵素的脂質過酸化促進因子に対して、雌の方が被過酸化性が高く、機能低下がおりやすいと推察される。

Ms は、非常に多種多様な酵素を含んでいる画分であり、そのなかでも種々脂溶性基質の酸化的代謝を行うミクロソーム電子伝達系と呼ばれる脂質過酸化に深く関連した酵素群をもっている。さらに、多価不飽和脂肪酸を多く含んでいることから、容易に脂質過酸化を起こし、TBARS の生成²²⁾、多価不飽和脂肪酸の減少²³⁾、膜流動性の減少²⁴⁾、膜の崩壊²³⁾、ミクロソーム酵素の失活²³⁾などの現象が報告されている。

Ms では、チトクロム P-450 活性が雄の方が高かったことから NADPH による TBARS は、雄で高くなることが推察されたが、反対の結果であった。これは、酵素的酸化においても、過酸化の基質になる多価不飽和脂肪酸の割合の方が重要であることを示唆している。

基質としての多価不飽和脂肪酸含量が TBARS の増加に影響することは、Hahn ら^{25), 26)}によっても示されている。彼らは、フェノバルビタールをラットに投与すると肝 Ms における酵素的および非酵素的な脂質過酸化が顕著に促進されることを認め、これがチトクロム P-450 活性の亢進と Ms でのホスフェチジルコリンの合成の亢進による多価不飽和脂肪酸の増加によるものであると考察している。

以上より、Ms では酵素的、非酵素的脂質過酸化促進因子の両方に対して、雌の方が被過酸化性が高く、過酸化脂質による障害も深刻であると推察される。

2 腎臓

Mt, Ms とも多価不飽和脂肪酸の割合は雌が高く、チトクロム P-450 活性は雌の方が高かったので、

NADPH による TBARS の増加が, Mt で雄, Ms で雌が高いという性差がみられた理由は明らかでない。

しかし, α -トコフェロール含量の高い方が TBARS の増加が抑制されたことより, 酵素的脂質過酸化促進因子に対しては, α -トコフェロールが性差に影響しているのかもしれない。

Fe-AsA による TBARS が, Mt, Ms とも雄で高くなったのは, 多価不飽和脂肪酸の割合が雄で高かったことと一致している。

以上より, Mt では雄の方が被過酸化性が高く, Ms では酵素的脂質過酸化促進因子には雌が, 非酵素的脂質過酸化促進因子には雄の方が被過酸化性が高かった。

3 心臓

Mt, Ms とも脂質の被過酸化性に関連する項目に有意な性差は認められず, 被過酸化性にも性差はないと考えられる。

要 旨

ラット各組織ミトコンドリアおよびミクロソームにおける脂質の被過酸化性について検討するため, α -トコフェロール量, チトクロム P-450 活性, 酵素的および非酵素的酸化によるチオバルビツール酸反応物 (TBARS) を測定した。

酵素的酸化に対して, 肝臓 Ms, 腎臓 Ms では雌で, 腎臓 Mt では雄で被過酸化性が高かった。非酵素的酸化に対して, 肝臓 Mt, 肝臓 Ms では雌で, 腎臓 Mt, 腎臓 Ms では雄で被過酸化性が高かった。心臓 Mt, 心臓 Ms では被過酸化性に性差はなかった。

文 献

- 1) 日本ビタミン学会編, ビタミン学(I), 東京化学同人, 東京, p197 (1980)
- 2) Nakano, M., Sugioka, K., Nakamura, t. et al, *Biochem. Biophys. Acta.*, 619, 274-286 (1980)
- 3) Hochstein, P., and Ernster, L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12, 388-394 (1963)
- 4) 泉 美治, 中川 八郎, 三輪谷 俊夫供編, 生物化学実験のてびき 1 生物試料調製法, 化学同人, 京都, pp61-63 (1985)
- 5) Ueda, T., Ichikawa, H. and Igarashi, O., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 39, 207-219 (1993)
- 6) Imai, Y., Ito, A. and Sato, R., *J. Biochem.*, 60, 417-428 (1966)
- 7) Nash, T., *Biochem. J.*, 55, 416-421 (1953)
- 8) Palamanda, J. R. and Kehrer, J. P., *Lipid*, 28, 427-431(1993)
- 9) Wills, E. D., *Biochem. J.*, 113, 315-324 (1969)
- 10) Kosugi, H., Kojima, T. and Kikugawa, K., *J. Am. Oil chem. Soc.*, 68, 51 (1991)
- 11) Kikugawa, K., Kojima, T. and Kosugi, H., *J. Rad. Res. Commun.*, 8, 107 (1990)
- 12) Yagi, K., *Biochem. Med.*, 15, 212-216 (1976)
- 13) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951)
- 14) Folch, J., Jeess, M. and Stanley, G. H. S., *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957)
- 15) Kato, R., Takanaka, A. and Takayanagi, M., *Jpn. J. Pharmacol.*, 18, 482-489 (1968)
- 16) Hunter, F. E. Jr., Scott, A., Hoffsten, P. E. et al, *J. Biol. Chem.*, 239, 614-621 (1964)
- 17) McKnight, R. C., Hunter, F. E. Jr. and Oehlert, W. H., *J. Biol. Chem.*, 240, 3439-3446 (1965)
- 18) 藤田 直, 薬誌, 92, 250-256 (1972)
- 19) 五十嵐 脩編集, ビタミン E - 基礎と臨床 -, 医歯薬出版, 東京, pp116-117 (1985)
- 20) Yasuda, M. and Fujita, T., *Japan. J. Pharmacol.*, 27, 429-435 (1977)
- 21) Pappu, A., S., Fatterpaker, P. and Sreenivasan, A., *Biochem. J.*, 172, 349-352 (1978)
- 22) Buege, J. A. and Aust, S. D., *Methods in enzymology*, Academic press, New York, pp302-310 (1978)
- 23) Hgberg, J., Bergstrand, A. and Jacobson, S. V., *Eur. J. Biochem.*, 37, 51-59 (1973)
- 24) Eichemberger, K., B hni, P., Winterhalter, K. H. et al., *FEBS Letters*, 142, 59-62 (1982)
- 25) Hahn, H. K. J., Tuma, D. J., Barak, A. J. and Sorrell, M. F., *Biochem. Pharmac.*, 25, 769-772 (1976)
- 26) Hahn, H. K. J., Barak, A. J., Tuma, D. J. and Sorrell, M. F., *Biochem. Pharmac.*, 26, 164-165(1977)