

鉄欠乏状態時の脂質過酸化反応と性差

上原万里子・立石 悟・茂木英喜・鈴木和春・五島孜郎
(東京農業大学農学部栄養学科)

Lipid Peroxidation and Sex-dependent Differences in Iron-deficient Rats.

Mariko UEHARA, Satoru TATEISHI, Hideki MOGI, Kazuharu SUZUKI and Shiro GOTO
Department of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

The purpose of the present study was to investigate the effects of iron deficiency on lipid peroxidation and sex-dependent differences in rats. Weanling male rats ($n=30$) were divided into three groups of ten, and were fed on three diets : a control diet (C) ; an iron deficient diet (FeD) ; and an iron-copper deficient diet, respectively for 60 days. Lipid peroxides in the liver were determined with four methods : the three thiobarbituric acid (TBA) assay and the luminol chemiluminescence assay by using high-performance liquid chromatography (CL-HPLC), and were expressed as TBA reactive substances (TBARS) for TBA assay and phosphatidylcoline hydroperoxide (PCOOH) for CL-HPLC method. By using the TBA assay, hepatic the TBARS was decreased, but the PCOOH were higher in the FeD rats than in the control rats by the CL-HPLC method. Iron ($50\sim 500\ \mu\text{g}$ of Fe/g liver as FeCl_3) was added to iron-copper deficient liver homogenate solution. The result was that correlation between iron levels and lipid peroxide values in all methods were significant. Lipid peroxide value in Uchiyama-Mihara method was affected by the increasing of iron, especially.

Weanling male and female rats ($n=40$) were divided into four groups of ten, and were fed on the control diet (CM, FM) and the iron deficient diet (DM, FM), respectively for 30 days. Serum and liver TG and PL values, hepatic cytosolic XOD, GSH-Px and serum and liver PCOOH were increased in iron deficient male rats (DM). As for female iron-deficient rats, these phenomena were not so particular without GSH-Px. It was suggested that TBARS was easy to affect by iron level in the sample solution for assay, and PCOOH accumulates as a primary peroxidation product of membrane phospholipids in liver were available for the determination of hepatic lipid peroxidation in iron deficient rat. We demonstrated that lipid peroxidation from PCOOH was occurred in iron deficiency and sex-dependent differences was detected on lipid peroxidation in iron deficient rats.

所在地：東京都世田谷区桜丘 1-1-1 (〒156)

鉄イオンは、脂質過酸化反応のイニシエーターとして知られており、鉄欠乏状態時には、肝および血清中チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) の低下が報告されている^{1),2)}。しかし、この TBARS は過酸化反応二次生成物であり、鉄イオンの存在により測定値が増大することから、鉄欠乏ラット肝のように著しい鉄含量の低下がみられる試料では、正常ラット肝との鉄含量の差が測定値に与える影響は少ない。そこで本研究では、金属イオンによる影響の少ない過酸化反応一次生成物に着目し、TBARS との比較を鉄欠乏ラット肝を用いて行い、さらに鉄欠乏状態時の脂質過酸化反応の性差についても検討することを目的とした。

実験方法

<実験1> 被験動物として、初体重45g前後のWistar系雄ラット20匹を用い、対照 (C) 群または鉄欠乏食 (FeD) に分け、Table 1 に示す飼料にて8週間飼育観察を行った。飼育終了後ラットを頸動脈より脱血屠殺し、肝臓を生理的食塩水にて灌流後試料とした。肝臓中铁および銅濃度は、原子吸光度計 (島津製作所: AA-640-13型) にて測定した。肝臓中過酸化脂質量として Uchiyama & Mihara 法³⁾、Ohkawa 法⁴⁾、Shinnhuber 法⁵⁾ の3種のTBA法でTBARSを、化学発光系を応用した宮澤らのCL-HPLC法⁶⁾でPhosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) 量を測定した。

<実験2> 実験1と同様な雄ラット10匹に用い、鉄・銅欠乏食を8週間投与後、脱血屠殺し、実験1に準じ肝臓を摘出し、ホモジネートを作製した。その肝臓ホモジネートにFeCl₃をFe濃度として50, 100, 200, 300, 400, 500 μg/gの6段階で添加した試料のTBA3法とCL-HPLC各定量法での過酸化脂質量の変動を検討した。

<実験3> 初体重45g前後のWistar系雌雄ラット40匹を対照 (CM, CF) と鉄欠乏食 (DM, DF) の計4群に分け、8週間飼育観察を行った。飼育終了後脱血屠殺にて血液採取後血清を分離し、実験1に準じ肝臓を摘出し、試料とした。遠心分離にて肝細胞各分画を得、各鉄濃度は湿式灰化後、原子吸光度計にて測定した。脂質成分として血清および肝臓トリグリセライド値を和光純薬工業(株)社製測定キッ

Table 1. Composition of Diets (%)

Groups	Control	Iron-deficiency
Casein, Milk	22	22
Starch, Corn	32	32
Sucrose	30	30
Oil, Corn	5	5
Cellulose	5	5
Mineral Mix. ¹⁾	4	4*
Vitamin Mix. ²⁾	2	2
Total	100	100

1) According to A.E. Harper (J. Nutr., 68, 408, 1959)

2) Panvitan Powder (Takeda Chemical Co., Ltd.)

* : Fe (C₆H₅O₇) · 6H₂O in Mineral Mix. was excluded.

トで、血清および肝臓リン脂質・総コレステロール、血清HDL-コレステロール値を協和発酵メデックス(株)製測定キットで測定し、肝臓総脂質量は総脂質抽出後、恒量を測定することにより求めた。肝中金属酵素としてXanthine Oxidase (XOD)⁷⁾、Superoxide dismutase (SOD)⁸⁾、Glutathione Peroxidase (GSH-Px)⁹⁾、Catalase (CAT)¹⁰⁾の測定を行った。

得られた数値については、Bartlett's Testを行い、5%水準で有為差ありの場合は、母分散は一樣ないと判定し、Kruskal-Wallisの検定を、有為差なしの場合には、分散分析を行った後、有為差がみられたものについて、個体の数が等しい時にはDunnett's Testを、等しくない時にはScheffe's Testを用いて多重比較を行った^{11),12)}。

結果と考察

過酸化脂質量の測定にはTBA法が広く利用されているが、TBA試薬は生成物であるMalondialdehyde (MDA)以外の物質にも反応することが知られている¹³⁾。これら夾雑物質の呈色性は、各種TBA改良法にて除去もしくは無視できるように検討されている。しかし、加熱処理やタンパク質さらに金属イオンなどによる呈色性の問題は考慮に入れられておらず、各々TBA改良法として同一試料の変化あるいは類似試料間における比較に使用するととどめられており、すべての夾雑物質の影響を無視することはできない。

実験1では鉄欠乏食投与により、肝臓中の鉄濃度が対照のそれと比べ明らかに低値を示すことから(Fig. 1)、この測定試料中鉄濃度がTBA法に影響を与えるものと考え、過酸化二次生成物であるTBARSと一次生成物であるPCOOH量との比較を行ったところ、Uchiyama & Mihara, Ohkawa, Shin-

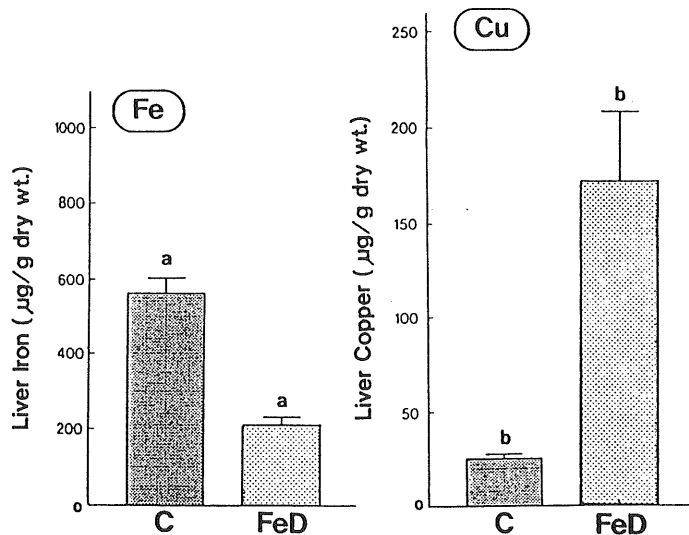


Fig. 1 Iron and Copper Contents in Liver

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

C: Control, FeD: Iron-deficiency

nhuber の TBA 3 法では低下傾向を示したのに対し、PCOOH 量は増加した (Fig. 2)。この矛盾を検討するため、実験 2 では鉄添加による各測定法による過酸化脂質量の変動を観察した。鉄・銅欠乏ラット肝ホモジネートに $500 \mu\text{g/g}$ の鉄を添加したところ、TBA 3 法はいずれも TBARS が増加する傾向を示したが、CL-HPLC 法では、鉄添加により 10pmol/g 程度減少するにとどまった。さらに、鉄添加量を $50 \sim 500 \mu\text{g/g}$ に変化させ、鉄添加量と過酸化脂質量間の相関を検討した結果、TBA 3 法では正の相関を示し ($r=0.91 \sim 0.98$, $p < 0.01$)、鉄濃度の上昇に伴う TBARS の増加がみられた。一方、CL-HPLC 法では、負の相関を示したが ($r=0.91$, $p < 0.01$)、鉄添加により PCOOH 量は 10pmol/g 程度減少するにとどまった (Fig. 3)。CL-HPLC 法での鉄濃度の上昇に伴う PCOOH 量の減少については、測定対象物が金属イオンにより分解されやすいことから、可能な限り前処理を迅速に行い、分析を開始すれば改善されると思われる。

次に、この結果より実験 3 で鉄欠乏雌雄ラットの過酸化脂質量の変動を観察するにあたって、PCOOH 量を用いることとし、血清・肝臓脂質成分および肝中金属酵素活性も併せて検討を行ったところ、鉄欠乏による血清および肝臓脂質成分の変動は雄で顕著であった (Fig. 4, 5)。鉄欠乏ラットの血清または肝臓で変動する脂質成分としてトリグリセライド、リン脂質、コレステロールが報告されてお

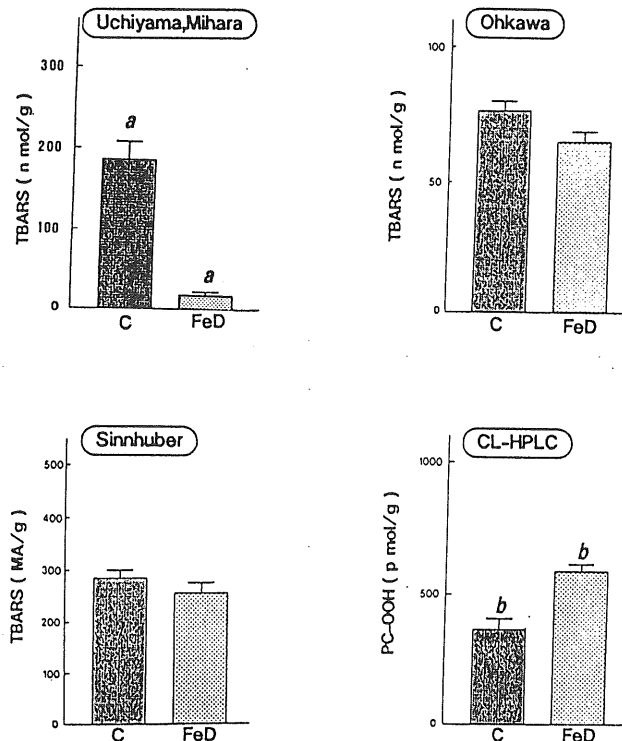


Fig. 2 Hepatic Lipid Peroxide Values by Four Methods

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

C : Control, FeD : Iron-deficiency

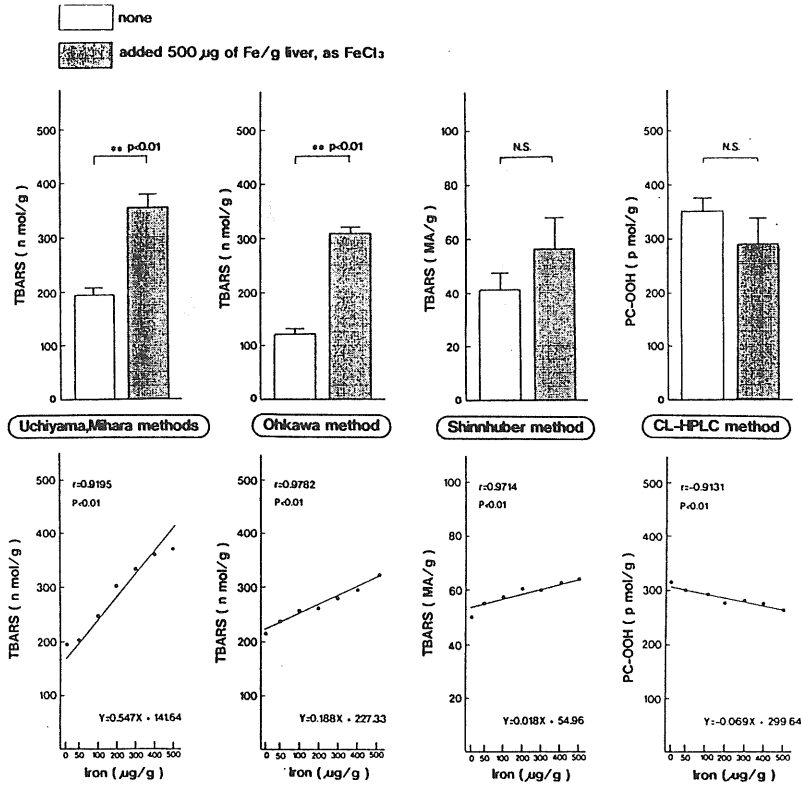


Fig. 3 Effect of Iron-addition on Hepatic Lipid Peroxide Values

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

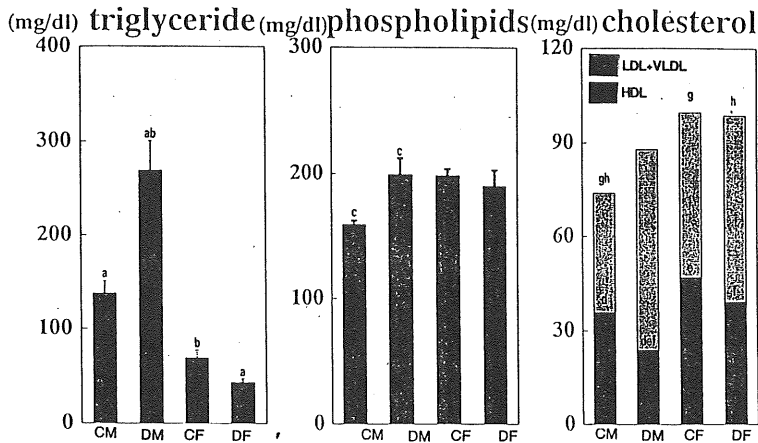


Fig. 4 Serum Lipid Contents

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

CM : Control Male, DM : Iron-deficient Male,

CF : Control Female, DF : Iron-deficient Female

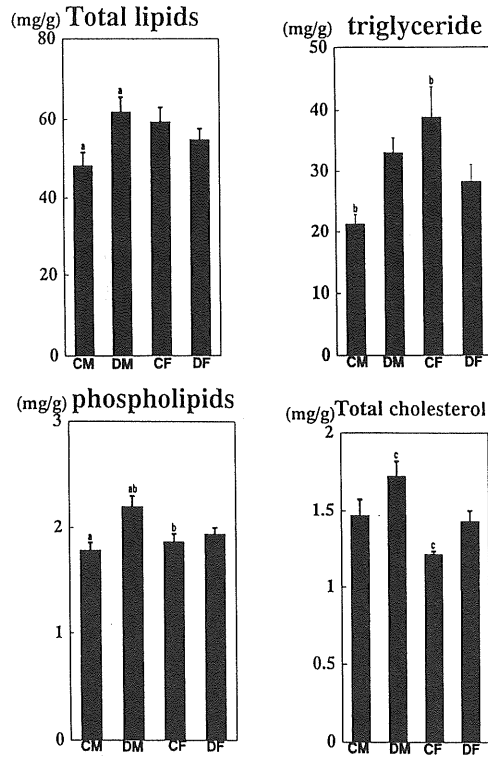


Fig. 5 Liver Lipid Contents

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

CM : Control Male, DM : Iron-deficient Male,

CF : Control Female, DF : Iron-deficient Female

り^{14),15)}, 本実験でも同様な変動結果を得た。雌に関しては Sherman¹⁶⁾が, 初体重90g 前後の雌ラットを用いた18週飼育の実験では, 鉄欠乏が血清脂質成分に与える影響はないものとしており, 鉄欠乏による血清および肝臓脂質成分は, 幼若なもの, 雌より雄, 飼料中铁レベルがより低いもの, 鉄欠乏食投与期間が短期より長期で変動を受け易いものと思われる。

一方, 鉄欠乏時には, 肝臓の貯蔵鉄を血中に動員するため Fe^{3+} を Fe^{2+} にする際, XOD の活性が上昇することが報告されている¹⁷⁾。XOD は活性酸素 (O_2^-) 生成系の酵素といわれていることから, この活性上昇は O_2^- の発生増加を惹起する可能性が考えられる。しかし, 本実験の XOD 活性は酸化型, 脱水素型に分けて測定しておらず, 活性の増加が即, O_2^- の発生増加を意味するとはいい難いが, 鉄欠乏の雄で対照群に比し明らかな上昇がみられた。それに対し雄では SOD の誘導はかからず, CAT も変動を示さず, GSH-Px のみ高値を示し (Fig. 6), 肝臓および血清中の PCOOH 量は増加した (Fig. 7)。このことは, 過酸化が起きうる材料である脂質量の上昇がみられ, 活性酸素発生系といわれる酵素の活性上昇に対し, 抗酸化酵素活性の顕著な上昇がみられないことから, 生成された活性酸素を迅速に消去しきれず, 過酸化脂質量の増加を惹起した結果と推測される。また, XOD 活性が酸化型を反映せずとも, イニシエーターとして鉄欠乏で減少した鉄の代わりに増加した銅が何らかの影響を及ぼしているも

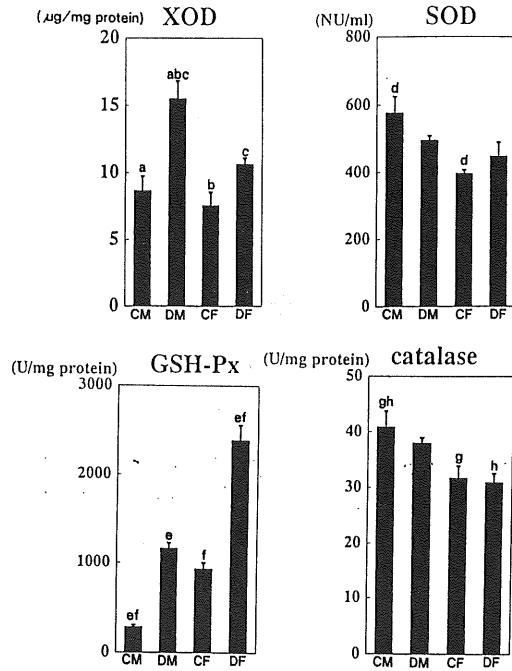


Fig. 6 Activities of Hepatic Metallo Enzymes

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

CM : Control Male, DM : Iron-deficient Male,

CF : Control Female, DF : Iron-deficient Female

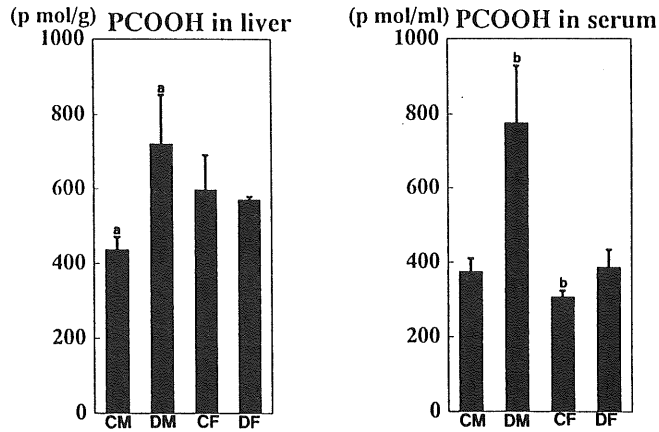


Fig. 7 PCOOH in Liver and Serum

Values are Means \pm SE.

Matching superscript letters denote significant differences, $P < 0.05$.

CM : Control Male, DM : Iron-deficient Male,

CF : Control Female, DF : Iron-deficient Female

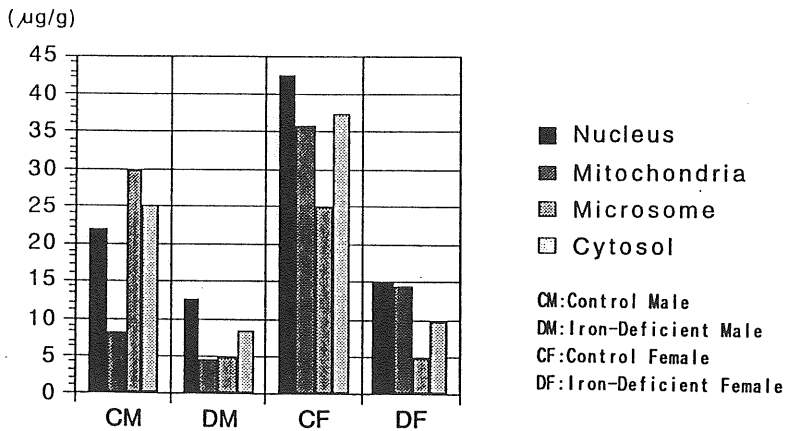


Fig. 8 Iron Distribution in Liver

Values are Means.

CM : Control Male, DM : Iron-deficient Male,

CF : Control Female, DF : Iron-deficient Female

のと考えるが、今後の検討が必要とされる。一方、雌では肝臓・血清中脂質成分の変動も少なく、XOD 活性の上昇も緩慢であるが、GSH-Px の活性は明らかに上昇し (Fig. 6), PCOOH 量の増加は観察されなかった (Fig. 7)。これは、雌で肝臓の貯蔵鉄量が雄より高く (Fig. 8), 貧血状態に陥りにくいことに起因するものと思われる。また、この貯蔵鉄量については、Estrogen が関与しているが¹⁸⁾, Estrogen には、抗酸化作用があることも知られており¹⁹⁾, 生成された過酸化脂質量と抗酸化酵素について性差があらわれたものと推察される。

以上のことから鉄濃度が明らかに異なる測定試料の場合、金属イオンによる影響の少ない CL-HPLC 法は、TBA 法よりも有用性を示す結果となり、鉄欠乏ラット肝の過酸化脂質量の増加についての信頼性を確認し、鉄欠乏状態における脂質過酸化反応と抗酸化性の性差についても確認した。

文 献

- 1) Yoshiji, H., Nakae, D., Mizumoto, Y., Horiguchi, K., Tamura, K., Denda, A., Tsujii, T. and Konishi, Y. (1992) *Carcinogenesis*, 13 : 1227-1233
- 2) 広末トシ子, 細貝祐太郎 (1993) *食衛誌* 37, 34 : 5
- 3) Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978) *Anal. Biochem.* 86 : 271-278
- 4) Ohkawa, H. (1979) *Anal. Biochem.*, 95 : 351-358
- 5) Shinnhuber, R.O. (1977) *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*, 26 : 259-267
- 6) Miyazawa, T. (1989) *Free Radical Biol. & Med.* : 209-217
- 7) Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassel, M. (1974) *Enzymes as biochemical reagents.* in *Method of Enzymatic Analysis Vol. 1*, ed. by Bergmeyer, H.U., Academic Press, New York : pp.518-521
- 8) Ohyanagui, Y. (1984) *Anal. Biochem.*, 142 : 290-296

- 9) Jensen, G.E. and Clausen, J. (1981) *Ann. Nutr. Metab.*, 25 : 27-37
- 10) Beers, R.F. and Sizer, I.W. (1952) *J. Biochem.*, 195 : 133-140
- 11) 池田 央編 (1989) 統計ガイドブック, 新曜社, 東京 : pp.111-148
- 12) 市原清志 (1990) バイオサイエンスの統計学, 南江堂, 東京 : pp.150-183
- 13) Nair, V. and Turner, G.A. (1984) *Lipids*, 19 : 804
- 14) Sherman, A.R. (1981) *Nutr. Res.*, 1 : 363-372
- 15) Amine, E.K., Desiletets, E.J. and Hegsted, D.M. (1971) *J. Nutr.*, 106 : 405-411
- 16) Sherman, A.R. (1981) *Nutr. Res.*, 1 : 363-372
- 17) Kelly, M.K. and Amy, N.K. (1984) *J. Nutr.*, 114 : 1652-1659
- 18) Bjorklid, E. and Helageland, L. (1970) *Biochem. Biophys. Acta*, 221 : 583
- 19) Sugioka, K., Shimosegawa Y. and Nakano, M. (1987) *FEBS LETTERS*, 210, 1 : 37-39