<原 著>

加齢と血清過酸化脂質 —比色法及び蛍光法による検討—

船迫真人 上江洲朝洋 岡本幸春 阪上良行
谷本幸三 大田喜一郎 大畑雅洋 藤田拓男

<要 約>最近遊離基と老化に関する問題が注目を集め、遊離基の作用の結果生じる過酸化脂質（以下 Px と略す）と組織及び細胞の老化に関する報告も増加の傾向にある。私共は入院患者 398名及び集団検診被検者75名の空腹時血清を使用して血清 Px を測定し、加齢及び各脂質分画との関係を検討した。又集団検診被検者については血清 Px を TBA 反応比色法（以下比色法と略す）及び TBA 反応蛍光法（以下蛍光法と略す）で測定し、両法の比較も若干行った。まず入院患者を対象に血清 Px を比色法により測定すると $m \pm SD = 13.08 \pm 2.45 \text{ nmole/ml}$ 、これを平均年齢のほぼ同じ集団検診被検者では $m \pm SD = 11.3 \pm 1.98 \text{ nmole/ml}$ で何らかの疾患を有する入院患者の方が高値を示した。又症例数の増加と共に正規分布に近い分布状態を示した。

血清 Px 値と年齢の関係は70歳までは加齢と共に血清 Px 値は増加の傾向を示し、70歳より高齢で逆に低下の傾向を示した。特に70歳以下の集団検診被検者に於ける蛍光法による Px 値と年齢の間では有意の正の相関がみられた。入院患者では胃痛・心筋硬塞・心不全・気管支喘息等種々の疾患に於いて比色法による Px 値が高値を示し、ことに比較的重症な症例では高頻度であった。

次に各脂質分画と Px 値の関係について検討すると入院患者では NEFA・ β リポ蛋白・ β リポ蛋白分画と Px 値は有意 正の相関を示した。又集団検診被検者に於ては蛍光法による Px 値は β リポ蛋白と正の相関を認めた。

血中 Vitamin E（以下 VE と略す）と Px 値との間には有意の相関を認めなかったが、このことは血清中には VE 以外にも抗酸化作用を有する物質が存在することを示唆した。

血清での比色法による Px 値と蛍光法による Px 値の間に有意の相関を認めず、比色法による Px 値の方が約10倍の値を示したが、比色法ではシアル酸等 Px 以外の物質を非特異的に測定している可能性が多い。

緒 言

Free radical と老化 に関しては Harman¹⁾ 以来多くの報告を見、老化機序についての最も有力な学説の一つとなっており、その作用の結果生じる過酸化脂質（以下 Px と略す）と組織及び細胞の老化に関する報告も最近増加の傾向にある^{2)~3)}。この意味で人の老化の指標として血中の Px 値の測定は極めて重要であるにもかかわらず、人血清 Px に関する報告は意外に少ない^{4)~5)}。私共は今回人血清中の Px の測定法について TBA を用いた比色法と蛍光法について検討すると共に、血清 Px 値と加

齢及び各脂質分画との関係について検討した。

検索材料及び方法

検索材料は和歌山県立医科大学及び府中病院入院患者（以下入院患者と略す）398名及び和歌山県南部七川及び大島地区集団検診被検者より無差別抽出成人（以下集団検診と略す）75名の空腹時血清を使用した。

主な測定方法は、脂質分画による β リポ蛋白フラクション（以下 β リポフラクションと略す）はセルロースアセテート膜電気泳動法、 β リポ蛋白（以下 β リポと略す）は免疫学的沈降法、コレステロールは Zak-Henly 法、遊離脂肪酸（以下 NEFA と略す）は Dole 法、トリグリセライド（以下 TG と略す）は Friedrikson 法、総脂質は酸化比色法で測定した。

M. Funasako, A. Uezu, Y. Okamoto, Y. Sakagami,
Y. Tanimoto, K. Ohta, M. Ohata, T. Fujita: 和
歌県立医科大学内科高年病部門

表1 Vitamin E. の測定法

○ 早朝空腹時血清 0.5ml

↓
20%TCAにて蛋白分離後、TBAを加え混和↓
100°C 30分間加熱後、n-ブタノールにて抽出↓
日立自記分光光度計124型にて535m μ 域の吸光度を測定し、標準曲線より血清1ml当りのMDA量として表わす。

○ 標準曲線は Tetra-Etoxy-Propane(TEP)を用いて上記の方法にて作製

○ 血清MDA測定の際の吸収曲線

図1 Px 測定法 (1)

血清ビタミンE (以下 VE と略す) は表1に示す如く、エタノール・n-ヘキサンで抽出後 Ex. 295m μ , Em. 320m μ の蛍光強度を測定する阿部らの方法⁶⁾によった。

比色法による Px (以下比色法 Px と略す) 測定は図1に示す如くトリクロール酢酸で蛋白分離後 TBA を加え100°Cで発色して 535m μ 域の吸光度を分光光度計で測定する内藤法⁷⁾を一部修正して用いた。即ち図1の下方の吸収曲線を全検体について記録し、535m μ の山の

○ 早朝空腹時血清0.05ml

↓
N/12H₂SO₄, 10%リタングステン酸にて蛋白分離後 TBAを加え混和↓
100°C 60分間加熱後、n-ブタノールにて抽出↓
Aminco-Bowman 蛍光分光光度計にて、Ex. 515m μ , Ex. 553m μ 域の蛍光強度を測定し、標準曲線より血清1ml当りのMDA量として表わす。

○ 標準曲線は Tetra-Etoxy-Propane(TEP)を用いて上記の方法にて作製

○ 血清MDA 測定の際の蛍光吸収曲線

図2 Px 測定法 (2)

不明瞭なものは測定不能として除外した。尚表中 MDA は malonyl-di-aldehyde の略である。

蛍光法による Px (以下蛍光法 Px と略す) 測定は図2に示す如く H₂SO₄・リタングステン酸で蛋白分離後、TBA を加え 100°Cで発色させて蛍光分光光度計で Ex. 515m μ , Em. 553m μ 域の蛍光強度を測定する八木らの方法⁸⁾の一部修正法によった。即ち H₂SO₄・リタングステン酸による蛋白分離過程を原法の2回の代わりに1回だけ行った。

尚 Px 測定の際の血清は、入院患者の場合は採血後約2時間放置後の分離血清を、集団検診の場合遠方運搬のため採血後約2時間で分離し8日間凍結保存後空温で融解した血清を用いた。

組織 Px 値の測定にはまず腎組織約1gに20mlのFolch液を加えて Waring Blender で5分間抽出し、比色法 Px 測定ではこの抽出液0.5mlを用いて上記の方法で Px を測定、蛍光法 Px 測定ではこの抽出液2mlに蒸留水2ml TBA 1mlを加え Px を測定した。尚組織 Px 値は mg Protein 当りの MDA 量として表わした。

検索成績

図3には入院患者398名に於ける比色法 Px 値の度数分布曲線を示すが、平均値±標準偏差 (以下 $m \pm SD$ と

図3 Distribution curve of serum Px. (N=398)

図4 Distribution curve of serum Px. (N=76)

略す) = $13.08 \pm 2.45 \text{ nmol/ml}$ を中心に正規分布に近い型を示した。集団検診の比色法 Px は $m \pm SD = 11.32 \pm 1.98 \text{ nmol/ml}$ であり、平均値が低い他、例数が少ないため不規則な曲線として認められる(図4)。

比色法 Px 値と年齢の関係は入院患者398名より無差別抽出した152例(図5)、集団検診(図6)共に有意の相関を示さなかったが、70歳までは増加の傾向を示し、それより高齢になるに従い低下の傾向が認められた。集団検診に於ける蛍光法 Px 値と年齢の関係を図7に示した。76名すべての $m \pm SD$ は $1.03 \pm 0.34 \text{ nmol/ml}$ と比色法 Px 値の約10分の1の値を示し、年齢70歳までは相関係数(以下 r と略す) = 0.354 , $p < 0.02$ で有意の正の相関を示し、70歳より高齢では低下の傾向を示した。この年齢との関係は比色法 Px と同じ傾向である。

次に同じ152名中比色法 Px 値が $m + 2SD$ 以上を示す疾患の検討を行った(図8)。この様な異常高値を示す

図5 Px & Age
○ m : 70 ● f : 82

図6 Age & serum Px. Measured by TBA Spectrophotometry
○...Male ●...Female

図7 Age & serum Px. Measured by TBA Fluorometry
○...Male ●...Female

症例は9例(5.9%)あり、疾患別には胃癌2例、心筋硬塞2例、気管支喘息2例、脳血管障害(片麻痺を呈する患者)1例、心不全1例、高血圧1例が含まれ、各疾

9例の疾患別内分け		全例中	疾患別中
胃 癌	2例	1.32%	2/5=40.0%
心 筋 硬 塞	2例	1.32%	2/5=40.0%
心 不 全	1例	0.66%	1/4=25.0%
気 管 支 喘 息	2例	1.32%	2/11=18.8%
脳 血 管 障 害	1例	0.66%	1/12= 8.3%
高 血 圧	1例	0.66%	1/22= 4.5%

図8 MDA>m+2SD を示す症例
152例中9例 (5.9%)

図9 Px & T.G. (N : 398)

図10 Px & Cholesterol (N : 398)

患中では胃癌が5例中2例 (40%), 心筋硬塞で5例中2例 (40%), 心不全で4例中1例等の頻度が高かった。

次に各脂質分画と Px の関係を検討した。まず入院患者398名を対象に TG, コレステロールとの関係を調べたところ一定の傾向を認めなかった (図9, 図10)。比色法 Px と NEFA, β リポ, β リポフラクションとの関

図11 Px & NrE.F.A. (N : 398) ($r=0.156$; $p<0.01$)

図12 Px & β Lipo (N : 398) ($r=0.160$; $p<0.01$)

係を調べたところそれぞれ $r=0.156$, $p<0.01$; $r=0.160$, $p<0.01$; $r=0.102$, $p<0.05$ の値で有意の相関を認めた (図11~13)。

しかしながら集団検診76名の比色法 Px と各脂質分画即ち総脂質, β リポ, コレステロールの関係を検索したところすべてに有意の相関を認めなかった (図省略)。又蛍光法 Px と各脂質分画の関係を集団検診を対象に検索を行ったところ, 総脂質, コレステロールと Px は相関がなかったが, β リポと Px の間には $r=0.229$, $p<0.02$ の値で有意の相関を認めた (図14)。

次に集団検診を対象に血清 VE と比色法 Px, 蛍光法 Px の関係を検索したが, 有意の相関を認めなかった (図15, 図16)。

図17は血清の比色法 Px と蛍光法 Px の関係を検索したグラフである。前述の如く蛍光法は比色法の約10分の1の値を示し, 両者は平行して増加する傾向を示したが

図13 P_x & β L.P. fraction (N : 398) ($r=0.102$: $p<0.05$)

図14 β Lipoprotein & P_x. Measured by Fluoromtry

図15 Serum Vitamin E & P_x. Measured by TBA Spectrophotometry

図16 Serum Vitamin E & P_x. Measured by TBA Fluorometry

図17 P_x. Measured by TBA Spectrophotometry & TBA Fluorometry

有意の相関は認められなかった。

この様に比色法と蛍光法では血清 P_x の測定値については大きな差が得られたので、この両者の差について更に検討するために前述の方法によるラット腎組織抽出物の P_x を両法で測定しその関係を図18に示した。このグラフからも明らかな様に比色法 P_x と蛍光法 P_x の間には $r=0.648$, $p<0.001$ で有意の正の相関を認めた。

考 案

最近 Free radical と老化¹⁾さらには過酸化脂質と老化及び疾患²⁾³⁾⁹⁾¹⁰⁾の関係が注目を集めている。私共も以前肝疾患と赤血球 P_x について報告した¹¹⁾¹²⁾。しかしなが

図18 Px. Measured by TBA Spectrophotometry & Fluorometry in Kidney

ら Px の測定方法特に血清 Px の測定方法には種々の因子の関与があり困難な点が多い。今回私共は入院患者398名、集団検診76名の空腹時血清を用いて比色法、蛍光法で Px を測定し、各脂質分画との関係及び加齢による影響について検索した。

まず比色法 Px は入院患者398名を対象に測定すると $m \pm SD = 13.08 \pm 2.45 \text{ nmole/ml}$ 集団検診では $m \pm SD = 11.32 \pm 1.98 \text{ nmole/ml}$ で何らかの疾患を有する症例の方が高値を示した。但し凍結による影響については更に検討する必要がある。

入院患者152名抽出群に於て比色法 Px 値が異常高値 ($m + 2SD$ 以上) を示す症例の疾患別の検討を加えた (図8)。この様な異常高値を示すものは5.9%で、胃癌、心筋硬塞、気管支喘息、脳血管障害、心不全、高血圧が含まれ、各疾患中では胃癌で5例中2例 (40%)、心筋硬塞5例中2例 (40%)、心不全4例中1例 (25%) 等が高頻度を示したが、これより疾患特異性は明らかでないが、比較的重症症例に異常高値のものが多くと思われた。

次に各脂質分画と Px 値の関係を検索した。入院患者398名を対象に検索するとコレステロール、TG と比色法 Px 値の間は相関を認めなかったが、NEFA、 β リポ、 β リポフラクシオンと Px の間には有意の相関を認

めた (図11~13)。脂質過酸化値と多価不飽和脂肪酸含量との間には平衡関係を認める¹³⁾という報告があり、不飽和脂肪酸の多いリン脂質を含む β リポフラクシオンと Px 値の相関は比較的容易に説明し得ると思われる。しかし NEFA と Px 値の相関に関しては十分な説明は困難であり今後の検討を要する。

しかしながら比色法 Px 値と各脂質分画の関係を76名の集団検診の症例で検索したところ、総脂質、 β リポ、コレステロールすべてに有意の相関を認めなかったが、これは血清脂質が低値を示し且つ変動幅の狭い特殊な集団であるためか、又は症例数が少いためか、今後の検討が必要である。ただし、蛍光法 Px 値は76名の症例でも β リポとは $r = 0.269$, $p > 0.02$ の値で有意の相関を認めた。このことは比色法より蛍光法の測定値の変動幅が小さいことによるものと思われる (図14)。

集団検診を対象に抗酸化剤の機能を有するとされる血清 VE と比色法 Px 値及び蛍光法 Px 値の関係を検索したが、両方とも有意の相関を認めなかった (図15、図16)。このことは血清中には VE 以外にも抗酸化作用を持つ物質が存在する可能性を示している。

加齢と Px 値の関係では年齢が70歳までは上昇、それより高齢では Px 値は加齢と共に低下傾向を示した。特に集団検診に於ける蛍光法 Px 値と年齢の関係は図7に示す如く、年齢70歳までは $r = 0.354$, $p > 0.02$ の値で有意の正の相関を示した。このことより血清 Px 値特に蛍光法 Px 値は加齢の指標となり得ると思われた。但し70歳以上では血清 Px 値は低下傾向を示したが、これは血清脂質と加齢の関係¹⁴⁾による影響と思われた。

最後に血清 Px の測定方法に関しては最近いろいろ議論の多いところでもまだ一定の測定方法が確立される段階に至っていない。最近五島ら¹⁵⁾により血清 Px 値は室温放置時間、凍結操作等により影響されることが報告されている。私共の血清 Px 測定は入院患者に関しては早朝空腹時採血2時間室温放置後の分離血清を用い、集団検診の場合は遠方運搬のため凍結操作を加えた8日後の血清を用いた。私共が正常人7名を対象に行った2時間室温放置、8日間凍結による影響の検索を図19に示すが、両者ともわずかに低下を示す傾向にあったが有意ではなかった。即ち2時間室温放置後の血清でも8日間凍結後の血清でも測定した Px 値は充分もとの血清 Px 値を反映しているものと思われた。血清での比色法 Px と蛍光法 Px は有意の相関を示さなかったのに、腎組織抽出物の Px 値に関しては $r = 0.648$, $p < 0.001$ で比色法 Px

	採血直後 (n-mol/ml)	2時間室温 (n-mol/ml)	8日間凍結 (n-mol/ml)
1	1.02	1.01	0.98
2	1.04	1.03	1.02
3	1.10	1.06	1.11
4	0.97	0.98	0.96
5	1.02	1.02	1.01
6	0.95	0.95	0.97
7	1.12	1.08	1.08
m + S D	1.03±0.03	1.02±0.04	1.02±0.04

図19 Px 値の室温保存・凍結による影響

値と蛍光法 Px 値は明瞭な正の相関を認めた。これに対する考え方としてはまず組織抽出の際比色法に影響を与える因子例えばシアル酸¹⁰⁾等を除去できた可能性が考えられ、また組織には血清と異なりその様な因子が存在しないかもしれないこと。さらには組織蛍光法では H₂SO₄ とリンタングステン酸を用いた蛋白分離操作を行っていないため、蛍光法でも比色法に影響を与える因子を測定している可能性等が考えられるが、今後さらに検討が必要と思われる。

結 語

入院患者398名及び集団検診76名の血清 Px を比色法及び蛍光法の両法で測定し、血清脂質分画との関係及び加齢との関係を検討して次の結論を得た。

(1) 比色法 Px 値の $m \pm SD$ は入院患者で $13.08 \pm 2.45 \text{ nmol/ml}$ 、集団検診で $11.32 \pm 1.98 \text{ nmol/ml}$ を示し、症例数の多い入院患者では正規分布を示した。

(2) 比色法 Px 値は入院患者・集団検診とも70歳まで加齢と共に増加の傾向を示し、70歳以上では低下の傾向を示した。又集団検診の症例での蛍光法 Px 値と加齢との間にも同様の傾向を認めこの場合は有意であり、蛍光法 Px 値は加齢の指標となり得ると思われた。

(3) 入院患者に於て比色法 Px 値が $m \pm 2SD$ 以上の異常高値を示すものに胃癌、心筋硬塞、気管支喘息、脳血管障害、心不全、高血圧が含まれていたが、比較的重症の症例に頻度が高かった。

(4) 各脂質分画と比色法 Px 値の関係に関して、入院患者に於て NEFA, β リポ, β リポフラクシオンと Px 値の間には有意の正の相関を認めたが、症例数の少ない集団検診に於ては有意の関係は認められなかった。又集団検診について施行した蛍光法 Px 値に関しては症例が少なかつたにもかかわらず β リポとの間に有意の正の相関を認めた。

(5) 血清 VE と比色法 Px 値蛍光法 Px 値の間には有意の関係は認められなかった。

(6) 血清比色法 Px 値と蛍光法 Px 値は平行して増加する傾向を認めたが有意の相関はなかった。しかし腎組織 Px 値に関しては症例が少なかつたが、両者間には $r=0.648$, $p<0.001$ で有意の正の相関を認めた。このことは血清 Px 測定に際し、比色法ではシアル酸等 Px 以外の物質を非特異的に測定している可能性を示しており、蛍光法の方が血清 Px 値をよく反映していると考えられた。

本論文の要旨は第17回、第18回日本老年医学会総会で発表した。

文 献

- 1) Harman, D.: A theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol., **11**: 298, 1956.
- 2) Luzio, N.R.Di.: Antioxidants, lipid peroxidation and chemical-induced liver injury. Fed. Proc., **32**: 1875, 1973.
- 3) Kellogg, E.W. & Fredovich, I.: Superoxide dismutase in the rat and mouse as a function of age and longevity. J. Gerontol., **31**: 405, 1976.
- 4) 山崎晴一郎: 過酸化脂質. 臨床化学, **1**: 52, 1971.
- 5) Tappel, A.L. & Zalkin, H.: Inhibition of lipid peroxidation in mitochondria by vitamin E. Arch. Biochem. Biophys., **80**: 333, 1959.
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎: 血清トコフェロールの蛍光定量. 栄養と食糧, **23**: 277, 1975.
- 7) 内藤周幸他: 血清脂質異常に及ぼす α -tocopheryl nicotinate の効果についての二重盲検試験 (第1報) 一過酸化脂質と疾患ならびに症状との関係一. 医学のゆみ, **91**: 628, 1974.
- 8) 八木国夫: Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿又は血清中の過酸化脂質の微量定量法. ビタミン, **49**: 403, 1975.
- 9) Tudhope, G.R. & Hopkins, J.: Lipid peroxidation in human erythrocytes in tocopherol deficiency. Acta Haemat., **53**: 98, 1975.
- 10) Rywlin, A.M., et al.: Ceroid histiocytosis of spleen and bone marrow in idiopathic throm-

- bocytopenic purpura (ITP): A contribution to the understanding of the sea-blue histiocyte. Blood, **37**: 587, 1971.
- 11) 船迫真人他：日本白兔 CCl₄ 肝障害時の赤血球 malonyl-di-aldehyde と hexose monophosphate shunt に及ぼす抗酸化剤の効果について。肝臓, **16**: 135, 1975.
 - 12) 船迫真人他：慢性肝疾患における赤血球膜 Malonyl-di-aldehyde と溶血の関係について。臨床血液, **16**: 614, 1975.
 - 13) Dahle, L.K.: The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methylesters. Arch. Biochem. Biophys., **98**: 253, 1962.
 - 14) Schaefer, L.E.: Serum cholesterol-triglyceride distribution in a "normal" New York City population. Am. J. Med., **36**: 262, 268, 1964.
 - 15) 五島雄一郎他：凍結及び室温放置の過酸化脂質測定に及ぼす影響。過酸化脂質研究会, 昭和51年8月29日於東京ヒルトンホテル.
 - 16) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chemis., **234**: 1971, 1959.

Abstract

Aging and leiperoxide —Investigation by spectrophotometry and fluorometry

Masato Funasako, Asami Uezu, Yukiharu Okamoto, Yoshiyuki Sakagami, Kozo Tanimoto, Kiichiro Ohta, Masahiro Ohata and Takuo Fujita

Since Harman proposed the free radical theory of aging, this theory receives an attention widespread and numerous reports on lipoperoxide (Px), the product of free radical, appears. In order to study the clinical significance of these changes, we measured Px, lipid fraction and vitamin E (VE) in human serum with reference to age in 398 patients admitted to the Department of Medicine, Wakayama Medical College Hospital and Fuchu Hospital in Osaka and 76 healthy working subjects examined on a mass healthy survey.

Methods of Px measure are modified TBA spectrometry by Naito (Px spectro) and modified TBA fluorometry by Yagi (Px fluoro). By spectrometry, serum Px in hospital patients was 13.0 ± 2.45 n mole/ml, significantly higher than 11.32 ± 1.92 n mole/ml in healthy subjects.

Prior to the age of 70, serum Px value tended to

increase with age, while it tended to fall after this age. Such tendency was most clearly seen in Px fluoro in healthy working subjects.

Cases with abnormally high values of Px spectro (above $m+2SD$) included those of gastric cancer, myocardial infarction and heart failure, especially those under serious conditions. Concerning the relationship between lipid fraction and Px value, a positive correlation was found between Px spectro on one hand, and β -lipo, β -lipoprotein fraction and NEFA on the other in 398 hospital patients. A positive correlation was also found between Px fluoro and β -lipo in 76 healthy working subjects.

No correlation was found between serum VE and Px, suggesting the presence of antioxidants other than VE in blood. Serum Px spectro was 10 times as high as Px fluoro and no correlation was found between two, suggesting that spectrometry also measures some non Px material such as sialic acid in serum.

Division of Gerontology, Department of Medicine, Wakayama Medical College