制限給餌ラットにおける過酸化脂質の加齢変化： 高速液体クロマトグラフィーポストカラム蛍光法による血漿，肝臓，腎臓中の ホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの定量

水谷 洋子¹⁾²⁾ 伊藤 美武²⁾³⁾

〈要 約〉 食餌制限による寿命延長効果は，すでに実験的に多くの動物種で明らかにされているが，その作用機序は未だ明らかとなっておらず，生理的機能低下の抑制や病変発生の抑制と遅延，酸化的ストレスによる障害の軽減作用などさまざまな報告がある。

本報告では加齢と食餌制限について，酸化的ストレスの関与を明らかにするため，ドンリュウ系雄ラットを用いて，自由摂取群と食餌制限下（給餌量を自由摂取群摂取量の60％に制限）で飼育した制限群の2群について，3～4, 6, 12, 18カ月齢時の血漿，肝臓，腎臓における過酸化脂質の変化を比較検討した。

過酸化脂質の指標として，脂質の酸化反応第一生成物ヒドロペルオキシドに高い選択性を示す蛍光試薬ジフェニル-1-ピレニルホスフィンを用いて，高速液体クロマトグラフィーポストカラム蛍光法により，ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド（PCOOH）を測定した。その結果，従来より汎用されているチオバルビツール酸法による結果と比較して特異的且つ高感度に，加齢に伴う過酸化脂質の変化および食餌制限による過酸化脂質への影響を観察することができ，以下の結果が得られた。1) 血漿，腎臓，肝臓において加齢に伴い PCOOH は増加した。2) 食餌制限により加齢に伴う PCOOH の上昇は，血漿では顕著に抑制され，肝臓においては抑制の傾向が認められ，腎臓においては顕著な影響は認められなかった。

これらの結果から，加齢に伴い PCOOH は増加し，この増加は食餌制限によって抑制される傾向にあることが明らかとなった。また，この抑制作用は臓器によって異なり，血漿では著しく抑制されることも判明した。以上から，加齢に伴う PCOOH の増加は生体膜の障害を引き起こし，それが疾病の発症へ導く要因の一つとなり，さらに寿命短縮につながるのではないかと考えられた。また，加齢に伴う PCOOH の増加が食餌制限により抑制傾向にあることから，これが加齢に伴う疾病の発生を抑制するものと推測された。

Key words：加齢，食餌制限，過酸化脂質，ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド

（日老医誌 2003；40：620—626）

緒 言

老化のメカニズムは，遺伝的にプログラムされているという説と環境要因による外的ストレス説の二つの説に大別できる。環境要因はいくつか挙げられるが，その中で寿命延長要因として食餌制限¹⁾，寿命短縮要因として酸化的ストレスが知られている²⁾。食餌制限による寿命延長は，加齢に伴う様々な生理機能低下の抑制と病変発生の抑制あるいは遅延に関与すると言われている³⁾。また，食餌制限は生体内に生ずる酸化的ストレス（ミトコンドリア DNA を始めタンパク質，脂質などの酸化障害）を抑制して寿命延長につながるのではないかという仮説がある²⁾⁴⁾。

酸化的ストレスの指標は様々な方法で測定されているが，最近ではフリーラジカルを捉える測定として電子スピン共鳴 (ESR) 法や，フリーラジカルや活性酸素によって生じた過酸化反応生成物を測定するチオバルビツール酸 (TBA) 法がよく用いられている。生体内の脂質を構成する脂肪酸は，過酸化反応により反応第一生成物ヒドロペルオキシドを生じ，これが更に分解してマロンジアルデヒド (MDA) などのカルボニル化合物となる。TBA 法は TBA による反応生成物であるチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) を測定する方法で，脂質ヒドロペルオキシド（測定中にアルデヒドになる），MDA や他のアルデヒド類，及びアルデヒドとタンパク質などの反応物を非特異的に捉える測定法である。このように TBA 法は脂質過酸化の一つの指標にはなるが，特異性，選択性の点で問題があり，過酸化脂質そのものを測定する方法ではないという点でその評価には慎重を要した。Akasaka ら⁵⁾は過酸化反応の第一生成物である

1) Y. Mizutani：愛知医科大学医学部法医学教室

2) Y. Mizutani, Y. Ito：同 加齢医科学研究所

3) Y. Ito：同 動物実験センター

受付日：2003. 3. 10, 採用日：2003. 6. 3

ヒドロペルオキシドに非常に高い選択性を持つ蛍光試薬 diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ポストカラム蛍光法を開発し、この方法により脂質ヒドロペルオキシドを脂質クラスレベルで分離、検出、定量することが可能となった。我々はこの方法を用いて脂質ヒドロペルオキシド、特に生体膜成分のリン脂質中大部分を占めているホスファチジルコリン (PC) の第一過酸化化物であるホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) の血漿、肝臓、腎臓からの検出、定量法を設定した⁶⁾。TBARS はさまざまな反応生成物を含むのに対し、PCOOH はホスファチジルコリンの過酸化化物として特定して捉えることができる。本研究では HPLC ポストカラム蛍光法を用いて制限給餌ラットの血漿、肝臓組織、腎臓組織中 PCOOH 量を測定し、食餌制限による過酸化脂質の加齢変化について検討を試みた。

方 法

1. 実験動物

実験にはドンリユウ系・雄性ラット (日本エスエルシー, 静岡) を使用し、3 週齢より specific pathogen free (SPF) 環境下で個別に飼育した。実験群は自由摂取群と制限群の 2 群とし、自由摂取群は制限群より 1 週間前から実験を開始した。先行して開始した自由摂取群の 1 週間毎の摂取量から一日平均摂取量を計算し、その 60% 量を同年齢の制限群ラットの給餌量とした。給餌飼料は蛋白源として大豆、とうもろこし、小麦を主体とした植物性蛋白のみを含有し、制限群では制限に応じてビタミン、ミネラル含有を増量した特注飼料 Open18 (オリエンタル酵母工業社より供与)³⁾ を毎日午前 10 時に計量、給餌した。

2. 過酸化脂質の定量

1) 試料の採取と調整

自由摂取、制限両群において各々 3~4, 6, 12, 18 カ月齢のラット (各 5 匹) をエーテル麻酔下で開腹後、腹部大動脈より採血 (抗凝固剤として 1/10 量 3.8% クエン酸ナトリウムを添加) し、30 分以内に 4℃, 3,500rpm, 15 分間の遠心分離を施して血漿を採取し、すみやかに PCOOH 及び TBARS を測定した。

肝臓、腎臓は採取後、液体窒素下で瞬時に凍結し、-80℃ で保存した。いずれの試料も採取後 2 週間以内に以下の調製を施し PCOOH 及び TBARS を測定した。すなわち、氷冷下で 1.15% KCl にて 20% 濃度のホモジネートを作成し、4℃, 2,400 rpm, 10 分遠心後、その上清について分析を行った。ホモジネート上清のタンパ

Fig. 1 HPLC system diagram for the assay of PCOOH

A: mobile phase; B: reagent solution; P1: pump 1; I: injector; C: column; U: UV/Vis detector; J: joint; P2: pump 2; O: reaction oven; W: water jacket; F: fluorometer; R: recorder

ク定量は Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA) を用いて行った。

2) HPLC-ポストカラム法⁵⁾による PCOOH の測定

血漿あるいはホモジネート上清 0.5ml にメタノール 0.5ml 及びジクロロメタン (抗酸化剤としてブチルヒドロキソトルエン 0.5g/l を含む) 2.0ml, 内部標準物質 (IS) として 1-hexadecanoyl-2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) aminohexanoyl]-sn-glycero-3-phospholine (1.0 mg/ml) のクロロホルム溶液 10μl を加え、激しく振とう後、4℃, 3,000rpm で 5 分間遠心分離を行い、下層のジクロロメタン層をバイアル瓶に移した。上層の水層に更に 2.0ml のジクロロメタンを加えて抽出を繰り返し、得られたジクロロメタン層を同じバイアル瓶に集めて N₂ 気流下で乾燥し、96μl のクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) に溶解し、その 40μl を HPLC に供した。

HPLC ポストカラムシステムの概要を Fig. 1 に示す。分離カラムはシリカゲルカラム YMC-pack SIL (長さ 150mm, 内径 4.6mm, 粒径 5μm) (ワイエムシー, 京都) を使用し、HPLC ポンプは UP-980 型インテリジェント HPLC ポンプ (日本分光, 東京) を移動相と蛍光試薬 DPPP (和光純薬, 大阪) 反応液の送液に使用した。移動相はクロロホルム/1-ブタノール/メタノール/水 (50: 50: 200: 15, v/v/v/v) 315ml にベースライン安定のためパルミチン酸 150mg を添加し、流速は 0.6ml/min に設定した。反応液は DPPP 3mg をアセトン/メタノール (1:3, v/v) 400ml に溶解し、流速 0.3ml/min で送液した。ポストカラム反応はステンレス製コイル (長さ 20 m, 内径 0.5mm) 内で行い、カラムヒーター (Waters, Milford, MA, USA) を用いて反応槽を 70℃ に保温し

Fig. 2 HPLC chromatograms of PCOOH in lipid extracts from 3-month-old rat plasma, kidney and liver
Left: Chromatograms of PCOOH monitored by fluorometry.
Right: Chromatograms of IS monitored by UV 475 nm.

た. 検出器は UVIDEC-100V 紫外・可視検出器 (日本分光, 東京) (475nm) を IS の検出に, RF-535HPLC 蛍光検出器 (島津, 京都) (Ex. 352nm, Em. 380nm) を PCOOH の検出にそれぞれ使用した. 標準物質として用いた PCOOH は Akasaka らの方法⁷⁾に従い調製し, クロロホルム/メタノール (1:1, v/v) 溶液として -80°C で保存し, 用時希釈して用いた. PCOOH の濃度は DPPH を用いた蛍光法⁷⁾により求めた.

3) TBA 法による TBARS の測定

血漿中の過酸化反応生成物 TBARS は Yagi ら⁸⁾による TBA 蛍光法にて測定した.

組織中の TBARS は Ohkawa らの方法⁹⁾に従い比色法にて測定した. すなわち, ネジ蓋付きの試験管にホモジ

Fig. 3 The effects of age and dietary restriction on PCOOH levels in plasma

Closed circle and triangle represent the PCOOH levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

ネート上清 0.2ml を入れ, 8.1% SDS 0.2ml, 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 試薬 1.5ml を加え, 沸騰水浴中で 60 分間加温した. 水道水で冷却後, 蒸留水 1.0ml を加え, さらに n-ブタノール/ピリジン混液 (15:1, v/v) 5.0ml を加えて 15 秒間振とうし, 4,000rpm, 10 分間の遠心後, ブタノール層を採取して 535nm における吸光度を測定した.

4) 測定値の解析

TBARS の測定値は 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane 標準液を対照として計算を行った. また, PCOOH は IS との比を計算して定量した. 各群の例数は 5 匹で, 測定結果は平均値 $\pm$ 標準偏差とし, 有意差の検定は分散分析 (ANOVA) により解析した.

結 果

1. PCOOH の検出および定量

Fig. 2 に, 3 カ月齢ラットの血漿, 腎ホモジネート上清, 肝ホモジネート上清より抽出して得られた試料のクロマトグラムを示す. 左は蛍光検出器でモニターした PCOOH を示し, 右はポストカラム反応前に UV 475nm でモニターした IS を示す.

2. 血漿中の過酸化脂質

1) 加齢に伴う血漿中 PCOOH の変化を Fig. 3 に示す. 自由摂取群では, 測定を開始した 3 カ月齢 (46.1 ± 17.4 pmol/ml) に比較して 12 カ月齢では 89.3 ± 7.07 pmol/ml, 18 カ月齢では 125.7 ± 34.7 pmol/ml と PCOOH は有意に上昇した. 一方, 制限群では 3 カ月齢 (36.6 ± 8.5 pmol/

Fig. 4 The effects of age and dietary restriction on TBARS levels in plasma

Closed circle and triangle represent the TBARS levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

ml), 12 カ月齢 (51.6 ± 10.4 pmol/ml), 18 カ月齢 (42.4 ± 19.9 pmol/ml) と, 加齢に伴う PCOOH の顕著な変化は認められなかった. また, 自由摂取群と制限群を比較すると, 12 カ月齢, 18 カ月齢で制限群の PCOOH が有意に抑制された.

2) 血漿中 TBARS の変化を Fig. 4 に示す. 自由摂取群では 4 カ月齢 (2.36 ± 0.39 nmol/ml) に比較して 6 カ月齢では 3.22 ± 0.33 nmol/ml, 18 カ月齢では 3.98 ± 0.75 nmol/ml と TBARS は加齢に伴い有意に増加した. 一方, 制限群は 4 カ月齢 (2.08 ± 0.29 nmol/ml) から 12 カ月齢まで上昇は観察されず, 18 カ月齢 (2.68 ± 0.38 nmol/ml) では有意に増加した. 自由摂取群と制限群を比較すると, 12 カ月齢と 18 カ月齢で制限群の血漿中 TBARS は抑制された. 4 カ月齢, 6 カ月齢では群間に有意差は認められなかったものの, 自由摂取群の TBARS は制限群に比較し一様に低い値で推移した.

3. 肝臓中の過酸化脂質

1) 加齢に伴う肝臓中 PCOOH の変化を Fig. 5 に示す. 自由摂取群では, 3 カ月齢 (7.47 ± 1.22 pmol/mg protein) に比較して 12 カ月齢では 12.84 ± 3.00 pmol/mg protein, 18 カ月齢では 16.65 ± 5.83 pmol/mg protein と加齢に伴い PCOOH の有意な増加が観察された. 制限群でも 3 カ月齢 (6.16 ± 1.26 pmol/mg protein) に比較して 12 カ月齢では 8.92 ± 1.82 pmol/mg protein, 18 カ月齢では 15.49 ± 3.03 pmol/mg protein と PCOOH は加齢に伴い有意に上昇した. 群間の比較では有意差は認められなかつ

Fig. 5 The effects of age and dietary restriction on PCOOH levels in liver

Closed circle and triangle represent the PCOOH levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: *** $P < 0.001$, * $P < 0.01$

Fig. 6 The effects of age and dietary restriction on TBARS levels in liver

Closed circle and triangle represent the TBARS levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

たが, 自由摂取群に比較し制限群の PCOOH は低値で推移した.

2) 肝臓中の TBARS の加齢変化を Fig. 6 に示す. 自由摂取群では TBARS は 3 カ月齢 (0.506 ± 0.049 nmol/mg protein) に比較し 6 カ月齢では 0.562 ± 0.016 nmol/mg protein, 12 カ月齢では 0.725 ± 0.098 nmol/mg protein と徐々に上昇したが, 18 カ月では 0.584 ± 0.027 nmol/mg

Fig. 7 The effects of age and dietary restriction on PCOOH levels in kidney

Closed circle and triangle represent the PCOOH levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

protein と上昇はみられなかった。制限群においては、3 カ月齢 ($0.473 \pm 0.026 \text{ nmol/mg protein}$) に比較し、12 カ月齢 $0.633 \pm 0.035 \text{ nmol/mg protein}$, 18 カ月齢 $0.617 \pm 0.027 \text{ nmol/mg protein}$ と加齢に伴う有意な上昇が観察された。自由摂取群と制限群を比較すると、制限群の TBARS の上昇は自由摂取群に比較して低値で推移し、6 カ月齢では自由摂取群に比し有意な抑制が認められた。

4. 腎臓中の過酸化脂質

1) 腎臓中の PCOOH の加齢変化を Fig. 7 に示す。自由摂取群では 3 カ月齢 ($3.92 \pm 1.29 \text{ pmol/mg protein}$) に比較し、12 カ月齢では $6.13 \pm 0.63 \text{ pmol/mg protein}$, 18 カ月齢では $11.57 \pm 2.35 \text{ pmol/mg protein}$ と PCOOH の有意な増加が観察された。制限群では、自由摂取群と同様 PCOOH の加齢に伴う有意な上昇が観察された。群間の比較では、12 カ月齢までは両群の間に差は認められなかったが、18 カ月齢では有意差は認められないものの自由摂取群の PCOOH は制限群に比較し高い傾向を示した。

2) 腎臓中の TBARS の加齢変化を Fig. 8 に示す。自由摂取群では、12 カ月齢では $0.947 \pm 0.057 \text{ nmol/mg protein}$, 18 カ月齢では 12 カ月齢より若干低いものの $0.769 \pm 0.041 \text{ nmol/mg protein}$ と 3 カ月齢 ($0.709 \pm 0.018 \text{ nmol/mg protein}$) に比較して TBARS の有意な上昇が認められた。制限群の TBARS は自由摂取群よりも低値で推移したが、自由摂取群との顕著な差異は認められな

Fig. 8 The effects of age and dietary restriction on TBARS levels in kidney

Closed circle and triangle represent the TBARS levels for *ad libitum* (AL) and dietary restricted (DR) rats, respectively. Each datum is the mean $\pm$ SD of five samples.

Levels of statistical significance: *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$

かった。

考 察

脂質過酸化と老化の関連については多数の報告がある¹⁰⁻¹²⁾。消去系酵素スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の活性と動物の寿命の長さとの間には密接な相関関係があると言われている¹⁰⁾。一方、ショウジョウバエを用いた実験では、抗酸化酵素の欠損は寿命を短縮するが高 SOD 活性では寿命に影響を与えないという報告もある¹¹⁾。このように老化に対する抗酸化防御システムは明確にはされていない部分もあるものの、これらの消去系酵素に関する報告から酸化的ストレスは寿命の短縮に関与しているとの見方が多い^{10,12)}。また、過酸化脂質の加齢変化については TBARS の測定に基づく研究が多く、TBARS は加齢に伴って上昇するという報告¹²⁾もあるが TBARS は相関しないという報告¹³⁾もあり、一定の結果が得られていない。

食餌制限と寿命の関連に対しては、食餌制限により寿命が延長することが実験的に多くの動物種で確認されているが¹⁾、その効果の作用機序は未だ明らかとなっておらず、生理的機能低下の抑制や病変発生の抑制と遅延³⁾、酸化的ストレスによる障害の軽減作用などさまざまな報告がある^{7,8)}。食餌制限が生体内脂質過酸化の亢進を抑制するという報告は多いが^{13,15)}、これまでの研究では脂質過酸化の指標として MDA 等を含む TBARS で論じられているものがほとんどである¹³⁾。Cook ら¹⁶⁾は TBA 法を用いて、加齢に伴う MDA の変化を腎臓、肝臓、脳につ

いて食餌制限の影響も加えて観察している。それによれば加齢に伴い MDA は腎臓、肝臓、脳中でいずれも増加し、肝臓と脳については食餌制限によって6カ月で MDA は抑制され、また腎臓については12カ月においても食餌制限の影響を受けないが、その後も食餌制限を続けることにより MDA の抑制が観察されたと報告している。

本研究においても TBARS が加齢に伴い上昇する傾向が観察されたが、脂質過酸化の情報はその発生部位、脂質の種類とその程度が重要となってくる。TBA は MDA 以外の物質、すなわち脂質ヒドロペルオキシド、他のアルデヒド、およびアルデヒドとタンパク質などとの反応物と反応することが知られており、TBARS はこれらをまとめて測定する方法で、過酸化脂質すなわち脂質ヒドロペルオキシドを直接測定する方法ではない。このように TBARS は脂質過酸化の加齢変化をある程度は捉えることが出来るが特異性に欠ける。一方 PCOOH の測定は、生体膜の成分であり重要な生理機能を持つホスファチジルコリンが過酸化され確実にヒドロペルオキシド化されたことを確認できる。脂質ペルオキシドの測定については、HPLC を用いた種々の方法¹⁷⁾¹⁸⁾が報告されているが、前述のように蛍光試薬 DPPH を用いて HPLC-ポストカラム法により直接脂質ヒドロペルオキシドの定量が可能となった⁵⁾。

PCOOH の加齢との関係について、Miyazawa ら¹⁸⁾は HPLC-化学発光検出法でラットの PCOOH を測定し、肝臓、脳では加齢とともに増加し、心臓、肺については加齢変化が認められなかったと報告している。

本研究では制限給餌ラットの血漿、肝臓、腎臓中 PCOOH の定量を蛍光検出法にて行ったが、その結果、血漿中 PCOOH は月齢間、群間に有意な変化が観察され、加齢に伴う血漿中 PCOOH の増加は食餌制限によって顕著に抑制された。肝臓中 PCOOH は自由摂取、制限両群とも加齢に伴い増加したが、食餌制限により PCOOH の増加は抑制される傾向にあった。腎臓中 PCOOH 量は、両群とも加齢に伴い増加したが、食餌制限による顕著な抑制は観察されず、18 カ月齢での若干の抑制が観察された程度であった。このように、血漿、肝臓、腎臓の過酸化脂質は加齢に伴い増加し、食餌制限によって血漿中過酸化脂質の増加は顕著に抑制された。TBA 法による TBARS の変化は PCOOH の変化と同様の傾向を示したが、PCOOH の変化は加齢、食餌制限と酸化ストレスの関連をより正確に反映しているものと考えられた。食餌制限による各種臓器への影響については、加齢に伴う病変の発現に対して食餌制限が抑制的に影響

するという報告があり、病変や臓器の種類によってその影響が異なると言われている³⁾。食餌制限による過酸化脂質の加齢に伴う増加に対する抑制作用についても同様で、臓器によってその作用は異なっていると考えられた。

過酸化脂質はさまざまな疾患と密接に関与し、その原因になると考えられている¹⁹⁾。生体内で何らかの反応によって発生する活性酸素やフリーラジカルは、脂質、核酸、蛋白質などを障害するが、特に細胞膜にある多価飽和脂肪酸を攻撃して過酸化脂質が生成されることになり、これが生体膜障害の原因になる。この膜障害は膜流動性に大きく関与しており、各種疾患の原因の一つと考えられている²⁰⁾。加齢に伴う PCOOH の上昇は、生体膜の障害を引き起こし、さまざまな病変を生むのではないかと考えられる。

ドンリュウ系・雄性ラットについては、自然発生性病変の発現様相と寿命曲線など基礎データは既に報告があり³⁾、加齢とともに高頻度に慢性腎症が発症することが観察されている。本研究では加齢に伴う腎組織内 PCOOH の増加が認められたが、これは慢性腎症の発症に繋がるものと推測される。また、食餌制限により慢性腎症の出現が抑制されたとの報告があるが³⁾、本研究での腎臓中 PCOOH が18 カ月齢で抑制傾向を示したという結果が慢性腎症の出現の抑制とどのように関連するかについては、更に検討が必要である。

結 語

本報告で、脂質の酸化第一生成物であるヒドロペルオキシドに特異的且つ選択的な分析方法を用いて PCOOH を測定した結果、加齢に伴い PCOOH は増加し、この増加は食餌制限によって抑制される傾向にあることが明らかとなった。PCOOH の増加は生体膜の障害を引き起こし、寿命短縮に繋がる疾病の発症や病的状態へと導く要因の一つであり、また食餌制限による PCOOH の抑制傾向は、加齢に伴う病変の発生に対して抑制的に働くものと推測された。

謝辞：本研究において、ご指導、ご校閲を頂きました愛知医科大学加齢医科学研究所佐藤秩子前教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Masoro EJ: Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. J Gerontol 1988;43: B59—B64.
- 2) 松尾光芳: 栄養制限による酸化的ストレスの抑制。老化と環境因子(松尾光芳編), 学会出版センター, 東京, 1994, p97—109.

- 3) 伊藤美武, 佐藤秩子, 田内 久: 制限給餌ラットにおける主要病変の発現様相と寿命への影響. 日老医誌 2000; 37: 382—387.
- 4) Sagai M, Ichinose T: Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane and pentane in respired gases of rats. Life Sci 1980; 27: 731—738.
- 5) 赤坂和昭, 森宗孝介, 大類 洋, 目黒 熙, 太田 実: 高速液体クロマトグラフィーポストカラム法による血しょう及び血清中のホスファチジルコリンヒドロペルオキシドの定量. 分析化学 1993; 42: 27—31.
- 6) 水谷洋子, 妹尾 洋: 塩化第二水銀による腎障害と脂質過酸化: 高速液体クロマトグラフィーポストカラム法による腎組織内過酸化脂質定量の試み. 法中毒 2001; 19: 243—250.
- 7) Akasaka K, Sasaki I, Ohru H, Meguro H: A simple fluorometry of hydroperoxides in oils and foods. Biosci Biotech Biochem 1992; 56: 605—607.
- 8) Yagi K: A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem Med 1976; 15: 212—216.
- 9) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95: 351—358.
- 10) Tolmasoff JM, Ono T, Cutler RG: Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 2777—2781.
- 11) Reveillaud I, Niedzwiecki A, Bensch KG, Fleming JE: Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance to oxidative stress. Mol Cell Biol 1991; 11: 632—640.
- 12) Phillips JP, Cambell SD, Michaud D, Charbonneau M, Hilliker AJ: Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2761—2765.
- 13) Langanieri S, Yu BP: Anti-lipoperoxidation action of food restriction. Biochem Biophys Res Commun 1987; 145: 1185—1191.
- 14) Mooradian AD, Lung CC, Shah G, Mahmoud S, Pinnas JL: Age-related changes in tissue content of malondialdehyde-modified proteins. Life Sci 1994; 55: 1561—1566.
- 15) Enesco HE, Kruk P: Dietary restriction reduces fluorescent age pigment accumulation in mice. Exp Gerontol 1981; 16: 357—361.
- 16) Cook CI, Yu BP: Iron accumulation in aging: modulation by dietary restriction. Mech Ageing Dev 1998; 102: 1—13.
- 17) Yamamoto Y, Brodsky MH, Baker JC, Ames BN: Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 1987; 160: 7—13.
- 18) Miyazawa T, Suzuki T, Fujimoto K: Age-dependent accumulation of phosphatidylcholine hydroperoxide in the brain and liver of the rat. Lipids 1993; 28: 789—793.
- 19) Yagi K: Lipid peroxides and human diseases. Chem Phys Lipids 1987; 45: 337—351.
- 20) 吉川敏一, 内藤裕二, 近藤元治: 活性酸素種による生体の障害. 化学総説 1990; 7: 163—175.

Abstract

Age-related changes of lipid peroxidation in food-restricted rats based on determination of phosphatidylcholine hydroperoxide in the plasma, liver and kidney by high-performance liquid chromatography with fluorometric post-column detection

Yoko Mizutani¹⁾²⁾ and Yoshitake Ito²⁾³⁾

Age-related changes of phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) were investigated in male Dawley rats aged 3 to 18 months, either fed *ad libitum* or dietary restricted (maintained on 60% of *ad libitum* food intake). Although there are many reports dealing with age-related changes of lipid peroxidation, they were exclusively results obtained by the non-specific thiobarbituric acid method. In this study, we measured PCOOH as an index of oxidative stress by a specific assay method using high-performance liquid chromatography with fluorometric post-column detection.

The PCOOH levels in *ad libitum*-fed rat plasma, liver and kidney increased with age. Dietary restriction significantly suppressed the age-related PCOOH accumulation in the plasma. In dietary restricted rat liver, PCOOH levels tended to be suppressed by the restriction. In dietary restricted rat kidney, they were not due to until 12 months of age, but the levels at 18-months of age were suppressed by the restriction.

Life span is mainly influenced by pathologic lesions. The increase in PCOOH levels with age can cause biomembrane damage, and appears to be involved in the development of lesions. Suppression of PCOOH level by dietary restriction appears to suppress the morbid conditions which shorten life span.

Key words: Aging, Dietary restriction, Lipid peroxidation, Phosphatidylcholine hydroperoxide
(Jpn J Geriat 2003; 40: 620—626)

1) Department of Legal Medicine, Aichi Medical University School of Medicine

2) Institute for Medical Science of Aging, Aichi Medical University

3) Laboratory Animal Research Center, Aichi Medical University