鉄欠乏性貧血ラットの肝細胞画分中ミネラル含有量に 及ぼすエタノール摂取の影響

(平成3年3月4日受理)

広末トシ子* 細貝祐太郎*

Effect of Iron Deficiency and/or Ethanol Administration on the Content of Minerals in Subcellular Fractions of Rat Liver

Toshiko HIROSUE and Yutaro HOSOGAI

(Laboratory of Food Hygiene, Kagawa Nutrition College: 3-9-21, Chiyoda, Sakado-shi, Saitama, Japan)

Wistar-strain female rats (about 40 g b.w.) were fed a normal or an iron-deficient diet for 8 weeks, and 10% ethanol (v/v) was simultaneously given as drinking water for the last 4 weeks.

The iron-deficient diet decreased Fe level and increased Cu level in all subcellular fractions of the liver. In addition, the iron-deficient diet decreased Zn level in microsomal and cytosolic fractions.

The ingestion of ethanol under conditions of iron-adequacy resulted in a decrease of Cu, Zn and Se levels in the nuclear fraction, Mn level in nuclear and mitochondrial fractions, and Mg level in nuclear and cytosolic fractions.

The ingestion of ethanol under iron-deficiency resulted in a decrease of Fe and Mn levels in the nuclear fraction, and an increase of Mn level in the microsomal and cytosolic fractions, and Mg and P levels in the microsomal fraction.

These observations suggest that chronic alcohol ingestion could accelerate the biological effects of iron-deficiency anemia induced by Fe-deficient diet through the further decrease of Fe content in the nuclear fraction, and increase of Mn content in the cytosolic fraction.

(Received March 4, 1991)

Key words: 貧血 anemia; 鉄欠乏 Fe-deficiency; エタノール ethanol; ミネラル mineral; 細胞画分 subcellular fraction; ラット rat

はじめに

若い女性の健康に及ぼす貧血と飲酒の影響について検討するため、前報¹⁾では貧血ラットにアルコールを投与し、各種臓器のミネラル含有量の変動について検討した。その結果、貧血で減少した肝臓と肺の鉄含有量をアルコールが更に減少させることを認め報告した。

肝臓など臓器中に存在するミネラルは細胞内小器官において特異的なタンパクと結合もしくは共同して特有の生物作用を発揮するとされている^{2), 3)}。しかし、細胞内小器官に含まれるミネラルに関しては、正常動物における

それらの分布状態や飼料組成による小器官中ミネラルの変化などについての報告は多数知られているが^{4)~9)}、各種臓器中のミネラル含有量の場合と同様、貧血下でのエタノール摂取を想定して検討した報告は認められない。

そこで、本研究においては、前報¹⁾の実験を更に発展させ、ラット肝臓の細胞内小器官におけるFe, Cu, Zn, Mn, Mg, Ca, P 及びSeなどのミネラル含有量が貧血とアルコールの投与の単独もしくは組合せによってどのような影響を受けるかを検討した。

実験方法

1. 実験動物及び飼育条件

体重約40gのWistar系雌ラット((株)日本クレア)49匹を用いて、標準固形飼料(オリエンタルMF)で7

* 女子栄養大学食品衛生学研究室: 埼玉県坂戸市千代田3-9-21

日間予備飼育後, 無作為に2群に分け, 正常食またはFe欠乏食で4週間飼育後, 両群を各々2群に分け, 一方には飲料水として10%エタノール溶液を, 他の一方にはエタノールの熱量に相当する量の15%グルコース溶液と飲料水(蒸留水)を自由摂取させ, さらに4週間飼育を続けた。また飼料はpair feedした。

所定飼育期間終了後, エーテル麻酔下で脱血死させ, 生理食塩水で灌流後, 肝臓を摘出, 直ちに -40° で冷凍保存した。

2. 飼料組成

前報¹⁾と同様で, 調製した飼料のFe含有量は, 正常食42.6, Fe欠乏食5.3 μ g/gであった。

3. 細胞内小器官の調製^{10), 11)}

細切したラット肝臓に, 0.25Mショ糖液(pH7.4)を5倍量加え, テフロン製ホモジナイザーでホモジナイズし, そのホモジネートを常法^{10), 11)}に従い分画した。すなわち, 600 $\times$ g, 10分間の遠心で得られた沈でん物を核を含む画分(核)とした。この際得られた上清をさらに12,000 $\times$ g, 15分間遠心して得られた沈でん物を, ミトコンドリア画分(ミトコンドリア)とし, その上清の105,000 $\times$ g, 90分間超遠心分離して得られた沈でん物をミクロソーム画分(ミクロソーム), 上清をサイトゾール画分(サイトゾール)とした。

4. 肝臓内小器官のミネラル含有量の測定

各画分を, 硝酸-過塩素酸により湿式灰化後, 前報¹⁾に従いFe, Cu, Zn, Mn, Mg及びCaは原子吸光分光光度計, Pはモリブデンブルー法, Seはジアミノナフタレン法によりそれぞれ測定した。

実験結果

1. 体重, 肝重量及び血液ヘモグロビン(Hb)とヘマトクリット(Ht)値

体重は, 4週間で各群に差異は認められなかったが, 8週目でpair feedしたにもかかわらず正常食投与群(エタノール非投与群(N群))205.7 $\pm$ 7.7 g, エタノール投与群(NE群)204.0 $\pm$ 11.4 g)に比べ, Fe欠乏食投与群(エタノール非投与群(D群))193.6 $\pm$ 8.4 g, エタノール投与群(DE群)193.0 $\pm$ 7.4 g)は低下した。

Hb及びHt値は, 各々N群13.0 $\pm$ 1.0 g/100 ml, 39.2 $\pm$ 3.3%, NE群14.0 $\pm$ 1.5 g/100 ml, 41.2 $\pm$ 2.3%, D群8.0 $\pm$ 0.6 g/100 ml, 27.3 $\pm$ 1.0%, DE群8.4 $\pm$ 1.2 g/100 ml, 28.7 $\pm$ 1.4%であり, Fe欠乏食により明らかに低値を示しFe欠乏性貧血をきたしていることが認められた。

2. 肝臓内小器官のミネラル含有量

(1) Feの含有量及び分布割合

各小器官のFe含有量及び分布割合をTable 1に示す。

各画分のFe含有量は, エタノール投与の有無にかかわらずいずれの画分でもFe欠乏食単独によって著しく低い値($p<0.01$)を示し, 特に, ミクロソームとサイトゾールでの減少が顕著であった。一方, エタノール投与の影響は, Fe欠乏食下の核で減少($p<0.05$)が認められた以外は, 他の画分では正常食, Fe欠乏食の両給餌下とも変化は認められなかった。

各画分間の分布割合は, エタノール投与の有無にかかわらずFe含有量(絶対量)が減少したFe欠乏食群にお

Table 1. Content and Distribution of Iron in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
	Absolute (μ g/g)			
Nuclei and debris	62.28 $\pm$ 19.28	55.17 $\pm$ 11.83	8.02 $\pm$ 1.73 ^b	6.33 $\pm$ 0.93 ^{b, e}
Mitochondria	37.43 $\pm$ 7.49	34.06 $\pm$ 6.61	5.63 $\pm$ 1.46 ^b	5.04 $\pm$ 1.17 ^b
Microsome	157.03 $\pm$ 24.5	159.50 $\pm$ 23.40	4.76 $\pm$ 1.74 ^b	4.88 $\pm$ 0.73 ^b
Cytosol	106.05 $\pm$ 10.23	103.24 $\pm$ 14.05	6.24 $\pm$ 0.92 ^b	6.54 $\pm$ 1.39 ^b
	Relative (%)			
Nuclei and debris	17.0 $\pm$ 4.0	15.7 $\pm$ 3.1	32.7 $\pm$ 5.2 ^b	27.8 $\pm$ 3.9 ^{b, e}
Mitochondria	10.3 $\pm$ 1.9	10.6 $\pm$ 3.3	22.7 $\pm$ 3.6 ^b	22.2 $\pm$ 5.3 ^b
Microsome	43.2 $\pm$ 2.3	45.3 $\pm$ 1.9 ^c	19.0 $\pm$ 5.2 ^b	21.4 $\pm$ 3.1 ^b
Cytosol	29.5 $\pm$ 2.8	29.4 $\pm$ 1.8	25.7 $\pm$ 4.1 ^c	28.6 $\pm$ 5.5

Values represent the mean $\pm$ SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

Table 2. Content and Distribution of Copper in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute ($\mu\text{g/g}$)				
Nuclei and debris	1.38 $\pm$ 0.29	1.03 $\pm$ 0.15 ^b	4.00 $\pm$ 1.63 ^b	3.41 $\pm$ 1.37 ^b
Mitochondria	0.98 $\pm$ 0.29	0.82 $\pm$ 0.20	2.55 $\pm$ 0.91 ^b	2.96 $\pm$ 1.65 ^b
Microsome	0.56 $\pm$ 0.17	0.79 $\pm$ 0.38	1.41 $\pm$ 0.55 ^b	2.10 $\pm$ 1.13 ^b
Cytosol	2.92 $\pm$ 0.49	2.65 $\pm$ 0.57	5.70 $\pm$ 1.44 ^b	6.09 $\pm$ 2.26 ^b
Relative (%)				
Nuclei and debris	24.0 $\pm$ 5.7	20.1 $\pm$ 4.2	28.8 $\pm$ 4.6	24.2 $\pm$ 5.5
Mitochondria	16.5 $\pm$ 3.0	15.5 $\pm$ 1.9	18.9 $\pm$ 4.3	19.2 $\pm$ 3.8
Microsome	9.5 $\pm$ 1.9	14.4 $\pm$ 5.2 ^b	10.2 $\pm$ 2.2	13.9 $\pm$ 2.7 ^{b, d}
Cytosol	50.0 $\pm$ 3.5	50.1 $\pm$ 3.6	42.1 $\pm$ 2.7 ^b	42.7 $\pm$ 3.9 ^b

Values represent the mean $\pm$ SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

Table 3. Content and Distribution of Zinc in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute ($\mu\text{g/g}$)				
Nuclei and debris	8.08 $\pm$ 1.41	6.54 $\pm$ 1.01 ^c	7.34 $\pm$ 2.05	6.56 $\pm$ 1.37 ^c
Mitochondria	3.67 $\pm$ 0.79	3.08 $\pm$ 0.83	3.09 $\pm$ 0.50	3.26 $\pm$ 0.50
Microsome	4.00 $\pm$ 0.66	4.66 $\pm$ 1.19	3.17 $\pm$ 1.01 ^c	3.82 $\pm$ 0.29
Cytosol	14.57 $\pm$ 1.74	11.75 $\pm$ 1.64	11.85 $\pm$ 1.53 ^b	11.85 $\pm$ 1.53 ^b
Relative (%)				
Nuclei and debris	26.7 $\pm$ 4.4	24.1 $\pm$ 3.9	28.7 $\pm$ 5.0	25.7 $\pm$ 4.9
Mitochondria	12.1 $\pm$ 1.9	11.1 $\pm$ 2.1	12.4 $\pm$ 2.3	12.8 $\pm$ 1.5
Microsome	13.2 $\pm$ 1.8	16.7 $\pm$ 2.7 ^b	12.3 $\pm$ 2.9	15.1 $\pm$ 1.2 ^{c, e}
Cytosol	48.0 $\pm$ 2.9	48.1 $\pm$ 3.6	46.6 $\pm$ 4.8	46.5 $\pm$ 4.2

Values represent the mean $\pm$ SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

いて、核とミトコンドリアで増加 ($p<0.01$)、逆にサイトゾールでは減少 ($p<0.05$) または減少傾向、ミクロソームで著しい減少 ($p<0.01$) が認められた。一方、エタノール投与の影響は、正常食下のミクロソームでの増加 ($p<0.05$) と Fe 欠乏食下の核での減少 ($p<0.05$) を引き起こした。

(2) Cu の含有量及び分布割合

各小器官の Cu 含有量及び分布割合を Table 2 に示す。

各画分の Cu 含有量は、エタノール投与の有無にかかわらず Fe 欠乏食により、いずれの画分でも増加 ($p<0.01$) が認められた。増加の程度は、サイトゾールでは約 2 倍、他の画分ではそれより若干高く 2.5~3.5 倍であった。エタノール投与の影響は、正常食下の核で減少 ($p<$

Table 4. Content and Distribution of Manganese in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute (μg)				
Nuclei and debris	0.80 ± 0.15	0.59 ± 0.08^b	0.89 ± 0.15	0.76 ± 0.10^e
Mitochondria	0.51 ± 0.13	0.37 ± 0.07^b	0.57 ± 0.15	0.54 ± 0.19
Microsome	0.40 ± 0.08	0.46 ± 0.13	0.34 ± 0.10	0.42 ± 0.06^e
Cytosol	0.80 ± 0.08	0.82 ± 0.08	0.87 ± 0.11	$1.00 \pm 0.01^{b,e}$
Relative (%)				
Nuclei and debris	31.9 ± 5.4	26.4 ± 4.4^c	33.5 ± 4.0	28.2 ± 4.4^e
Mitochondria	20.3 ± 4.1	16.5 ± 2.0^c	21.3 ± 4.4	19.5 ± 4.8
Microsome	15.7 ± 2.0	20.2 ± 4.1^b	12.5 ± 2.8^b	15.6 ± 1.9^d
Cytosol	32.1 ± 1.2	36.9 ± 2.2^b	32.7 ± 2.2	$36.7 \pm 3.0^{b,d}$

Values represent the mean $\pm$ SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

0.01) が認められた以外は, Fe 欠乏食下か否かにかかわらず変化は認められなかった。

各画分間の分布割合は, Fe 欠乏食により, エタノール投与の有無にかかわらずサイトゾールでの減少 ($p<0.01$) とエタノール投与時のミクロソームでの増加 ($p<0.01$) が認められた。エタノール投与の影響は, ミクロソームで, 両給餌下とも増加 (正常食下: $p<0.05$, Fe 欠乏食下: $p<0.01$) が認められた。

(3) Zn の含有量及び分布割合

各小器官の Zn 含有量及び分布割合を Table 3 に示す。

各画分の Zn 含有量は, Fe 欠乏食単独によりミクロソーム ($p<0.05$) とサイトゾール ($p<0.01$) で, エタノール投与時の Fe 欠乏食により核 ($p<0.05$) とサイトゾール ($p<0.01$) でそれぞれ減少が認められた。エタノール投与の影響は, 正常食下の核で減少 ($p<0.05$) が認められた以外変化はなかった。

各画分間の分布割合は, Fe 欠乏食単独ではいずれの画分でも認められなかったが, エタノール投与時の Fe 欠乏食によってミクロソームで占める割合が増加 ($p<0.05$) した。エタノール投与の影響は, ミクロソームで, 両給餌下とも増加 (正常食下: $p<0.01$, Fe 欠乏食下: $p<0.05$) が認められた以外は, 他の画分では認められなかった。

(4) Mn の含有量及び分布割合

各小器官の Mn 含有量及び分布割合を Table 4 に示す。

各画分の Mn 含有量は, エタノール投与時の Fe 欠乏

食によってサイトゾール中の含量が増加 ($p<0.01$) した以外は, Fe 欠乏食単独による変化を認めなかった。一方エタノール投与は, 正常食下の核とミトコンドリア ($p<0.01$) 及び Fe 欠乏食下の核でそれぞれ減少 ($p<0.05$), Fe 欠乏食下のミクロソームとサイトゾールでは逆に増加 ($p<0.05$) をさせた。

各画分間の分布割合では, Fe 欠乏食単独により, ミクロソームで減少 ($p<0.01$) が, エタノール投与時の Fe 欠乏食によりサイトゾールでの増加 ($p<0.01$) が認められた。一方エタノール投与の影響は, 正常食下の核とミトコンドリアで減少 ($p<0.05$), 逆にミクロソームとサイトゾールで増加 ($p<0.05$) し, Fe 欠乏食下では, 核で減少 ($p<0.05$), ミクロソームとサイトゾールでは逆に増加 ($p<0.01$) した。

(5) Mg の含有量及び分布割合

各小器官の Mg 含有量及び分布割合を Table 5 に示す。

いずれの画分でも Mg 含有量は, Fe 欠乏食単独による影響は認められなかったが, エタノール投与時の Fe 欠乏食によっては核でのみ減少 ($p<0.05$) をきたした。エタノール投与の影響は, 正常食下の核 ($p<0.01$) とサイトゾールで減少 ($p<0.05$), Fe 欠乏食下のミクロソームで増加 ($p<0.05$) がみられた。

各画分間の分布割合の変化は, Fe 欠乏食ではエタノール投与時のミクロソームで増加 ($p<0.05$) した以外は, 他の画分では認められなかった。エタノール投与によって, 正常食下のミクロソームで増加 ($p<0.05$), Fe 欠乏食下の核で減少 ($p<0.05$), 逆にミクロソームで増加

Table 5. Content and Distribution of Magnesium in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute ($\mu\text{g/g}$)				
Nuclei and debris	75.15 $\pm$ 10.73	59.04 $\pm$ 4.56 ^b	70.86 $\pm$ 16.20	64.24 $\pm$ 10.50 ^c
Mitochondria	38.50 $\pm$ 6.84	36.47 $\pm$ 8.10	36.03 $\pm$ 6.29	38.92 $\pm$ 6.98
Microsome	43.03 $\pm$ 10.72	50.45 $\pm$ 13.93	37.79 $\pm$ 12.38	47.77 $\pm$ 7.07 ^e
Cytosol	56.11 $\pm$ 9.32	47.67 $\pm$ 6.77 ^c	50.73 $\pm$ 8.89	52.66 $\pm$ 6.14
Relative (%)				
Nuclei and debris	35.7 $\pm$ 6.5	31.0 $\pm$ 4.8	36.2 $\pm$ 4.2	31.7 $\pm$ 5.2 ^e
Mitochondria	18.0 $\pm$ 2.2	18.8 $\pm$ 3.0	18.7 $\pm$ 2.9	19.0 $\pm$ 2.2
Microsome	20.0 $\pm$ 3.8	25.6 $\pm$ 4.9 ^c	18.8 $\pm$ 4.3	23.4 $\pm$ 2.4 ^{c, d}
Cytosol	26.3 $\pm$ 2.5	24.7 $\pm$ 2.4	26.2 $\pm$ 3.4	25.9 $\pm$ 2.1

Values represent the mean $\pm$ SD^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol ($n=10$)^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group**Table 6.** Content and Distribution of Calcium in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute ($\mu\text{g/g}$)				
Nuclei and debris	6.19 $\pm$ 1.05	5.52 $\pm$ 1.47	6.31 $\pm$ 1.43	5.83 $\pm$ 1.03
Mitochondria	4.49 $\pm$ 1.18	4.31 $\pm$ 0.81	4.12 $\pm$ 1.09	4.25 $\pm$ 0.72
Microsome	4.90 $\pm$ 1.69	5.41 $\pm$ 1.69	4.09 $\pm$ 1.51	5.15 $\pm$ 1.82
Cytosol	0.20 $\pm$ 0.30	0.37 $\pm$ 0.14	0.78 $\pm$ 0.94	0.38 $\pm$ 0.45
Relative (%)				
Nuclei and debris	40.2 $\pm$ 6.8	35.5 $\pm$ 7.1	41.7 $\pm$ 6.0	36.8 $\pm$ 5.4
Mitochondria	28.3 $\pm$ 3.4	27.9 $\pm$ 3.5	27.0 $\pm$ 2.2	27.5 $\pm$ 2.8
Microsome	30.5 $\pm$ 4.2	34.4 $\pm$ 6.8	27.0 $\pm$ 8.3	32.4 $\pm$ 4.7
Cytosol	1.0 $\pm$ 1.4	2.4 $\pm$ 2.0	4.4 $\pm$ 4.6 ^c	2.3 $\pm$ 2.8

Values represent the mean $\pm$ SD^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet+ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet+ethanol($n=10$)^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group $(p<0.01)$ が認められた。

(6) Ca の含有量及び分布割合

各小器官の Ca 含有量及び分布割合を Table 6 に示す。

各画分の Ca 含有量は、Fe 欠乏食及びエタノール投与による影響は全く認められなかった。

各画分間の分布割合においても、サイトゾールでのみ

Fe 欠乏食による若干の増加 ($p<0.05$) が認められた以外変化は認められなかった。

(7) P の含有量及び分布割合

各小器官の P 含有量及び分布割合を Tabel 7 に示す。

各画分の P の含有量については、Fe 欠乏食単独による影響は全く認められなかった。エタノール投与による影響は、Fe 欠乏食下のミクロソームで増加 ($p<0.05$) し

Table 7. Content and Distribution of Phosphorus in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute (mg/g)				
Nuclei and debris	1.10±0.24	0.95±0.08	1.21±0.21	1.06±0.16
Mitochondria	0.60±0.11	0.52±0.09	0.58±0.09	0.61±0.12
Microsome	0.75±0.17	0.69±0.20	0.61±0.16	0.74±0.10 ^e
Cytosol	0.89±0.15	0.90±0.16	0.87±0.17	0.93±0.09
Relative (%)				
Nuclei and debris	33.0±6.0	31.5±5.6	37.0±4.5	31.8±5.1 ^e
Mitochondria	17.8±2.0	16.9±2.0	18.2±3.9	18.1±2.6
Microsome	22.7±5.5	22.3±4.4	18.3±3.2 ^c	22.1±2.4 ^d
Cytosol	26.5±2.4	29.3±3.0 ^c	26.5±2.7	28.0±1.4

Values represent the mean ± SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet + ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet + ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

Table 8. Content and Distribution of Selenium in Subcellular Fractions of Liver

Item	Group ^a			
	N	NE	D	DE
Absolute ($\mu\text{g/g}$)				
Nuclei and debris	0.18±0.03	0.14±0.02 ^b	0.19±0.06	0.17±0.04
Mitochondria	0.10±0.03	0.08±0.02	0.11±0.02	0.10±0.03
Microsome	0.08±0.02	0.09±0.03	0.07±0.02	0.09±0.01
Cytosol	0.46±0.08	0.41±0.07	0.39±0.06	0.43±0.04
Relative (%)				
Nuclei and debris	22.6±5.2	19.5±3.1	24.9±5.2	21.2±4.6
Mitochondria	12.0±2.5	10.9±1.1	14.0±2.9	13.0±3.1
Microsome	9.6±1.9	11.9±1.9 ^c	9.4±1.7	10.8±0.9 ^e
Cytosol	55.8±3.7	57.7±1.7	51.7±3.4 ^c	55.0±2.7 ^e

Values represent the mean ± SD

^a N: normal diet ($n=10$); NE: normal diet + ethanol ($n=10$); D: iron-deficient diet ($n=10$); DE: iron-deficient diet + ethanol ($n=10$)

^b Significantly different ($p<0.01$) from the values for the N group

^c Significantly different ($p<0.05$) from the values for the N group

^d Significantly different ($p<0.01$) from the values for the D group

^e Significantly different ($p<0.05$) from the values for the D group

たのを除き認められなかった。

各画分間の分布割合においては、Fe 欠乏食単独によってミクロソームで減少 ($p<0.05$) を示したのを除き変化は認められなかった。一方エタノール投与では、正常食下のサイトゾールで若干の増加 ($p<0.05$)、Fe 欠乏食下の核で減少 ($p<0.05$)、ミクロソームで増加 ($p<0.05$) が認められた。

(8) Se の含有量及び分布割合

各小器官の Se 含有量及び分布割合を Table 8 に示す。

各画分の Se 含有量は、Fe 欠乏食単独によってはこれらの画分も全く変化はなかった。またエタノール投与によっても、僅かに正常食下の核で減少 ($p<0.01$) が認められた以外含有量の変化は認められなかった。

各画分間の分布割合は、Fe 欠乏食単独によってサイトゾールで減少 ($p < 0.05$) が認められたが、それ以外の変化はなかった。一方エタノール投与の影響は、正常食下のミクロソーム ($p < 0.05$) 及び Fe 欠乏食下のミクロソームとサイトゾールでいずれも増加 ($p < 0.05$) が認められた。

考 察

1) Fe 欠乏食による影響

Fe 欠乏食を与えることにより、pair feed したにも関わらず、体重が正常食群に比べ減少し、また血中 Hb が有意に低下し、明らかに被験動物に Fe 欠乏性貧血を誘発させたことは前報¹⁾に示した。

本研究において、Fe 欠乏食は肝臓細胞内小器官中の Fe、Cu 及び Zn 含有量に対し強く影響を及ぼし、すべての小器官で、Fe 含有量の低下を認めると同時に、全ての小器官での Cu 含有量の増加を認めた。また Zn は、ミクロソーム及びサイトゾールで減少を認めた。

Fe 含有量は、特にミクロソームとサイトゾールで減少が著しく、また Cu 含有量は、サイトゾールでの増加が若干低いものの、画分による差違はそれほど顕著ではなかった。

このような、肝臓の細胞内小器官での Fe と Cu 含有量の変動は、肝臓全体の現象 (Fe と Cu 含有量の相関: $r = -0.746$) と酷似している (Fe と Cu 含有量の相関: 核 $r = -0.658$, ミトコンドリア $r = -0.635$, ミクロソーム $r = -0.588$, サイトゾール $r = -0.734$) ことが認められる。

Fe の分布割合は、核及びミトコンドリアでは増加しているのに対し、サイトゾールと特にミクロソームで減少しており、Fe 欠乏食が他の小器官に比べミクロソームとサイトゾールに強く影響していることが推察される。また絶対量では増加した Cu もサイトゾールでのみ分布割合の減少が認められ、他のミネラルとは異なった挙動をとっている傾向がみられる。

以上のように Fe 欠乏食によってもたらされる Fe と Cu 含有量の変動の意義については現時点では推測の域を脱し得ない。Fe と Cu は、チトクロムオキシダーゼやカタラーゼなどの構成成分であり、それら酵素の合成及び活性発現等に与える影響が考えられる。この点に関しては Fe 欠乏による肝の cytochrome P-450 及び NADPH cytochrome P-450 への影響は認められなかったとの報告^{12), 13)}がある上、肝ミクロソーム系の酵素は、Fe を優先的に活用するため影響が現れないとの知見¹⁴⁾もみられる。

また、ミネラル間の生体分子上の変動については多くの報告があり、特に酵素の活性中心のミネラルが、他のミネラルで置換すると活性の低下が抑えられる¹⁵⁾といわれている。さらに、Cu の添加で貧血を軽減することができるとの報告²⁾もある。これらのことから、今回の実験

結果である Fe の減少に対する Cu の増加は、含鉄酵素活性への影響を最小限にとどめるように働いているとも考えられるので、今後検討が必要と思われる。

Zn については、肝臓全体では、Fe 欠乏食による変化は認められなかった¹⁾にもかかわらず、小器官中ではミクロソームとサイトゾールで減少を認めた。既に、肝のサイトゾールに局在するアルカリホスファターゼ、アルドラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ及びミクロソームに局在する 5'-ヌクレオシダーゼなどの Zn 依存性酵素がそれぞれ Zn 欠乏によって活性の低下する¹⁶⁾ことが知られているので、本研究においても同様の結果が想定される。しかし、それらの結果の生物学的意義については未だ確立されていない。

2) 正常食下でのエタノール投与の影響

エタノール投与によって起こった Cu、Zn 及び Mn 濃度の変化がスーパーオキシディスムターゼ (SOD, フリーラジカルの障害を防衛する役割を担っている) 活性の変化を反映する¹⁷⁾ことが、既にラットやブタの肝で認められている。しかし、前報¹⁾のように、肝全体のミネラルの変動を検討した際に Cu、Zn、Mn 及び Mg はエタノールの投与によって減少が認められたにもかかわらず、今回の実験では、Cu と Zn が核で、Mn は核とミトコンドリアで、Mg は核とサイトゾールで減少が認められただけで、SOD の変動に結びつくような結果とは考え難い。核分画には、組織の残留物なども含まれている恐れもあるので今後より詳細な研究が必要と思われる。

3) Fe 欠乏食下でのエタノールの影響

Fe 欠乏食下でのエタノールの投与によって生じた変化の中で特徴的であるのは、核画分での Fe の減少とミクロソームとサイトゾール、特にサイトゾールでの Mn の増加である。核の Fe については貧血により減少したものが、エタノールの投与により、若干ではあるが更に減少の傾向が認められ、前報¹⁾の肝臓全体での結果、すなわち Fe 欠乏食によって減少した Fe 含有量が、エタノールの投与により更に減少する傾向が認められたのと同様の変化と思われる。

しかし核については、前述のように本実験の核画分には核以外の組織等も含まれている恐れがあり、小器官の変動と断定することはできないが、前報¹⁾でも触れたように、Fe はタンパク質酵素に組み込まれ、多くの酵素伝達反応及び電子伝達に関与しているので、肝全体で認められた Fe 欠乏下での肺と肝の Fe の減少が、エタノール投与により拍車をかける現象は、細胞内小器官でも起こっている可能性が予想され、更に検討を加える必要があると考える。

一方、Mn については既に Zidenberg ら¹⁷⁾が、エタノールを投与したブタの肝で Mn の増加と Mn-SOD の活性上昇が平行することを認めているので、本実験でも Fe 欠乏食下のエタノール投与によってミクロソームや

サイトゾール画分で Mn 含量が増加したことは、同処理によって Mn-SOD も増加し活性酸素の消去に寄与したことが示唆される。

また Dhur ら¹²⁾の、酵素活性への影響は認められない場合でも、Mg を利用する酵素は、Mg の代わりに Mn を利用できるという報告¹⁵⁾もあり、生体内でのミネラルの複雑な動きが想像できる。前報¹⁾でも示したように鉄欠乏やエタノール投与によって連動して生じるミネラル間の相関については、前述の Fe と Cu 以外のミネラルにおいても高い相関を示すものが多く認められている。

有意差としては現れていないものの、正常食下でのエタノールの投与により核とミトコンドリアの測定したすべてのミネラルが減少傾向を示し、またミクロソームの P を除くすべてのミネラルが増加傾向を示すこと、更に鉄欠乏食下の核におけるすべてのミネラルで減少傾向、更にミクロソームのすべてのミネラル及びサイトゾールの Ca を除くすべてのミネラルで増加傾向を認めたが、このような変化がどのような意味を有するのか、また Cu のミトコンドリアでの過剰は、脂質過酸化に傾かせるとの報告¹⁰⁾もあり、今後更にミネラルの相互作用を含め、金属酵素との関係及び脂質過酸化への、Fe 欠乏及びエタノール投与の影響など検討していく必要があると考える。

ま と め

ラットを Fe 欠乏食で飼育し貧血状態とした後エタノールを慢性的に与えることにより、肝臓中の細胞内小器官のミネラルにどのような変化が生じるかを検討した。

その結果、被験動物を単に貧血状態にただけで特に Fe, Cu, Zn に変化が認められ、Fe はすべての小器官で減少したのに対し、Cu は、Fe とは全く反対にすべての小器官で増加した。また、Zn はミクロソームとサイトゾールで減少した。

一方エタノールの投与は、正常動物の核の Cu, Zn, Se, 核とミトコンドリアの Mn, 核とサイトゾールの Mg を減少させ、貧血動物においては、核の Fe, Mn を

減少、ミクロソームとサイトゾールの Mn, ミクロソームの Mg, P を増加させた。

文 献

- 1) 広末トシ子, 入江逸子, 細貝祐太郎: 食衛誌. **31**, 314~322 (1990).
- 2) Abdel-Mageed, A. B., Oehme, F.: Vet. Hum. Toxicol. **32**, 230~234 (1990).
- 3) 木村正己, 荒記俊一訳: '環境汚染物質の生体への影響 (12) 銅・鉄' p. 28, 202, (1981)(株)東京化学同人.
- 4) Cox, D. H.: Nutr. Rep. Inter. **5**, 145~150 (1972).
- 5) Smeyers-Verbeke, J., May, C., Drochmans, P., Massart, D. L.: Anal. Biochem. **83**, 746~753 (1977).
- 6) Swick, R. A., Cheeke, P. R., Buhler, D. R.: J. Anim. Sci. **55**, 1,425~1,430 (1982).
- 7) Ludany, A., Kellermayer, M., Jobst, K.: Acta Biochem. Biophys. Acad. Sci. Hung. **15**, 229~236 (1980).
- 8) Shinogi, M., Fukuda, K., Nakazawa, M., Mori, I.: Chem. Pharm. Bull. **28**, 2,094~2,100 (1980).
- 9) Jayawickreme, C. K., Chatt, A.: J. Radioanal. Nucl. Chem. **110**, 583~593 (1987).
- 10) Miranda, C. L., Henderson, M. C., Buhler, D. R.: Toxicol. Appl. Pharmacol. **76**, 62~68 (1984).
- 11) 毛利秀雄, 香川靖雄編: "実験生物学講座 6・細胞分画法" p. 3~25 (1984) 丸善.
- 12) Dhur, A., Galan, P., Hercberg, S.: J. Nutr. **119**, 40~47 (1989).
- 13) Bailey-Wood, R., Blayney, L. R., Muir, R., Jacobs, A.: Br. J. Exp. Path. **56**, 193~198 (1975).
- 14) Mizokami, M., Suzuki, K., Inoue, K., Sunouchi, M., Hirakawa, S., Goto, S., Takenaka, A., Kanke, Y.: Experientia **41**, 734~735 (1985).
- 15) Mildvan, A. S.: Annu. Rev. Biochem. **43**, 357~399 (1974).
- 16) 山根靖弘他訳: "環境汚染物質の生体への影響 (17) 亜鉛" p. 191, (1986)(株)東京化学同人.
- 17) Zidenberg-Cherr, S., Halsted, C. H., Olin, K. L., Reisenauer, A. M., Keen, C. L.: J. Nutr. **120**, 213~217 (1990).