ラット肝ミクロゾームおよび可溶性画分における脂質過酸化物の含量 (*in Vivo*
におけるアスコルビン酸, Fe^{2+} の影響について)

藤田 直

大阪薬科大学¹⁾Lipid Peroxide Content in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after
Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

TADASHI FUJITA

Osaka College of Pharmacy¹⁾

(Received July 26, 1973)

1) An *in vivo* study was made on the effect of ascorbic acid and ferrous ion on the formation of lipid peroxide on the rat liver microsomes and soluble fraction. Lipid peroxide content in microsomes and soluble fraction increased gradually with time after intraperitoneal administration of ascorbic acid (176 mg/kg/day) and ferrous chloride (28.2 mg Fe^{2+} /kg/day).

2) Among the composition of phosphatidylserine and phosphatidylinositol, diminution of arachidonic acid and docosahexaenoic acid was predominant during increase in the formation of lipid peroxide in microsomes and soluble fraction.

3) Total sulfhydryl content of microsomes and soluble fraction decreased markedly by the application of ascorbic acid and ferrous ion.

肝ミクロゾームおよび可溶性画分はミトコンドリアとともに脂質代謝の主な場所であることは最近明らかになりつつある。

Wills はミクロゾームで脂質過酸化物が形成されるとき、ミクロゾームの酸化還元代謝が低下することを示唆している。^{2,3)}

アスコルビン酸 (VC), Fe^{2+} をラットの腹腔内に投与すると肝に中性脂肪が蓄積するといわれ、⁴⁾ VC, Fe^{2+} による脂質過酸化物の形成が肝の脂質代謝に異常をきたすことが考えられる。著者はこの点を考慮して *in vivo* で VC, Fe^{2+} のミトコンドリアに対する影響を検討したが、⁵⁾ さらにミクロゾームでの脂質過酸化物の形成が脂質代謝にどのような影響をおよぼすかを検討するための基礎実験としてミクロゾームおよび可溶性画分 (105000×g の上清) に対する VC, Fe^{2+} の影響について 2, 3 の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料および実験操作 動物および飼育条件——動物は Wistar 系雄性白鼠 150—250 g のものを用い、1 群 8 匹とし VC, Fe^{2+} (塩化第一鉄) 投与群には VC 176 mg/kg/day, 28.2 mg Fe^{2+} /kg/day の生理食塩水溶液を腹腔内に投与後 6, 24 時間で、また 1 週間毎日 VC, Fe^{2+} を上と同じ量を投与、最終投与後 24 時間で各群のラットを断頭し肝を摘出して 0.25M sucrose で洗い、フリーザー内 (−20°) に保存し約 1 週間以内に実験に供した (新鮮な肝組織と、−20° で 1 週間保存した組織の脂質過酸化物量の測定値を比較したがほとんど差はみられなかった)。なお対照群には同量の生理食塩水をそれぞれ腹腔内に投与し処置した。

ミクロゾームの調製——ミクロゾームの調製は Hogeboom⁶⁾ らの方法に準じて行ない、ミクロゾームの pellet に対し新鮮な肝組織重量 1 g 当り 4 ml の割合で 0.25M sucrose を加えてテフロンホモジナイザーで軽くホモジ

1) Location: 504 Kawaicho, Matsubara, Osaka.

2) E.D. Wills, *Biochem. J.*, 113, 333 (1969).

3) E.D. Wills, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 239 (1972).

4) Z. Placer, J. Erazimová, P. Poledne, M. Vidláková *Experientia*, 27, 1274 (1971).

5) 藤田 直, 薬誌, 93, 756 (1973).

6) G.H. Hogeboom, "Methods in Enzymol," Vol. 1 Academic press, New York, 1955, p. 16.

ナイズしその suspension を得た。なお可溶性画分は $105000 \times g$, 60 分遠沈後その上清をとり実験に供した。また蛋白質の定量は Lowry⁷⁾ の方法によった。

チオバルビツール酸 (TBA) 陽性物質の定量——TBA 陽性物質の定量は前報⁹⁾ の方法によって行なった。

SH の定量——ミクロゾームおよび可溶性画分の総 SH 含量の測定は Sedlak⁸⁾ の方法にしたがって行なった。

脂質の分離と定量——脂質の分離, 抽出ならびに同定は前報⁹⁾ の方法によった。

推計学的有意差の検定——有意差の有無は t 検定により判定した。ガスクロマトグラフィーにおいて対照群の値は 0, 6, 24 時間, 1 週間にいずれも変化がみられず, ほぼ同じ値を示したので, 0 時間の値を対照値として表示した。脂肪酸の定量は半値幅法により算出し相対比で示した。なお VC, Fe^{2+} 投与後 6 時間では脂肪酸にほとんど変動がみられなかったので省略し, 24 時間と 1 週間の比較を行なった。

試薬——溶媒はすべて市販特級あるいは 1 級のもを常法により蒸留して用いた。その他の試薬は特級あるいは分析用のものを用いた。

結果および考察

Fig. 1 は VC, Fe^{2+} を腹腔内に投与後一定時間経過後のミクロゾームおよび可溶性画分における脂質過酸化物の量を TBA 値で示したものである。

VC, Fe^{2+} による脂質過酸化物の量はミクロゾームでは両者を投与後 6, 24 時間でほとんど差はみられなかったが, 1 週間連日投与するとその量に有意な上昇がみられた ($p < 0.01$)。

可溶性画分においては VC, Fe^{2+} による脂質過酸化物の量は 24 時間で有意な差がみられた ($p < 0.01$)。また 1 週間の連日投与では対照に比し脂質過酸化物の量は約 20% 増加した。

つぎに TBA 陽性物質の量が VC, Fe^{2+} の投与によって増加したが, この場合の基質として内因性的高级不飽

和脂肪酸が考えられるので, 肝ミクロゾームおよび可溶性画分の脂肪酸組成を VC, Fe^{2+} 処置後経時的に分析しその量的な関係を相対比で示したのが Table I である。

ミクロゾームおよび可溶性画分における脂肪酸組成は量的な差はあるが飽和脂肪酸として $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, 不飽和脂肪酸として $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{20:4}$, $C_{22:6}$ などの分布がみられた。ミクロゾームにおいては $C_{18:0}$, $C_{20:4}$ の総脂肪酸に対する割合は可溶性画分におけるよりも高い値を示したが, 逆に可溶性画分では $C_{22:6}$ が多いことが分った。

高級不飽和脂肪酸は VC, Fe^{2+} 処置後 24 時間では両画分において $C_{18:2}$ がそれぞれ 10—20% 減少し, $C_{22:6}$ は可溶性画分で約 50% の低い値を示した。

VC, Fe^{2+} を 1 週間毎日投与するとミクロゾームにおいては高級不飽和脂肪酸の中でも特に $C_{18:2}$ が, 可溶性画分では $C_{18:2}$, $C_{22:6}$ の減少が著明であった。飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の比 (sat/unsat) からみると VC, Fe^{2+} の処置後では対照に比べ両画分とも 24 時間, 1 週間でその値は高くなっており, このことは不飽和脂肪酸が相対的に減少していることを示している。

Table I に示したごとくミクロゾーム, 可溶性画分の脂肪酸組成のうち高級不飽和脂肪酸が VC, Fe^{2+} の

Fig. 1. Lipid Peroxide Content in the Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

a) daily administration of ascorbic acid and ferrous ion for one week. Vertical bars represent the mean $\pm$ S.E. of five experiments.

*: statistically significant ($p < 0.01$) from corresponding control value

□: microsome
▨: soluble fraction

7) O.H. Lowry, N.H. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

8) J. Sedlak, R.H. Lindsay, *Anal. Biochem.*, **25**, 192 (1968).

9) 藤田 直, 薬誌, **92**, 250 (1972).

TABLE I. Fatty Acid Composition of Total Lipid in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	21.4	28.5	23.9	38.5	24.9	37.6
Stearic	21.3	9.4	22.9	10.8	22.2	10.0
Oleic	12.7	18.8	12.2	18.3	17.1	28.3
Linoleic	19.0	24.6	15.3	22.1	13.2	14.5
Arachidonic	19.6	4.6	19.2	3.3	18.1	8.6
Docosahexaenoic	6.0	14.1	6.5	7.0	4.5	1.0
Sum of sat	42.7	37.9	46.8	49.3	47.1	47.6
Sum of unsat	57.3	62.1	53.2	50.7	52.9	52.4
Sat/unsat ^{b)}	0.75	0.61	0.88	0.97	0.89	0.91

Values are expressed as percentages against fatty acids in microsomes and soluble fraction prepared from pooled liver of five rats.

a) intraperitoneal administration of ascorbic acid and ferrous ion for one week (daily dose; VC 176 mg/kg, FeCl₂, 28.2 mg Fe²⁺/kg)

b) ratio of saturated/unsaturated fatty acid

Mic: Microsomal fraction Soluble: Soluble fraction

投与によって影響を受けることは両画分の機能維持に必要と思われるリン脂質を構成する不飽和脂肪酸が VC, Fe²⁺ によって変化を受けることが考えられる。

そこで薄層クロマトグラフィーを用いて前回⁵⁾と同様、両画分から5種類のリン脂質を分離同定し、それらの band を剥離して transmethylation を行ない脂肪酸の分析を行なった。その結果は Table II—VI に示した。

カルジオリピンを構成する脂肪酸のうち不飽和脂肪酸では C_{18:2} がミクロゾームに多くみられたが、可溶性画分では飽和脂肪酸の C_{16:0}, C_{18:0} で全体の 60% 以上を占め、ミクロゾームとは全く対称的な組成を示した。

VC, Fe²⁺ 処置後ではミクロゾームの C_{18:2} は 24 時間で減少したが、可溶性画分の C_{18:2} は 24 時間ではほとんど変化がなく、1 週間連日投与して約 70% 減少した (Table II)。

可溶性画分のホスファチジルエタノールアミンはその脂肪酸構成で C_{16:0}, C_{18:0} がそれぞれ 40% 以上を、不飽和脂肪酸では C_{18:2}, C_{20:3}, C_{20:4} で約 10% を占めていた。一方ミクロゾームは可溶性画分に比し不飽和脂肪

TABLE II. Fatty Acid Composition of Cardiolipin in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	4.1	45.1	7.2	51.4	14.2	51.7
Palmitoleic	1.6	6.2	1.7	—	2.5	—
Stearic	—	16.9	2.4	13.2	3.1	20.7
Oleic	15.6	21.8	15.8	22.6	15.7	19.8
Linoleic	78.7	7.0	72.9	7.2	64.5	2.2
Eicosatrienoic	—	3.0	—	5.6	—	5.1
Sum of sat	4.1	62.0	9.6	64.6	17.3	72.4
Sum of unsat	95.9	38.0	90.4	35.4	82.7	27.1
Sat/unsat ^{b)}	0.043	1.63	0.11	1.83	0.21	2.67

Values are expressed as percentages against fatty acids in cardiolipin prepared from microsomes and soluble fraction of pooled liver of five rats.

a, b) For details see Table I.

TABLE III. Fatty Acid Composition of Phosphatidylethanolamine in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	21.1	44.2	20.2	45.8	29.2	56.6
Stearic	24.9	43.5	25.7	48.3	32.0	40.3
Oleic	6.3	—	5.4	—	6.1	—
Linoleic	11.2	4.9	9.0	4.1	5.0	—
Eicosatrienoic	—	3.3	—	1.8	—	3.1
Arachidonic	23.4	4.1	25.4	—	19.4	—
Docosahexaenoic	13.1	—	14.3	—	8.3	—
Sum of sat	46.0	87.7	45.9	94.1	61.2	96.9
Sum of unsat	54.0	12.3	54.1	5.3	38.8	3.1
Sat/unsat ^{b)}	0.85	7.13	0.85	17.75	1.58	31.26

Values are expressed as percentages against fatty acids in phosphatidylethanolamine prepared from microsomes and soluble fraction of pooled liver of five rats.

^{a,b)} For details see Table I.

酸の値は相対的に高かった。

VC, Fe²⁺ 処置後では 24 時間および 1 週間でミクロゾームの C_{18:2} は減少したが, C_{20:4} に対してはほとんど影響はみられなかった。可溶性画分においては 1 週間毎日 VC, Fe²⁺ を投与することによって C_{18:2}, C_{20:4} は全く検出されなかった (Table III)。

このホスファチジルエタノールアミンでみられた脂肪酸の組成および VC, Fe²⁺ によるそれらの変化はミクロゾームおよび可溶性画分のホスファチジルコリン画分においても同様な傾向を示した (Table IV)。

ミクロゾームのホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトールにおいてはその脂肪酸組成は C_{16:0}, C_{18:0} で 60% 以上を, 不飽和脂肪酸では C_{20:4}, C_{18:2} で約 30% を占めていた。一方可溶性画分のホスファチジルセ

TABLE IV. Fatty Acid Composition of Phosphatidylcholine in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	23.3	45.8	21.1	52.4	28.1	63.2
Stearic	24.2	29.7	27.5	33.9	26.3	36.8
Oleic	8.3	6.7	4.9	4.4	11.0	—
Linoleic	17.0	11.1	12.1	6.5	9.8	—
Eicosatrienoic	—	1.1	—	—	—	—
Arachidonic	22.3	5.6	26.4	2.8	21.3	—
Docosahexaenoic	4.9	—	7.9	—	3.8	—
Sum of sat	47.5	75.5	48.6	86.3	54.4	100.0
Sum of unsat	52.5	24.5	51.3	13.7	45.9	0
Sat/unsat ^{b)}	0.90	3.08	0.95	6.30	1.19	100.0

Values are expressed as percentages against fatty acids in phosphatidylcholine prepared from microsomes and soluble fraction of pooled liver of five rats.

^{a,b)} For details see Table I.

リン, ホスファチジルイノシトールではマイクロゾームとは異なり $C_{18:2}$, $C_{20:4}$ はほとんど認められなかったが, $C_{22:6}$ はホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトールでそれぞれ 15.6, 7.6% の値を示した. またホスファチジルイノシトールのみ $C_{18:1}$ が検出された.

このようにマイクロゾームおよび可溶性画分のホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトールでは相対的に飽和脂肪酸の値が高く, 不飽和脂肪酸の値は低かった.

このような脂肪酸組成に対し VC, Fe^{2+} 処置後ではマイクロゾームのホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトールの $C_{20:4}$ は減少した. また可溶性画分ではホスファチジルセリン, ホスファチジルイノシトールとも $C_{22:6}$ の減少が著明であった (Table V—VI).

脂質の過酸化反応は free radical による連鎖反応である. この free radical は反応性に富み, 生体組織中の成分に対する影響が考えられる. そこでマイクロゾームおよび可溶性画分の SH について検討した.

VC, Fe^{2+} 処置後の肝マイクロゾーム, 可溶性画分の総 SH の含量を Fig. 2 に示した.

TABLE V. Fatty Acid Composition of Phosphatidylserine in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	21.9	50.8	22.9	58.5	30.0	73.3
Stearic	42.9	33.6	55.3	38.9	49.0	26.7
Linoleic	6.5	—	4.9	—	5.1	—
Arachidonic	28.7	—	16.9	—	15.9	—
Docosahexaenoic	—	15.6	—	2.6	—	—
Sum of sat	64.8	84.4	78.2	97.4	79.0	100.0
Sum of unsat	35.2	15.6	21.8	2.6	21.0	0
Sat/unsat ^{b)}	1.84	5.41	3.59	37.46	3.76	100.0

Values are expressed as percentages against fatty acids in phosphatidylserine prepared from microsomes and soluble fraction of pooled liver of five rats.

a, b) For details see Table I.

TABLE VI. Fatty Acid Composition of Phosphatidylinositol in Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

Fatty acid	Normal		Treatment			
	Mic	Soluble	24 hr		1 week ^{a)}	
			Mic	Soluble	Mic	Soluble
Palmitic	25.8	45.7	27.1	57.1	35.7	61.0
Stearic	46.9	40.7	53.3	31.8	46.3	29.6
Oleic	—	6.7	—	6.5	—	7.4
Linoleic	5.0	—	6.0	—	6.0	—
Arachidonic	22.7	—	13.6	—	12.0	—
Docosahexaenoic	—	7.6	—	4.0	—	2.0
Sum of sat	72.7	86.4	80.4	89.5	82.0	90.6
Sum of unsat	27.7	14.3	19.6	10.5	18.0	9.4
Sat/unsat ^{b)}	2.63	6.04	4.10	8.52	4.56	9.64

Values are expressed as percentages against fatty acids in phosphatidylinositol prepared from microsomes and soluble fraction of pooled liver of five rats.

a, b) For details see Table I.

Fig. 2. Total Sulfhydryl Content in the Rat Liver Microsomes and Soluble Fraction after Intraperitoneal Administration of Ascorbic Acid and Ferrous Ion

*: statistically significant ($p < 0.01$) from corresponding control value

a) for details see Fig. 1

□: microsome

▨: soluble fraction

前述の結果から VC, Fe^{2+} の処置ではミクロゾームおよび可溶性画分の脂質過酸化物の量は増加した。また両画分における脂肪酸組成は VC, Fe^{2+} の投与によって $\text{C}_{18:2}$, $\text{C}_{20:4}$, $\text{C}_{22:6}$ などが減少した。特にホスファチジルセリン、ホスファチジイルノシトールを構成する不飽和脂肪酸 ($\text{C}_{20:4}$, $\text{C}_{22:6}$) の減少が著明であった。このことはこれまでの成績^{5,9)} と同じ傾向を示している。Utley¹⁴⁾ は *in vitro* でマウスの肝ミクロゾームと SH 剤 (HgCl_2 , PCMB) を反応させると SH は減少し、その結果脂質過酸化物が形成されることを報告している。

In vivo で VC, Fe^{2+} によってミクロゾームおよび可溶性画分の SH は減少したが、VC, Fe^{2+} が SH に働いて SH の減少をきたし、その結果脂質過酸化物の量が増加したとは考えにくく、むしろミクロゾームおよび可溶性画分の SH 量は VC, Fe^{2+} のような prooxidant によって内因性の高級不飽和脂肪酸を基質として free radical が形成され、それによって SH が酸化を受け減少し、そしてミクロゾームの heme 化合物¹⁵⁾ の構造に変化をきたし、ヘム鉄を触媒としてミクロゾームに含まれる高級不飽和脂肪酸の過酸化反応が促進されるものと思われる。そして形成された脂質過酸化物が可溶性画分に流出していることも考えられるが、可溶性画分の高級不飽和脂肪酸および SH の減少、あるいは上述の脂質過酸化物量の増加などがミトコンドリアやミクロゾーム中で形成された結果によるものかは明らかでない。

ミクロゾーム、可溶性画分はミトコンドリアとともに細胞における脂質代謝の重要な場所であり、脂質過酸化物が形成されるとき、それぞれの画分における代謝機能の変化などについては目下検討中である。

正常なラット肝ミクロゾームおよび可溶性画分の総 SH 含量は前者で約 500 μmole 、後者で約 380 μmole であった。このラットに VC, Fe^{2+} を投与すると 6 時間後では肝の両画分の総 SH 含量は有意に減少した ($p < 0.01$)。

また VC, Fe^{2+} を 1 週間連日投与するとミクロゾームの総 SH 含量は対照に比し約 50%、可溶性画分ではその含量は 25.6% 減少した。

脂質過酸化物の形成機序については十分解明されていないが、アスコルビン酸¹⁰⁾、鉄¹¹⁾、heme 蛋白¹²⁾ および NADPH¹³⁾ などによってその生成が促進されることが知られている。

ミクロゾームは細胞におけるトリグリセライドおよびリン脂質の生合成ならびに脂肪酸の不飽和化反応の主な画分である。また可溶性画分は主として飽和脂肪酸の合成がその役割とされている。それゆえ *in vivo*, *in vitro* での脂質過酸化物の形成は両画分における脂質代謝に何らかの変化をきたすことが予想される。

著者は正常ラットに VC, Fe^{2+} を投与しその肝ミクロゾームおよび可溶性画分の脂質過酸化物などについて対照と比較検討した。

10) A. Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 355 (1959).

11) R.C. Mcknight, F.E. Hunter, W. Oehlert, *J. Biol. Chem.*, **240**, 3439 (1965).

12) A.L. Tappel, *J. Biol. Chem.*, **217**, 721 (1955).

13) P. Hochstein, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 388 (1963).

14) H.G. Utley, P. Hochstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, **118**, 29 (1967).

15) E.G. Hrycaay, P.J. O'Brien, *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 14 (1971).